

28
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

SECRECION DE ACIDO MALICO POR ALEURONAS
AISLADAS DE TRIGO

Triticum aestivum L. var. Tonichi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JOSE MENDOZA SOTELO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	Pag
Indice	
Indice de tablas	
Indice de figuras	
Resumen	1
CAPITULO 1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	2
1.1 Generalidades	4
1.1.1 Estructura de la semilla de trigo	4
1.1.1.1 Composición química	6
1.1.2 Estructura de la célula de aleurona	12
1.1.2.1 Composición química	12
1.1.3 Definición de germinación	14
1.1.3.1 Movilización de reservas ali-	
menticias y control hormonal	
durante la germinación de la	
semilla de trigo	18
1.1.4 Papel del malato en el metabolismo de	
plantas	17
1.1.4.1 Papel central del malato en	
la fisiología celular de	
plantas	18
1.2 Fundamentación del tema y planteamiento del	
problema	20
CAPITULO 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21

CAPITULO 3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Material	23
3.1.1 Equipo	24
3.1.2 Reactivos	24
3.1.2.1 Preparación de reactivos y soluciones	25
3.2 Material biológico	27
3.2.1 Inhibición de las medias semillas	28
3.2.2 Aislamiento de capas de aleurona	28
3.2.3 Incubación de capas de aleurona (procedimiento general) y Determi- nación de la acidificación	29
3.3 Métodos	32
3.3.1 Desproteínización de las muestras	32
3.3.1.1 Medio de inducción	32
3.3.1.2 Tejido (homogenado)	32
3.3.2 Determinación de L-malato por punto final (reacción completa)	33
3.3.2.1 Fundamento	33
3.3.2.2 Técnica	37
3.3.2.3 Cálculos	38

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1 Cinéticas de acidificación y secreción de malato; la relación existente entre ambas.	42
4.2 Efecto de iones K^+ y Ca^{2+} sobre la acidifi- cación y secreción de malato.	46

4.3 Efecto de iones H^+ y Na^+ sobre la acidificación y secreción de malato.	49
4.4 Efecto de manitol sobre la acidificación y secreción de malato.	56
4.5 Efecto de iodacetamida sobre la acidificación y secreción de malato.	59
4.6 Efecto de oligomicina sobre la acidificación y secreción de malato.	62
CAPITULO 5. DISCUSION	65
CAPITULO 6. CONCLUSIONES PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	81
CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA	83

INDICE DE TABLAS

	pag
1.1 Composición de aminoácidos de las proteínas de la capa de aleurona comparada con las del endospermo en el grano de trigo (<u>Triticum aestivum</u> var. Timgalen).	11
5.1 Efecto del pH en la solubilización de diferentes componentes del endospermo almidonoso de trigo.	75
5.2 Inhibición de la acidificación del medio por capas de aleurona.	77
5.3 Inhibición del consumo de Oxígeno por capas de aleurona aisladas de trigo.	78
5.4 Cuantificación de ácidos dicarboxílicos en el medio, después de 24 hrs. de incubación.	80

INDICE DE FIGURAS

	pag
1.1 Corte longitudinal del grano de trigo.	6
1.2 Cariópsis (c) del grano de trigo y su pericarpio.	8
1.3 Célula de aleurona despues de 36 hrs de germinación.	13
1.4 Corte diagonal del grano de cebada.	16
3.1 Imbibición de las medias semillas y aislamiento de las capas de aleurona.	30
3.2 Incubación de la aleuronas (procedimiento general).	31
3.3 Coeficiente de extinción (α) como una función de la longitud de onda λ para NAD y NADH.	34
3.4 Curva estandar de concentración de malato contra Abs.	?
4.1 Cinética de secreción de malato por capas de aleurona aisladas de trigo.	38
4.2 Cinética de acidificación por capas de aleurona aisladas de trigo.	40
4.3 Efecto de iones Ca^{2+} y K^+ sobre la secreción de malato.	42
4.4 Efecto de iones Ca^{2+} y K^+ sobre la acidificación.	43
4.5 Efecto de iones K^+ y Na^+ sobre la secreción de malato.	45
4.6 Efecto de iones K^+ y Na^+ sobre la acidificación.	46
4.7 Efecto de K^+ y Na^+ sobre la secreción de malato.	48
4.8 Efecto de K^+ y Na^+ sobre la acidificación.	49
4.9 Efecto de manitol sobre la secreción de malato.	51
4.10 Efecto de manitol sobre la acidificación.	52
4.11 Efecto de Iodoacetamida sobre la secreción de malato.	54

4.12 Efecto de Iodoacetamida sobre la acidificación.	55
4.13 Efecto de Oligomicina sobre la secreción de malato.	57
4.14 Efecto de Oligomicina sobre la acidificación.	58

RESUMEN

Durante la germinación de las semillas de cebada el endospermo almidonoso tiene un pH alrededor de 5, mientras que el tejido vivo que lo rodea (capa de aleurona) permanece en valores cercanos a la neutralidad. Esta diferencia se ha atribuido a la capacidad de la aleurona aislada de acidificar el medio y este evento se ha correlacionado con la secreción de ácido málico.

Las aleuronas aisladas de trigo también son capaces de acidificar su entorno de forma similar a la cebada.

En este trabajo se estudia el mecanismo de la acidificación correlacionado a la secreción de ácido málico y el papel fisiológico que pueda tener.

Los resultados obtenidos sugieren que la acidificación es un proceso fisiológico que favorece la hidrólisis de reservas.

La acidificación del medio de inducción por capas de aleurona es dependiente de energía metabólica, que probablemente proceda de la oxidación de glucosa. Los intentos por demostrar la presencia de una H^+ -ATPasa en la aleurona aislada mediante el uso de inhibidores conocidos no dieron el resultado esperado.

En base a la tendencia similar que presenta la acidificación y secreción de malato, concluimos que el mecanismo utilizado por la aleurona aislada de trigo para acidificar su entorno puede ser la secreción de ácido málico, y su ulterior disociación fuera de la célula de la capa de aleurona.

CAPITULO 1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Cuando una semilla viable es humedecida, el agua es captada; entonces diversas actividades metabolicas comienzan y despues de un cierto periodo de tiempo el embrión emerge de la semilla. La semilla ha germinado.

Varios requerimientos obviamente deben ser satisfechos antes de que estos eventos puedan ocurrir; pero una vez que se han dado y la semilla ha logrado romper los obstáculos que la mantenian en un estado de latencia, y la germinación ocurre; el crecimiento de la plántula continua, soportado por la movilización de reservas alimenticias, hasta que aquella pueda adquirir la capacidad de mantenerse como un organismo autotrófico.

Sin duda alguna, uno de los acontecimientos de mayor importancia durante la germinación de las semillas es la provisión de nutrientes para el crecimiento del embrión. En las gramíneas el almidón es el principal nutrimento de almacén. La acidificación del endospermo almidonoso durante la germinación es también de gran importancia, pues favorece la actividad de las hidrolasas en el endospermo y activa el sistema de transporte de nutrimentos en el escutelo (Hamabata, 1988).

En cereales, específicamente en cebada, se ha encontrado que durante la germinación, el endospermo almidonoso tiene un pH alrededor de 5, mientras que el tejido vivo que lo rodea (capa de aleurona), se supone, permanece en valores cercanos a la neutralidad. Esta diferencia de pH fue atribuida a la capacidad de la aleurona de acidificar su entorno y la acidificación fue

correlacionada con la secreción de ácido málico (Mikols, 1981).

En el laboratorio se ha encontrado que las aleuronas de trigo acidifican el medio de inducción y que este fenómeno es independiente de la adición de hormonas (ácido giberélico (GA_3) y ácido abscisico) (Hamabata, 1986). También se ha observado que tal fenómeno es dependiente de la glucólisis y la producción de energía metabólica, así como de la aereación del tejido.

La solubilización de proteínas, iones Ca^{2+} y almidón del endospermo se ve incrementada cuando el pH disminuye de 6 a 4, produciendo sustrato soluble para la actividad enzimática. La acidificación del endospermo almidonoso durante la germinación de la semilla es una función fisiológica de la capa de aleurona, la cual, por esta vía proporciona sustratos solubles y favorece la actividad de las hidrolasas en el endospermo almidonoso y activa el sistema de transporte en el escutelo (Hamabata, 1986).

De estas evidencias surge la necesidad de estudiar si el fenómeno de la acidificación se debe a la secreción de ácido málico como tal o a la secreción de malato y protón por separado; siendo este el principal interés que conforma el presente trabajo, y utilizando como modelo experimental la capa de aleurona aislada de medias semillas de trigo; pues éste tejido a pesar de ser separado de los demás componentes de la semilla, las células de aleurona siguen conservando su capacidad para acidificar el medio de inducción. Es por esto que el modelo experimental in vitro puede ser comparable con lo que probablemente sucede en semilla completa.

1.1. Generalidades

1.1.1. Estructura de la semilla de trigo

El trigo pertenece a la familia de las gramíneas y tiene una gran importancia en todo el mundo por sus propiedades alimenticias y sobre todo nutritivas.

Existen alrededor de siete especies principales de trigo (Triticum). Todos son plantas anuales o anual invernales. Del trigo común se cultivan muchas variedades, incluyendo razas anuales verdaderas (trigo de primavera) y trigos invernales (trigos de invierno u otoño), trigos duros con granos pequeños ricos en proteínas, trigos blandos de granos grandes, ricos en almidón y formas de granos blandos o de granos rojos. El trigo duro (Triticum durum) de granos muy duros, rojos y rico en gluten (una sustancia proteica pegajosa), es usado ampliamente para hacer macarrones y productos similares. Los otros trigos no son ya de importancia directa Triticum monnoides (trigo escanda menor), T. dicoccum (trigo escanda mayor) y T. spelta (trigo espelta) difieren de los otros trigos en que el eje de la espiga es nudoso y quebradizo, y el grano no se separa rápidamente de las brácteas que lo encierran.

La semilla de trigo se desarrolla a partir de un óvulo y, en la madurez, consta de las siguientes partes: el esporófito joven y parcialmente desarrollado llamado embrión; una cantidad variable

--a veces ninguna-- de endospermo (de las palabras griegas que significan dentro y semilla), y las capas protectoras, la cubierta de la semilla o testa (del latín, ladrillo, teja), como se muestra en la figura 1.1.

Embrión de las gramíneas. El embrión de las gramíneas, principalmente el de los cereales cultivados, ha recibido mucha atención. Como se ve en el de trigo (figura (1)), tiene la estructura siguiente: un eje provisto de escutelo (en latín, bandeja) a un lado, una radícula con una caliptra cubierta por la coleorriza (del griego, vaina y raíz) en el polo radical, y una plúmula cubierta por el coleóptilo (en griego, vaina) y el polo del brote. En los embriones jóvenes la coleorriza se continúa con el suspensor. Por encima, la coleorriza lleva una proyección, el epiblasto (del griego, encima y brote), insertado opuestamente al escutelo.

El escutelo es una estructura escutiforme. Su ensanchada superficie abaxial lleva una epidermis epitelial secretora, que está en contacto con el endospermo. El coleóptilo, en forma de cono, tiene un poro en el apice, por el cual emerge la primera hoja.

La coleorriza se identifica como una parte del suspensor o del hipocótilo, o es considerada como la raíz primaria suprimida, y la radícula como una raíz adventicia (Guignard, 1951; Negbi, 1962; Pankov, 1957).

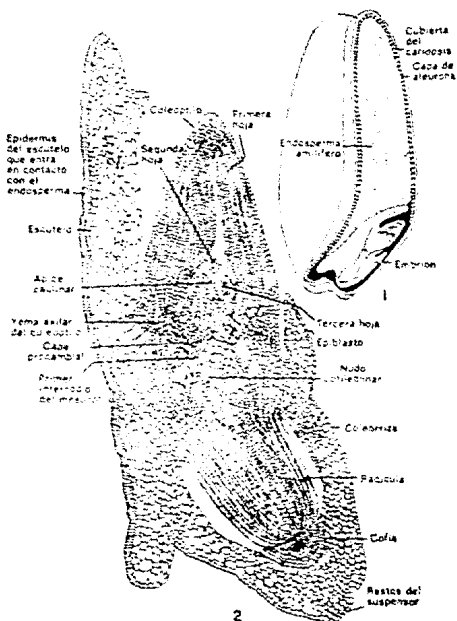


Figura 1.1 (1). Grano de trigo cortado longitudinalmente a nivel del surco. (2). Sección longitudinal del embrión de Triticum. (Num. 1 Esau, 1953, num. 2 Hayward, 1938.)

El endospermo se desarrolla normalmente despues de la fecundación a partir del producto de la triple fusión, es decir, de la fusión de los dos nucleos polares con un gameto masculino (Brink, 1947). El endospermo está formado por dos tipos de tejido: el endospermo almidonoso y una capa de células llamadas de aleurona. El primero está constituido por células muertas llenas de gránulos de almidón, mientras que las células de aleurona son vivas pero que no tienen la capacidad de dividirse. Esta característica permite que este tejido sea homogéneo en cuanto a su ciclo celular. Tanto el embrión como el endospermo se encuentran rodeados por dos cubiertas protectoras: La testa o cubierta de la semilla y el pericarpio o cubierta del fruto (figura 1.2)

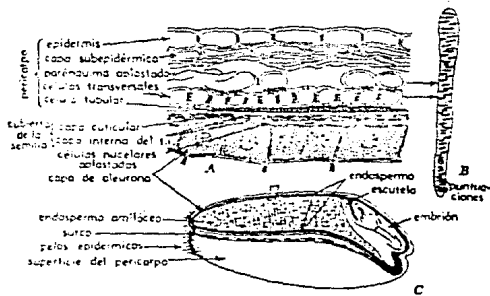


Figura 1.2 Cariópsis (C) de *Triticum* (trigo) y su pericarpio (A y B). La cariópsis ha sido cortada longitudinalmente paralela al surco. El pequeño rectángulo en C indica la situación de la sección representada en A. Las células transversales están alargadas perpendicularmente al eje longitudinal del grano. B, célula transversal vista en una sección transversal del grano. La célula tubular forma parte de la epidermis interna del pericarpio. (A y B, x300, C, x70) (Esau, 1985)

1.1.1.1. Composición química

El trigo pertenece al grupo de semillas cuyos principales materiales de reserva alimenticia son los carbohidratos.

El principal carbohidrato almacenado es el almidón en forma de grancs de almidón. El almidón se combina en diversas porciones con proteínas, aceites y grasas. Los grancs de almidón se originan en plastidios (uno o muchos) (Buttrose, 1960). Los cereales tienen frecuentemente grancs de almidón pequeños y grandes. Aproximadamente el 75% del peso seco del granc está formado por almidón mientras que el 12% es proteína, y otro 2% son grasas.

Las proteínas que se hallan en la semilla se encuentran en dos formas principales. 1) los glutenes, de estructura amorfa, y 2) los grancs de aleurona.

Los glutenes son comunes en las células que contienen almidón de los grancs de los cereales. Los grancs de aleurona se encuentran en la capa periférica del endospermo (capa de aleurona) de las poligonáceas y de las gramíneas.

Las proteínas endospermicas son principalmente de reserva; entre ellas se incluyen la glutelina y la gliadina (una prolamina), que forman en conjunto alrededor del 8% del peso de la semilla. También se encuentran cantidades mucho menores de albumina y globulina, que representan indudablemente las proteínas funcionales o enzimáticas del endospermo y del embrión. Estas proteínas son ricas en glutámico, prolina y amidas (glutamato y asparagina) y tienen un contenido relativamente bajo de

triptofano, metionina, lisina y glicina por lo que son catalogadas como proteínas de baja calidad nutricional en la dieta alimenticia (tabla 1.1).

Además de los compuestos principales ya mencionados, la semilla de trigo contiene un almacén de elementos minerales, la fitina que se encuentra en los granos de aleurona formando sales insolubles con los cationes, K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} .

TABLA 1.1 Composición de aminoácidos de las proteínas de la capa de aleurona comparada con las del balance de el endospermo del grano de trigo (*Triticum aestivum* cv. Mingalen). Los valores representan el porcentaje del estimado total (Murray, 1984).

Aminoácido	Fuente de Proteína	
	Aleurona	Endospermo
Aspartato ^a	9.3	5.7
Glutamato ^a	18.3	33.5
Treonina	3.8	3.1
Serina	5.0	6.1
Glicina	7.0	4.6
Alanina	8.5	3.9
Valina	5.5	4.1
Cisteína	n.d.	n.d.
Metionina	0.4	0.4
Isoleucina	3.2	3.5
Leucina	6.7	7.0
Tirosina	2.5	3.1
Fenilalanina	4.2	4.4
Triptófano	n.d.	n.d.
Histidina	4.3	2.3
Arginina	12.3	4.0
Lisina	5.9	3.1
Prolina	4.6	11.5

^a Los valores de aspartato y glutamato incluyen sus respectivas amidas

n.d. - no detectado

1.1.2. Estructura de la célula de aleurona

En la figura 1.3 se observan los principales componentes estructurales de la célula de aleurona; encontrándose particularmente una gran cantidad de cuerpos lipídicos, y una clara asociación de polisomas a los poros nucleares, distribuidos a lo largo de la periferia del núcleo.

1.1.2.1. Composición química

La célula de aleurona se constituye de los siguientes componentes: Lípidos. Aceites y grasas (lípidos de almacenamiento), más otros compuestos de características lipídicas, como ceras, suberina y cutina; que se forman en el citoplasma, en los plastidios y en los esferosomas o cuerpos lipídicos. Los aceites y grasas son material de reserva común en semillas, embriones y células meristemáticas. Almidón. Se desarrolla dentro de los plastidios. El almidón de reserva se forma en los leucoplastos (Fahn, 1978).

Proteína. La proteína es material de reserva y adquiere estructura cristalina o amorfa. La proteína amorfa se encuentra junto al almidón en el endospermo de los granos de trigo.

Tanto proteína cristalina como amorfa se encuentran juntas en los granos de aleurona. Los granos de aleurona, están compuestos de sustancia proteica con un cuerpo cristalofide (cristal de proteína) y un cuerpo globulide (fosfato doble de calcio y magnesio con un radical orgánico) (Fahn, 1978).

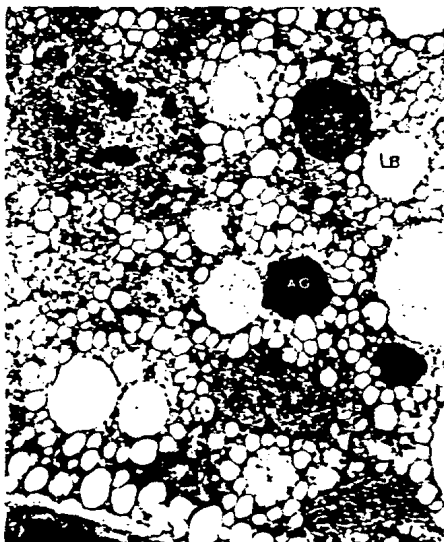


Figura 1.3 Célula de aleurona después de 36 hrs. de germinación. Cuerpos lipídicos (LB) y granos de aleurona (AG), mitocondria (MD), plastidios (CP) y macrocuerpos (MB). Se puede ver la estrecha asociación de los polisomas (Ps) a los poros nucleares a lo largo de la periferia del núcleo (N). x 23.100. (Vigil, 1973).

Los polisomas compuestos por la asociación de cadenas ribosomales a los poros nucleares están presentes en su mayoría en el área periférica del núcleo (Vigil, 1973).

1.1.3. Definición de germinación

Cuando una semilla viable es humedecida, el agua es captada, la respiración, la síntesis de proteínas y otras actividades metabólicas comienzan y después de un cierto período de tiempo el embrión emerge de la semilla, generalmente primero la radícula: la semilla ha germinado. Varios requerimientos obviamente deben ser satisfechos antes de que estos eventos puedan ocurrir; en muchos casos sería suficiente el oxígeno para permitir en algunos respiración aeróbica, y una temperatura conveniente para permitir a varios procesos que se lleven a cabo totalmente a una velocidad adecuada. Muchas especies de semillas sin embargo no germinan igual cuando estos requerimientos son satisfechos. Esto es porque existe dentro de la semilla obstáculo (u obstáculos) en alguna parte a lo largo de la secuencia de cambios, los cuales normalmente culminan en la proyección de la radícula a través de las estructuras circundantes. Estos impedimentos son vencidos uno u otro por la provisión antes de la germinación visible de algunos estímulos ambientales tales como luz o temperatura baja, o por cambios suaves que ocurren lentamente en la semilla con el paso del tiempo. Esta condición de no germinación igual bajo condiciones favorables es llamada latencia. Pero una vez que la germinación ha ocurrido, el crecimiento de la plántula joven

continúa, soportado por la movilización de reservas alimenticias, eventualmente la plumula es transportada hacia arriba y en su naturaleza es levantada hacia afuera de la tierra a la luz donde su vida autotrófica puede comenzar.

Por lo tanto, la germinación consiste de estos procesos los cuales comienzan con la incorporación de agua y la cual sucesivamente termina con la emergencia de la radícula o hipocotilo a través de las cubiertas de la semilla (Bewley, 1978).

1.1.3.1. Movilización de reservas alimenticias y control hormonal durante la germinación de la semilla de trigo.

Uno de los eventos de mayor importancia durante la germinación de las semillas es la provisión de nutrientes para el crecimiento del embrión. En las gramíneas el almidón es el principal nutrimento de almacén. La movilización de las reservas del endospermo es controlada por un fitorregulador llamado giberelina (GA) el cual se sintetiza en el embrión (fig. 1.4). La giberelina difunde del embrión al endospermo y por consiguiente a la capa de aleurona que cubre al endospermo. La aleurona está compuesta de células homogéneas, ricas en proteína no embebida. En respuesta a la GA estas células sintetizan diferentes hidrolasas, incluyendo α -amilasa y proteasas. Estas enzimas son secretadas al endospermo donde hidrolizan el almidón y las proteínas de reserva a azúcares simples y aminoácidos. Los azúcares y aminoácidos son absorbidos por el escutelo y transportados al embrión para sostener el crecimiento heterotrófico de toda la planta (Be, 1979).

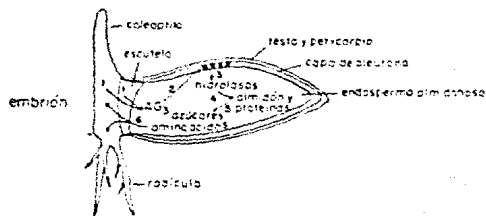


Figura 1.4 Corte diagonal de grano de cebada siguiendo la relación entre producción de GA, la síntesis y secreción de hidrolasas, y la movilización de nutrientes del endospermo (Ho, 1979).

1.1.4. Papel del malato en el metabolismo de plantas

El malato juega un papel importante en la fisiología celular de las plantas.

Es grandemente conocido y muy comúnmente encontrado este ácido orgánico en los tejidos de plantas, su nombre se origina de malum (= manzana) y fue descubierto hace 205 años por Scheele en 1785, es más comúnmente conocido como un intermediario importante, componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Pero el malato está también implicado en una extensa variedad de procesos fisiológicos que ocurren en tejidos de plantas, más que en tejidos animales.

Aparte de su papel en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el malato está involucrado también en el ciclo del glioxalato, en fotosíntesis de plantas C_4 y plantas CAM, en movimientos estomáticos, en el control del pH del citosol, en el mantenimiento del balance eléctrico celular, etc. El malato está sujeto a transformaciones en todos los compartimentos debido a la distribución ubicua de enzimas que favorecen su formación o remoción y/o a la presencia de acarreadores específicos de membranas que facilitan su movimiento entre los compartimentos celulares. A diferencia de la célula animal, la célula de la planta tiene una vacuola grande que está disponible para almacenar cantidades considerables de malato y la mitocondria de la planta posee rutas específicas para la oxidación de malato.

Hay por lo tanto muchos procesos bien establecidos, importantes para la fisiología de la planta, los cuales involucran malato.

1.1.4.1. Papel central del malato en la fisiología celular de las plantas

El malato puede ser acumulado a mayores niveles que otros ácidos orgánicos en células de plantas.

Las concentraciones de malato en los tejidos de plantas usualmente concuerdan en el rango de 1 a 10mM (Ugochukwu, 1979), mientras las del fosfoenolpiruvato (PEP) están en el rango de 10 a 100µM (Latzko, 1983). Bajo circunstancias especiales la concentración de malato puede exceder estos límites: por ejemplo en plantas CAM, siguiendo la fijación de CO_2 durante la noche, la concentración de malato en la vacuola puede aproximarse a 100mM (Osmond, 1981). En esas circunstancias el malato se origina de la carboxilación de fosfoenolpiruvato por fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la subsecuente reducción de oxalacetato (OAA) por malato deshidrogenasa (MDH). El equilibrio termodinámico de estas reacciones está tan abrumadoramente en favor de la formación de malato que el destino del fosfoenolpiruvato se convierte en una asociación íntima con el malato.

La concentración de malato puede permanecer por largo tiempo o cambiar como resultado de cambios en las condiciones ambientales. Condiciones de Stress de alguna naturaleza (frío, calor, drogas, sales, radiaciones, químicos, herbicidas, pesticidas, etc.), tienen generalmente una fuerte influencia sobre el balance de las enzimas que actúan sobre el malato y modifican su distribución celular (Levitt, 1980). Por ejemplo, condiciones de anoxia debidas a la inundación, dramáticamente incrementan la concentración de

malato (Hook, 1976). Algunas otras condiciones de Stress tales como tejidos envolventes (Rhodes, 1966; Brinkman, 1962), contaminación con SO_2 (Pierre, 1984), o ataque por parásitos (Millard, 1982) también incrementan la producción de malato. El malato es también sintetizado como una respuesta a un exceso de sales en el medio ambiente (Jacoby, 1971; Ting, 1961; Ismond, 1983).

Latzko y Kelly (1983) enlistan once funciones fisiológicas dependientes de la actividad del acoplamiento PEP-C-MDH, relacionados a la concentración de malato. Por ejemplo; el malato puede abastecer al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, puede generar NADPH através de una enzima malica (ME) específica NADPH-dependiente, actuar como un almacén para retener el CO_2 respirado, es una fuente de CO_2 para la fotosíntesis, es un producto en fermentación ("fermentación de malato"), actúa como un donador de electrones en la respiración no fosforilante y resistente a cianuro bajo condiciones de energía desbordante, actúa como acarreador de equivalentes reducidos para la asimilación de nitrógeno, contribuye al mantenimiento del pH citoplásmico y balance de carga, etc. (Davies, 1979; O' leary, 1962; Latzko, 1983).

1.2. Fundamentación del tema y planteamiento del problema

Se ha mencionado ya que la capa de aleurona que rodea al endospermo de la semilla de trigo, es un conjunto de células homogéneas ricas en proteína no esbebida, que conserva su capacidad de acidificar el medio, y que además es el único tejido que se mantiene vivo y permanece sin reproducirse, al ser aislado de los demás constituyentes de la semilla. Por lo consiguiente; estas características son las que hacen de este tejido, un modelo experimental ideal para el estudio del fenómeno de la acidificación.

Por otro lado la dependencia de este fenómeno, de la glucólisis, la producción de energía y la aereación del tejido durante la incubación; sugieren que en el proceso de acidificación puede estar involucrada una H^+ -ATPasa, ya que uno de los sistemas membranales de transporte, que actualmente se conocen, capaces de acidificar un compartimento utilizando directamente energía metabólica, son las bombas de protones (H^+ -ATPasas). Por lo tanto esto nos lleva a proponer un mecanismo mediante el cual se explique si la secreción de ácido málico por aleurona de trigo (Triticum aestivum L. var. Tonichi), es el proceso utilizado por el tejido para acidificar el medio durante la germinación, o si la acidificación está dada por la secreción de malato y protón por separado sin conservar alguna relación estequiométrica; lo que nos sugeriría un fenómeno de cotransporte malato-protón.

CAPITULO 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En base a estas evidencias presentadas se establece entonces la siguiente hipótesis:

La secreción de malato es un fenómeno de transporte a través de membrana, secundario a un transporte primario de protones por la actividad de una H^+ -ATPasa. Planteándose también como hipótesis alternativa:

La secreción de ácido málico es un fenómeno de cotransporte a través de membrana.

En consecuencia a lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

1. Analizar la relación que existe entre la acidificación causada por la aleurona y la secreción de malato a partir de este tejido.

a). Comparar la cinética de acidificación contra la cinética de secreción de malato y su acumulación en el tejido.

b). Establecer la estequiometría entre los H^+ causantes de la acidificación y la cantidad de malato secretada.

2. Observar el efecto de la adición de iones sobre la acidificación y la secreción de malato.

a). Efecto de K^+ y Ca^{2+} a diferentes concentraciones.

3. Efecto de inhibidores metabólicos sobre la acidificación y la secreción de malato:

a). Efecto de inhibidores de la fosforilación oxidativa

1). Oligomicina

b). Inhibidores de la glucólisis

1). Iodoacetamida

CAPITULO 3. Material y metodos

3.1. Material

Vasos deprecipitados de 10,50,100,250,y 500 ml.; marca (PYREX)

Pipetas graduadas y volumétricas de 10 ml. (PYREX)

Cajas Petri (PYREX)

Matraces Kitazato de 25 ml. (KIMAX)

Matraces volumétricos de 100 ml. (PYREX)

Tubos Eppendorf de 1.5 ml.

Micropipetas de 5,10,20,100,200 y 1000 μ l., marca (Gilson)

Tubos de ensayo de 12x73 mm 13x100 mm y 18x130 mm (PYREX)

Filtros Millipore (HA 0.5 μ m.)

Microespátulas

Bisturi de disección

Pinzas de disección

Pipetas Pasteur

Mortero con pistilo de porcelana

La esterilización del material de vidrio y los filtros millipore se llevo a cabo en el autoclave a (1.5 Kg/cm² a 120°C) durante 20 minutos

3.1.1. Equipo

Potenciómetro (Beckman) digital. Modelo 9500

Espectrofotómetro (Beckman). Modelo 35

HPLC (Variant)

Balanza analítica (Mettler H51AR)

Incubador de agitación a temperatura constante (Precision)

Microcentrifuga para tubos Eppendorf (Brinkmann)

Baño de incubación con control de temperatura (J. M. Ortiz)

Agitador de tubos (Vortex)

Computadora y graficador (Printaform) y (Brother Printaform) M1509

Ultracongelador (Fevcon Freezer)

Parrilla de calentamiento y agitación (Thermolyne)

3.1.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados para la realización del presente trabajo, fueron de grado analítico de las siguientes marcas:

MALLINCKRODT : Cloruro de magnesio hexahidratado, y cloruro de potasio.

MERCK : Acido etilendiaminotetraacético dihidratado, fosfato de sodio dodecahidratado, y ácido succínico.

PIERCE : Hidrazina anhidra.

SISMA : Glicina, ácido L-málico, oligomicina, iodoacetamida, sulfato de estreptomycin, cloranfenicol, y β -nicotinamida adenin dinucleotido.

3.1.2.1. Preparación de reactivos y soluciones

La enzima malato deshidrogenasa (MDH), utilizada para la cuantificación enzimática de L-malato fue donada por el M.C. Rogelio Rodríguez, de la División de estudios de posgrado del departamento de bioquímica de la facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. (Preparación: Ochoa S. 1955 Malic dehidrogenase from pig heart In : Colowick y Kaplan (Ed.). Methods in Enzymology, 1:735-739).

Para la utilización de esta enzima, se efectuó una dilución 1:5000, la cual se trabajó en todos los ensayos para cuantificar el malato presente en nuestras muestras.

Para las diferentes diluciones de la enzima, se preparó una solución de fosfato de sodio dodecahidratado, adicionando 1.07 gr. a 80 ml de agua tridestilada; se ajustó el pH a 7, y posteriormente se llevo a 100 ml.

La solución buffer de hidrazina-glicina que se utilizó para el mismo análisis fue preparada disolviendo; 3.75 gr. de glicina, 1.27 ml. de hidrazina anhidra, 800 mg. de cloruro de magnesio

hexahidratado, y 200 mg. de ácido etilendiamintetraacético en 60 ml. de agua tridestilada. Se ajustó el pH a 9.5 y se llevó a 100 ml. nuevamente con agua tridestilada (Hans-Jürgen Hohorst).

Ácido L-malico 100 mM: esta solución se preparó adicionando 134.1mg en 10 ml de agua bidestilada.

De esta misma solución se hicieron diluciones 1:10, para una concentración de 10mM, y a su vez de esta misma 1:10, para una solución 1mM. Utilizando esta última como patrón de comparación en los ensayos para la determinación enzimática de L-malato.

β -nicotinamida adenin dinucleótido: Se preparó adicionando 30mg por cada ml de agua.

Solución de hidróxido de potasio aproximadamente 3M. Esta solución se preparó; adicionando 8.4 gr. de hidróxido de potasio en 50 ml de agua.

Solución de ácido perclórico 6N. Para esta solución se adicionaron 30.63 ml. de ácido, tomando en cuenta su pureza y su densidad a 22.37 ml de agua, haciendo un total de 60 ml. de solución 6N de ácido.

Indicador de pH. Se utilizó indicador de pH universal. Pero también se usó como indicador de pH el azul de bromotimol, preparado con 0.1 gr. en 8 ml. de hidróxido de sodio 0.02N diluido a 250 ml con agua.

El rango de coloración utilizado para determinar el pH neutro ;

fue el cambio observado de amarillo a azul turquesa.

Se utilizó también carbón activado para eliminar la coloración conferida por el indicador de pH a las muestras en solución. Este se preparo a una concentración de 50 mg./ ml.; centrifugando para eliminar las partículas finas y menos pesadas.

Para la esterilización de las medias semillas se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 8%. Para esto se hizo una dilución 4:50 del blanqueador comercial Cloralex con 8% de cloro activo.

Las soluciones utilizadas en las incubaciones de las aleuronas fueron esterilizadas a través de filtros Millipore estériles tipo HA 0.45µm de poro.

El material de vidrio y el agua tridestilada se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1.5 Kg./cm² durante 20 minutos.

3.2. Material biológico

Semillas de trigo (Triticum aestivum L. var. Tonichi) cosechas 1981 y 1983-1984, donadas por Pronase.

Las semillas utilizadas en el presente trabajo, fueron seleccionadas, eliminando aquellas de color diferente, quebradas, de tamaño pequeño, y en general, todas las que estaban infestadas por hongos. Se utilizó esta especie, por ser una variedad de trigo principalmente blando, con la característica de que se puede aislar fácilmente la capa de aleurona sin ser afectada durante el proceso de obtención.

3.2.1. Imbibición de las medias semillas

Las semillas seleccionadas se cortaron transversalmente con un bisturí, desechando la parte que contenía el embrión. Las mitades de semilla sin embrión se esterilizaron con 50 ml. de una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 8% en un matraz kitazato de 125 ml. y conectado a vacío durante 15 minutos. Después de este tiempo las medias semillas se lavaron 5 veces con agua bidestilada estéril para eliminar residuos del hipoclorito de sodio; posteriormente se transfirieron a cajas Petri estériles de 9 cm. de diámetro, que contenían un disco de papel filtro Whatman # 40, humedecido en 10 ml. de agua bidestilada estéril.

Las cajas Petri con las medias semillas estériles se cubrieron con papel aluminio para dejarlas embeber durante las 24 hrs. siguientes a una temperatura de 25°C.

3.2.2. Aislamiento de capas de aleurona

Las capas de aleurona se obtuvieron de las medias semillas previamente incubadas por 24 hrs., utilizando una espátula plana y curva de la punta y por presión sobre la media semilla para eliminar el endospermo almidonoso. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos del endospermo almidonoso y dejarlas lo más limpias posible para iniciar la incubación (Fig. 3.10).

3.2.3. Incubación de las aleuronas (Procedimiento general) y Determinación de la acidificación

Después de 24 hrs. de enbeber las medias semillas, se elimina el almidón del grano y se obtienen las aleuronas para su posterior incubación. Una vez que se tuvieron las aleuronas aisladas se efectuaron los pasos siguientes.

- a. Se lavó la muestra (lote de 10 aleuronas) 2 veces con 3 ml. de medio de inducción que consiste en: ácido succínico 5mM, cloranfenicol y estreptomucina 50ug/ml. de cada uno; para prevenir la contaminación microbiana y a un pH de 5.8.
- b. Se colocaron 2 ml. por muestra en cada matraz; y se metieron en un baño a incubar durante las horas requeridas.
- c. Para medir el pH, después de terminada la inducción se separó el medio de inducción del tejido, y se determinó el pH a cada una de las muestras, con un potenciómetro (Beckman) digital (fig. 3.2).

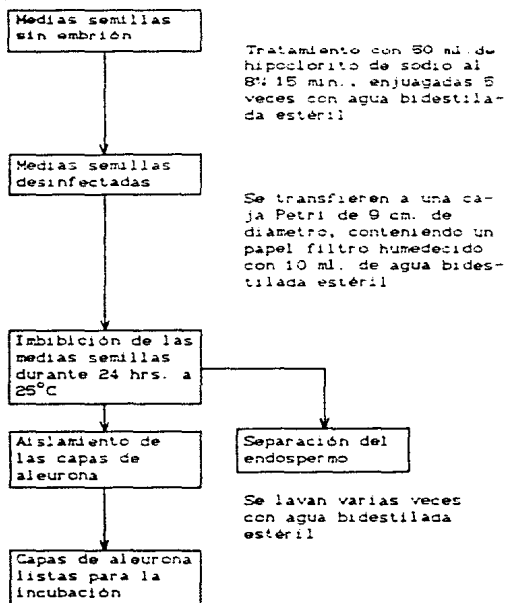


Figura 3.1 Imbibición de las medias semillas y aislamiento de las capas de aleurona.

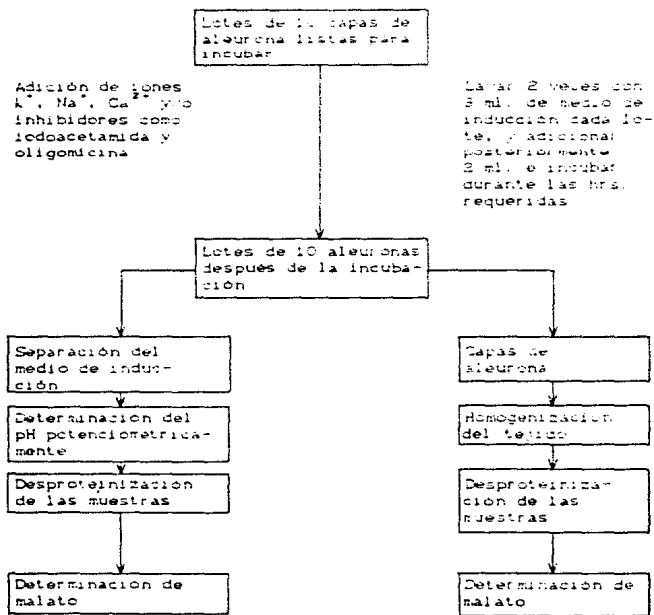


Figura 3.2 Incubación de las aleuronas (procedimiento general)

3.3. Métodos

3.3.1. Desproteínización de las muestras

3.3.1.1. Medio de inducción

- a. Tomar una alícuota de cada muestra de 0.5 ml. y precipitar las proteínas con ácido perclórico 6N (50 μ l.) dejando en hielo durante 15 minutos.
- b. Centrifugar a 12.000 rpm en la microcentrifuga durante 5 minutos a 4°C.
- c. Separar el sobrenadante (450 μ l.) y adicionar 10 μ l. de indicador de pH diluido 1:10 y neutralizar con hidróxido de potasio 3M.
- d. Clarificar con carbón activado (50 μ l.) durante 10 minutos en hielo y con agitación, centrifugar en la microcentrifuga por 10 minutos a 4°C.
- e. Determinar malato a 28°C por el método de punto final (reacción completa).

3.3.1.2. Tejido (homogenado)

- a. después de haber separado las aleuronas del sobrenadante (paso 3 del procedimiento de incubación; ver figura 3.2), se muelen con 0.75 ml. de ácido perclórico 0.6N y se enjuaga el mortero con otros 0.75 ml. del ácido, obteniéndose así una completa homogenización del tejido. Posteriormente se centrifuga a 4°C durante 5 minutos y se sigue el procedimiento como la desproteínización del medio de inducción a partir del inciso g en adelante (Bergmeyer, 1953).

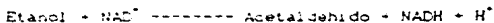
3.3.2. Determinación de L-malato por el método de punto final (reacción completa).

3.3.2.1 Fundamento

Si una sustancia toma parte en una reacción enzimática, esta reacción puede ser usada para la determinación cuantitativa de la sustancia por análisis fisicoquímico, o análisis enzimático del producto o de los sustratos después de que la reacción catalizada por la enzima se ha completado.

Si la conversión del sustrato es prácticamente completa, el análisis enzimático es simple, y el resultado puede ser fácilmente calculado con la ayuda del conocimiento de la constante física del sustrato (por ejemplo, El coeficiente de extinción en el caso de las sustancias que absorben la luz).

La piridin coenzima absorbe la luz a 260 nm, y el estado reducido tiene una absorción adicional con un máximo a 340 nm. (Ver figura 3.3). Para la observación de la extinción a 340 nm, la conversión enzimática del sustrato S_1 o S_2 puede seguirse directamente en la cuveta fotométrica sin intervención en el proceso químico. No obstante si el NAD acepta electrones del sustrato como en el ejemplo siguiente de la oxidación del etanol, o si el NADH dona electrones como en la reducción de piruvato a lactato, las consideraciones aplicadas son las mismas. La cantidad medida es la diferencia en extinción ΔE .



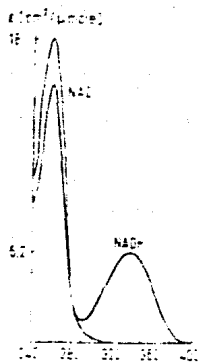


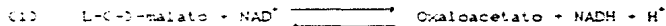
Figura 3.3 Coeficiente de extinción ϵ como una función de la longitud de onda λ para NAD y NADH. NADP y NADPH tienen las mismas curvas (Bergmeyer, 1974).

El método de análisis por punto final, involucra la medida de la concentración del producto o coproducto cuando una reacción está muy cerca a completarse y puede solamente ser usado para análisis de sustratos.

El método utilizado en este trabajo para la determinación de L-malato se basa fundamentalmente en lo anteriormente revisado.

Determinación de L(-)-malato con malico
deshidrogenasa y NAD⁺

La malico deshidrogenasa (MDH) cataliza la oxidación de L(-)-malato por β -Nicotinamida Adenin Dinucleotido (NAD).

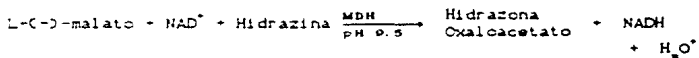


El equilibrio de la reacción, la cual tiende a la izquierda, tiene una Kc de 5.0×10^{-13} moles / Lt. a 25°C.

Los protones son enlazados por el uso de un medio de reacción alcalino donde el oxaloacetato es atrapado como la hidrazona.

Por consiguiente la ecuación básica para el ensayo espectrofotométrico de L(-)-malato es:

(2)

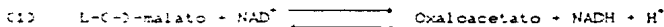


El método de análisis por punto final, involucra la medida de la concentración del producto o coproducto cuando una reacción está muy cerca a completarse y puede solamente ser usado para análisis de sustratos.

El método utilizado en este trabajo para la determinación de L-malato se basa fundamentalmente en lo anteriormente revisado.

Determinación de L-(+)-malato con malico
deshidrogenasa y NAD^+

La malico deshidrogenasa (MDH) cataliza la oxidación de L-(+)-malato por β -Nicotinamida Adenin Dinucleótido (NAD).

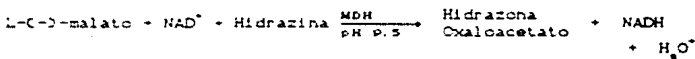


El equilibrio de la reacción, la cual tiende a la izquierda, tiene una K_c de 5.0×10^{-3} moles / Lt. a $25^\circ C$.

Los protones son enlazados por el uso de un medio de reacción alcalino donde el oxaloacetato es atrapado como la hidrazona.

Por consiguiente la ecuación básica para el ensayo espectrofotométrico de L-(+)-malato es:

(2)



Son necesarias concentraciones relativamente altas de NAD^+ y MDH para obtener una cuantitatividad y rapidez suficiente de la reacción. El curso de la reacción es seguido espectrofotométricamente (el incremento en la densidad óptica leído a 340 nm da la formación de NADH).

3.3.2.2 Técnica

1. Efectuar la mezcla de reacción con las concentraciones de reactivos siguientes:

258.5 μ l de Buffer de Hidrazina-Glicina pH 9.5 (0.214 mmoles)

40 μ l de NAD (0.0054 mmoles)

134 μ l de Agua tridestilada

2. Colocar 442.5 μ l de la mezcla de reactivos en cada uno de dos tubos de ensayo y adicionar 50 μ l de agua tridestilada; transvasar a las celdas y ajustar a cero de Abs. el aparato, a una longitud de onda de 340 nm.

3. Colocar 442.5 μ l de la mezcla de reactivos por tubo y 50 μ l de malato 1mM y leer a 340 nm. Esto se hace por duplicado.

4. Lo mismo que se hace en el paso 3, además que en el lugar de agregar 50 μ l de malato 1 mM, se adicionan 50 μ l de muestra problema, y se lee a 340 nm.

5. Hacer lo mismo para las demás muestras problema.

6. Después de leer la primera Abs. de todas las muestras (tiempo cero); adicionar 7.5 μ l de enzima MDH dilución 1:75 (0.174 UD, a cada tubo e incubar en Baño María a 29°C durante 30 min.. Leer posteriormente a la misma longitud de onda.

La diferencia de Abs. obtenida a los 30 min. menos la Abs. leída a tiempo cero, nos muestra la cantidad de NADH presente; por consiguiente la cantidad de malato cuantificado.

3.3.2.3 Cálculos:

Para calcular la cantidad de malato presente en nuestra muestra, se utilizó la fórmula siguiente donde se incluye el uso del coeficiente de extinción del NADH:

$$\mu\text{moles L-malato} \cdot \text{ml} = \frac{D.O. \cdot \text{Vol. Total}}{6.22 \cdot (\text{Vol. muestra})}$$

Donde:

D.O. = Diferencia de la densidad óptica $\text{NAD}_2 - \text{Abs}_1$

Vol. Total = Volumen de la dilución total de la muestra

$6.22 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}$ = Valor del coeficiente de extinción para el NADH a 340 nm y $\text{pH } 10$

Vol. muestra = Volumen de la muestra colocado en la celda

Para determinar el tiempo en el cual se completa plenamente la reacción (punto final), durante la determinación enzimática de L-(+)-malato; se incubaron varias muestras a 25°C y se leyeron a los tiempos de cero, 15, 30, 45 y 60 min., observándose que a partir de los primeros 15 min. de incubación ya no hubo cambio en la Absorbancia de nuestras muestras leídas a los 30, 45 y 60 min.. Por lo que se tomo el tiempo de 15 min., como tiempo de término de reacción y para dar un margen de mayor seguridad se amplió el tiempo a 30 min.; incubando por esto las muestras a 25°C y durante el tiempo de 30 min..

En otro experimento se efectuaron varios controles con el fin de observar si había algún cambio significativo en la Absorbancia, y comprobar a la vez si había un exceso de reactivos realmente para desplazar la reacción hacia la derecha, y además si alguno de estos reactivos no era limitante. Por lo tanto los controles efectuados son los siguientes:

- a). Mezcla de reactivos (sin enzima)
- b). Mezcla de reactivos (sin malato pero con enzima)
- c). Después de terminar la reacción adicionar malato en concentración conocida
- d). Lo mismo pero en el lugar de adicionar malato, adicionar NAD en concentración conocida

De los resultados obtenidos se observó que en los incisos a, b y d, no hubo cambio significativo en la Absorbancia, pero sí en el inciso c; pues al adicionar malato después de haber terminado la reacción, se detectó un 47% de incremento en la Absorbancia; lo que muestra que tenemos un 47% de exceso de NAD y reactivos para

desplazar la reacción hacia la derecha.

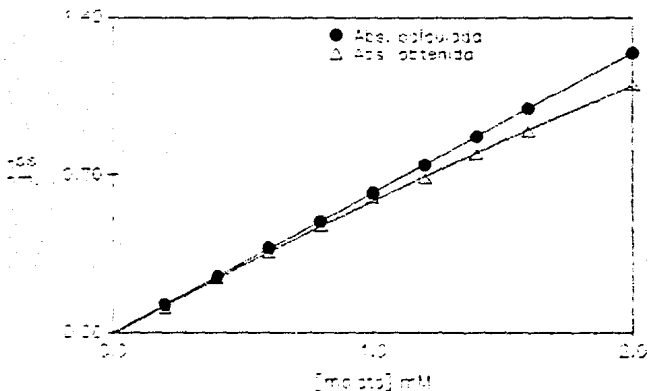
Por otro lado y con el fin de determinar el porcentaje de L-C-Dmalato que se cuantifica por el método de punto final, se efectuó una curva de calibración de malato y se comparó con las Absorbancias que teóricamente deberíamos obtener para cada una de las concentraciones a utilizar, sustituyendo cada una de estas en la ecuación dada en los cálculos.

Por lo tanto la curva de calibración de malato se efectuó con las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, y 2.0 mM, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 3.4, y que se enlistan a continuación:

[Malato] mM	Abs. obtenida	Abs. Calculada	% obtenido	% promedio
0.2	0.1136	0.1244	91.23	95
0.4	0.2415	0.2468	97.06	
0.6	0.3535	0.3732	94.72	
0.8	0.4755	0.4976	95.55	
1.0	0.5995	0.622	96.38	
1.2	0.685	0.7464	91.77	90.28
1.4	0.7935	0.8708	91.12	
1.6	0.893	0.9952	89.73	
2.0	1.101	1.244	88.50	

De los resultados obtenidos observamos que el método de punto final, nos cuantifica en promedio el 95% del total de nuestra muestra hasta una concentración de 0.8 mM, y un 91% a partir de 0.8 a 2.0 mM (ver fig. 3.4).

FIGURA 3.4 CURVA ESTANDAR DE CONCENTRACION DE MALATO CONTRA ABSORBANCIA



Lotes de 10 capas de aleurona fueron incubadas en 2 ml de medio de inducción, conteniendo; succinato 5 mM, 50 μ g/ml de estreptomicina, y 50 μ g/ml de cloranfenicol durante un tiempo de 4 hrs. y a un pH de 6. Al finalizar la incubación se separaron el medio de inducción y el tejido, este último fue homogenizado y ambos desproteinizados. En las soluciones resultantes se cuantificó el malato con Malato Deshidrogenasa.

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1. Cinéticas de acidificación y secreción de malato; la relación existente entre ambas.

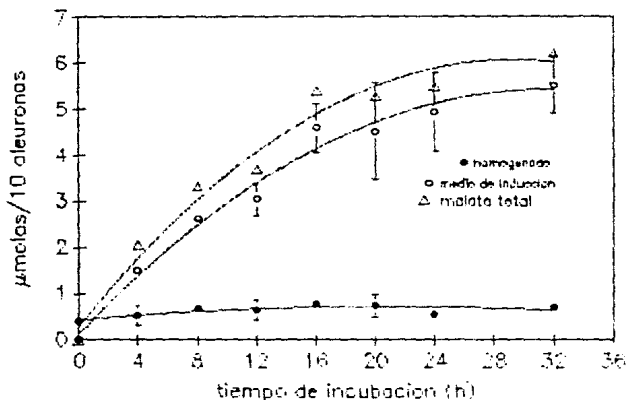
La realización de las cinéticas de acidificación y secreción de malato, fueron efectuadas mediante la incubación de varios lotes de 10 aleuronas, cada uno con 2 ml. de medio de inducción y a una temperatura de 25°C durante los períodos de tiempo que se muestran en las gráficas. Al término de cada uno de estos tiempos, se separó el medio de inducción del tejido y se le determinó el pH con un potenciómetro (Beckman) digital, procesando el tejido para su homogenización y determinación de malato como ya se describió en la sección (3.3.1.) inciso (f).

En la elaboración de estos experimentos se utilizó un baño de precisión con agitación constante, en el cual se incubaron las muestras.

Los resultados obtenidos de éstos experimentos para cada punto, son el producto de por lo menos 5 observaciones.

En la figura 4.1. se muestran los resultados obtenidos para la cinética de secreción de malato en tejido (homogenado), medio de inducción, y malato total. En ella se observa que en el tejido (homogenado) no hay cambio en la concentración de malato manteniéndose constante durante todo el tiempo. En cambio la cantidad de malato secretada al medio de inducción por el tejido,

FIGURA 4.1 CINETICA DE SECRECION DE MALATO POR CAPAS DE ALEURONA AISLADAS DE TRIGO

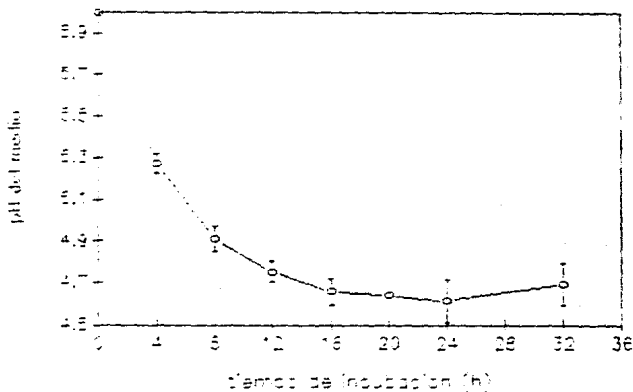


Lotes de 10 capas de aleurona fueron incubadas en 2 ml de medio de inducción conteniendo; succinato 5 mM, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin, y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol durante los tiempos indicados y a un pH de 6. Al finalizar la incubación se separaron el medio de inducción y el tejido, este último fue homogenizado y ambos desproteinizados. En las soluciones resultantes se cuantificó el malato con Malato Deshidrogenasa. Cada punto es el promedio de por lo menos 5 observaciones, representado con su desviación estándar mediante barras.

se va incrementando conforme pasa el tiempo; llegando a una concentración de 2.5 mM en 24 hrs., lo que sugiere que el malato se está sintetizando y secretando a la vez, según se muestra en la figura, secretando aproximadamente 9 veces más malato que el presente en el tejido a las 24 hrs., que es de 0.283 mM (ver fig. 4.1).

En la figura 4.2 se presenta la cinética de acidificación, determinada a los mismos tiempos de la cinética de secreción de malato. En esta gráfica observamos que conforme pasa el tiempo, la acidificación del medio de inducción se hace mayor, partiendo desde un pH 6 y llegando a un pH de 4.6 en un medio amortiguado con 5 mM de succinato; lo que nos muestra claramente con respecto a la secreción de malato y a los mismos tiempos, que existe una correlación temporal entre la secreción de malato y la acidificación; pues conforme aumenta la secreción de malato con el tiempo, también se observa un incremento en la acidificación del medio de inducción, provocado por la capa de aleurona.

FIGURA 4.2 CINÉTICA DE ACIDIFICACION POR CAPAS DE ALEURONA
- GLUDAS DE TRIGO



Las condiciones experimentales fueron las mismas que las anotadas en la (fig. 4.1), sólo que al finalizar la incubación y separar el medio, a este se le determinó el pH con un potenciómetro digital, obteniendose los resultados para la cinética mostrada en esta figura.

4.2. Efecto de iones K^+ y Ca^{2+} sobre la acidificación y secreción de malato.

Para observar el efecto de iones K^+ y Ca^{2+} sobre la acidificación y secreción de malato provocada por la capa de aleurona de trigo; se efectuó el experimento, en las mismas condiciones dadas para la cinética de éstas. Esto es: Se incubaron lotes de 10 aleuronas con 2 ml. de medio de inducción y a una temperatura de $25^{\circ}C$. durante 4 y 24 hrs. La única modificación efectuada al medio de inducción utilizado en las muestras, fue la adición de cloruro de potasio 20 y 100 mM a unos y Cloruro de calcio 10 y 50 mM a otras, mostrandose los resultados en las figuras 4.3 y 4.4.

En los resultados obtenidos y graficados en la figura 4.3. se puede observar que, en las primeras 4 hrs. de incubación, el K^+ a una concentración de 100 mM presenta una cierta inhibición de la secreción de malato y que en el homogenado parece haber una acumulación de éste, comparandolo con los resultados de la cinética de secreción de malato (fig. 4.1), cuyos valores considerados como controles son de 1.52 μ moles/10 aleuronas para el medio de inducción, y de 0.53 μ moles/10 aleuronas para el homogenado. Para los valores de Ca^{2+} 10 y 50 mM en el medio de inducción, parecen no tener efecto importante sobre la secreción de malato, pero en el homogenado se observa nuevamente una acumulación de éste, siendo mas marcada con K^+ 20 mM.

En relación a la incubación durante 24 hrs.; y en base a los resultados obtenidos en la cinética de secreción de malato, que son de 4.937 μ moles 10 aleuronas para el medio de inducción, y de

FIGURA 4.3 EFECTO DE IONES Ca^{2+} Y K^{+} SOBRE LA SECRECIÓN DE MALATO POR ALEJRONAS AISLADAS DE TRIGO

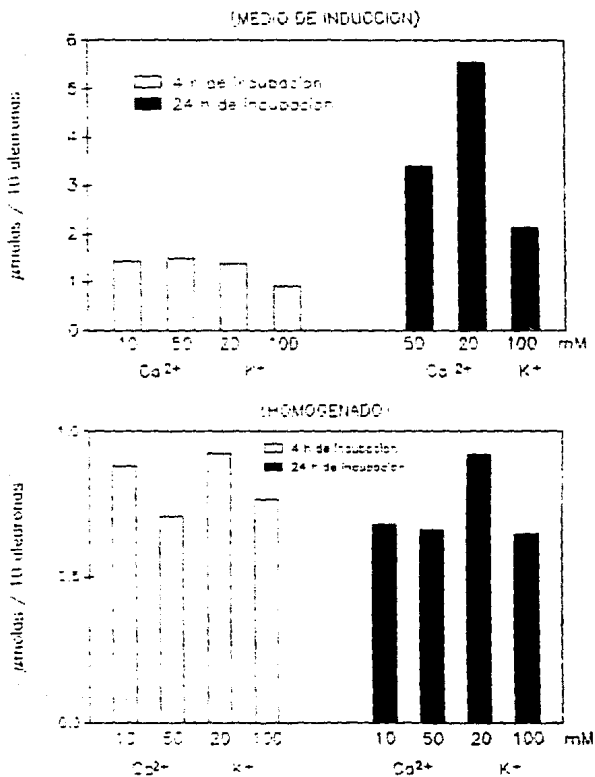
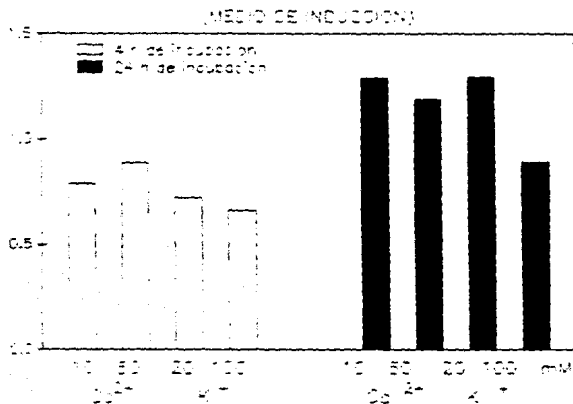


Figura 4.3 Lotes de 10 capas de aleurona fueron incubados en 2 ml de medio de inducción conteniendo: 50 ug/ml de estreptomizina, 50 ug/ml de cloranfenicol, 5 mM de succinato y con las concentraciones indicadas de Ca^{2+} y K^{+} , a un pH inicial de 6. La incubación de las muestras se realizó a 4 y 24 hrs. Al finalizar la incubación se separaron medio y tejido, este ultimo fue homogenizado y ambos desproteinizados. En la solución resultante se cuantificó el malato con Malato Deshidrogenasa.

FIGURA 4.4 EFECTO DE IONES Ca^{2+} Y K^{+} SOBRE LA ACIDIFICACION POR ALEURONAS A ISLADAS DE TRIGO



Las condiciones experimentales fueron las mismas que las anotadas en la figura 4.3, sólo que al finalizar la incubación y separar el medio, a este se le determinó el pH con un potenciómetro digital, mostrándose los resultados obtenidos en esta figura.

0.56 $\mu\text{moles}/10$ aleuronas para el homogenado, se puede ver también que hay una inhibición solo con K^+ 100 mM en el medio de inducción y en el homogenado se presenta otra vez una pequeña acumulación, observándose más notoriamente a una concentración de K^+ 20 mM. Por lo tanto se observa que en el homogenado hay una acumulación de malato a las 4 y 24 hrs. de incubación, y un efecto inhibitorio en la secreción de malato del 38 y 56% a una concentración de 100 mM de K^+ a las 4 y 24 hrs. respectivamente.

Con respecto a la acidificación (fig. 4.4), se observa un efecto inhibitorio del 8 y 36%, comparando la muestra control con un ΔpH de 0.72 y 1.39 para 4 y 24 hrs. respectivamente (cinética de acidificación fig. 4.2) y el obtenido para K^+ 100 mM a estos mismos tiempos.

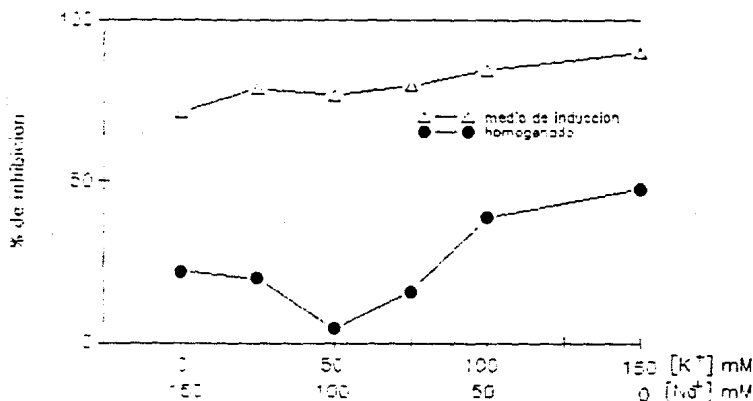
De la muestra correspondiente al medio de inducción con Ca^{2+} 10 mM incubada durante 24 hrs., no se pudo obtener el dato.

4.3 Efecto de iones K^+ y Na^+ sobre la acidificación y secreción de malato

En este experimento se utilizaron concentraciones crecientes de K^+ y Na^+ iniciando desde 0 hasta 150 mM para cada uno de ellos.

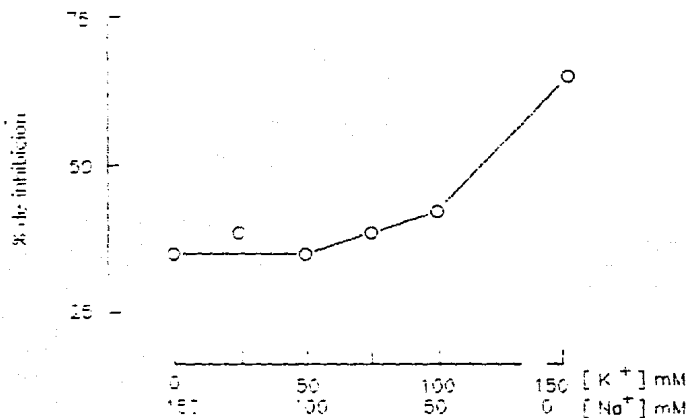
Las condiciones en que se realizó el experimento fueron las mismas que las empleadas en la realización de las cinéticas de acidificación y secreción de malato. La única modificación efectuada, como en el experimento anterior fue realizada en el medio de inducción de las aleuronas, al cual se adicionaron las concentraciones de iones que se muestran en las figuras 4.5 y 4.6

FIGURA 4.5 EFECTO DE IONES K^+ Y Na^+ SOBRE LA SECRECIÓN DE MALATO POR ALEURONAS AISLADAS DE TRIGO



Se incubaron lotes de 10 capas de aleurona en 2 ml de medio de inducción conteniendo; 50 μ g/ml de estreptomicina, 50 μ g/ml de cloranfenicol, succinato 5 mM y con las concentraciones de K^+ y Na^+ que se muestran en la gráfica. La incubación de las muestras se realizó durante 4 hrs. Al finalizar la incubación se separaron medio y tejido, homogenizando éste último y desproteinizando ambos. En las soluciones resultantes se cuantificó el malato con Malato Deshidrogenasa. La inhibición se expresa como el porcentaje de la secreción con respecto al control del experimento, el cual consta de lo mismo pero sin K^+ y Na^+ .

FIGURA 4.6 EFECTO DE IONES K^+ Y Na^+ SOBRE LA ACIDIFICACION



Las condiciones experimentales fueron las mismas que las anotadas en la figura 4.5, únicamente que al finalizar la incubación y separar el medio de inducción y tejido, se determinó al primero el pH con un potenciómetro digital, mostrándose en ésta figura los resultados obtenidos como el porcentaje de inhibición de la acidificación con respecto al control experimental.

respectivamente; e incubadas con este medio de inducción por un tiempo de 4 hrs.

De los resultados obtenidos y graficados, se observa que hay un efecto inhibitorio constante en la secreción de malato conforme la concentración de K^+ va siendo mayor y la concentración de Na^+ va disminuyendo; presentando una máxima inhibición del 69.99% con K^+ a 150 mM en el medio de inducción. También en el homogenado sucede lo mismo pero en menor proporción, presentandose un efecto inhibitorio del 48% (fig. 4.5).

Para la acidificación similarmente se observa un efecto inhibitorio constante conforme aumenta la concentración de K^+ y disminuye la de Na^+ . Sin embargo presenta una máxima inhibición con K^+ 150 mM de 85.43% con respecto al control del experimento (fig. 4.6); lo que sugiere que el K^+ a una concentración mayor de 100 mM presenta un efecto inhibitorio sobre la acidificación.

Por otro lado se realizó otro experimento con iones K^+ y Na^+ pero con concentraciones de 0 a 75 mM del primero y de 75 a 0 del segundo.

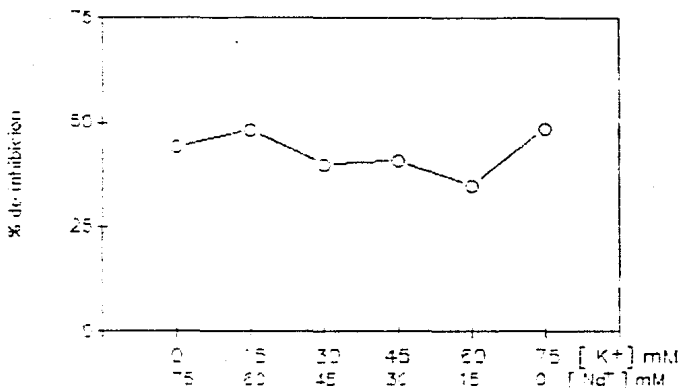
En la figura 4.7 se muestran los promedios de dos experimentos, presentados como el porciento de inhibición de la secreción de malato con respecto al control experimental.

En esta gráfica, observamos que hay un efecto inhibitorio de la secreción de malato en el medio de inducción prácticamente constante desde K^+ 15 mM, hasta K^+ 75 mM, habiendo una diferencia entre ambos valores de inhibición de un 48.5% y un 47.5%, respectivamente que no es significativa.

En el homogenado no hay inhibición aparente de malato, pues por el contrario parece incrementarse la cantidad de este, con respecto

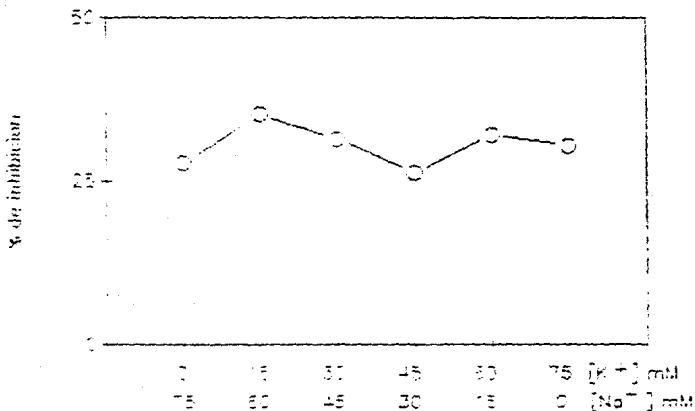
al control experimental. Por otro lado, en la acidificación el efecto inhibitorio presentado parece ser constante, observándose un valor del 35% para el máximo efecto inhibitorio obtenido a la concentración de 15 mM de K^+ (fig. 4.8).

FIGURA 4.7 EFECTO DE IONES K^+ Y Na^+ SOBRE LA SECRECIÓN DE MALATO



Las condiciones experimentales fueron las mismas que las anotadas en la figura 4.5. Los resultados son el producto de dos experimentos realizados por duplicado, y se presentan como el porcentaje de inhibición de la secreción de malato con respecto al control experimental.

FIGURA 4.6 EFECTO DE IONES K^+ Y Na^+ SOBRE LA ACIDIFICACION



Las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo el experimento cuyos resultados se muestran en esta gráfica, son las mismas que las descritas para la figura 4.6 .

4.4 Efecto de manitol sobre la acidificación y secreción de malato

Este experimento se realizó con concentraciones de manitol de 0 hasta 300 mM contenidas como en los experimentos anteriores en el medio de inducción (2ml) por muestra.

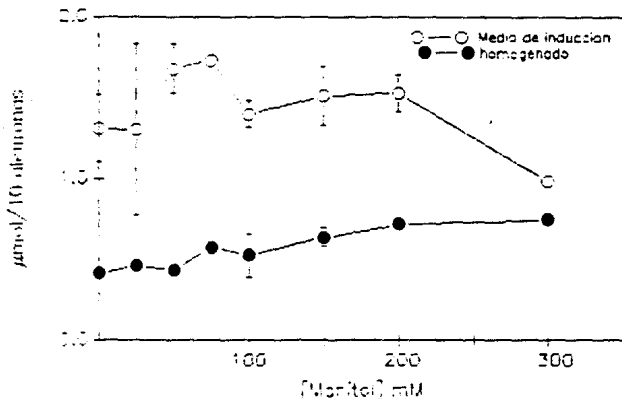
Los resultados graficados muestran que no hay inhibición en la mayoría de los datos y que en el medio de inducción el único punto que se inhibe es a 300 mM de manitol (fig. 4.9). En la acidificación también se observa que no hay inhibición, a excepción del único punto a 25 mM de manitol, donde se nota una pequeña inhibición; pero parece que en la mayoría de los valores hay un pequeño incremento, como se ve también en el medio de inducción y en el homogenado; lo que sugiere una acumulación de malato en el tejido, obviamente comparando con respecto al control.

En la acidificación los valores parecen no variar significativamente con respecto al control o valores obtenidos para la cinética de acidificación (fig. 4.10).

En base a estos resultados, se puede decir que el efecto de manitol sobre la acidificación y secreción de malato no presenta

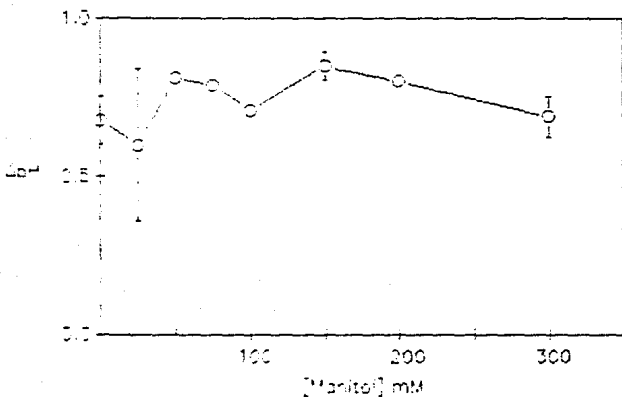
inhibición y que el efecto inhibitorio presentado con los iones K^+ y Na^+ es debido a la fuerza iónica de éstos y no de presión osmótica; pues el manitol es una molécula sin carga, y no presenta inhibición de estos fenómenos.

FIGURA 4.9 EFECTO DE MANITOL SOBRE LA SECRECION DE MALATO



Lotes de 10 capas de aleurona fueron incubadas en 2 ml de medio de inducción conteniendo; succinato 5 mM, 50 µg/ml de estreptomicina y 50 µg/ml de cloranfenicol, con las concentraciones de manitol mostradas en la figura. La incubación de las muestras se realizó durante 4 hrs. Al finalizar la incubación se separaron medio y tejido, este ultimo fue homogenizado y ambos desproteinizados. En las soluciones resultantes se cuantificó el malato, con Malato Deshidrogenasa, mostrandose los resultados como la cantidad de malato secretada con respecto a la concentración de manitol. Los resultados son el producto de dos experimentos realizados por duplicado.

FIGURA 4.10 EFECTO DE MANITOL SOBRE LA ACIDIFICACION



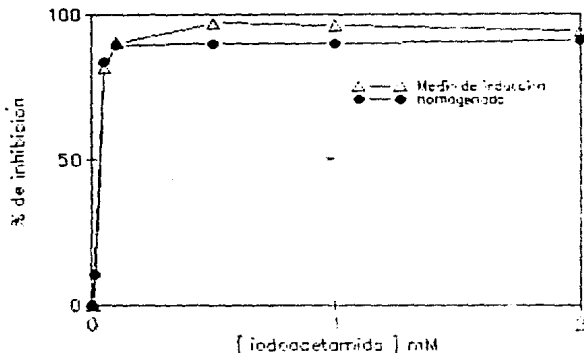
Las condiciones experimentales fueron las mismas que las anotadas en la figura 4.9, sólo que al separar el medio y el tejido, se determinó al primero el pH con un potenciómetro digital, mostrándose los resultados como la diferencia de pH con respecto a la concentración de malato.

4.5 Efecto de iodoacetamida sobre la acidificación y secreción de malato

En este experimento se observa que hay una gran inhibición en la secreción de malato, en la acidificación y aun en el propio homogenado (figs. 4.11 y 4.12), dejando ver claramente el efecto inhibitorio de la iodoacetamida sobre la secreción de malato hasta en un 100%; notando también que a partir de una concentración de 0.1 mM de iodoacetamida la inhibición de la secreción es mayor del 50%.

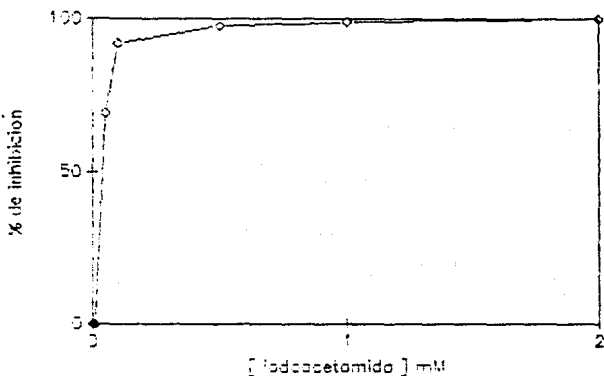
Por otro lado en la acidificación se observa un efecto inhibitorio de prácticamente 100% a una concentración de iodoacetamida de 0.5 mM. Por lo tanto una observación importante parece ser, que la inhibición de la secreción de malato y de la acidificación son afectadas similarmente en cuanto a su porcentaje de inhibición por efecto de iodoacetamida.

FIGURA 4.11 EFECTO DE IODOACETAMIDA SOBRE LA SECRECIÓN DE MALATO



Se incubaron lotes de 10 aleuronas con 2 ml de medio de inducción incluyendo las concentraciones de iodoacetamida indicadas en la figura. La incubación de las muestras se realizó durante 4 hrs. Al finalizar la incubación se siguió el mismo procedimiento ya mencionado en las figuras anteriores. Los resultados se presentan como el porcentaje de la inhibición de la secreción con respecto al control experimental. Estos resultados son el producto de dos experimentos realizados por duplicado.

FIGURA 4.12 EFECTO DE IODOACETAMIDA SOBRE LA ACIDIFICACION



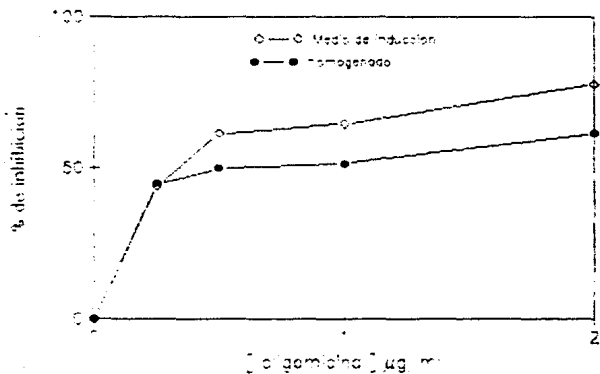
Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la figura 4.11, igualmente determinando el pH con un potenciómetro digital después de la incubación de las muestras. Los resultados se muestran como el porcentaje de la inhibición de la acidificación con respecto al control experimental.

4.6 Efecto de oligomicina sobre la acidificación y secreción de malato

Para éste experimento se utilizaron concentraciones de oligomicina de 0 hasta 2 $\mu\text{g/ml}$, tal como se muestra en la (fig. 4.13), y en la cual se ve claramente el efecto inhibitorio provocado por la oligomicina sobre la secreción de malato, alcanzando un 77.97% a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$; y un 61.66% para el homogenado a la misma concentración de oligomicina.

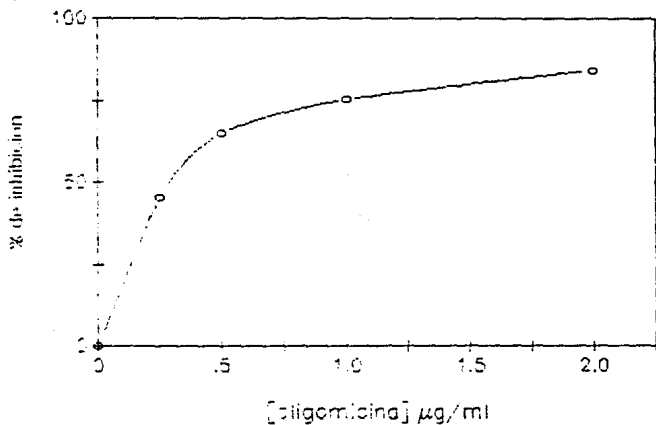
Por otra parte la acidificación presenta un efecto inhibitorio del 84.42% a la misma concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 4.14); y aunque se presenta un poco menor el efecto inhibitorio de la oligomicina en comparación con la iodoacetamida sobre la acidificación y secreción de malato, se observa que el efecto inhibitorio de la acidificación por oligomicina es mayor que el efecto inhibitorio de secreción de malato por el tejido, según se muestra en los resultados obtenidos (figs. 4.13 y 4.14).

FIGURA 4.13 EFECTO DE OLIGOMICINA SOBRE LA SECRECION DE MALATO



Las condiciones experimentales fueron similares a las de la figura. 4.11, sólo que en ésta figura se presenta para oligomicina. Estos resultados son el producto de por lo menos 6 observaciones.

FIGURA 4.14 EFECTO DE OLIGOMICINA SOBRE LA ACIDIFICACION DEL MEDIO POR CAPHS DE PLEURONA AISLADAS DE TRIGO



Las mismas condiciones experimentales que las de la figura 4.12, sólo que en esta figura se muestra para oligomicina.

CAPITULO 5. DISCUSION

5.1. Cinéticas de acidificación y secreción de malato; la relación existente entre ambas.

En los resultados obtenidos y graficados en la figura 4.1, observamos que la secreción de malato al medio de inducción se incrementa conforme transcurre el tiempo de incubación; no sucediendo así en el tejido (homogenado), pues prácticamente permanece constante. Esto sugiere que el tejido está sintetizando y secretando malato al mismo tiempo, observandose claramente, que en el tejido (homogenado) no hay acumulación de malato, y se conserva constante la concentración de este durante todo el tiempo de incubación.

Con respecto a la acidificación, se puede ver que hay desde el inicio de la incubación, un incremento en la acidez del medio de inducción, enfocandonos en el tiempo de 32 hrs.; en donde se ve claramente que hay un ligero incremento en el pH, sin afectar aparentemente la secreción (ver figs.4.1 y 4.2), como si éste tendiese a regresar al pH inicial. Más como en los experimentos realizados no seguimos por más tiempo ésta cinética, desconocemos por consiguiente en que valor se mantiene finalmente el pH. Por otro lado se encuentra también que; conforme se va dando la secreción de malato, similarmente se va acidificando el medio; lo que sugiere, que al mismo tiempo que se secreta malato también están saliendo H^+ , como lo muestran los resultados mencionados en la sección 4.1 y cuya relación aproximada es de 1.5:1 de H^+ por

cada malato respectivamente. Sin embargo se ha visto también que la pared celular de la aleurona posee capacidad amortiguadora y que aunada a la capacidad amortiguadora de los ácidos (málico y succínico) presentes en el medio, incrementan la captación de H^+ . Por lo que la relación malato-proton puede ser realmente de 2:1, lo que sugiere que el mecanismo de la acidificación se debe a la salida de ácido málico.

5.2. Efecto de iones K^+ y Ca^{2+} sobre la acidificación y secreción de malato.

De los resultados obtenidos en los experimentos con los iones K^+ y Ca^{2+} , observamos que el único que tiene efecto sobre la acidificación y secreción de malato es K^+ a una concentración de 100 mM, pues el Ca^{2+} no tiene efecto inhibitorio aparente como se muestra en los resultados. Sin embargo una observación importante con respecto al efecto inhibitorio del K^+ es: que de acuerdo a los resultados, conforme transcurre el tiempo de incubación, la inhibición de la secreción de malato y por consiguiente también la acidificación se va incrementando; como se observa en el porcentaje de inhibición obtenido para cada uno de los tiempos de incubación, 4 y 24 hrs. (secc.4.2).

Otro resultado de gran interés; es que en el tejido (homogenado) se observa una acumulación de malato en comparación con la cantidad de malato obtenida en la cinética de secreción de éste a los mismos tiempos de incubación (fig. 4.1).

Estos resultados sugieren que el K^+ puede estar penetrando a la célula conforme pasa el tiempo, y regulando de esta manera el

equilibrio de cargas dentro de la célula; favoreciendo así que la salida de malato sea menor y que la extrucción de H^+ disminuya, lo que explicaría la baja concentración de malato encontrada en el medio de inducción y la acumulación de éste en el tejido (homogenado). A la vez también, el efecto inhibitorio de la acidificación conforme transcurre el tiempo.

5.3 Efecto de iones K^+ y Na^+ sobre la acidificación y secreción de malato

En este experimento se vuelve a notar el efecto inhibitorio que tiene el K^+ sobre la acidificación y secreción de malato: pues de acuerdo a los resultados hay una inhibición creciente conforme aumenta la concentración de K^+ y disminuye la de Na^+ ; aunque se observa también, que el Na^+ tiene efecto inhibitorio sobre la secreción de malato y la acidificación en forma similar al K^+ (figs. 4.5, 4.6).

Al parecer la diferencia entre el efecto inhibitorio del Na^+ en comparación con el de K^+ no es significativa según muestra la figura 4.5, lo que sugiere que ambos iones están provocando un efecto inhibitorio sobre la acidificación y secreción de malato; sin embargo, el K^+ tiene un efecto de inhibición más marcado sobre éstos fenómenos, como se puede apreciar a la concentración de 150 mM de K^+ (fig. 4.5).

Otra observación con respecto a la cantidad de K^+ y su efecto sobre la acidificación y secreción, se presenta en este experimento; pues comparando el anterior experimento con K^+ 100 mM (secc.5.2), se encuentra que en éste el porcentaje de inhibición

se incrementa a 89.99% en la secreción de malato y 65.43% para la acidificación, a 150 mM de K^+ en un período de 4 hrs. de incubación. Estos resultados nos sugieren por lo tanto, que el efecto inhibitorio de éstos fenómenos se incrementa al aumentar la concentración de iones K^+ .

En otro experimentos realizados similarmente al anterior con concentraciones de K^+ de 0 a 75 mM y Na^+ de 75 a 0 mM, se encuentra nuevamente una inhibición constante en la secreción de malato, no sucediendo así en el tejido (homogenizado): en el cual se ve ligeramente incrementada la cantidad de malato con respecto al control experimental, lo que indicaría que se está acumulando el malato en el tejido. Esto refuerza el comentario efectuado en la (secc.5.2) para este efecto.

Un detalle claro es, que el máximo efecto inhibitorio de la secreción de malato al medio de inducción se da a 75 mM de K^+ y le sigue 15 mM de K^+ . Más en cambio en la acidificación el máximo efecto inhibitorio se da a 15 mM de K^+ (figs.4.7 y 4.8): lo cual no concuerda con el resultado máximo esperado para la inhibición de la acidificación, de que fuera a 75 mM de K^+ . Esto puede explicarse por la gran variación de los datos; por lo que sería conveniente efectuar el experimento poniendo el mayor cuidado posible ya que es muy sensible el sistema; para con esto obtener mejores resultados y hacerlos comparativos con los obtenidos; ya que los resultados presentados son el producto de al menos 4 observaciones para cada punto, pero detectando una gran variación.

5.4. Efecto de manitol sobre la acidificación y secreción de malato.

De los resultados discutidos en las secciones 5.2 y 5.3, surge la necesidad de comprender el efecto inhibitorio provocado en sí, por los iones sobre la secreción de malato y la acidificación; pues en estos experimentos hemos visto que el K^+ y Na^+ inhiben ambos fenómenos.

Al realizar éste experimento con manitol y debido a que esta molécula no posee carga alguna, se puede apreciar que la secreción de malato y la acidificación no sufren significativamente algún cambio; comparándolo obviamente con los controles de las cinéticas respectivas (figs. 4.9 y 4.10). Por lo tanto los resultados obtenidos sugieren que el efecto de inhibición provocado por los iones es debido principalmente a efecto por fuerza iónica, el cual se aprecia de forma más marcada con K^+ a concentraciones mayores de 100 mM (figuras 4.5 y 4.6), ya que por abajo de estas concentraciones, el efecto de inhibición prácticamente es constante.

5.5. Efecto de iodoacetamida sobre la acidificación y secreción de malato.

De experimentos preliminares realizados en el laboratorio, se ha visto que el fenómeno de acidificación por capas de aleurona aisladas de trigo; es dependiente de glucosa, pues al incubar lotes de 10 aleuronas durante un periodo de 24 hrs. lavar y volver a incubar en medio de inducción fresco, se observe que la

capacidad de acidificación por la capa de aleurona disminuía. Sin embargo al adicionar glucosa al medio de inducción, las capas de aleurona recuperaban el 100% de su capacidad de acidificación. Con sustancias como la iodoacetamida; la cual inhibe a nivel de la enzima gliceraldehído 3P deshidrogenasa, catalizadora de la reacción de gliceraldehído 3P a 3P glicerilfosfato y por consiguiente la continuación de la ruta de la glucólisis; se obtiene una inhibición de la secreción de malato y acidificación por la capa de aleurona aislada de trigo, de prácticamente un 100% (ver figs. 4.11 4.12). Estos resultados sugieren que la cantidad de malato que se está sintetizando en el tejido (capa de aleurona) proviene de esta ruta y si se inhibe ésta, se detiene la secreción de malato y también la acidificación; lo que implicaría que ambos fenómenos dependen de esta vía. Por otro lado si se inhibe la glucólisis, afecta al ciclo de Krebs y por consiguiente la cadena respiratoria. Por lo tanto si se detiene la cadena respiratoria no hay flujo electrónico y por consecuencia se inhibe la extrucción de H^+ . Esto podría explicar la inhibición de la acidificación en nuestro sistema.

Las evidencias sugeridas por Northcote (1977). muestran que la extrucción activa del protón en el plasmalema es actualmente reconocido como el mejor transporte activo en células de plantas, con un papel en la regulación del pH y un número de funciones secundarias.

Hay evidencias en ambas, directas e indirectas para un transporte semejante en algunas células de plantas, y es actualmente considerado como una propiedad básica de todas las células de plantas, cuya actividad es esencial para la función celular.

La evidencia directa viene de la observación de la acidificación del medio, al parecer de un gradiente de potencial electroquímico adverso para la extrucción del protón o algún valor creíble asignado al pH citoplásmico.

La evidencia indirecta viene del comportamiento eléctrico de la membrana y la evidencia para un proceso de transporte electrogénico metabólicamente potenciado transfiriendo cargas positivas hacia afuera de la célula.

En la ausencia de algún otro candidato disponible para la transferencia de carga, el pH depende de los procesos reforzando su identificación con una bomba de extrucción activa de protón.

La existencia de tal transporte electrogénico en un rango de las células de plantas fue demostrado por Higinbotham (1970) y revisada por Higinbotham (1974), Slayman (1974) y MacRobbie (1975).

La consecuencia de estos procesos es el establecimiento de un potencial de membrana más negativo y el mantenimiento de un gradiente de pH a través del plasmalema es comúnmente del orden de 100 mV (negativo adentro), y el potencial de membrana de -200 mV poco más o menos que el obtenido en consecuencia de la extrucción del protón. Aparece por lo tanto que un transporte ATP-asa está involucrado, con la energía para el transporte del protón derivada de la hidrólisis de ATP.

Spanwick (1974), sugiere que el movimiento de protones controla el potencial de la membrana en células de Characean como un resultado de la operación de la bomba de extrucción activa de protón dependiente de un voltaje, la cual provee la mayoría de especies iónicas cargadas en el plasmalema.

La carga transferida será balanceada por el flujo pasivo neto, de las cuales el flujo de K^+ puede ser la mayor parte. El balance de pH puede ser logrado solamente por procesos tendientes a producir H^+ dentro, cualquiera de las dos reacciones bioquímicas tales como la síntesis de ácidos orgánicos para los procesos de transporte en membrana tales como el flujo de H^+ , por cotransporte interno de H^+ con algún otro soluto, o por cambio de OH^- interno para un anión externo.

Se sugieren dos caminos por los cuales este medio ha sido logrado. En uno, el balance de cargas es logrado por el flujo de I^- , puesto que el cambio de $Cl^- - OH^-$ (o $H^+ Cl^-$ en un cotransporte interno) es responsable del límite del gradiente de pH; el resultado neto es responsabilidad de las cantidades equivalentes de K^+ y Cl^- . En el segundo, por la activación de fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP), donde el OH^- es removido internamente por síntesis de ácidos orgánicos para generar oxaloacetato, y de ahí malato o un ácido orgánico alternativo.

Estas evidencias muestran que el mecanismo probable de la acidificación del medio en nuestro sistema puede ser la salida de ácido málico, ya que tomando en cuenta las consideraciones anteriores para la extrucción de protón, se observa una gran similitud del proceso de síntesis de ácidos orgánicos para los procesos de transporte en membrana tales como el flujo de H^+ , con los resultados obtenidos en nuestros experimentos.

Otra ruta alternativa que podría funcionar en ausencia de la glucólisis como vía de suministro para la formación de malato e incluso de carbohidratos, es el ciclo del glioxalato; mediante el cual durante la germinación de las semillas los ácidos grasos son

utilizados como fuente de energía y también en la transformación a carbohidratos por el proceso de gluconeogénesis, que requiere de las contribuciones de los glioxisomas, mitocondria y el citosol (Hess, 1980) (fig. 5.1).

5.6. Efecto de oligomicina sobre la acidificación y secreción de malato.

Una observación de gran importancia realizada durante el desarrollo de la incubación de las capas de aleurona fue, que al detenerse la agitación de las muestras en el baño de incubación, no había acidificación ni secreción de malato al medio, lo que implicaba que el tejido requería de una aereación constante.

Mikola y Virtanen (1981), efectuaron experimentos en los cuales muestran que, al incubar lotes de capas de aleurona de cebada en condiciones aeróbicas, obtenían secreción de H^+ y iones malato en diferentes medios de incubación y ajustando el pH inicial a 5.1, disminuyendolo de 3.5 -3.7 en 24 hrs. Si embargo cuando la aereación fue reemplazada por burbujeo de N_2 , el pH del medio se incrementaba lentamente y muy poco malato aparecía en el medio de inducción (Mikola, 1981).

Estas evidencias nos sugieren que los fenómenos de acidificación y secreción de malato pueden depender entonces de la fosforilación oxidativa, ya que al privar de oxígeno al tejido, éste disminuye la acidificación y secreción de malato.

Por otro lado, el conocer el efecto debido a oligomicina sobre estos fenómenos adquiere gran importancia, ya que la oligomicina pertenece a una clase de agentes inhibidores de la fosforilación oxidativa o inhibidores de la formación de ATP (Lehninger, 1988), este tipo de agentes impiden tanto la estimulación del consumo de oxígeno por el ADP, como la fosforilación del ADP a ATP. Sin embargo éstos agentes no inhiben directamente a cualquiera de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria: en lugar de ello impiden el mecanismo de formación de ATP que utilice el intermediario de energía elevada, o sea el estado producido por el transporte electrónico. A consecuencia de ello el transporte electrónico no puede continuar, a menos que se utilice y consuma el intermediario o estado de energía elevada.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos debido al efecto de oligomicina sobre la acidificación y secreción de malato, muestran una clara inhibición de estos fenómenos que va desde un 60 a 78% en cuanto a la secreción de malato y que aparentemente se va incrementando conforme aumenta la concentración de oligomicina (ver fig. 4.13). Por otro lado, el efecto inhibitorio de la acidificación presenta un porcentaje similar, aunque un poco mayor, pero cuya diferencia no es significativa (fig. 4.14). Estos resultados y evidencias presentadas, corroboran la dependencia energética de los fenómenos de acidificación y secreción de malato, además sugieren que tales fenómenos requieren de la oxidación de la glucosa para llevarse a cabo.

Hasta aquí los resultados presentados sugieren que el efecto de la acidificación es un proceso fisiológico que favorece de esta manera la hidrólisis de reservas (ver tabla 5.1) (Hamabata, 1988),

Tabla 5.1 Efecto del pH en la solubilización de diferentes componentes del endospermo almidonoso de trigo (Hamabata, 1988).

pH	Ca ²⁺ ^a	Proteína ^a	Almidón ^b
	μmol		soluble
8.0	1.29 ± 0.19	3.85 ± 0.38	8.09 ± 0.48
5.0	2.67 ± 0.34	5.15 ± 0.45	8.44 ± 0.27
4.0	3.47 ± 0.36	5.29 ± 0.70	16.42 ± 0.40
3.0	4.73 ± 0.19	5.22 ± 0.21	22.37 ± 0.50

^aCa²⁺ y proteínas fueron extraídos de 25 endospermos bajo agitación continua durante cuatro horas, a 25°C, en 5 ml. de acetato de sodio 50 mM como buffer al pH indicado.

^bEl almidón soluble fue extraído de 20 endospermos homogeneizados en 10 ml. de buffer de acetato de sodio 50 mM hirviendo, al pH indicado, durante 5 min.. Los valores son los promedios del duplicado de tres experimentos ± SD.

ya que como se ha visto esta acidificación alcanza un valor en el pH de 4.8 en 24 hrs.; lo que puede explicarse similarmente al comparar lo reportado en cebada para varias enzimas hidrolíticas, las cuales degradan las sustancias de reserva en el endospermo almidonoso y cuyo pH óptimo es de 4 a 6; teniendo además en cuenta que el sistema de transporte activo, el cual toma los aminoácidos y pequeños péptidos del endospermo almidonoso transportandolos hacia el escutelo es más activo a un pH de 4 a 5 (Mikola, 1981); lo que explicaría la tendencia del pH en nuestro sistema de llegar a mantenerse en un pH de 4.5 a 5.

Por otro lado los intentos por demostrar la presencia de una H⁺-ATPasa mediante la utilización de inhibidores conocidos no ha dado resultado, ya que la adición de Vanadato 20 mM, DCCD 0.5 mM, Nitrato 50-75 mM y Manitol 25-300 mM, no mostraron ningún efecto; por lo que la primera hipótesis planteada no se cumple, ya que los resultados obtenidos muestran que probablemente la segunda hipótesis alternativa sea el mecanismo mediante el cual el tejido está acidificando el medio (ver capítulo 2).

En la tabla 5.2 se muestra el efecto inhibitorio causado por algunas de estas sustancias sobre la acidificación del medio por capas de aleurona, cuyos resultados obtenidos en el laboratorio (Edmundo R.C., Tesis de Maestría, CINVESTAV), se comparan con lo encontrado en algunas referencias; observando que no hay similitud entre los resultados obtenidos y los encontrados en la literatura, aunque se reafirman otros; como en el caso de la azida de sodio, donde se aprecia un 100% de inhibición del fenómeno de acidificación. Además de lo anterior, al considerar el consumo de

Tabla 5.2 Inhibición de la acidificación del medio por capas de aleurona.

	Conc.	% de inhib. acidificación	Antecedentes		
			Conc.	%	Ref.
Azida de sodio	1.0 mM	100 ⁻²	0.5 mM	70	49
Oligomicina	2.0 µg/ml	82 ⁻⁹	3.0 µg/ml		26
Iodacetamida	0.2 mM	60	0.2 mM		70
Vanadato de sodio	20.0 mM	0	1.0 mM	100	49
DCCD	0.5 mM	0	3.0 µM	50	60

El dato de inhibición por Azida de sodio corresponde a diferentes experimentos tanto en presencia como en ausencia de amortiguador. Los experimentos con Vanadato y Diciclohexilcarbodiimida se realizaron a 4 y 24 hrs. de incubación con Tris(hidroxi)metilamino metano-HCL 5mM y pH 7. Las columnas referidas como antecedentes corresponden a datos de la literatura obtenidos en otros sistemas experimentales.

Tabla 5.3 Inhibición del consumo de Oxígeno por capas de aleurona aisladas de trigo.

	Conc.	% de Inhibición
Azida de sodio	1.0 mM	81 [±] 6
Iodoacetamida	0.5 mM	74 [±] 7

Se cuantificó el consumo de Oxígeno por lotes de 10 aleuronas en 4 ml. de succinato 5 mM pH 6. El consumo de Oxígeno antes de agregado el inhibidor fue de 2.06 nmol de Oxígeno min^{-1} aleurona⁻¹. La inhibición por Iodoacetamida fue registrada 45 min. después de agregado el inhibidor.

oxígeno por capas de aleurona aisladas de trigo, en presencia de azida de sodio y iodoacetamida (tabla 5.3), se observa claramente una inhibición en el consumo de este, tanto al utilizar un inhibidor de la glucólisis como la iodoacetamida y un inhibidor de la cadena respiratoria como la azida de sodio; lo que nos sugiere que el fenómeno de la acidificación requiere, que las células de aleurona estén en presencia de oxígeno, para realizar la respiración, y por ende la acidificación del medio; ya que al privar o disminuir la cantidad de oxígeno a éstas, se ve disminuida también la acidificación (Mikola, 1981). Por otro lado, esto refuerza también la dependencia energética, que a partir de la oxidación de la glucosa presenta tal fenómeno, como se ha mencionado ya anteriormente.

En base a los datos publicados por Mikola y Virtanen (1981) sobre la acidificación por capas de aleurona de cebada; se analizó el medio de incubación para detectar la presencia de ácidos dicarboxílicos después de la incubación.

El análisis por HPLC (tabla 5.4) muestra que aparece en el medio una cantidad significativa de ácido málico y solo trazas de los otros ácidos dicarboxílicos del ciclo de Krebs; lo que nuevamente nos sugiere que la acidificación del medio por células de aleurona aisladas de trigo sea la presencia de ácido málico.

Tabla S.4 Cuantificación de ácidos dicarboxílicos en el medio después de 24 hrs. de incubación.

	mM
Succínico	5.56 ¹
Málico	4.38
α -Cetoglutarico	0.28
Fumárico	<0.05
Oxalacético	n.d. ²

¹El medio contenía 5 mM de succinato como amortiguador.

²n.d. = no detectado.

CAPITULO 8 CONCLUSIONES PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Las aleuronas aisladas de trigo son capaces de acidificar el medio.

La acidificación del medio por capas de aleurona es dependiente de energía metabólica, que probablemente proceda de la oxidación de glucosa.

Los intentos por demostrar la presencia de una H^+ -ATPasa en la aleurona aislada de trigo mediante el uso de inhibidores conocidos no han dado resultado. Los resultados obtenidos y la tendencia similar que presentan la acidificación y secreción de malato, sugieren que el mecanismo utilizado por la aleurona aislada de trigo para acidificar su entorno puede ser la secreción de ácido málico.

Aunque los esfuerzos realizados para obtener una estequiometría malato-protón que nos identificara plenamente dicha relación en nuestro sistema, fueron muy ilustrativos en cuanto al comportamiento del fenómeno de la acidificación ; persiste la necesidad de conocer de una manera más precisa la estequiometría que guarda este fenómeno de acidificación, por lo que se sugiere la determinación del pH por titulación directa de las muestras a los tiempos deseados durante el desarrollo del experimento, con una solución de KOH ó NaOH previamente valorada; ya que con ésto se determinan con mayor precisión los protones que se van liberando al medio y se puede obtener una estequiometría que ayude a dilucidar la relación buscada.

Otro experimento de gran interés sería; la adición de ácido L-málico exógeno a las capas de aleurona aisladas de trigo, en concentraciones similares a las secretadas a cada uno de los tiempos determinados en la cinética de secreción de malato, e incubarlas los mismos tiempos, para posteriormente determinar malato con Malato Deshidrogenasa.

Por otro lado un experimento que resulta de gran importancia y que puede ayudar a comprender este fenómeno de acidificación sería, el incubar nuestras muestras al pH más bajo alcanzado por las aleuronas y que es aproximadamente de 4.5.

Aquí esperaríamos que no hubiese incremento en la acidificación y por consiguiente tampoco secreción de malato.

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA

1. AYRES, G. H. (1970). Analisis Químico Cuantitativo. Editorial Harla. Impreso en México. p 64-70.
2. BERGMEYER, U. H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. Second Edition. Printed in E.U.A. pp 103-106, 545-548.
3. BERGMEYER, U. H., AND BERNT, E. (1963). Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. Printed in Germany. pp 328-332, 757-760.
4. BEWLEY, D. J., BLACK, M. (1976). Physiology and Biochemistry of seeds. Tomo 1. pp 2-3.
5. BCHINSKI, C. R. (1978). Bioquímica. Segunda Edición. Fondo de Cultura Económica. pp 594-620.
6. BRINK, R. A., AND COOPER, D. C. (1947). The endosperm in seed development. Bot. Rev. 13: 423-477, 479-541.
7. BRINKMAN, F. G., DONKERS, C. K. (1982). Respiration rate and redox state of NAD during wound-induced defferentiation of potato tuber tissue (*Solanum tuberosum* L.). Plant Sci. Lett., 27: 29-36.
8. BUTTROSE, M. S. (1960). Submicroscopic Development and structure of Starch granules in cereal endosperms. Jour. Ultrastruct. Res. 4: 231-257.
9. CHANG, K., ROBERTS, J. K. M. (1989). Observation of Cytoplasmic and Vacuolar Malate in Maize Root Tips by ¹³C-NMR Spectroscopy. Plant Physiol., 89: 197-203.
10. CHRISTOPHER, J. A., POMEROY, M. K. (1989). Metabolic Acclimation to Hypoxia in Winter Cereals. Plant Physiol. 91: 1063-1068.

11. CRONQUIST, A. (1977). Introducción a la Botánica. Segunda Edición. Cía Editorial Continental. Impreso en México. pp 469. 508, 580-581.
12. DAVIES, D. D. (1979). The Central Role of Phosphoenol Pyruvate in Plant Metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol., 30: 131-158.
13. DEIKMAN, J., JONES, L. R. (1985). Plant Physiol., 80: 672-675.
14. DEVLIN, M. R. (1980). Fisiología Vegetal. Tercera Edición. Impreso en España. pp 24-25.
15. DICK, G. J. (1979). Química Analítica. Primera Edición. Editorial el Manual Moderno. Impreso en México. p 90.
16. DILLAR, R. C. (1977). Química. Fondo Educativo Interamericano. Impreso en E.U.A. pp 6, 101. 91-92.
17. ESAU, K. (1953). Plant Anatomy. Wiley, New York.
18. ESAU, K. (1965). Plant Anatomy. Second Edition. Printed in E.U.A. pp 562.
19. ESAU, K. (1976). Anatomía Vegetal. Tercera Edición. Ediciones Omega. Impreso en España. pp 558-564. 620-663.
20. ESAU, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. Second Edition. Printed in E.U.A. pp 475-479. 482-485.
21. ESAU, K. (1985). Anatomía Vegetal. Tercera Edición. Ediciones Omega. Impreso en España. pp 582. 525.
22. FAHN, A. (1974). Anatomy Plant. Second Edition. Pergamon Press. Impreso en Gran Bretaña.
23. FAHN, A. (1978). Anatomía Vegetal. Primera Edición Española. H. Blume Ediciones. Impreso en España. pp 25-27. 566. 595-599.

24. GARCIA, M. M. (1982). "Control Post-transcripcional del Acido abscisico sobre la sintesis de α -amilasa en aleurona de trigo". Tesis de Maestria. Centro de Investigaci3n y Estudios Avanzados (CIPN).
25. GOODMAN, S. L. (1978). Bases Farmacologicas de la Terapeutica. Quinta Edici3n. Interamericana. Impreso en Mexico. pp 1037-1039.
26. GUIGNARD, J. L. (1961). Recherches sur l'embryogenie des Graminées; rappots des Graminées avec l'autres Monocotylédones. Ann. des Sci. Nat., Bot. Ser. 12. 2: 491-510.
27. HAMABATA, A. (1986). Plant Physiol., 80: 5-21.
28. HAMABATA, A., GARCIA, M. M. (1988). Kinetics of the acidification Capacity of aleurone Layer and Its Effect upon Solubilization of Reserve Substances from Starchy Endosperm of Wheat. Plant Physiol. 86: 843-844.
29. HAWLEY, G. G. (1975). Diccionario de Quimica y Productos Quimicos. Ediciones Omega. Impreso en Espa1a.
30. HAYWARD, H. E. (1938). The Estructure of Economic Plants. Macmillan. New York.
31. HESS, D. (1980). Fisiologia Vegetal Ediciones Omega. Barcelona. Impreso en Espa1a. pp 62-63, 118-121.
32. HIGINBOTHAM, N. (1973). Electropotentials of plant cells. Plant Physiol., 24: 25-46.
33. HIGINBOTHAM, N., GRAVES, J. S. (1970). J. Membrane Biol. 3: 210.
34. HIGINBOTHAM, N., ANDERSON, W. P. (1974). Can. J. Botany. 52: 1011.

35. HO, T. D. (1979). Hormonal Control of Enzyme formation in Barley Aleurone Layers. *Molecular Biology of Plants*. Academic Press. pp 217-240.
36. HOOK, D. D. AND CRAWFORD, R. M. M. (1978). Plant life in anaerobic environments Ed., Ann Arbor Science, Ann Arbor.
37. JACOBY, B. AND LATIES, G. G. (1971). Bicarbonate fixation and malate compartmentation in relation to salt-induced stoichiometric synthesis of organic acids. *Plant Physiol.* 47: 525-531.
38. KINRAIDE, T. B. (1988). Proton Extrusion by Wheat Roots Exhibiting Severe Aluminum Toxicity Symptoms. *Plant Physiol.* 88: 418-423.
39. LAGUNA, J. (1976). *Bioquímica. Segunda Edición. Décima reimpresión.* La Prensa Médica Mexicana. pp 122, 593-595.
40. LANCE, C., RUSTIN, P. (1984). The Central Role of Malate in Plant Metabolism. *Physiol. Veg.* 22 (5): 625-641.
41. LAZTNO, E. AND KELLY, G. J. (1983). The Many-Faceted Function of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C_3 Plants. *Plant Physiol.* Veg. 21: 805-815.
42. LAUGER, P. (1972). Carrier-Mediated Ion Transport. *Science.* 178: 24-30.
43. LEHNINGER, L. A. (1988). *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. Segunda Edición. Décima segunda reimpresión.* Ediciones Omega. Impreso en España. pp 36, 39, 458-460, 527, 640, 650-651.
44. LEWITT, J. L. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. 1 y 2. Academic Press. New York.

45. LITTER, M. (1978). Compendio de Farmacología. Segunda Edición. Cuarta reimpression. Editorial "El Ateneo". pp 510-590.
46. MACROBBIE, E. A. C. (1975). Membranes Transport. Curr. Top. 7: 1.
47. MARRE, E. AND BELLARIN-DENTI, A. (1985). J. Eiseberg. Biomembranes. Plenum Press. 17: 1-21.
48. MIKOLA, J. AND VIRTANEN, M. (1980). Plant Physiol. 66: S 142.
49. MIKOLA, J. AND VIRTANEN, M. (1981). Regulation of pH in the Starchy Endosperm of Barley Grain During Reserve Protein Mobilization. Naturwiss Techn. # 5N. pp 257-258.
50. MILLIRD, A., AND SCOTT, K. J. (1982). Respiration in Diseased Plant. Annu. Rev. Plant Physiol. 13: 559-574.
51. MURRAY, R. D. (1984). Physiology Seed. 1. Edit. Academic Press. Printed in Australia. pp 9.
52. NEGBI, M., AND KOLLER, D. (1982). Homologies in the grass embryo-a re-evaluation. Phytomorphology. 12: 286-296.
53. NORTHCOTE, H. D. (1977). Existencia de un Transporte Activo de Iones en Células de plantas. Plant Biochemistry II. Vol 13. pp 211-226.
54. O'LEARY, M. H. (1982). Phosphoenolpyruvate Carboxylase: An Enzymologist's View. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 297-315.
55. OCHOA, S. (1955). Malic Dehydrogenase from pig heart. In: Colowick and Kaplan (Ed.). Methods in Enzymology. Vol. 1. pp 735-739.
56. GRAH, F. G., HUMMER, J. D., SMOOT, C. R. (1984). Biología Sistemas Vivientes. Cia. Editorial Continental. Segunda Impresión. Impreso en México.

57. OSMOND, C. B., AND HOLTUM, J. A. M. (1981). Crassulacean acid Metabolism. In *The Biochemistry of Plants*, B. M.D. Hatch and N. K. Boardman, Edit. Academic Press, New York. pp 283-328.
58. OSMOND, C. B., AND POPP, M. (1983). The balance of malate Synthesis and metabolism in response to ion uptake in excised Wheat Roots. *Plant Sci. Lett.* 32: 115-123.
59. OVCHIRNIKOV, Y. A. (1979). Physico-Chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion Channels. *Eur. J. Biochem.* 94: 321-338.
60. PALEG, L. (1980). Physiological effects of gibberelic acid I. on Carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* 35:293-294.
61. PANKOW, H., AND GUTTENBERG, H. VON. (1957). Vergleichende Studien über die Entwicklung monocotyler Embryonen und Keimpflanzen. *Bot. Stud.* Aeft 7: 1-39.
62. PERLIN, D. S. (1961). *Plant Physiol.* 68: 521-526.
63. PIERRE, M. (1984). Effects non visibles de la pollution des végétaux par le SO_2 ; modifications du métabolisme et coût physiologique chez le Haricot (*Phaseolus vulgaris*). *Doct. Thesis.* Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris.
64. PORTILLO, F. (1970). *Principios de Fisiología Vegetal*. Primera reimpresión. Editorial Aguilar. p 258.
65. RHODES, M. J. C., WOOTTON, L. S. C. (1968). Metabolic Changes in excised fruit tissue. I. Factors affectin the development of a malate decarboxylation system during the aging of disks of preclimacteric apples. *Phytochemistry.* 7: 1439-1451.

65. SALISBURY, F. B., ROSS, W. C. (1985). *Plant Physiology*. Second Edition. Wadsworth Publishing Company, Inc. pp 110-122, 136-144, 240-271.
67. SEMENZA, G., AND CARAFOLI, E. (1982). *Plant Physiol.* 70: 498-505.
68. SERRANO, R. (1984). Plasma Membrane ATPase of Fungi and Plants as a Novel Type of Proton Pump. *Curr. top. in cellular regulation*. Vol. 23. Academic Press. Printed in E.U.A. pp 87-126.
69. SLAYMAN, C. L. (1974). In U. Zimmermann and J. Dainty (eds.). *Transport in Plants*. Springer-Verlag. Berlin. pp 107-119.
70. SMITH, A. F. (1979). Intracellular pH and its regulation. *Plant Physiol.* 30: 289-311.
71. SPANSWICK, R. M. (1974). *Biochemistry Biophys. Acta*, 332,387.
72. STRYER, L. (1981). *Biochemistry*. Second Edition. Cap. 35. W. H. Freeman and Company. Printed in E.U.A. pp 861-882.
73. STUMPF, K. P., AND CONN, E. E. (1980). *La Bioquímica de Plantas*. Vol. 2. Davies, D. D. *Metabolismo y Respiración*. Academic Press. Impreso en E.U.A. pp 511-513.
74. THIBAUD, JEAN-B., DAVIDIAN, JEAN-C. (1988). H^+ Cotransports in Corn Roots as Related to the Surface pH Shift Induced by Active H^+ Excretion. *Plant Physiol.* 88: 1469-1473.
75. TING, I. P. (1981). Towards a model for malate accumulation in plant tissues. *Plant Sci. Lett.* 21: 215-221.
76. UGOCHUKWU, E. N., AND ANOSIKE, E. D. (1979). Effect of Storage under nitrogen en ethanol, lactate malate and their dehydrogenases in yam tubers. *Phytochemistry* 18: 1621-1624.

77. VIGIL, E. E., AND RUDDAT, M. (1973). Plant Physiology 51: 549-558.

78. WALKER, R. R. LEIGH. (1981). Plant 153: 140-149.

79. YOMO, H. AND VARNER, J. E. (1971). Hormonal Control of a secretory tissue. Curr. Topics Devel Biol. 6; 111-144.