

190  
24°



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SINTESIS Y SECRECION  
DE  $\alpha$ -AMILASA INDUCIDA POR AG<sub>3</sub> EN ENDOSPERMOS  
DE SEMILLAS DE DIFERENTE VIGOR**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**DAVID ROMERO GARCIA**

Bajo la Asesoría de la Dra.  
**IRMA BERNAL LUGO**

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON  
SALA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE

1.	ANTECEDENTES	1
2.	INTRODUCCION	3
2.1	ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA DE TRIGO	3
	2.1.1 Testa	3
	2.1.2 Capa de aleurona	3
	2.1.3 Endospermo almidonoso	6
	2.1.4 Embrión	7
2.2	FACTORES DE DETERIORO	8
	2.2.1 La humedad en el almacén	8
	2.2.2 La temperatura en el almacén	9
2.3	EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO HETEROTROFICO DE LA PLANTULA.	10
	2.3.1 Alteraciones fisiológicas y funcionales del embrión	10
	2.3.2 Alteraciones moleculares del embrión	11
	2.3.3 Alteraciones ultraestructurales del embrión	12
	2.3.4 Movilización de reservas y su regulación	13
	2.3.5 Propiedades enzimaticas de la $\alpha$ -amilasa	15
	2.3.6 Isoenzimas de $\alpha$ -amilasa	16
	2.3.7 Participación de la $\alpha$ -amilasa en la expresión del vigor de la semilla	17
3.	OBJETIVO	20
4.	MATERIALES Y METODOS	20
	4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	20

4.2	REACTIVOS	20
4.3	OBTENCION DE LAS MEDIAS SEMILLAS	20
4.4	INCUBACION DE LAS MEDIAS SEMILLAS	21
4.5	METODOS ANALITICOS	21
4.5.1	Obtención del extracto para determinar la actividad de la $\alpha$ -amilasa	21
4.5.2	Determinación de la actividad de $\alpha$ -amilasa	22
4.5.3	Determinación de proteínas	25
4.5.4	Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas de las medias semillas	27
4.5.5	Identificación de las proteínas radioactivas en geles de poliacrilamida	28
4.5.6	Geles de actividad de $\alpha$ -amilasa	29
4.5.7	Identificación de $\alpha$ -amilasa por electrotransferencia	30
4.5.8	Análisis estadístico	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
5.1	EFFECTO DEL AG <sub>9</sub> EN LA PRODUCCION Y SECRECION DE $\alpha$ -AMILASA	33
5.2	PATRON ISOENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -AMILASA PRODUCIDA POR ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS	35
5.3	NIVELES Y TERMOESTABILIDAD DEL PEPTIDO DE $\alpha$ -AMILASA EN ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADO	38
5.4	DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS DE $\alpha$ -AMILASA EN ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS	42

<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>49</b>

## RESUMEN

En semillas almacenadas el metabolismo de la aleurona se encuentra disminuido, especialmente la producción de la  $\alpha$ -amilasa, esta hidrolasa se sintetiza de novo como respuesta al AGe y se secreta al endospermo almidonoso. Lo anterior sugiere que el proceso de biosíntesis y/o secreción de  $\alpha$ -amilasa se encuentra modificada en la aleurona deteriorada. Para demostrar lo anterior en este trabajo se estudio la biosíntesis y/o secreción de la  $\alpha$ -amilasa en endospermos provenientes de semilla deteriorada de trigo. En concordancia con reportes anteriores se encontró que los endospermos deteriorados producen una menor actividad de  $\alpha$ -amilasa. El patrón isoenzimático producido por ambos tipos de endospermos fué similar, sin embargo en endospermos deteriorados las isoenzimas de bajo pI contribuyen en mayor proporción a la actividad total. Por otra parte la acumulación del péptido de  $\alpha$ -amilasa fue mayor en endospermos control que en el deteriorado. La capacidad de síntesis de proteínas para ambos tipos de tejidos es similar, mientras que la cantidad de  $\alpha$ -amilasa radiactiva sintetizada es mayor en los endospermos deteriorados que en los controles.

Los resultados anteriores se interpretaron como que la menor actividad de  $\alpha$ -amilasa observada en tejido de bajo vigor se debió a la menor producción de uno de los isogrupos de esta hidrolasa, muy probablemente al isogrupo de alto pI.

## 1) ANTECEDENTES

La semilla como organismo vivo durante el tiempo de que se almacena sufre un proceso de envejecimiento o pérdida de vigor que conduce a cierto deterioro bioquímico y fisiológico que se observa durante todo el ciclo de vida de la planta que se origina a partir de ella (Pollack y Ross, 1972; Tiburcio, 1986). Este proceso es acelerado por la alta humedad relativa y temperatura de almacenamiento (Bewley 1978, 1982; Roberts, 1972).

Desde un punto de vista fisiológico el deterioro sufrido por las semillas en el almacén se manifiesta en etapas tempranas de su desarrollo como un retraso en la germinación y una disminución en el crecimiento heterotrófico de la plántula. Esto último va acompañado de una disminución en la eficiencia con la cual se movilizan las reservas (Tiburcio 1986, y Padilla 1987).

La movilización de reservas es un proceso que se realiza en el endospermo de la semilla de cereal y en el cual participan las hidrolasas que la capa de aleurona sintetiza de novo y secreta al endospermo almidonoso. La función de estas enzimas es la de hidrolizar los polímeros que constituyen las reservas (Bewley y Black, 1978).

Una de las hidrolasas sintetizadas de novo y secretada por la aleurona se encuentra la  $\alpha$ -amilasa (Bewley y Black, 1978). Esta enzima inicia la hidrólisis del almidón, los productos de esta hidrólisis, maltosa y glucosa, constituyen el mayor aporte de

sustratos para el crecimiento y desarrollo del embrión ( Murray, 1984).

En semillas almacenadas el metabolismo de la aleurona se encuentra disminuido especialmente en la producción de  $\alpha$ -amilasa (Tiburcio 1986, Rodríguez 1991), por lo que la hidrólisis de almidón es más lenta que en las semillas no almacenadas (control), ocasionando una menor disponibilidad de sustratos para el crecimiento del embrión germinado.

Desde el punto de vista mecanístico lo anterior podría deberse a una alteración de los eventos moleculares que participan en la inducción, biosíntesis y/o secreción de  $\alpha$ -amilasa.

Estudios previos han demostrado que los eventos que participan en la inducción enzimática: disponibilidad de ácido giberélico (AGA) (Tiburcio, 1986) y sensibilidad del tejido inductor, no se encuentran modificados en el tejido deteriorado (Rodríguez, 1991). Lo anterior sugiere que el proceso de biosíntesis y/o secreción de  $\alpha$ -amilasa se encuentra modificado en la aleurona deteriorada, para demostrar lo anterior en este trabajo se estudió la biosíntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa en aleurona deteriorada de trigo. A continuación se presenta en forma breve, la información que el lector requiere para una mayor comprensión del tema.

## 2) INTRODUCCION

### 2.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA DE TRIGO

El trigo constituye uno de los cereales mas extendidos en el mundo. Es una angiosperma y pertenece a la familia de las gramíneas. Las estructuras básicas que se reconocen en una semilla de trigo son: testa, capa de aleurona, endospermo almidonoso y embrión.

#### 2.1.1 Testa

La testa es la cubierta de la semilla y tiene la función de proteger al embrión de posibles daños mecánicos y restringe el intercambio de gases entre el embrión y el medio externo. Esta cubierta puede estar formada de una ó varias capas de células y posee cutículas externa e interna, impregnadas con ceras y grasas.

#### 2.1.2 Capa de aleurona

La capa de aleurona es la parte del endospermo externo y esta diferenciado morfológica y funcionalmente como una capa distinta que puede estar formada de una a varias células de espesor, dependiendo de la especie de que se trate (Fincher, 1989). Aunque la aleurona y el endospermo almidonoso comparten el mismo origen, solo las células de aleurona permanecen vivas después de que el

almacenamiento de reservas se ha completado (llenado de grano).

En el caso del trigo la capa de aleurona (Fig 1) esta formada por una sola capa de células (Fincher, 1989), cuyas paredes consisten de una capa interna relativamente delgada y una capa exterior espesa, hay canales intercelulares que conectan a las células adyacentes, contienen un material similar a la pared interior de la aleurona (Fincher, 1989).

Las células de la aleurona están rodeadas por una pared celular primaria compuesta por diversos polisacáridos, como arabinoxilanos que representan el 65-67% de su peso y de un 26-29% de glucanos con enlace  $\beta$ -(1-4), así como, pequeñas cantidades de glucomananos y celulosa que representan un 2% de su peso cada uno, asimismo contienen ácidos fenólicos, predominantemente ácido ferúlico, los cuales estan unidos covalentemente a la pared celular.

Las células maduras de aleurona de los cereales contiene cuerpos proteicos, conocidos como granos de aleurona los cuales estan rodeadas por cuerpos lipídicos. Los gránulos de almidón estan ausentes en la aleurona de granos maduros. Los cuerpos proteicos contienen una matriz amorfa formada por proteínas relativamente ricas en aminoácidos básicos, presentan inclusiones del tipo I que son globoides, formados por fitina asociados con sales de  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  que forman la mayor reserva de fosfato y minerales del grano.

También presentan inclusiones del tipo II que contiene o-aminofenol, proteínas y carbohidratos. Otras reservas presentes en la célula incluyen carbohidratos (sacarosa, rafinosa y fructanos), ácidos ribonucleicos, exo y endopeptidasas y vitaminas (Fincher, 1989).

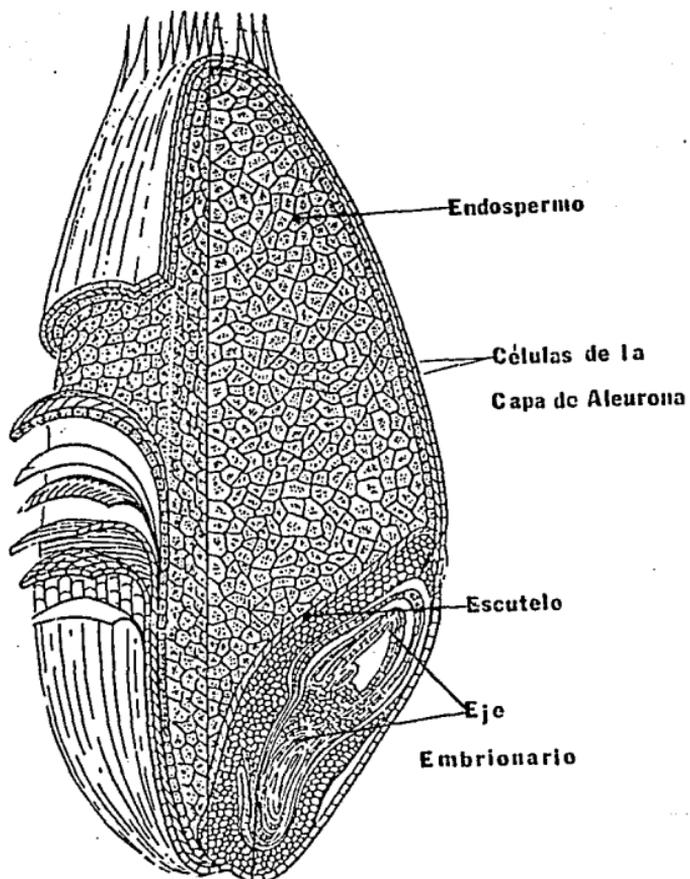


Fig 1. Estructura de la semilla de trigo (*Triticum aestivum*)

### 2.1.3 Endospermo Almidonoso

El endospermo almidonoso ocupa la mayor parte del volumen de la semilla de trigo (Fig 4) representa la reserva de nutrientes que se moviliza durante la germinación. Así el endospermo constituye el tejido blanco de las enzimas hidrolíticas secretadas por la aleurona y en menor proporción por el escutelo. Las células del endospermo contienen en su interior granulos de almidón los cuales son sintetizados en amiloplastos durante el desarrollo del endospermo. Los granulos de almidón estan compuestos por amilosa: cadenas lineales compuesta por enlaces glucosídicos- $\alpha$ -(1-4) y amilopectina. cadenas ramificadas compuesta por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4 y 1-6); las proporciones de cada una, varían entre las especies y variedades. Los lípidos y proteínas constituyen los menores componentes de los granulos de almidón.

Las proteínas de reserva se encuentran en cuerpos proteicos presentes en el endospermo almidonoso, se encuentran divididas en cuatro clases, basadas en su solubilidad: las albuminas son solubles en agua y en soluciones salinas diluidas, las globulinas son solubles en soluciones salinas diluidas y poco solubles en agua, las prolaminas son insolubles en agua, pero solubles en etanol al 70-80% y las glutelinas las cuales se caracterizan por ser insolubles en soluciones neutras, pero son solubles en disoluciones diluidas de ácidos o de bases (Devlin, 1970).

En trigo predominan las glutelinas y prolaminas, ya que en conjunto representan un 80% de las proteínas de reserva, mientras que las albuminas y globulinas contribuyen con un 15%, dentro de

este grupo se encuentran enzimas como  $\beta$ -amilasa y proteasa e inhibidores de proteasas (Fincher, 1989).

El endospermo posee células muertas con residuos de núcleo, ribosomas, retículo endoplásmico y ARN. Asimismo contienen proteínas de varias clases incluyendo algunas enzimas como  $\beta$ -amilasa, proteasas, inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y otras proteínas de función desconocida (Fincher, 1989).

#### 2.1.4 Embrión

El embrión está formado de un eje embrionario y un cotiledón (Fig 2). El eje está formado por las siguientes estructuras: el hipocotilo al cual está unido el cotiledón, la raíz embrionaria llamada radícula está ubicada en la base del eje y está cubierta por la coleoriza; la plúmula que dará origen a las hojas y tallo, se encuentra en la parte superior del mismo cubierta por el coleoptilo. Las monocotiledoneas presentan un cotiledón reducido llamado escutelo el cual también participa en la movilización de reservas como una fuente de enzimas hidrolíticas y funciona como un tejido de absorción de los productos de la hidrólisis del endospermo.

Las células del epitelio del escutelo presentan características estructurales semejantes a la capa de aleurona como cuerpos proteicos análogos, los cuales están rodeados de cuerpos lipídicos y contienen fitina. Sus células también presentan pared celular, mitocondrias, ribosomas libres, un núcleo central y en algunos casos el retículo endoplásmico y los dictiosomas ya están presentes, contienen azúcares solubles como sacarosa y rafinosa,

vitaminas, reservas de fosfato, así como enzimas para iniciar rápidamente la síntesis de proteínas en los primeros estadios de la germinación (Fincher, 1989), carecen de almidón almacenado.

## 2.2 FACTORES DE DETERIORO

El deterioro causa una disminución en el vigor de las semillas inicialmente, hasta llegar a eliminar la capacidad de germinación de las mismas. Durante el almacenamiento, el vigor de la semilla disminuye, las semillas de bajo vigor ó deterioradas se caracterizan por una menor velocidad de germinación y una reducción de la capacidad para establecerse como organismo autotrófico. La disminución del vigor de las semillas, depende de los factores físicos y biológicos que se encuentran en el sitio de almacenamiento, ó en el campo (Roberts, 1972). Entre los factores físicos están la atmósfera que rodea a la semilla en el almacén y el daño mecánico sufrido durante la cosecha; los más importantes son la temperatura y la humedad, por lo que un manejo eficiente de estos minimiza los cambios de la semilla durante su almacenamiento. Entre los biológicos tenemos: la invasión por hongos, insectos y roedores (Hallbin, 1986).

### 2.2.1 La humedad en el almacén

En cereales la mejor condición de almacenamiento es una humedad relativa del 20% y una temperatura de 0 a 4 °C, a este respecto existen condiciones particulares óptimas de almacenamiento para cada especie de semillas.

Un aumento en la humedad relativa del almacén, ocasiona un incremento en el contenido de agua de la semilla; este incremento de agua desencadena varios procesos en la semilla como son:

i) Un aumento en la respiración (Fristley, 1986): al aumentar el contenido de humedad en la semilla la respiración de esta se incrementa, ocasionando una elevación en la temperatura y en la concentración de CO<sub>2</sub> en el ambiente del almacén, creándose una atmósfera mas anaeróbica que puede causar el deterioro de las semillas, como la respiración se realiza gracias a las reservas de disponibilidad inmediata (Mayer, 1980) éstas disminuyen ocasionando, tal vez una menor velocidad de germinación de las semillas.

ii) Daños funcionales: al incrementarse la cantidad de agua libre en la semilla, se disparan algunas funciones bioquímicas características de la germinación (Bewley y Black, 1982), que al no llevarse a término por no encontrarse la semilla en condiciones adecuadas, sufriendo daños que disminuyen el vigor de la semilla incluso causando la muerte del embrión.

### 2.2.2 La temperatura en el almacén

Con respecto a la temperatura, un incremento tanto en la temperatura como en la humedad del almacén, además de causar una elevación en la respiración de la semilla, favorece su invasión tanto por hongos como por insectos que le causan daño en la semilla (Ross, 1986).

### 2.3 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA FISIOLÓGIA, BIOQUÍMICA DE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE LA PLANTULA.

La germinación es la serie de eventos fisiológicos estructurales y anatómicos que se inician con la absorción de agua por la semilla y culmina con la protusión de la radícula, la posibilidad de que se establezca una nueva generación, depende de los procesos bioquímicos y fisiológicos conocidos como movilización de los compuestos de reserva, que se utilizaran para que la plántula adquiere la capacidad de establecerse como organismo autotrófico (Bewley y Black, 1982).

La coordinación de las funciones dependientes del embrión (viabilidad de la semilla) y de las del resto de la semilla, como son la movilización de reservas que resulta en un establecimiento óptimo de la plántula aún en condiciones ambientales adversas.

A continuación se exponen los principales daños que sufre el embrión durante el almacenamiento de la semilla. Respecto al efecto del almacenamiento en tejido de reserva de cereales solo se ha reportado que hay una disminución en la síntesis de  $\alpha$ -amilasa (Tiburcio, 1986).

#### 2.3.1 Alteraciones fisiológicas y funcionales del embrión.

Se ha informado que el deterioro produce las siguientes alteraciones fisiológicas en la semilla : disminución en la velocidad de germinación y de crecimiento, la pérdida de la capacidad de formación de raíces en embriones de trigo envejecidos y anomalías morfológicas en las plántulas (Priestley, 1986).

Entre las alteraciones funcionales causadas por el deterioro, se ha reportado una disminución en la cantidad de ATP en las células de semillas deterioradas, probablemente como consecuencia de una mala formación estructural de las mitocondrias al iniciarse la germinación y lo que conduce a una disminución en su capacidad de sintetizar ATP (Priestley, 1986).

También la síntesis de proteínas, en embriones de semillas deterioradas, es menor en comparación con la presentada por embriones de alto vigor, esto puede deberse a una ó a una combinación de las siguiente razones: a) a una degradación de ARNm preformados, b) a una disminución en la síntesis de los mismos, c) a un daño en los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, d) a un número menor de polisomas que se ha observado que se presenta en semillas de bajo vigor (Priestley, 1986).

Asimismo, en grados extremos de deterioro, se reportan daños en el ADN, aberraciones cromosómicas, y un retardo en la división celular (Priestley, 1986).

### 2.3.2 Alteraciones moleculares del embrión.

Se han reportado daños en lípidos y en proteínas (Priestley, 1986). Con respecto a los primeros las semillas con alto contenido de lípidos se deterioran rápidamente, quizá debido a la degradación de estas moléculas en reacciones de peroxidación que ocurren en el almacén, o a la acción de lipasas ya sea de la semilla o de la microflora circundante (Priestley, 1986). En lo que se refiere a las proteínas, éstas cumplen 3 funciones en la semilla, sirven como material estructural, compuestos de reserva o enzimas, los

efectos que se registran por el deterioro son un cambio en las propiedades de solubilidad de las proteínas de reserva en función del tiempo de almacenamiento de la semilla, ocasionando con esto alteraciones como la proteólisis o polimerización de estas moléculas (Priestley, 1986). Se reportan varios casos de reducción de las actividades enzimáticas la de la  $\beta$ -amilasa,  $\alpha$ -amilasa, catalasa, entre otras (Priestley, 1986), en relación a la semilla. También se ha reportado que el cambio del perfil de isoenzimas que se observa durante la germinación se retrasa en semillas deterioradas o bien no se lleva a cabo, como es el caso de la peroxidasa en arroz (Priestley, 1986).

En cuanto a los carbohidratos, parece ser que ocurre un consumo de las reservas de primera utilización como sería el caso de la rafinosa (Priestley, 1986), por la respiración que se lleva a cabo durante el almacenamiento.

### 2.3.3 Alteraciones ultraestructurales del embrión.

En células de embriones envejecidos, se ha observado una coalescencia de los cuerpos lipídicos, las membranas parecen sufrir un retraimiento, los núcleos presentan forma lobulada, las mitocondrias y cloroplastos, tienen perfiles distorsionados y hay una disminución en el número de polisomas (Priestley, 1986), las células de semillas deterioradas tienen una respuesta osmótica limitada en los primeros estadios de la imbibición, manifestándose en una salida de metabolitos del interior de las mismas, lo cual ha sido utilizada como prueba de vigor (Priestley, 1986).

#### 2.3.4 Movilización de reservas y su regulación

Las reservas contenidas en el endospermo almidonoso constituyen la fuente principal de los sustratos utilizados por el embrión para el desarrollo de la nueva plántula. Pero las reservas del endospermo almidonoso son polímeros que previo a su utilización requieren hidrolizarse y transportarse al sitio de utilización. Al conjunto de eventos bioquímicos que participan en la hidrólisis, transporte y asimilación de estos sustratos se conoce como movilización de reservas (Fig 2). En este proceso se distinguen las siguientes etapas:

a) Síntesis y/o secreción de hidrolasas por la capa de aleurona al endospermo almidonoso.

La síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas por la aleurona constituye el paso limitante de la movilización de reservas. Respecto a la forma como esta etapa se realiza, se acepta que una giberelina denominada ácido gibbérelico (AG<sub>3</sub>) proveniente del embrión interacciona con las células de la aleurona promoviendo la síntesis y secreción de  $\alpha$ -amilasa, glucosidasa, y dextrinasa límite y la secreción de la  $\beta$  1,3-glucanasa, la fosfatasa ácida y la ribonucleasa.

b) Hidrólisis del contenido del endospermo almidonoso (almidón, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos etc.).

En cereales la hidrólisis del almidón constituye el evento principal del proceso de movilización de reservas y es degradado por la acción concertada de varias enzimas, que incluyen  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, enzima desramificadora, fosforilasa y maltosidasa. (Murray, 1984).

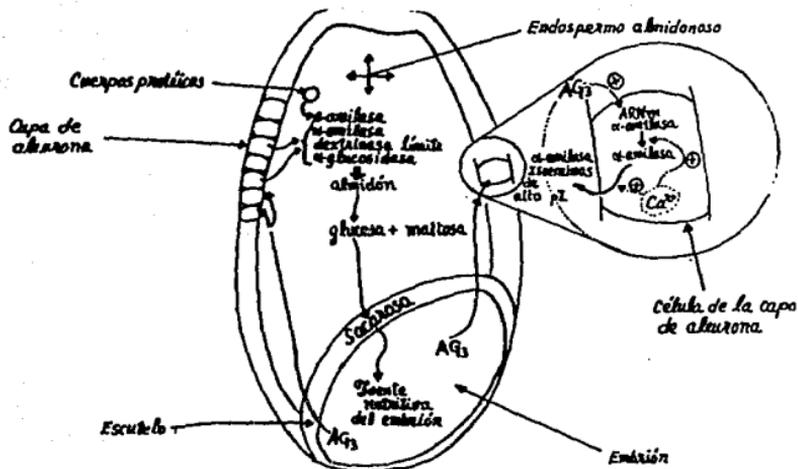


Fig 2. Corte transversal de plántula de cebada mostrando la relación entre la producción de AG3, la síntesis y secreción de hidrolasas, así como la movilización de nutrientes del endospermo.

c) Adaptación química de los productos de hidrólisis para su posterior transporte. Por ejemplo el producto final de la hidrólisis del almidón es una mezcla de glucosa y maltosa, ambos azúcares deben ser transformados a sacarosa en el escutelo, antes de ser transportados al embrión.

d) Transporte de los productos de la hidrólisis hacia el embrión. La posición del escutelo entre el tejido de reserva y el embrión es indicativo del papel crucial que juega en la absorción de los productos de la hidrólisis. La glucosa es absorbida del endospermo, la cual es convertida a sacarosa en el escutelo y transportada a la plántula en crecimiento.

#### 2.3.5. Propiedades enzimáticas de la $\alpha$ -amilasa.

Se ha reportado que el peso molecular de la  $\alpha$ -amilasa en trigo duro rojo de primavera, es de 45000 daltones determinado por coeficiente de sedimentación y de 42500 daltones por electroforesis; el punto isoeléctrico de esta enzima es de 6.1 a 6.2 (Tkachuk y Kruger, 1974).

La actividad enzimática presenta un pH óptimo de 5.5 a 5.6 y una actividad específica de 1465  $\mu$ moles de maltosa por min por mg de proteína a 25 °C, siendo estable a 50°C, y por tiempos cortos también lo es a 60 y 70 °C, presenta una relación lineal en la gráfica de Arrhenius de 20 a 60°C, con una energía de activación ( $E_a$ ) de 8.71 kcal mol<sup>-1</sup>deg<sup>-1</sup> (Tkachuk y Kruger, 1974).

### 2.3.6. Isoenzimas de $\alpha$ -amilasa

En la actualidad esta muy claro claro, que la degradación del almidón se promueve por diversas isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa (Murray, 1984). Este polimorfismo de proteínas es el resultado de la expresión de dos familias de genes diferentes (Nishikawa y Nobuhara, 1971).

La expresión de estos genes da lugar a dos grupos de proteínas que se han clasificado de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), inmunogenicidad y control genético: el grupo de isoenzimas de pI alto y el grupo de isoenzimas de pI bajo.

En el trigo estas familias de genes se denominan  $\alpha$ -Amy 1 a los que codifican para las isoenzimas de pI alto (6.3-7.5) y  $\alpha$ -Amy 2 a los que codifican para las enzimas de pI bajo (4.9 -6.0) teniendo, 11 y 16 alelos respectivamente. Estos genes están codificados en los cromosomas 6 y 7 del genoma de trigo (Ainsworth y col., 1985).

En cebada se denomina  $\alpha$ -Amy-A al grupo de genes que codifican para isoenzimas de bajo pI (4.5-5.1) y  $\alpha$ -Amy-B a los genes cuya expresión da lugar a proteínas de pI alto (5.9-6.6). Para cada uno de estos grupos, se han aislado y caracterizado cuando menos 2 isoenzimas. En el caso del genoma de cebada, estos genes están situados en los cromosomas 1 y 6 (Nolan y Ho, 1988; Priestley 1986). Durante la germinación de la semilla de trigo, los grupos de isoenzimas mencionadas no aparecen simultáneamente, ya que es el grupo de PI alto ( $\alpha$ -Amy 1) el que aparece primero acumulándose a través de la germinación, a diferencia del otro grupo ( $\alpha$ -Amy 2) que lo hace posteriormente (Lazarus y col., 1985).

Una situación similar parece ocurrir con los grupos de isoenzimas

de cebada, solo que invertida, pues el grupo de PI bajo ( $\alpha$ -Amy A) es el que aparece primero y posteriormente lo hace el grupo de PI alto (Jacobsen y Higgins, 1982).

### 2.3.7. Participación de la $\alpha$ -amilasa en la expresión del vigor de la semilla.

Las semillas de trigo recién cosechadas ó almacenadas en condiciones óptimas (temperatura de almacenamiento menor de 20°C y contenido de humedad menor del 12%) germinan rápida y homogéneamente y las plántulas a que dan lugar se caracterizan por un rápido crecimiento heterotrófico y se dice que son semillas vigorosas ó de buena calidad, mientras que aquellas almacenadas en condiciones de alta humedad y temperatura ó en condiciones óptimas por muy largos periodos de tiempo se dice que son semillas deterioradas, de bajo vigor, de baja calidad ó envejecidas y sus parámetros de germinación y crecimiento heterotrófico son menores que las de las vigorosas.

El crecimiento heterotrófico de la plántula depende de la disponibilidad de nutrientes producida por la hidrólisis de las reservas de la semilla. En trigo al igual que en otros cereales, el almidón es el principal compuesto de reserva y la  $\alpha$ -amilasa como ya se mencionó, participa en esta hidrólisis. Esta enzima se sintetiza y secreta en la capa de aleurona en respuesta al ácido giberélico, fitoregulator proporcionado por el embrión durante la germinación.

En trigo se ha demostrado que la pérdida de vigor de la semilla por almacenamiento es concomitante a una menor producción de

$\alpha$ -amilasa por la capa de aleurona así como una disminución en la velocidad del crecimiento heterotrófico de la plántula, con respecto a la semilla fresca.

De lo anterior se concluye que los niveles de  $\alpha$ -amilasa producidos en la semilla contribuyen a la velocidad con la cual se realiza el crecimiento heterotrófico de la plántula, reflejando de esta forma el vigor de la semilla.

### 3) OBJETIVO

- a) Determinar la reducción en la capacidad y/o fidelidad de la síntesis de proteínas en las células de aleurona inducida por el deterioro.
  
- b) Detección de daños en el sistema secretor de la proteína.

#### 4) MATERIALES Y METODOS

##### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos lotes de semillas de trigo Triticum aestivum, variedad Tonichi. Un lote de estas semillas con un contenido de humedad del 5 % se almacenó a 4 °C en un frasco de vidrio con tapon de rosca y muñecas de silica gel, en esas condiciones mantiene sus características de viabilidad y vigor, a estas semillas se les denominó control.

Otro lote de semillas con un contenido de humedad del 12 % se almaceno a 25 °C por el mismo lapso de tiempo en un frasco de vidrio con tapon de rosca, sin silica gel, donde disminuye el vigor y la viabilidad, a estas semillas se les denominó deterioradas.

Ambos lotes presentaron una viabilidad mayor del 92%. El lote control presentó mayor velocidad de germinación y crecimiento heterotrófico que el deteriorado (Rodríguez, 1991).

##### 4.2 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

##### 4.3 OBTENCION DE LAS MEDIAS SEMILLAS

Las semillas seleccionadas se cortan transversalmente con un bisturí y las mitades sin embrión se desinfectaron con una

solución de hipoclorito de sodio de marca comercial (cloralex) al 0.8% para eliminar la contaminación por hongos y bacterias que pudieran tener las semillas en la superficie. Se enjuagaron cinco veces con agua bidestilada estéril, para lavar el exceso del desinfectante.

#### 4.4 INCUBACION DE LAS MEDIAS SEMILLAS

Veinte medias semillas entre 0.58 y 0.60 g de endospermos se agitan a 150 rpm durante 48 horas a una temperatura de 25°C y se colocan en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca conteniendo 5 ml de buffer de incubación.

Buffer de incubación: 20 mM succinato de sodio pH 4.0, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, adicionando y sin adicionar AGs ( $\text{AGs} \times 10^{-5} \text{M}$ ).

#### 4.5 METODOS ANALITICOS

4.5.1 Obtención del extracto para determinar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa.

Las medias semillas se separaron por decantación del medio de incubación y se homogeneiza con 8 ml de buffer de homogeneización (0.2% de acetato de calcio a pH 6.0) en un mortero con arena a temperatura ambiente. El homogeizado se divide en dos partes: una se calienta por 20 min a 65°C y luego se enfría rápidamente y la otra se deja a 4°C durante el mismo tiempo. Ambas porciones se centrifugan a 12,100 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante de cada porción se utiliza como fuente de enzima y se denominan extracto

calentado. (tcc) y no calentado (tsc) (Fig 2.1) El medio de incubación de las medias semillas también se divide en dos alícuotas una se calienta a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 min y se enfría rápidamente y la otra se deja a  $4^{\circ}\text{C}$  durante el mismo tiempo. Ambas alícuotas se centrifugan a  $12,100 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y al sobrenadante se le denomina medio de incubación calentado (scc) y no calentado (ssc), ambas fracciones se utilizan como fuente de  $\alpha$ -amilasa (Fig 2.1)

#### 4.5.2. Determinación de la actividad $\alpha$ -amilasa

Para esta determinación se siguió el método de Chrispeels y Varner (1967), que consiste en medir la disminución del complejo almidón-yodo debido a la degradación del almidón por acción de la  $\alpha$ -amilasa.

Sustrato: se suspenden 0.125 g de almidón soluble en 5 ml de agua bidestilada, calentando a ebullición por 1.5 min, la suspensión se enfría a temperatura ambiente, luego se le agrega 0.25 ml de acetato de calcio 1.3 M, pH 6.0 y 0.25 ml de NaCl 0.1 M, se afora a 50 ml con agua bidestilada y se centrifuga a 3000 rpm en una centrifuga clínica. El sobrenadante se transfiere a un matraz Erlenmeyer. La solución de almidón se preparó el día del ensayo.

Solución de yodo-yoduro de potasio: 0.6 g de iodo metálico sublimado se disuelve en 100 ml de una solución de yoduro de potasio al 6%, se almacenó a  $25^{\circ}\text{C}$  en un frasco ambar. El día del ensayo se hace una dilución de 1:100 con ácido clorhídrico 0.05 M.

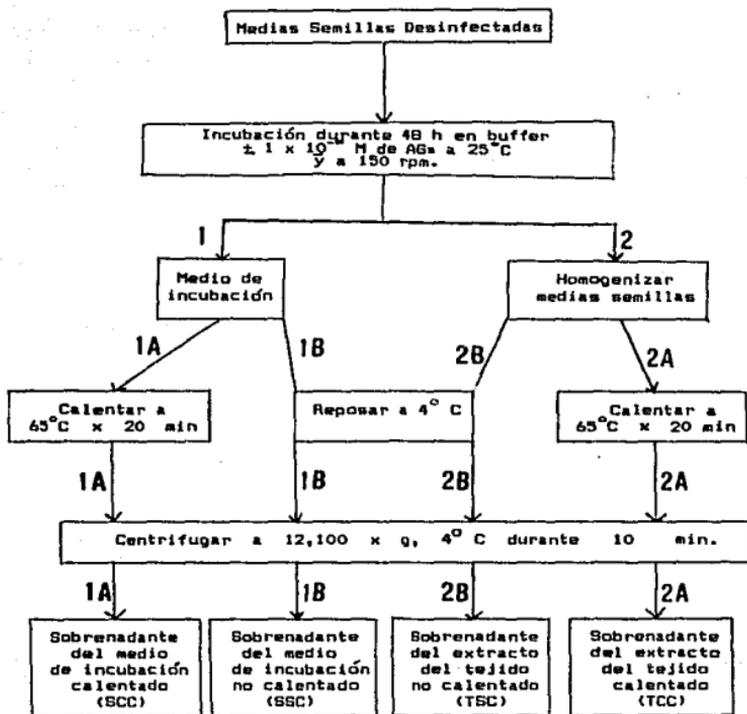


Fig. 2-1. Incubación de las medias semillas y preparación de extractos para la determinación de  $\alpha$ -amilasa.

Método: en tubos de vidrio de 12 x 130 mm se coloca 0.250 ml de la solución de almidón, 3.75 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y 2 ml de iodo-yoduro de potasio (1:100), se lee a 620 nm contra un blanco de reactivos conteniendo 4 ml de agua bidestilada y 2 ml de la solución de I<sub>2</sub>/KI. Esta lectura corresponde a la cantidad de almidón inicial (A<sub>i</sub>) y debe tener una absorción de 1.0. Si es menor que la unidad hay que aumentar el volumen de almidón empleado y si es mayor hay que disminuirlo sin alterar el volumen de 4.0 ml para la mezcla de almidón agua. A 250 µl de almidón se le agrega una alícuota (20-100 µl) del extracto enzimático o del medio de incubación, se incubó a temperatura ambiente por un lapso menor de 10 min. La reacción se finaliza adicionando 2 ml de la solución de I<sub>2</sub>/KI y la cantidad de agua necesaria para completar 6 ml, finalmente se lee a 620 nm. Esta lectura corresponde a la cantidad de almidón que no se consumió en la reacción (A<sub>f</sub>).

La alícuota de extracto enzimático y el lapso de tiempo de reacción (tr) se escogen de tal manera que la absorbancia para el ensayo enzimático (A<sub>f</sub>) fuese entre 0.5 a 0.7 que es el rango de absorbancia de mayor linealidad. La actividad de la enzima se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa} = \frac{(A_i - A_f) / t_r \times \text{vol total de muestra ensayada (ml)}}{\text{vol de la muestra ensayada (ml)}} \times 6$$

La unidad de α-amilasa se definió como la cantidad de enzima que provoca un cambio de 1 D.O/min a una longitud de onda de 620 nm en las condiciones estandares de determinación.

#### 4.5.3. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Lowry (1951) modificado por Peterson (1977).

##### Reactivos

- 1) Solución de carbonato-tartrato cobre (CTC). A una solución de 100 ml de carbonato de sodio al 10% se le añade 0.1 g de sulfato de cobre y 0.2 g de tartrato de potasio.
- 2) Hidróxido de sodio 0.8 M
- 3) Dodecil sulfato de sodio 10% (SDS)
- 4) Reactivo de folín ciocalteu

Solución A: se mezclaron partes iguales de las soluciones de CTC, NaOH, SDS y agua.

Solución B: un volumen del reactivo de folín ciocalteu se mezcló con cinco volúmenes de agua.

Método: a 1 ml de la muestra se le agregan 1 ml de la solución A y se deja reposar por 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se le agregan 0.5 ml de la solución B. se incuba por 30 min a temperatura ambiente. Se lee a 750 nm contra un blanco preparado con 1 ml de agua en lugar de la muestra. Como estándar se utiliza albúmina de suero bovino fracción V libre de ácidos grasos en un rango de concentración entre 0 y 40  $\mu\text{g/ml}$ . En la Figura 2.2 se muestra la curva patrón de seroalbúmina cuyo coeficiente de correlación es de 0.989

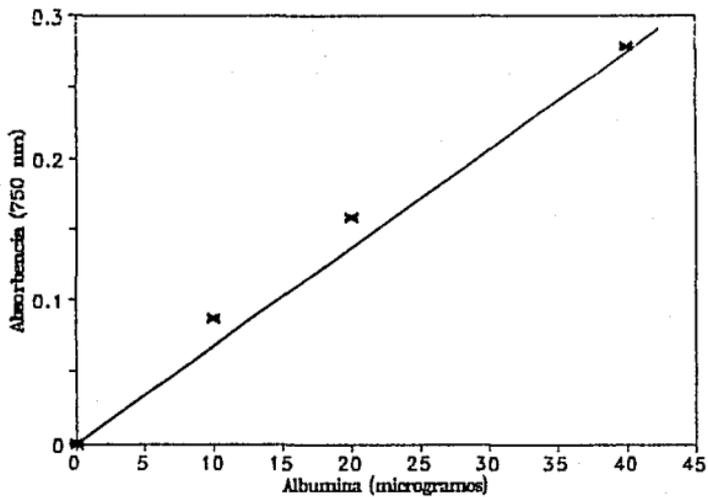


Fig. 2.2.- Curva estandar de seroalbúmina (BSA).

#### 4.5.4. Determinación de la capacidad de síntesis de proteínas de las medias semillas.

Las medias semillas de trigo se incuban por 45 h en buffer de incubación en presencia ó ausencia de AGs, a este tiempo se retira el medio de incubación. Las medias semillas se lavan 2 veces con medio de incubación fresco con y sin ( $\pm$ ) AGs, posteriormente se les agrega a 5 ml del mismo y se aplican a cada uno 25  $\mu$ ci de  $^{35}$ S-metionina, incubandose durante un periodo de tres horas más, se separa el medio de incubación del tejido. El primero se centrifuga y se utiliza directamente como fuente de proteína. El tejido se homogeneiza en un mortero con arena de mar y 3 ml del siguiente medio: 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0.125 M de Tris-HCl (pH 6.8), leupeptina 100 mM, 1 mM de metionina y se centrifugaron a 12,100 x g, el sobrenadante se utiliza para determinar la incorporación de precursor radiactivo a proteína. Para determinar y cuantificar la marca incorporada en proteínas en el sobrenadante del medio de cultivo y del extracto del tejido se siguió el método descrito por Mans y Novelli (1961), se aplican alícuotas de 5  $\mu$ l del extracto anterior sobre discos de papel filtro (Whatman 3 MM de 1 cm de diámetro) y se trataron con diferentes concentraciones de TCA al 10% a 4°C por 10 min, luego en TCA al 5% a 4° durante 5 min, después se hierven en TCA al 5% durante 30 min. En seguida se lava sucesivamente con TCA al 5% a 4°C, con etanol:éter (1:1 v/v) y finalmente con éter. Para evaporar el éter de los discos de papel se meten en el horno a 45°C por 15 min, una vez que los papeles filtros están completamente secos y fríos se introducen en viales que contienen

5 ml de solución de líquido de centelleo (aquasol NEN) y los viales se cuentan por 10 min en un contador de centelleo líquido modelo minaxi  $\beta$  tri-carb serie 4000.

#### 4.5.5 Identificación de las proteínas radiactivas en geles de poliacrilamida.

Las proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$ -Met se analizan en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio en la forma descrita por Laemli (1970). Se utilizan geles en placas que se preparan a partir de una solución patrón cuya composición fué: acrilamida 30% y N,N'metil en bisacrilamida al 0.8%.

La composición final del gel separador fué: 10% de acrilamida, 0.375 M de tris-HCl (pH 8.8) y dodecil sulfato de sodio al 0.1% y se polimeriza con la adición de tetraetilendiamina al 0.025% y persulfato de amonio al 0.0625%. El gel concentrador contiene 3% de acrilamida, 0.125 M de tris-HCl (pH 6.8) dodecil sulfato de sodio 0.1% y se polimeriza de manera similar a los geles de separación. El amortiguador de la electroforesis contiene tris-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1% (pH 8.3).

Se aplican 25,000 cpm por carril disueltas en el buffer del gel concentrador que contiene azul de bromofenol al 0.02%, glicerol al 15% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.07 M.

La electroforesis se corre a temperatura ambiente a 100 volts por una h y luego a 150 volts por 4 h. Terminada la electroforesis el gel se deshidrata por 3 h en una solución de etanol al 30% conteniendo ácido acético al 10% y luego se sumerge por una hora en una solución de 55% de ácido acético, 15% de etanol, 30% de

xileno y 0.4% de 2,5-Difeniloxaxol (PPO) por una hora. Pasado este tiempo se lava con agua 2 veces, 30 min cada vez y se seca en un secador de geles. El gel seco se expone a una película Kodak X-omat K de 8 X 10 plg a  $-70^{\circ}\text{C}$ , Para obtener una mejor resolución se utiliza una pantalla intensificadora. La radiactividad relativa de las bandas se determina por método fluorográfico (Laskey, 1975).

#### 4.5.6. Geles de actividad de $\alpha$ -amilasa.

Una alícuota de extracto enzimático del medio de incubación correspondiente a una unidad de  $\alpha$ -amilasa ó alícuotas equivalentes se colocaron en tubos Eppendorf y se les adiciona igual volumen de un buffer que contiene tris HCl a 0.250 M (pH 6.8), glicerol al 50%, azul de coomasie al 0.04%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.15 M. Estas muestras se corren en un gel plano bajo condiciones no desnaturalizantes. El gel concentrador fue al 3% y el separador a 7.5% ambos contenían 12.5% de glicerol. Los geles se polimerizan en forma similar que los geles desnaturalizantes y se corren a 20 mA por 6 horas. Las bandas de  $\alpha$ -amilasa se revelan embebiendo al gel en almidón al 1% por 30 min seguido de una incubación en acetato de calcio 0.05 M (pH 6.0) a  $50^{\circ}\text{C}$  por 5 min, se retira este buffer y se le agrega solución  $\text{I}_2/\text{KI}$ . El gel se torna de color azul excepto donde se encuentran las bandas de  $\alpha$ -amilasa.

#### 4.5.7 Identificación de $\alpha$ -amilasa por electrotransferencia.

Se corren 75  $\mu$ g de proteína en un gel desnaturalizante de poliacrilamida con las condiciones descritas en la sección 4.5.6. Una vez terminada la corrida, el gel se prepara para la electrotransferencia sumergiéndolo por 30 min en un buffer de transferencia (3 g de tris, 14.4 g de glicina, 200 ml de metanol y 1 g de SDS aforados a 1 litro). Luego se escurre y se coloca en medio de un papel filtro 3MM y otro de nitrocelulosa previamente embebidos en buffer de transferencia, la cual se realiza a 60 mA por un lapso de 19.5 horas.

Una vez terminada se retira la membrana de nitrocelulosa y se embebe en una solución de buffer salino de Tris (TBS) cuya composición final fue 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5) y 0.5 M de NaCl y se agita durante un lapso de 10 min. Posteriormente se reemplaza la solución por una solución bloqueadora de leche descremada al 5% en TBS a agitación constante durante 60 min.

Una vez transcurrido este tiempo se remueve la solución y se sustituye por una solución de buffer salino de Tris Tween 20 (TTBS) cuya composición final fué: 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M de NaCl y 0.05% de Tween-20. Se lava en esta solución dos veces por un lapso de 5 min cada vez y se le agrega el primer anticuerpo llamado anti- $\alpha$ -amilasa en una dilución (1:200) en 200 ml de buffer y con agitación constante durante una h, una vez finalizado este tiempo, se lava dos veces en TTBS durante 5 min cada vez y se agrega 18  $\mu$ l del segundo anticuerpo llamado anti-anti- $\alpha$ -amilasa, en 60 ml de buffer TTBS con agitación

constante durante 1 hora. Al término de este tiempo se lava en buffer TTBS por 10 min cada una y una final de 5 min. Una vez terminado este tiempo se le agrega la solución de desarrollo de color.

Soluciones de desarrollo de color.

A. 1 Litro de buffer de Bicarbonato (0.1 M de  $\text{NaHCO}_3$ , 1.0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.8).

Agregar 8.40 g de  $\text{NaHCO}_3$  a 0.2033 g de  $\text{MgCl}_2$  y aforar a 1 litro con agua destilada y desionizada (dd), ajustar a pH 9.8 con  $\text{NaOH}$ .

B. Se prepara 1 ml de dimetil formamida (DMF) al 70% mezclando 0.7 ml de DMF con 0.3 ml de agua. Se disuelven 30 mg de NBT (azul de *p*-nitro cloro tetrazolio (NBT) en la solución al 70% de DMF.

C. Disolver 15 mg de sal de 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato de *p*-toluidina (BCIP).

Desarrollo de color.

Se mezcla 1 ml de la solución stock de NBT (30 mg/ml) y 1 ml del stock de BCIP (15 mg/ml) en 100 ml de buffer de carbonatos y se agita. Posteriormente se sumerge la membrana de nitrocelulosa en esta solución de color y se agita constantemente durante 15 min, al final de este tiempo aparecen las bandas de proteína, después se enjuaga con agua destilada para parar el desarrollo de color durante 10 min.

#### 4.5.8 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se manejaron con un "análisis de varianza", para k-muestras independientes con un valor de probabilidad del 95% y un factor de confianza de 0.05.

Después se realizó un análisis de intervalo múltiple por el método "gráfico-estadístico Tukey" (Duran, et al. 1987).

## 5) RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO (AG<sub>G</sub>) EN LA PRODUCCION Y SECRECION DE $\alpha$ -AMILASA.

Los niveles endógenos (-AG<sub>G</sub>) de  $\alpha$ -amilasa fueron similares en endospermos de semillas deterioradas y no deterioradas pero las medias semillas deterioradas producen una menor actividad amilolítica como respuesta al AG<sub>G</sub> que la producida por el lote control (Tabla 1). Se ha demostrado que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa se inhibe cuando su secreción de la misma se ve inhibida (Okita y Col, 1979). Asimismo en aleurona de trigo aislada se demostró que la actividad de  $\alpha$ -amilasa secretada por aleurona deteriorada era menor que la actividad de la enzima secretada por el tejido control (Aspinal y Paleg, 1971). Además, durante el deterioro se alteran algunas funciones membranales (Bewley, 1986) y de la pared celular (Priestley, 1986). Lo anterior sugiere que probablemente el sistema secretor de  $\alpha$ -amilasa esté dañado y esto podría contribuir a una menor producción de la misma.

En la Tabla 1 se muestra que la cantidad de  $\alpha$ -amilasa secretada, expresada en porcentaje del total producido por ambos lotes de tejido es similar independientemente de la presencia de inductor en el sistema. Estos datos sugieren que la secreción de la actividad enzimática no está alterada en tejido de bajo vigor por lo que este factor no estaría contribuyendo en forma importante a la menor producción de  $\alpha$ -amilasa inducida por AG<sub>G</sub> en aleuronas de semilla deteriorada.

TABLA 1. EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO (AG<sub>3</sub>) EN LA PRODUCCION DE α-AMILASA EN ENDOSPERMOS DE TRIGO.

Lote <sup>a</sup>	Tratamiento	ACTIVIDAD DE α-AMILASA <sup>1</sup> (U de enzima <sup>2</sup> /20 endospermos)		
		Sn <sup>4</sup>	Tj <sup>5</sup>	Secreción <sup>d</sup> (%)
Control	+AGs	456.78 <sup>e</sup> ± 164.44	85.63 <sup>d</sup> ± 19.44	82.31 ± 4.46
	-AGs	97.51 <sup>b</sup> ± 60.74	41.00 <sup>c</sup> ± 9.59	72.38 ± 5.49
	+AGs	275.28 <sup>f</sup> ± 75.17	64.99 <sup>d</sup> ± 18.77	81.38 ± 4.86
Deteriorado	-AGs	91.83 <sup>b</sup> ± 55.11	34.30 <sup>c</sup> ± 15.98	68.62 ± 13.52

numeros seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes a un α=0.05

1) Promedio de 7 determinaciones ± desviacion estandar.

2) Unidad de α-amilasa (U): cantidad de enzima que provoca un cambio en 1 D. O/min a 620 nm.

3) El peso fresco utilizado para c/lote fue entre 0.58 y 0.60 g.

4) Sn: sobrenadante del medio de incubacion.

5) Tj: sobrenadante del homogeneizado de la aleurona.

6) %: calculado en cada experimento  $\frac{U.Sn}{U.Sn + U.Tj} \times 100$  ± desviacion estandar

## 5.2 PATRON ISOENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -AMILASA PRODUCIDA POR ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS.

La actividad de  $\alpha$ -amilasa inducida por AG<sub>6</sub> en tejido de aleurona de trigo esta constituida por dos grupos de isoenzimas las llamadas de alto pI (6.8-5.5) y las de bajo pI (5.5-4.5) formadas por 4 bandas cada uno (Rodríguez, 1991). En cebada se ha demostrado que las isoenzimas de alto pI contribuye en mayor proporción a la actividad total (Murray, 1984). Lo anterior sugiere que la menor actividad de  $\alpha$ -amilasa producida por endospermos deteriorados podría deberse a que en el tejido deteriorado se sintetizen un menor número de isoenzimas de alto pI ó bien a que el tejido deteriorado sea mas abundante la proporción de isoenzimas de bajo pI respecto a las de alto.

En la Fig 3 y 3A se muestra que a nivel cualitativo el patrón electroforético de isoenzimas producido por ambos tipos de endospermos es similar por lo que se concluye que en el tejido deteriorado ambos grupos de isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa se expresan, sin embargo en ambas figuras tambien se observa que las bandas de las isoenzimas de bajo pI son de mayor intensidad en los endospermos deteriorados que en el control, independientemente de que la muestra este o no calentada (comparar carril A con C y B con D).

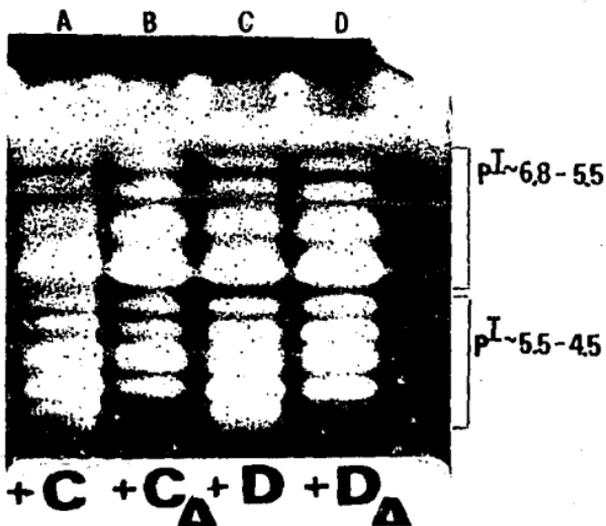


FIG 3. PATRON ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS OBTENIDAS DE A 48 HORAS DE INDUCCION CON  $Ag_2$  ( $\bullet$ )  $1 \times 10^{-3}M$  CALENTADAS ( $\Delta$ ) O NO DURANTE 20 MINUTOS A  $65^{\circ}C$ . Se colocó una alicuota del extracto correspondiente a cantidades equivalentes de aleurona. De izquierda a derecha muestras control (C) y deterioradas (D).

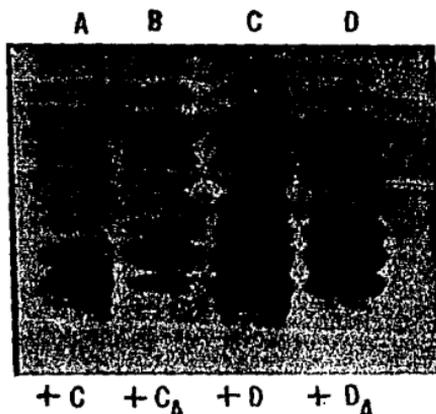


FIG 3A. PATRON ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS OBTENIDAS DE A 48 HORAS DE INDUCCION CON  $Ag_2$  ( $\leftarrow$ )  $1 \times 10^{-5}M$  CALENTADAS ( $\Delta$ ) O NO DURANTE 20 MINUTOS A  $65^{\circ}C$ . Se colocó una alícuota del extracto correspondiente a cantidades equivalentes de aleurona. De izquierda a derecha muestras control (C) y deterioradas (D). Nota: el negativo se obtuvo con la finalidad de observar las diferencias de intensidad de los diferentes isogrupos.

### 5.3 NIVELES Y TERMOESTABILIDAD DEL PEPTIDO DE $\alpha$ -AMILASA EN ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS.

En embriones aislados de trigo se ha demostrado que la eficiencia y fidelidad de la maquinaria de síntesis de proteína disminuye a medida que aumenta el tiempo de deterioro (Bray, 1979). Si en la capa de aleurona de la semilla, el almacenamiento tuviese un efecto similar, los niveles del péptido de  $\alpha$ -amilasa y/o la estabilidad del mismo se verían afectados en forma negativa. La contribución de estos parámetros se estudió cuantificando en ambos lotes la cantidad y termoprecipitación del péptido de  $\alpha$ -amilasa producido en 48 h de inducción. La cantidad del péptido de  $\alpha$ -amilasa se estimó por inmunoréplica (Fig 4), donde la intensidad de las banda de  $\alpha$ -amilasa inmunoprecipitada se estimó en un espectrofotómetro de barrido y se expresó como unidades arbitrarias de área (Tabla 2) La cantidad de péptido acumulado en el sobrenadante del medio de incubación del lote control fué mayor que en el deteriorado, independientemente de si el tejido fué tratado con AGe ó si fué calentado o no (Tabla 2)

El porcentaje de péptido de  $\alpha$ -amilasa que se precipita por calor, es similar para ambos tipos de tejidos, independientemente del tipo de tratamiento, los resultados anteriores indican que la menor respuesta al AGe que presentan los endospermos deteriorados no se debe a la producción de péptidos de  $\alpha$ -amilasa inestables al calor si no más bien a que hay una menor acumulación de péptidos. Esta menor acumulación podría deberse a que la síntesis de proteínas del tejido o a que solo la  $\alpha$ -amilasa se encuentra disminuída. Ambas posibilidades se exploraron en este trabajo.

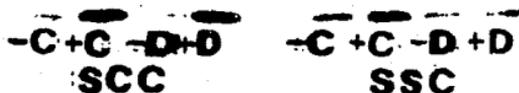


FIG 4. INMUNDREPLICA DE  $\alpha$ -AMILASA ACUMULADA A LAS 48 HORAS EN ENDOSPERMOS CONTROL (C) Y DETERIORADOS (D). Se colocó en cada carril 75  $\mu$ g de proteína para ambos lotes y se procesó como se indica en Materiales y Métodos para la realización de la electrotransferencia. A la izquierda se muestra el efecto del calor a 65°C x 20 min (scc) y a la derecha sin calentamiento (ssc), así como en ausencia (-) y presencia (+) de AGs.

$$\begin{array}{c} \overline{-C} + \overline{C} \rightarrow \overline{D} + \overline{D} \\ \text{SCC} \end{array} \quad \begin{array}{c} \overline{-C} + \overline{C} \rightarrow \overline{D} + \overline{D} \\ \text{SSC} \end{array}$$

FIG 4. INMUNDREPLICA DE  $\alpha$ -AMILASA ACUMULADA A LAS 48 HORAS EN ENDOSPERMOS CONTROL (C) Y DETERIORADOS (D). Se colocó en cada carril 75  $\mu$ g de proteína para ambos lotes y se procesó como se indica en Materiales y Métodos para la realización de la electrotransferencia. A la izquierda se muestra el efecto del calor a 65°C x 20 min (scc) y a la derecha sin calentamiento (ssc), así como en ausencia (-) y presencia (+) de AGs.

Nota: fotografía de la transferencia con menor tiempo de revelado.

**TABLA 2. NIVELES Y ESTABILIDAD AL CALOR DEL PEPTIDO DE  $\alpha$ -AMILASA SINTETIZADO POR ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADO.**

Lote	Tratamiento	NO CALENTADO <sup>a</sup>		CALENTADO <sup>a</sup>	
		Sn	Tj	Sn	Tj
C	+AGe	1674	78	1103	62
	-AGe	352	36	136	47
D	+AGe	878	145	531	66
	-AGe	203	N.D	82	94

-----  
<sup>a</sup>: Unidades arbitrarias de area

Sn: Sobrenadante del medio de incubacion

Tj: extracto del tejido

N.D: no detectado

n = 2

#### 5.4 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS Y DE $\alpha$ -AMILASA DE ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS.

La síntesis de proteínas en endospermos control y deteriorados se cuantificó por medio de incorporación de  $^{35}\text{S}$ -metionina al material precipitable por TCA. En la Tabla 3 se muestran los resultados de dos experimentos independientes realizados con el tejido control y tres con el tejido deteriorado.

La captación de  $^{35}\text{S}$ -metionina fué similar para ambos tipos de aleuronas independientemente de la presencia de AGs (tabla 3, columna 1).

Debido a que las cpm captadas por el tejido fuerón ligeramente diferentes en cada experimento y para cada tratamiento, la capacidad de síntesis de proteínas se expresó como el % de cpm incorporadas a proteína precipitable con TCA del total captado. Al determinar esté parámetro (columna 3, tabla 3) se observó que en el control la adición de AGs al tejido, disminuye la síntesis de proteínas en un 44 % con respecto al tejido del mismo lote pero incubado sin fitorregulador, mientras que el tejido deteriorado el AGs tiende a aumentar este parametro.

Por otra parte, cuando se realizó el patrón de proteínas sintetizadas (Fig 5), se observó que el patrón de proteínas sintetizado y remanente en el tejido fue muy similar para ambos lotes independientemente de la presencia de AGs. Estos resultados son similares a los mostrados por otros autores (Higgins 1984 y Mozer, 1980), donde las diferencias se encuentran a nivel de síntesis de  $\alpha$ -amilasa y ésta se excreta al endospermo almidonoso. El péptido  $\alpha$ -amilasa marcado con  $^{35}\text{S}$ -Met se aisló del resto de las

**TABLA 3.- CAPACIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS DE ENDOSPERMOS CONTROL Y DETERIORADOS**

Lote	Tratamiento	Captación <sup>1</sup> (cpm)	Síntesis de proteína <sup>2</sup> (cpm precipitables por TCA)	Capacidad de síntesis de proteína <sup>3</sup> (%)
Control	-AGs	4.74 x 10 <sup>6</sup>	1.30 x 10 <sup>6</sup>	27.52
		5.64 x 10 <sup>6</sup>	1.37 x 10 <sup>6</sup>	24.38
	+AGs	4.65 x 10 <sup>6</sup>	0.56 x 10 <sup>6</sup>	12.01
		3.45 x 10 <sup>6</sup>	0.57 x 10 <sup>6</sup>	16.42
	-AGs	4.49 x 10 <sup>6</sup>	0.88 x 10 <sup>6</sup>	19.68
		4.13 x 10 <sup>6</sup>	0.78 x 10 <sup>6</sup>	18.92
3.57 x 10 <sup>6</sup>		0.68 x 10 <sup>6</sup>	19.07	
Deteriorado	+AGs	5.06 x 10 <sup>6</sup>	0.66 x 10 <sup>6</sup>	12.83
		4.07 x 10 <sup>6</sup>	1.04 x 10 <sup>6</sup>	25.76
		3.14 x 10 <sup>6</sup>	0.90 x 10 <sup>6</sup>	28.72

cuentas captadas por minuto (cpm)

1.- cpm captadas de <sup>35</sup>S-Metionina x 20 endospermos

2.- cpm incorporadas a proteína x 20 endospermos

3.- % =  $\frac{\text{cpm incorporadas en material precipitable en TCA}}{\text{cpm incorporadas al tejido}} \times 100.$



FIG 5. PATRON DE PROTEINAS SINTETIZADAS. Se colocaron 50,000 cpm del extracto del tejido (Tj) de las aleuronas control (C) y deteriorada (D) inducidas en ausencia (-) y presencia (+) de AGe 1  $\times 10^{-3}$  M durante un lapso de 3 horas y se corrieron en un gel de acrilamida SDS. Al final de la corrida se procesó como se indica en Materiales y Métodos para la realización de una fluorografía. proteínas sintetizadas por inmunoprecipitación.

El péptido precipitado se corrió en un gel desnaturalizante, la banda de  $\alpha$ -amilasa se puso de manifiesto por fluorografía y su síntesis se cuantificó determinando las cpm en la banda. Los resultados se muestran en la Tabla 4. La cantidad de  $\alpha$ -amilasa sintetizada fue mayor en el tejido tratado con AGE que en el no tratado para ambos tipos de tejido.

De acuerdo a la Fig 3 los dos isogrupos de  $\alpha$ -amilasa se expresan en ambos tipos de tejidos, sin embargo, la proporción de cada uno de estos isogrupos no puede determinarse en este tipo de experimento. Bien podría ser que en los tiempos utilizados para medir  $\alpha$ -amilasa radiactiva, en el tejido deteriorado se sintetizen en mayor proporción las isoenzimas de alto contenido de metionina (bajo pI), mientras que en el control se están sintetizando de manera preferencial las de alto pI. Cuando se cuantificó la cantidad de péptido acumulado (Tabla 2) se encontró casi dos veces más péptido en el tejido control que en el tejido deteriorado y si la actividad es reflejo del número de sitios catalíticos (número de moléculas de  $\alpha$ -amilasa) habrá mayor actividad en el tejido control que en el deteriorado.

Los resultados anteriores sugieren que la menor actividad de  $\alpha$ -amilasa observada en tejido de bajo vigor se debe a la menor producción de péptido de  $\alpha$ -amilasa muy probablemente por una menor síntesis de uno de los isogrupos.

**Nota:** Mientras esta tesis se encontraba en proceso de revisión, en el laboratorio se determinó que la radiactividad acumulada como  $\alpha$ -amilasa, cerca del 60 % se incorporaba a las bandas de bajo pI.

**TABLA 4.- SINTESIS DE  $\alpha$ -AMILASA**

Lote	Tratamiento	$\alpha$ -amilasa/endospermo (CPM inmunoprecipitadas)
Control	-AGs	9145
	+AGs	30356
Deteriorado	-AGs	16301
	+AGs	38094

---

CPM: cuentas por minuto.

n = 4

#### 6) CONCLUSION

- 1.- Las aleuronas provenientes de semillas de bajo vigor responden al tratamiento con AGa produciendo  $\alpha$ -amilasa aunque en menor cantidad que en semillas control (tabla 1).
- 2.- La capacidad de síntesis de proteína que presenta la aleurona deteriorada es ligeramente menor que la del tejido control (tabla 3).
- 3.- La adición de AGa al tejido produce una mayor síntesis de proteína en el tejido deteriorado que en el control (tabla 3).
- 4.- Cuando se cuantificó la  $\alpha$ -amilasa como péptido acumulado se encontró que el control acumulaba un 52% mas que el deteriorado (fig 4 y tabla 2). Mientras que cuando se cuantificó su síntesis por incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met (tabla 4) la aleurona deteriorada produce un 26% mas de  $\alpha$ -amilasa que el control (tabla 4).
- 5.- Los cambios fisiológicos y bioquímicos que sufre la aleurona durante el deterioro limitan la síntesis de uno de los isogrupos de  $\alpha$ -amilasa.

## BIBLIOGRAFIA

Aisworth, C. C., Doherty, P., Edwards, K.G.K., Martienssen, R.A., Gale, M. A. (1985). Allelic variation at  $\alpha$ -amilase loci in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 70:400

Aspinall, D. and Paleg, L. G. (1971). The deterioration of wheat embryo and endosperm function with age. *Journal of Experimental Botany.* 22:925-935

Bewley, J. D. (1986). Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. *Physiology of seed deterioration.* Crop Science Society of America, Inc. Cap 2:27-45

Bewley, J. D. and Black, M. (1978). The structure of seeds and their food reserves. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.* Springer Verlag. V. 1 Cap 2:7-40

Bewley, J. D. and Black, M. (1978). Imbibition, germination and growth. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.* Springer Verlag. V. 1 Cap 4:106-131

Bewley, J. D. y Black, M. (1978). Mobilization of reserves. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.* Springer Verlag. V. 1 Cap 6:177-244

Bewley, J. D. and Black, M. (1982). Viability and longevity. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Springer Verlag. V. 2 Cap 1:1-59

Chrispeels, M. J. and Varner, J. E. (1967). Gibberellic acid enhanced synthesis and release of alfa amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. Plant Physiol. 42:378-406

Copeland, L. O. (1976). Seed and seedling vigor. Principles of seed Science and Technology. Burgess publishing Co. Cap. 7:149-183

Fincher, G. B. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40:305-346

Hallon, J. M. (1986). Physiology of seed deterioration. Crop Science Society of America. Inc. Cap 5:89-99.

Higgins, T.V.J. (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Annu. Rev. Plant Physiol. 35:191-221

Jacobsen, J. V., Higgins, T.J.V. (1982). Characterization of the  $\alpha$ -amylases synthesized by aleurone layers of himalaya baley in response to gibberellic acid. Plant Physiol. 70:1647-1653

Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the haed bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1975). Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56:335-341

Lazarus, C. M., Baulcombe, D. C. Martienssen, R. A. (1985).  $\alpha$ -amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. Plant Molec Biol. 5:13-24

Mans, R. J. and Novelli, G. D. (1961). Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter paper disk method. Archs. Biochem. Biophys 94:48-53

Mayer, A. M. (1980/1981). Control mechanisms in seed germination. Israel Journal of Botany. Vol 29

Mozer, T. J. (1980). Control of protein synthesis in barley aleurona layers by the plant hormones giberelic acid and abscisic acid. Cell 20:479-85

Murray, R. D. (1984). Mobilization of polysaccharide reserves from endosperms. seed physiology germination and reserve mobilization. Academic Press. Australia. Cap 4 117-157

Nishikawa, K., Nobura, M. (1971). Genetic studies of  $\alpha$ -amylase isozymes in wheat I. Location of genes and variation in tetra- and hexaploid wheat. Japan J. Genetics. 46:343-353.

Nolan, R.C., Ho, D. T. (1988). Hormonal regulation of gene expresión in barley aleurone layers. *Planta*. 174:551-560.

Okita, T. W., DeCalera, R., and Lawrence, R. (1979). Synthesis of a possible precursor of  $\alpha$ -Amylase in wheat aleurone Cells. *Plant Physiol*. 63:195-200

Padilla-Martinez, I. (1987). Participación de la nitrato-reductasa en la expresion del vigor de plantulas de trigo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Quimica. UNAM.

Pedreguera-Quintana, P. (1991). Efecto de la temperatura en la actividad de nitrato-reductasa de plantulas de maiz de bajo vigor. Tesis de licenciatura. U.N.A.M.

Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal. Biochem*. 83: 346-356

Priestley, D. A. (1986). Loss of seedquality in storage. *Seed aging*. Comstock Publishing Associates. Cap 3:39-73

Priestley, D. A. (1986). Morphological, structural, and biochemical changes associated with seed aging. *Seed aging*. Comstock Publishing Associates. Cap 7:125-193.

Pollack, B. M. and Ross, E. E. (1972). Seed and seedling vigor in viability of seeds. Sry Univ Press. Cap 6:317-387

Roberts, E. H. (1972). Storage, environment and the control of viability. Viability of seed. Univ Press. Cap. 2. 12-57

Roberts, E. H. (1972). Loss of viability and crop yields. Viability of seeds. Syracuse Univ Press. Cap 10:307-391

Rodríguez-Penagos, M. (1991). Actividad de  $\alpha$ -amilasa en aleurona de semillas de trigo deterioradas. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.

Tkachuk, R., Kruger, J.E. (1974). Wheat  $\alpha$ -amylases. II physical characterization. Cereal Chem. 51:508-529.

Tiburcio-Trejo, L. (1986). Caracterización bioquímica de la capa de aleurona de semillas de bajo vigor. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM.