



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

CAMPUS IZTACALA

**“ACTIVIDAD DE DOS ATPasas DE H⁺ EN
FRACCIONES MICROSOMALES DE EJES
EMBRIONARIOS Y EMBRIONES DE MAIZ
DURANTE LA GERMINACION”.**

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

OSCAR RICARDO GARCIA RUBIO

DRA. MARINA GAVILANES RUIZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

A mis padres Tere y Ricardo, que quiero tanto.

A mi tia Nati y toda mi familia.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Marina Gavilanes Ruíz**, por el apoyo que me brindó durante la elaboración de la tesis y su atinada dirección; además de la confianza que siempre me otorgó así como por todo lo que de ella aprendí.

A **Jorge Sepúlveda**, por su paciente ayuda en la toma de las fotografías al microscopio electrónico de la fracción microsomal y de las vesículas de membrana plasmática

A la **Biol. Emma Bertha Gutierrez Cirlos**, por el tiempo que nos brindó en el análisis densitométrico de los dot blot.

Al **Dr. Ramon Serrano** por habernos proporcionado el anticuerpo antiATPasa de Membrana Plasmática.

Al **Dr. Aquiles Carballo** que nos proporciona la semilla de maíz utilizada en todos los proyectos del laboratorio.

A la **M. en C. Sobeida Sánchez Nieto de Ortuño**, por sus atinadas correcciones en el escrito de la tesis.

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)**, con el número de proyecto IN206691.

INDICE

INTRODUCCION	1
Estructura de la semilla de maíz.....	2
Germinación.....	3
Estructura membranar.....	4
Transporte membranar.....	6
Tipos de ATPasas-H ⁺	9
ATPasa mitocondrial.....	10
ATPasa del cloroplasto.....	10
ATPasa de tonoplasto.....	11
ATPasa-H ⁺ de la membrana plasmática.....	14
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	21
Material biológico.....	21
Siembra de semillas, embriones y ejes embrionarios.....	21
Porcentaje de germinación.....	21
Toma de agua.....	22
Cuantificación del consumo de oxígeno.....	22
Obtención de la fracción microsomal.....	23
Determinación de la concentración de proteína.....	23
Medición de hidrólisis de ATP.....	24
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	25
Inmunoréplica en Western.....	26
Western en rejilla (Slot blot).....	27
Microscopía electrónica.....	28

RESULTADOS	29
Porcentaje de germinación.....	29
Toma de agua.....	30
Consumo de oxígeno.....	32
Actividad de hidrólisis de ATP en fracciones microsomales de embriones y ejes embrionarios.....	34
Inmunoréplica en Western de la ATPasa de membrana plasmática en la fracción microsomal de embriones y ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos.....	38
Microscopía electrónica de la fracción de vesículas de membrana plasmática purificadas por reparto en un sistema de polímeros en dos fases.....	41
DISCUSION	46
Selección de los tiempos para el estudio de la ontogenia de las ATPasas.....	46
Ontogenia de las ATPasas de membrana plasmática, de tonoplasto y mitocondrial.....	48
Inmunodetección de la ATPasa de la membrana plasmática.....	51
Microscopía electrónica.....	54
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCION

Estructura de la semilla de maíz.

La formación de una semilla se inicia con la fertilización del óvulo, y cuando se encuentra totalmente desarrollada consta de una cubierta protectora (testa), material de reserva (endospermo) y un embrión (figura 1A).

La cubierta protectora o testa se origina de la planta progenitora y normalmente se desarrolla de los integumentos del óvulo. Su importancia es considerable para la semilla, ya que en ocasiones es la única barrera entre el embrión y el medio externo. La testa es generalmente una capa dura y su naturaleza protectora se debe a la presencia de una cutícula externa y otra interna, las cuales pueden contener ceras o grasas y una o más capas de una pared celular. Tales características confieren a la testa ciertas propiedades de impermeabilidad, con lo que se logra un efecto mecánico regulador sobre el metabolismo de la semilla.

El material de reserva o endospermo, se encuentra en todas las semillas - con excepción de la familia Orchidaceae- y es la fuente de donde el embrión toma los nutrimentos necesarios para su desarrollo, hasta que es capaz de elaborarlos por sí mismo. El endospermo está constituido en su gran mayoría por almidón (90% aprox.), aunque también contiene aceites y proteínas. El endospermo se origina de la fusión de dos núcleos polares con uno de los núcleos espermáticos. La capa de células más exterior del endospermo es citológicamente distinta y constituye la capa de la aleurona (1).

El embrión es el resultado de la fertilización de una célula huevo por una célula masculina en el saco embrionario. Un embrión maduro de maíz consiste de un escutelo -que posee un alto contenido de aceites-, un epicotilo con cinco hojas embrionarias encerradas en el coleóptilo, un hipocotilo y una raíz primaria meristemática encerrada en una coleorriza (2 y 3).

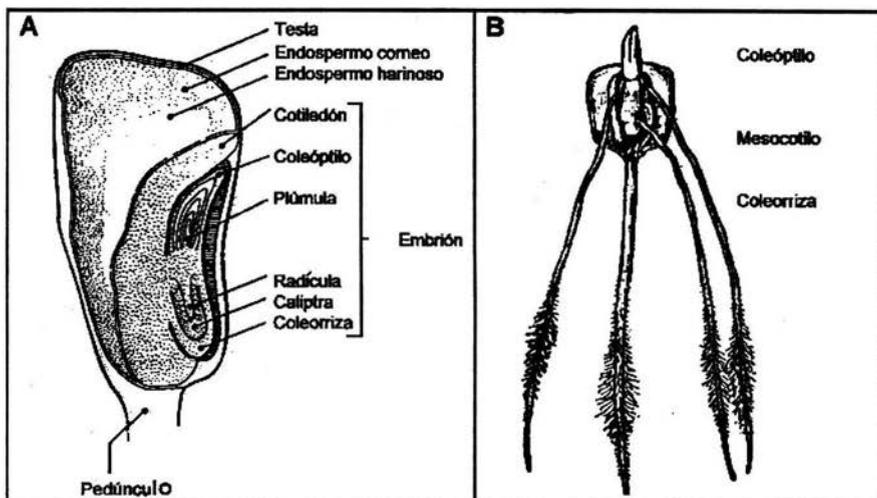


Figura 1. Estructura de la semilla (A) y de la plántula (B) de maíz. (Adaptado de Bewley, J. and Black, M. 1986. Ref. 1).

Al término de la maduración de la semilla se inicia un proceso gradual de desecación natural en donde la semilla pierde agua hasta llegar a un 10% de contenido de humedad aproximadamente. Esta pérdida de agua conlleva a una reducción al mínimo de la actividad metabólica. Una vez seca la semilla puede permanecer en estado de latencia por largos períodos de tiempo, como en el caso de semillas ortodoxas como la del maíz (4).

Germinación.

La germinación es un conjunto de procesos mediante los cuales la semilla abandona el estado de latencia en que se encuentra, para reanudar su actividad metabólica y reiniciar su desarrollo, que culminará con la formación de una nueva planta.

Para que una semilla pueda germinar es necesario por un lado, que reúna ciertas características propias o intrínsecas, como que la semilla esté estructuralmente bien formada y haya alcanzado su madurez fisiológica; y por otro, que se encuentre en condiciones ambientales favorables, como suministro de agua, una temperatura adecuada, aeración suficiente, iluminación, etc. (1).

Fisiológicamente el proceso de germinación arranca cuando la semilla se embebe (cuando es puesta en contacto con el agua) y se da por completado con la protrusión de la radícula.

Con la entrada de agua comienza la hidrólisis de los polímeros de reserva. Una vez hidrolizados, sus productos (aminoácidos y sacáridos principalmente) son exportados desde el endospermo hacia el eje embrionario a través de las diferentes membranas de las células del escutelo y del eje embrionario fundamentalmente (4). Con este aporte de nutrimentos las células del eje embrionario comienzan a ejercer su potencial metabólico, a crecer, alargarse y aún a dividirse, para ir conformando los tejidos que constituirán las diferentes partes de la plántula.

Estructura membranal.

Una célula vegetal contiene varias estructuras membranosas. Las membranas aíslan regiones específicas de la célula que realizan tareas especializadas, tales como la fosforilación oxidativa de la mitocondria, la degradación de macromoléculas en el lisosoma etc. Las enzimas unidas a membranas catalizan reacciones que difícilmente podrían llevarse a cabo en un medio acuoso. Otras proteínas de la membrana sirven de puntos de anclaje para la estructuración del citoesqueleto. Existen también proteínas que proporcionan a ciertas moléculas una vía de paso a través de la membrana, permitiendo el movimiento selectivo de distintas sustancias de un compartimiento a otro.

Todas las membranas, sea cual sea su origen, contienen tanto proteínas como lípidos. La proporción de ambos varía enormemente en las diferentes membranas (por ej. la membrana mitocondrial interna tiene un 76% de su peso constituido por proteínas, mientras que la membrana de la mielina sólo tiene un 18%). Todas las membranas contienen una proporción importante de fosfolípidos, como fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, etc. y de esfingolípidos, como la esfingomielina.

Los carbohidratos son constituyentes importantes de muchas membranas. Están unidos tanto a proteínas como a lípidos, constituyendo las glucoproteínas y los glucolípidos respectivamente. Los carbohidratos son especialmente abundantes en las membranas plasmáticas de células eucariontes pero no se han encontrado en membranas procariotas (5).

A pesar de su composición variable, todas las membranas biológicas tienen un patrón estructural común. Todas contienen una bicapa de fosfolípidos como unidad estructural básica. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas: tienen una parte hidrofóbica (insoluble en agua) y una parte hidrofílica (soluble en agua). Las fuerzas físicas fundamentales en la construcción de las membranas biológicas son las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de ácidos grasos de las moléculas lipídicas. Estas interacciones dan por resultado la formación de la bicapa fosfolípida, una hoja que contiene dos capas de moléculas de fosfolípidos cuyas cabezas polares se disponen frente al medio acuoso, mientras que sus cadenas de ácidos grasos forman un interior hidrofóbico continuo (fig. 2).

Las propiedades de las membranas varían entre distintos orgánulos y tipos celulares en función de las proteínas presentes en ellas. Tales proteínas de membrana pueden llevar a cabo multitud de funciones, como el transporte de moléculas hacia el interior o el exterior de la célula, o la recepción de señales tanto hormonales como de otras sustancias químicas, así como su transmisión al interior celular.

Las proteínas de membrana se han clasificado en proteínas integrales de membrana (llamadas también proteínas intrínsecas), las cuales tienen uno o más segmentos que interaccionan directamente con el "núcleo" hidrofóbico de la bicapa fosfolípida. Las proteínas integrales de membrana solo se pueden extraer por solubilización de la membrana gracias a la acción de detergentes que desplazan los lípidos unidos a las cadenas laterales hidrofóbicas de las proteínas.

Por otro lado encontramos a las proteínas periféricas o extrínsecas, las cuales no interaccionan directamente con el "núcleo" hidrofóbico de la membrana. Por lo regular se unen a la membrana indirectamente por interacciones con los grupos de las cabezas polares de los lípidos. La mayor parte de las proteínas periféricas son solubles en soluciones acuosas (5 y 6).

Todas estas características quedan bien ilustradas en el modelo del mosaico fluido, que fué propuesto en 1972 por Singer y Nicholson (7), (figura 2).

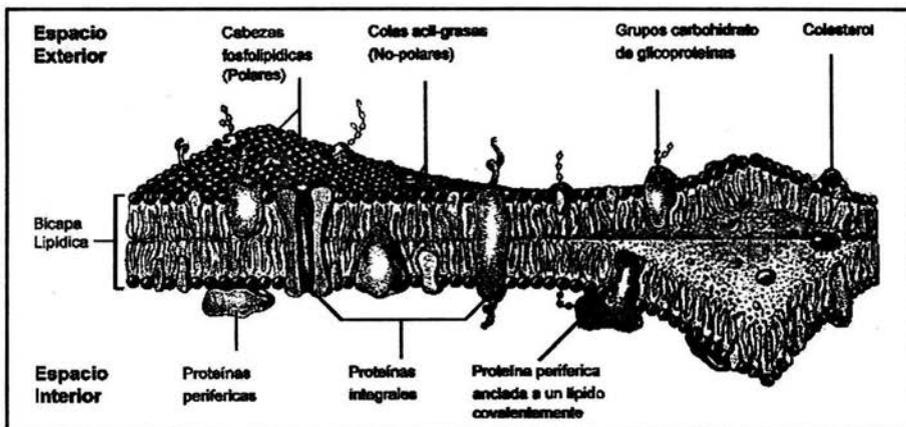


Figura 2. Modelo del mosaico fluido (Lehninger, A. Nelson, D. and Cox, M. 1993. Ref. 8).

Transporte membranar

La membrana plasmática actúa como una barrera semipermeable entre la célula y el medio extracelular. Esta permeabilidad debe ser altamente selectiva para asegurar que moléculas como la glucosa, aminoácidos y lípidos puedan

entrar cuando se requieran. De la misma manera los orgánulos de la célula deben mantener su propio medio interno para poder desempeñar sus diferentes funciones.

La entrada de iones y moléculas a la célula y sus diferentes orgánulos es facilitada por moléculas de transporte específicas que se encuentran en las membranas y que funcionan uniendo y transportando los solutos a ambos lados de las membranas. Las diversas proteínas específicas integrales de membrana denominadas translocasas, permeasas o acarreadores, integran el sistema de transporte membranar.

El transporte a través de la membrana puede ser de dos tipos: pasivo o activo. El primero se da a favor de un gradiente de concentración, por lo que no requiere de un gasto de energía metabólica. En cambio el transporte activo requiere de un gasto energético celular, pues se da en contra de un gradiente de concentración del soluto transportado. Por esta razón es necesario que el sistema de transporte esté acoplado a algún proceso que le proporcione energía libre (5).

Podemos distinguir dos tipos de transporte activo impulsados por la energía libre: el transporte activo primario, donde la energía es proporcionada directamente por una reacción química que involucra al sistema de transporte y el transporte activo secundario, que es promovido por la energía almacenada en gradientes iónicos recién creados por el transporte activo primario. El movimiento desfavorable de un soluto está acoplado y se mueve por el flujo de un segundo soluto en favor de su gradiente de concentración. A este fenómeno se le conoce como cotransporte paralelo (simporte) o como cotransporte antiparalelo

(antiporte), dependiendo de si los solutos se mueven en la misma dirección o en direcciones opuestas respectivamente.

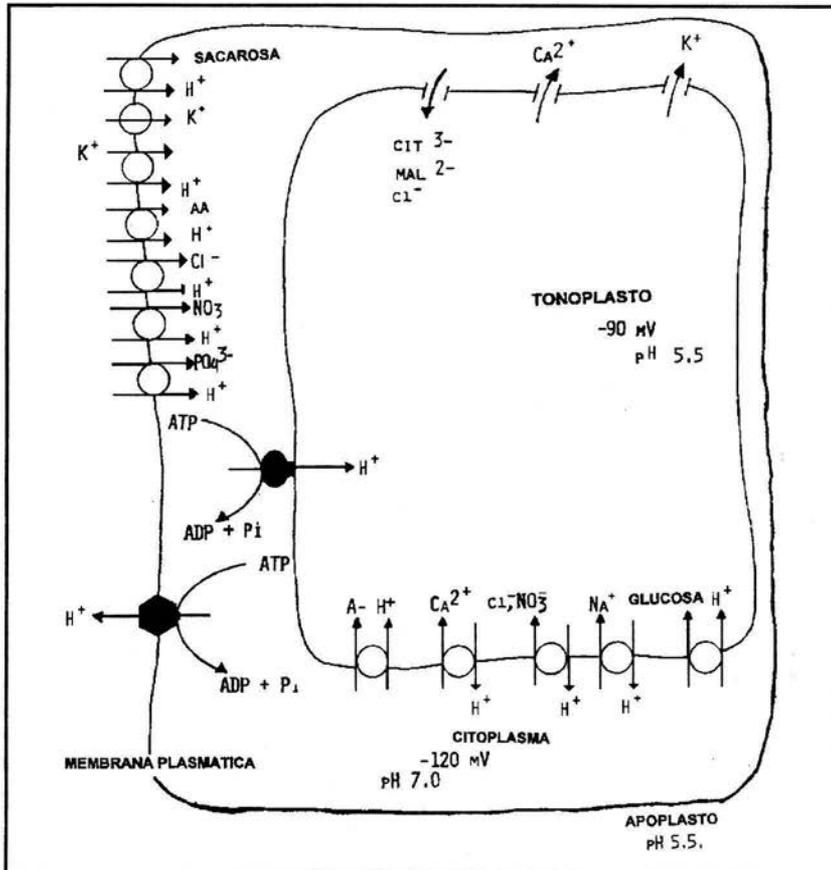


Figura 3. Célula vegetal mostrando la función y localización de las ATPasas transportadoras de H^+ , una ATPasa sensible a vanadato localizada en la membrana plasmática y otra sensible a nitrato situada en la membrana del tonoplasto. De acuerdo con la Hipótesis Quimiosmótica de Mitchell, el gradiente electroquímico de H^+ puede estar acoplado al transporte de otros solutos (cationes, aniones y solutos orgánicos).

El proceso de transporte primario en plantas promueve el transporte electrogénico de protones. El gradiente electroquímico de protones o fuerza proton-motriz provee la fuerza impulsora del movimiento de una amplia variedad de nutrimentos tanto orgánicos como inorgánicos. Existen dos principales mecanismos para producir este gradiente de protones en células vegetales. Uno depende de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) catalizada por ATPasas incluídas en la membrana y/o promovido por la oxidación de sustratos reducidos por reacciones redox (9) (figura3).

Tipos de ATPasas-H⁺.

Se han reportado varias ATPasas de H⁺ en plantas. Estas difieren entre sí en estructura, función y localización celular. Por la reacción que catalizan se han dividido en dos grupos: las ATP sintetasas y las ATP hidrolasas.

Las ATPsintetasas se encargan de la formación de ATP a partir de ADP más Pi y están presentes en mitocondrias, cloroplastos y bacterias, usando el mismo mecanismo para generar el ATP: en todos los casos las fuentes inmediatas de energía para la síntesis del ATP son los gradientes de concentración de protones que involucran a un gradiente de potencial eléctrico y a un gradiente de pH a través de la membrana. Este movimiento de protones a través de una serie de proteínas específicas de membrana es llevado a cabo paralelamente a una transferencia de electrones en sus centros redox y se halla acoplado al sistema de síntesis de ATP (5 y 9).

En plantas existen dos ATPsintetasas: la ATPasa mitocondrial y la del cloroplasto (ATPasas tipo-F).

ATPasa mitocondrial.

Esta enzima puede ser dividida en un complejo hidrofóbico integral estrechamente enlazado a la estructura membranal (F₀) y una proteína hidrofílica periférica (F₁) enlazada a la F₀. Para la F₁ se han identificado 5 polipéptidos α , β , γ , δ y ϵ . Su probable estequiometría es 3 α , 3 β , γ , δ y ϵ . En plantas de maíz el peso de las cinco subunidades es de α 58; β 56; γ 35; δ 22 y ϵ 3-12 kDa. El sitio catalítico se encuentra en la subunidad β , aunque puede involucrar a la subunidad α . La fracción F₀ esta compuesta por tres polipéptidos a, b y c; pero la composición de éstos no es la misma para todas las ATPasas. Se reconocen como inhibidores para esta ATPasa a la azida y a la oligomicina (9).

ATPasa del cloroplasto.

Esta enzima posee una estructura similar a la de la ATPasa mitocondrial (3 α , 3 β , γ , δ y ϵ). El complejo CF₀-CF₁ se encuentra enlazado a la membrana del tilacoide, con la porción CF₁ mirando hacia el estroma. Los polipéptidos de CF₁ tienen un peso molecular neto de alrededor de 400 kDa, las subunidades pesan α 59; β 56; γ 37; δ 17.5 y ϵ 13 kDa. Los genes que codifican para las subunidades α , β y ϵ están localizados en el genoma del cloroplasto, mientras que para las subunidades γ y δ se localizan en el genoma nuclear. Los polipéptidos de la fracción CF₀ pesan: a, 15; b, 12.5 y c, 8 kDa.

La ATPasa del cloroplasto es una enzima latente pero se activa por la exposición a la luz, el sitio de inhibición parece encontrarse en la subunidad ϵ . Su actividad puede ser estimulada por Ca²⁺, Mg²⁺ y calmodulina (9).

Por otro lado las ATPasas hidrolíticas, se encargan de hidrolizar ATP procurando ADP más Pi, con lo que generan un gradiente electroquímico de

protones transmembranal, que da como resultado cambios de pH en los diferentes compartimentos celulares. Estos gradientes a su vez son utilizados para el transporte de solutos a través de las diferentes membranas, lo cual ha sido denominado transporte secundario (10).

Las ATP hidrolasas más importantes en las membranas de plantas son la del tonoplasto (ATPasas tipo-V) y la de la membrana plasmática (ATPasas tipo-P).

ATPasa de H⁺ de tonoplasto.

La purificación parcial de esta enzima en varias especies vegetales ha mostrado que posee una estructura multimérica que incluye tres polipéptidos de 67-70, 55-60 y 16-17 kDa, que son comunes para todas las ATPasas tipo-V. La composición de las subunidades de las ATPasas de betabel, frijol mungo, cebada y avena es similar en general, pero existen algunas diferencias remarcables. La ATPasa de betabel y cebada contiene una subunidad de 100-115 kDa que parece estar ausente en ATPasas de frijol mungo y avena. En betabel existe una subunidad de 52 kDa y no la subunidad de 34-37 kDa encontrada en las otras especies. Estas variaciones en el número de subunidades sugiere la presencia de algunos subtipos de ATPasas tipo-V en plantas o bien problemas técnicos en su purificación.

La enzima está compuesta por un gran sector periférico y un sector integral de la membrana. El sector periférico puede ser dissociado de la membrana con reactivos caotrópicos (como el KI) que inactivan la hidrólisis de ATP y la actividad de transporte de H⁺. El sector periférico es visible por

microscopía electrónica, se ve como una protuberancia de unos 9-10 nm de diámetro. La vista al microscopio electrónico revela una distribución irregular de estructuras que contienen seis subpartículas que podrían ser tres copias de las subunidades de 70 y 60 kDa (11).

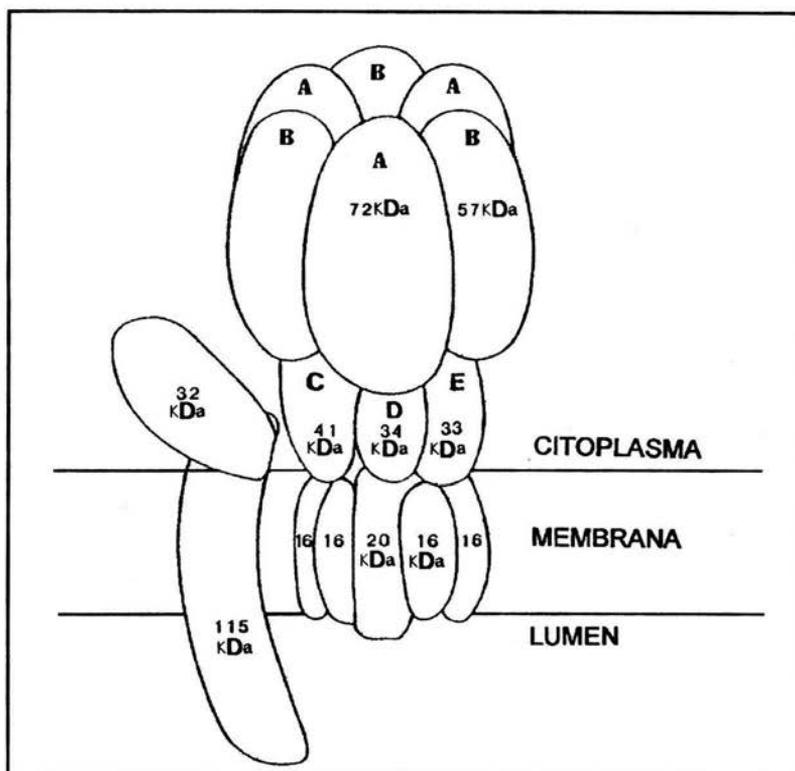


Figura 4. Esquema de la ATPasa de tonoplasto (Nelson, N. 1989. Ref. 11).

El mayor componente integral de la membrana es la subunidad de 16 kDa, de la que se encuentran alrededor de seis copias. Este polipéptido es soluble en una mezcla de cloroformo/metanol. Las subunidades de 32, 13 y 12 kDa de la ATPasa de avena junto con la subunidad de 16 kDa son consideradas parte del

sector integral de la membrana, que no es solubilizada por reactivos caotrópicos. En betabel se incluye una subunidad de 100 kDa (12).

La mayor subunidad pesa alrededor de 70 kDa y tiene un sitio de enlace para el nucleótido, que es el sitio de hidrólisis (sitio catalítico). La subunidad de 60 kDa tiene un sitio de enlace para nucleótidos, que ha sido considerado como un sitio de regulación. En la subunidad de 16 kDa existe un sitio de enlace para el DCCD que inhibe la actividad por modificación covalente del polipéptido. Los papeles de las otras subunidades no están claros. Algunas podrían servir para el anclaje del sector periférico y otras para la regulación o el ensamblaje, de la enzima (12) (figura 4).

La ATPasa es relativamente insensible a cationes incluyendo álcalis y cationes orgánicos tales como el tris y la colina. En general los aniones estimulan la actividad de la ATPasa en vesículas microsomales con una secuencia de selectividad: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^-$. El Cl^- estimula directamente la hidrólisis de ATP, pues disipa el potencial de membrana. El Cl^- en presencia de ionóforos (como la gramicidina) disipa el potencial eléctrico aumentando la actividad de la ATPasa (13).

El nitrato (NO_3^-) y el DIDS (ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-etilbenedisulfónico) son inhibidores relativamente específicos. La sensibilidad al NO_3^- ha sido usada para identificar y localizar a la ATPasa en diferentes preparaciones para poder caracterizar sus propiedades (13).

El ATP es el sustrato preferente de la enzima, aunque puede usar GTP y PPI que son efectivos parcialmente para generar un gradiente de protones. La ATPasa tiene una K_m para el ATP de 0.1-0.2 mM. La estequiometría H^+/ATP de

la ATPasa de tonoplasto ha sido determinada tanto en vacuolas enteras como en vesículas de tonoplasto y es de $2\text{H}^+/\text{ATP}$. El pH óptimo para la actividad de la enzima está entre 7 y 8 (12 y 13).

La ATPasa de tonoplasto parece tener un papel fisiológico muy importante. En la vacuola son almacenadas proteínas, particularmente en legumbres. También pueden ser compartamentalizados metabolitos secundarios nocivos para la célula que podrían actuar como insecticidas o fungicidas. El exceso de nutrimentos es transportado inmediatamente a través del tonoplasto. Se ha demostrado que el NO_3 es almacenado en las vacuolas de hojas y es devuelto al citoplasma bajo la influencia de la luz. En plantas halófitas la compartamentalización de Na^+ en la vacuola es muy importante para la osmorregulación de la célula (12). En plantas crasuláceas (CAM) se produce una enorme cantidad de ácido málico durante la fijación nocturna de CO_2 , éste es transportado al interior de la vacuola en la fase oscura y es devuelto al citoplasma en la fase luminosa. Tales procesos de transporte están acoplados al movimiento de protones efectuado por la ATPasa del tonoplasto lo cual además contribuye al control del pH citoplasmático (14).

ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

La ATPasa de membrana plasmática ha sido bien caracterizada en varios tejidos vegetales, siendo aislada de diversas especies. La ATPasa de membrana plasmática tiene un peso molecular de aprox. 100 kDa (15).

Los análisis hidropáticos de la estructura primaria obtenidos a partir de diversos algoritmos han permitido desarrollar un modelo hipotético de la topología de la ATPasa- H^+ de membrana plasmática (figura 5). La región NH_2 -

terminal se localiza en el citoplasma, el péptido cruza a través de la membrana para formar de 8 a 10 posibles hélices transmembranales. La variación de las hélices transmembranales está relacionada con el arreglo de la región COOH-terminal, para la que se han propuesto dos modelos: i) un único segmento transmembranal con la región COOH-terminal fuera de la célula y ii) un asa formada por dos segmentos transmembranales con el COOH-terminal del lado citoplasmático (16 y 17). Un trabajo publicado más recientemente propone la existencia de 12 cruces transmembranales. Estas discrepancias reflejan las limitaciones de los diferentes métodos para la predicción de los cruces transmembranales (18) (figura 5).

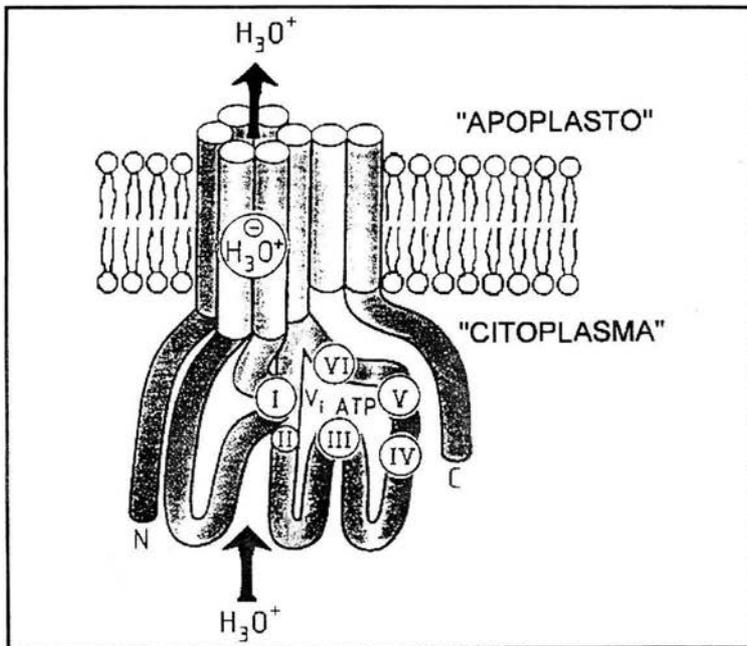


Figura 5. Modelo de la ATPasa de membrana plasmática para plantas y hongos (Serrano. R. 1992. Ref. 23).

Las cuatro o seis primeras hélices transmembranales han sido propuestas para representar un posible canal donde atraviesan la membrana los H^+ (16 y 17).

Las regiones más conservadas de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática son las asociadas con: el enlace del nucleótido (ATP) y la formación de la fosfoenzima (dominio cinasa), la descomposición de la fosfoenzima (dominio fosfatasa) y el sitio de fosforilación (dominio transduccional) (17).

De acuerdo a la predicción de la estructura secundaria, la ATPasa tiene un 20% de su estructura embebida en la membrana distribuida a lo largo de los 8-10 segmentos transmembranales, el 70% (la parte más hidrofílica) está expuesta al citoplasma y sólo el 5% se encuentra expuesta al espacio extracelular (19) (figura 5).

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es altamente específica para su sustrato, el ATP. Los resultados obtenidos con preparaciones parcialmente purificadas, indican que el verdadero sustrato de la enzima es el complejo Mg-ATP. Este tiene una K_m de 0.3-0.7 mM. Aunque el Mg^{2+} es probablemente el cofactor fisiológico, puede ser reemplazado por Mn^{2+} , Co^{2+} ó Zn^{2+} . Su actividad máxima se alcanza alrededor de los 38° C y su pH óptimo es de 6.5 (13 y 15).

Existen varios inhibidores de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática pero los más poderosos son el Cu^{2+} ($CuSO_4$) y los mercuriales (como el p-cloromercuribenzenosulfonato), el cual produce una inhibición completa con 10-20 μM . A pH alcalino la ATPasa es inhibida por modificación covalente con

concentraciones milimolares de N-etilmaleimida. Estos inhibidores, no son específicos para la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y son muy tóxicos para la célula. El orto-vanadato es un inhibidor muy efectivo, el 50% de inhibición es obtenido con 2-10 μM y una inhibición total es alcanzada con 50-100 μM . La eritrocina B también es efectiva y ha sido probada en ensayos *in vivo* e *in vitro*, la inhibición total se alcanza con 10-30 μM . El dietilestilbestrol es un inhibidor débil (200 μM para la inhibición total). La inhibición por el DCCD (diciclohexilcarbonamida) es dependiente del tiempo, alcanzando el 50% de inhibición con 10-30 μM en 10-30 min. Estos tres últimos inhibidores no son específicos para la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (20).

La ATPasa es estimulada por cationes en especial por el K^+ , aunque también la estimulan el Rb^+ , Na^+ , Cs^+ y Li^+ . La estimulación por K^+ es la única que se conoce en la que existe una interacción directa entre catión y enzima. Existen otros estimulantes como las auxinas y la fusicocina (las cuales tienen un modo de acción más complejo, que posiblemente se da a través de otra(s) macromolécula(s)). La fusicocina, una fitotoxina, tiene varios efectos en las células vegetales, como la hiperpolarización del potencial de membrana, incremento del flujo de protones, incremento del crecimiento y de la apertura de los estomas.

Estudios de biología molecular han revelado la existencia de 3 genes para la ATPasa de membrana plasmática en *A. thaliana* AHA1, AHA2 y AHA3 (19), de 6 a 8 genes muy relacionados codifican para las diferentes isoformas en *L. esculentum* (21) y 3 genes se han encontrado en *N. plumbaginifolia*, cPMA1, cPMA2 y cPMA3 (22). Estos estudios han mostrado que la ATPasa es codificada por múltiples genes, dando por producto a varias isoformas que pueden jugar

diferentes papeles fisiológicos en distintos tejidos durante el desarrollo de la planta.

Fisiológicamente la ATPasa-H⁺ de membrana plasmática juega un importante papel en la regulación del pH, dado que es el más eficiente sistema usado por las células vegetales para bombear protones hacia el espacio extracelular, de hecho la ATPasa es activada por la acidificación del citoplasma, por hiperpolarización inducida por cargas ácidas y por entrada de K⁺ (24). La alcalinización intracelular activa la síntesis de ácido málico (15). Con la consecuente alcalinización del pH citoplasmático, el pH del espacio apoplástico y el espacio de la pared celular se acidifican produciendo en ella la protonación de ciertos grupos, que producen un aflojamiento de la pared celular, requisito indispensable para el crecimiento celular; asimismo, el pH alcalino del citoplasma posiblemente activa la división celular (25). El gradiente eléctrico generado por la ATPasa propicia flujos iónicos, lo cual produce cambios de turgor en las células guardia que llevan a la apertura de los estomas (26). La ATPasa actúa como bomba primaria, ayudando a que se de el transporte secundario. Iones y moléculas cargadas de tal manera que no pueden atravesar la membrana, lo hacen junto con los protones bombeados por la ATPasa desde el citoplasma, de esta manera son transportados al interior celular iones, aminoácidos, sacáridos y otras moléculas pequeñas que utiliza la célula como intermediarios metabólicos (9).

HIPOTESIS

Debido a que en las fases iniciales del proceso de germinación, existe una necesidad de transporte a través de las membranas celulares para la reactivación del metabolismo y la elongación celular, y debido a que tanto las ATPasas del tonoplasto como la de la membrana plasmática pueden ayudar a estas funciones, en este trabajo se propone conocer la expresión catalítica de estas enzimas en la germinación del maíz.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la actividad enzimática de las ATPasas del tonoplasto y de la membrana plasmática durante las fases tempranas de la germinación del maíz.

Objetivos particulares:

Establecer los tiempos más convenientes para estudiar la actividad de las ATPasas de membrana plasmática y del tonoplasto dentro del período inicial de la germinación del maíz, usando parámetros fisiológicos.

Detectar la actividad de hidrólisis de ATP de las ATPasas de membrana plasmática y del tonoplasto en fracciones microsomales de embriones y ejes embrionarios de maíz, utilizando inhibidores específicos para cada ATPasa.

Detectar a la ATPasa de membrana plasmática por medio de un anticuerpo específico, en fracciones microsomales de embriones y en la fracción U2 (fracción purificada de vesículas de membrana plasmática).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico.

La semilla de maíz utilizada fue el híbrido Montecillo A6 o 2 CPS-1, que fue proporcionada por el Dr. Aquiles Carballo del Colegio de Posgraduados de Montecillo, Chapingo. La semilla se almacenó en frascos ámbar con sílica gel (como desecante) a 4° C. Tanto embriones como ejes embrionarios fueron obtenidos por disección manual, cuidando de remover completamente el endospermo y el escutelo respectivamente.

Siembra de semillas, embriones y ejes embrionarios.

Semillas, embriones y ejes embrionarios fueron esterilizados en hipoclorito de sodio al 2% por 30 segundos y enjuagados con agua desionizada 2 veces, por 2 minutos cada vez. Una vez estériles fueron sembrados en cajas petri de 3.5" de diámetro, con un papel filtro de base, al que se le añadieron 7 ml de agua desionizada estéril. Luego se incubaron en obscuridad a una temperatura de 29° C por los períodos de 1, 2, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 70 h en los distintos experimentos.

Porcentaje de germinación.

Fueron germinados 30 especímenes de cada tejido (semilla, embrión y eje embrionario) acomodando 30 en cada caja petri. Cuando ya no cabían en la caja fueron reacomodados en cajas adicionales. Se consideró germinada a una

semilla cuando la radícula había protruído de la testa, al embrión cuando la radícula sobresalía del escutelo 3 mm y al eje embrionario cuando la radícula medía 5 mm de longitud. Los tiempos registrados fueron 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 70 h. El experimento se hizo por triplicado.

Toma de agua.

Se incubaron embriones y ejes embrionarios (30 por caja petri) a los tiempos 1, 2, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 70 h. A cada tiempo se pesaron en una balanza analítica, tratando de quitar el exceso de agua del tejido, y posteriormente fueron devueltos a la incubación. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad. El experimento se repitió tres veces.

Cuantificación del consumo de oxígeno.

Se utilizó un oxímetro con un electrodo de Clark. El oxímetro se calibró a 100% de oxígeno con un buffer de fosfatos (KH_2PO_4 50 mM pH 7.0) y agitación constante, a continuación se calibró el 0% de oxígeno agregando ditionita al buffer anterior. El electrodo se enjuagó con agua desionizada, después con etanol diluido y nuevamente con agua desionizada. Se corroboró si el oxímetro había sido bien calibrado al 100% de oxígeno y al 0% de oxígeno. Una vez calibrado se procedió a la medición del consumo de oxígeno. Para ello se colocaron 3 embriones o 5 ejes embrionarios por cada tiempo en la cubeta del oxímetro, a la que se le agregaron 3 ml del buffer de fosfatos. Los especímenes se mantuvieron en agitación constante. Los valores obtenidos se expresaron en η átomos de O_2 /especimen. Este experimento se llevó a cabo tres veces usándose los especímenes procedentes del lote de la toma de agua.

Obtención de la fracción microsomal.

Todo el procedimiento fue llevado a cabo a una temperatura de 4° C. Los especímenes se congelaron con nitrógeno líquido al terminar los tiempos de imbibición y se homogeneizaron en seco con un mortero hasta obtener porciones muy finas. Una vez homogeneizado se le adicionó el medio de homogeneización, que consta de 250 mM de sacarosa, 70 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM de ácido etilendiaminotetracético-NaOH (pH 7.0) y en el momento de su uso se le adicionaron: 15 mM de β -mercaptoetanol, 4mM de ditioneitról (DTE), 10 μ g/ml de quimostatina, 50 μ g/ml de n-tiosil-l-fenilalanina clorometil cetona (TLCK) y 100 μ g/ml de $n\alpha$ -p-tosil-l-lisina clorometil cetona (TPCK). El tejido fue homogeneizado por segunda vez con un triturador de tejidos a 12,000 rpm aprox. por 4 min. El homogeneizado obtenido se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 1,300 g por 10 min., el pellet se descartó (fracción nuclear) y el sobrenadante se recentrifugó a 13,000 g por 10 min. El pellet se eliminó (fracción mitocondrial) y el sobrenadante nuevamente se centrifugó a 80,000 g por 1 h. El pellet (fracción microsomal) se resuspendió en un buffer que contenía 250 mM de sacarosa, 2 mM de BTP-Mes (pH 7.0), 10% (v/v) de glicerol y en el momento de su uso se le adicionaron: 1mM de DTE, 5 μ g/ml de quimostatina, 50 μ g/ml de TLCK y 100 μ g/ml de TPCK. La fracción microsomal obtenida fue dividida en porciones pequeñas y almacenada a -70° C.

Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry modificado por Peterson (27). Las muestras a determinar, se llevaron a un volumen final de 1 ml con agua desionizada.

A cada muestra se le adicionaron 0.1 ml de ácido deoxicólico (Na-DOC) al 0.15 %, a continuación se les agregó 1 ml de la solución A que consta de 0.8 N de NaOH, 10 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), solución stock de CTC (formado por 10 % Na_2CO_3 , 0.2 % $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 % CuSO_4) y agua desionizada, mezcladas en proporción 1:1:1:1. Por último se les agregó 0.5 ml de la solución B (un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu + 5 volúmenes de agua desionizada). Se agitó la mezcla y se dejó reposar por 30 min. La absorbancia se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 65.

Para la construcción de la curva patrón de proteína se prepararon diferentes concentraciones de albúmina de suero de bovino (BSA) de 0 μg a 60 μg , en incrementos de 10 μg , llevándose cada muestra a un volumen final de 1 ml con H_2O desionizada. La concentración de proteína se calculó restando la absorbancia del buffer de resuspensión a la absorbancia de las diferentes muestras e interpolando el valor resultante en la curva patrón de BSA.

Medición de hidrólisis de ATP.

El ensayo de la actividad de hidrólisis de ATP se llevó a cabo añadiendo 10 μg de proteína de la fracción microsomal a 150 μl del medio de reacción, constituido por 250 mM de sacarosa, Tris-HCl 20 mM (pH 7.0), CCCP 7 μM , ATP-Tris 10 mM (pH 7.0) y 10 mM MgCl_2 . Para inhibir específicamente las ATPasas de membrana plasmática, de tonoplasto, de mitocondria y la fosfatasa ácida presentes en la fracción microsomal se usaron: 5 mM de Na_3VO_4 , 100 mM de KNO_3 , 100 mM de NaN_3 y 100 mM de Na_2MoO_4 respectivamente.

Se permitió que la reacción procediera durante 1 h a 30° C, al término de este tiempo la reacción se detuvo por la adición de 150 μl de SDS al 24 % (para

una concentración final del 12 %). La hidrólisis de ATP se midió a través de la cuantificación del Pi liberado por el método de Chifflet modificado por González *et al.* (28). Este consiste en añadir 300 μ l del reactivo B-C (una mezcla de ácido ascórbico al 12 % y molibdato de amonio al 2 %, en proporción 1:1 v/v), se dejó reposar de 4 a 7 min a temperatura ambiente y se adicionan 450 μ l de la solución D (que consta de citrato de sodio 2 %, arsenito de sodio 2 % y ácido acético 2 %). Se dejó que procediera la reacción por 20 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 850 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 65.

Para la curva estándar se usaron concentraciones de 0 a 60 μ g con un incremento de 10 μ g de KH_2PO_4 , completándose el volumen con agua desionizada. El cálculo de la actividad específica se hizo restando los valores de la absorbancia del blanco a la absorbancia de la muestra problema e interpolando el resultado en la curva estándar de fosfatos. Los resultados se expresaron en η molas de Pi/h/mg.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los geles de poliacrilamida utilizados tenían un grosor de 0.75 mm usando la técnica de Laemmli (29). Los geles fueron del 10% (gel separador) y de 3% el gel concentrador. El gel separador se hizo mezclando 0.32 ml de Tris 3.75 M pH 8.6, 1.34 ml de acrilamida 30% más 0.8% bis-acrilamida, 21.8 μ l de SDS al 20% y 2.3 ml de agua, adicionando por último los catalizadores de la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida: el persulfato de amonio al 10%, 8 μ l y del TEMED 4.8 μ l. Se esperó a que gelificara y se agregó entonces el gel concentrador que constaba de 0.228 ml de Tris 0.5 M pH 6.6, 0.168 ml de acrilamida 30% más 0.8% bis-acrilamida, 8.64 μ l de SDS al 20% y 0.79 ml de

agua, adicionando por último el persulfato de amonio al 10%, 4.6 μ l y el TEMED 2.9 μ l.

La proteína, 25 μ g, se aplicó en los pozos del gel, previamente solubilizada en una solución desnaturalizante en proporción 1:1. Según la técnica de Laemmli (29), esta solución o buffer de muestra es una solución que contiene 8 M de urea, 0.5 M de Tris-HCl pH 6.6, 10 % de SDS, 5 % de β -mercaptoetanol y 0.01 % de azul de bromofenol. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 130 mV por 1.5 h, empleando un buffer de corrida que consta de 0.192 M de glicina, 0.025 M de Trizma y 0.1 % de SDS. El gel se tiñó sumergiéndolo en una solución de azul brillante R-250 de Coomasie, disuelto en ácido acético glacial al 10% y metanol al 50%. Cuando el gel se sobretiñó se usó una solución de metanol al 50% y ácido acético glacial al 10%, para desteñirlo. El gel se deshidrató entre dos hojas de celofán para su conservación.

Inmunoréplica en Western

El gel a transferir se lavó por 15 min a temperatura ambiente en un buffer de transferencia que constó de 25 mM de trizma base, 0.192 M de glicina, 20 % de metanol y 0.1 % de SDS. Posteriormente el gel fue transferido en este mismo buffer según describe Towbin (30) por 2 h a 230 mA.

La nitrocelulosa se lavó por 10 min en TBS (20 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 0.5 M de NaCl). Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 2 % (disuelta en TBS) por 2 h a 37° C. Después del bloqueo se lavó dos veces a temperatura ambiente por 5 min con TTBS (20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M de NaCl y 0.05 % de tween-20). Una vez lavado se agregó el primer anticuerpo (Ab-

NaCl y 0.05 % de tween-20). Una vez lavado se agregó el primer anticuerpo (Ab-antiATPasa de membrana plasmática) en dilución 1:300 manteniéndolo por 6 h a temperatura ambiente. Este anticuerpo fue donado por el Dr. Ramón Serrano y reacciona contra el segmento central de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *A. thaliana*. Se aplicaron dos lavados a temperatura ambiente por 5 min con TTBS y se añadió el segundo anticuerpo Ab-anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 por 6 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó dos veces por 5 min. con TTBS y una tercera vez por 5 min. con TBS a temperatura ambiente. Por último se le adicionó la mezcla para desarrollar color. Son necesarias tres soluciones stock: el buffer de carbonatos (0.1 M de bicarbonato de sodio, 1 M de MgCl₂ pH 9.8) NBT (30 mg de NBT disuelto en una solución de DMF al 70%) y el BCIP (15 mg de BCIP en 1 ml de DFM). La mezcla se preparó justo antes de su uso. 1 ml del stock de NBT se mezcló con 1 ml del stock de BCIP en 100 ml del buffer de carbonato. La inmunoréplica se colocó en esta mezcla y se dejó en agitación de 5-30 min para esperar la aparición de bandas. Para detener la reacción, la membrana se lavó en agua. La inmunoréplica se guardó en una bolsa de polietileno con agua y NaN₃ a 4° C en obscuridad.

Western en rejilla (Slot blot).

Para esta técnica se usó el aparato Miniprotean II Screen de Bio-Rad. El aparato se ensambló colocando una hoja de nitrocelulosa de 12 por 3.5 cm, la cual se había humedecido previamente en TBS por 15 min. En cada ranura se aplicaron 25 µg de proteína preparada de igual manera que para la técnica de geles en poliacrilamida-SDS. Como blanco se usó la solución de muestra. Por último cada ranura se enjuagó en TBS para evitar que quedara proteína en las

paredes de la ranura y se difundiera fuera de ella, dejándose secar con el vacío conectado. La réplica en ranura se reveló siguiendo el mismo método que para la réplica transferida electroforéticamente a papel de nitrocelulosa.

Microscopía Electrónica.

Las micrografías fueron tomadas en el Instituto de Fisiología Celular por el Señor Jorge Sepúlveda.

Se fijaron 50 μ l de la fracción microsomal o de la fracción U2 (fracción de membrana plasmática purificada por un sistema de reparto de polímeros en dos fases) de embriones secos o embebidos 1 h en 200 μ l de glutaraldehído al 3%, se centrifugó la mezcla por 5 min en una microcentrífuga Beckman E, manteniéndose en la solución por 2 h a 4° C. Se centrifugó nuevamente por 5 min y el pellet obtenido se resuspendió en un buffer de fosfatos 100 mM pH 7.2. Para pos fijar la muestra se eliminó el buffer de fosfatos y se añadió una solución de Osmio al 2% dejándose reposar por 2 h. La muestra se centrifugó por 5 min para eliminar la solución de Osmio y el pellet se resuspendió en el buffer de fosfatos. Se procedió a la deshidratación de la muestra comenzando con una solución inicial de etanol al 30% hasta llevarla al etanol absoluto. La muestra deshidratada se infiltró en óxido de propileno y Epon 812 (relación 1:1) por 48 h. Finalmente la muestra se incluyó en Epon 812 horneándola por 48 h a 60° C. Los cortes de la muestra fueron hechos en un ultramicrotomo Rayher. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 2%, 30 min y citrato de plomo por 30 min. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico JEOL 12EX-II.

RESULTADOS

Porcentaje de germinación.

Se midió el porcentaje de germinación de semillas, embriones y ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de imbibición (Fig 6). Todos alcanzaron un 100% de germinación, aunque a diferentes tiempos. El que todos alcanzaran el mismo máximo de germinación denota que el embrión y el eje embrionario no fueron dañados al ser aislados del resto de la semilla. Por otro lado, se observó que las tres estructuras tienen diferente velocidad de germinación, los ejes embrionarios alcanzaron el 100% de germinación a las 60 h. Los embriones alcanzaron el 50% de germinación a las 30 h y germinaron totalmente a las 72 h. Por otro lado observamos que los ejes embrionarios y los embriones tienen cinéticas de germinación parecidas, a las 12 h ambos comenzaron a germinar rápidamente aunque los ejes embrionarios en menor proporción que los embriones. Las semillas en cambio germinaron más lentamente al principio, pero a las 40 h (cuando alcanzan el 50% de germinación) aceleraron su desarrollo alcanzando el 100 % de germinación antes que los embriones (60 h).

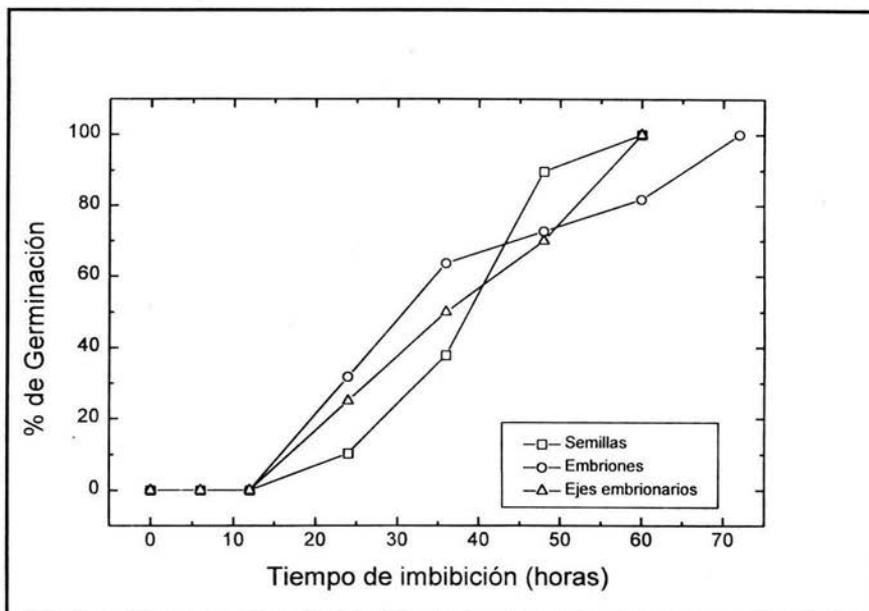


Figura 6. Cinética de germinación de semillas, embriones y ejes embrionarios.

Toma de agua.

La cinética de toma de agua de los embriones y ejes embrionarios se registró en un curso total de tiempo de 72 h (Fig. 7A y B). Dichas cinéticas se asemejan a la reportada para semillas enteras (Fig. 8) (1). En el primer par de horas de imbibición se registra una rápida entrada de agua a los embriones y ejes embrionarios (I), después disminuye la velocidad de toma de agua (II), (ésta podría corresponder a la fase en que se ha reportado que empiezan a ocurrir los cambios metabólicos necesarios para que el embrión germine), después hay una fase de toma rápida de agua (III), que parece preceder a una fase más lenta (IV).

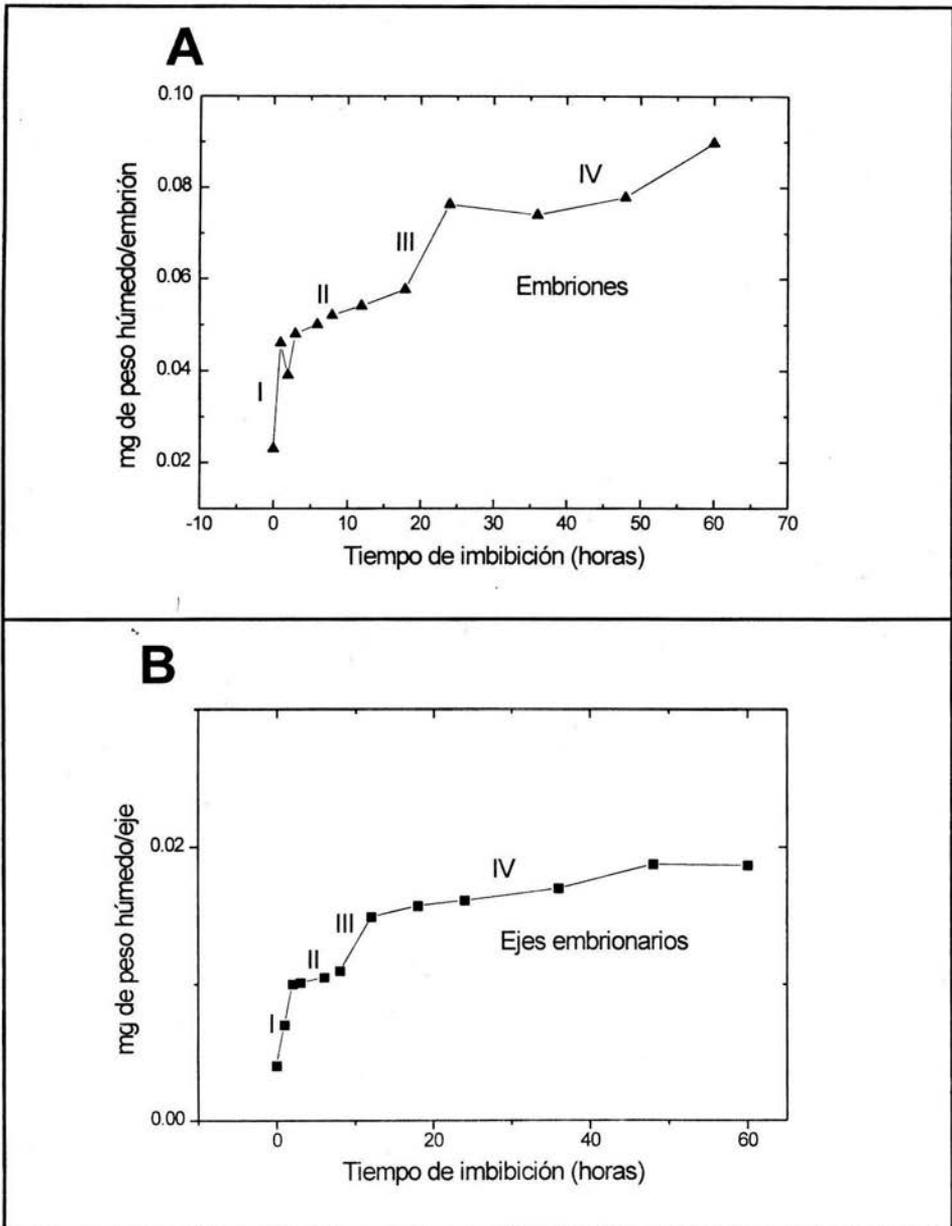


Figura 7. Cinética de toma de agua de embriones y ejes embrionarios de maíz.

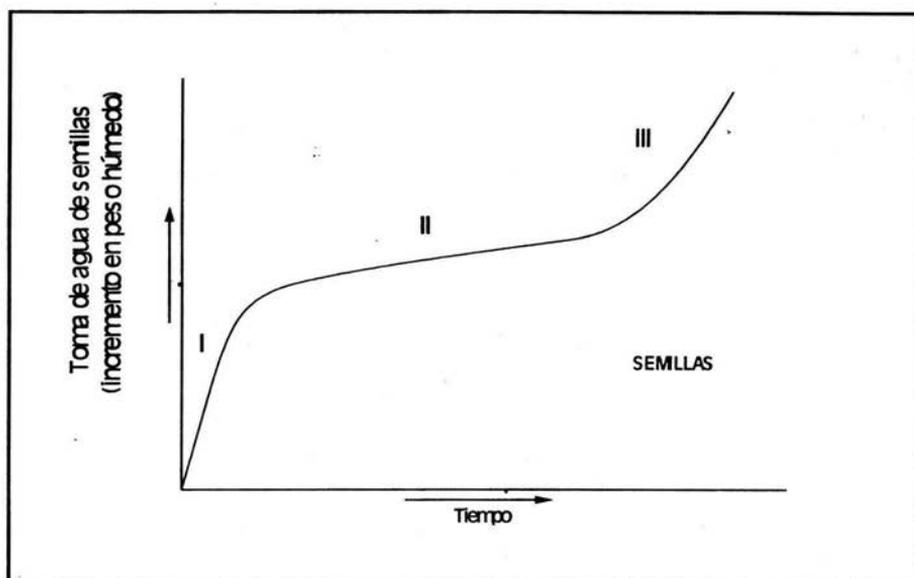


Figura 8. Patrón de la toma de agua de semillas enteras en germinación (adaptado de Bewley and Black, Ref. 1).

Consumo de Oxígeno.

El consumo de oxígeno de embriones y de ejes embrionarios se midió en un curso de tiempo total de 72 h (Fig. 9 A y B). Inicialmente, no se detectó consumo de oxígeno, cuando provienen de especímenes secos, pero después de una hora de imbibición, el consumo de oxígeno se incrementó considerablemente (de 0 a 6.8 η átomos de O_2 /embrión y de 0 a 3.5 η átomos de O_2 /eje). El embrión y el eje mantuvieron un rápido incremento en el consumo de oxígeno hasta las 10 h, de este punto en adelante el consumo de oxígeno continuó incrementándose pero más lentamente en ambas estructuras. Cuando calculamos el consumo de oxígeno por mg de tejido, el eje embrionario presentó una mayor actividad en el consumo de oxígeno registrando a la hora de

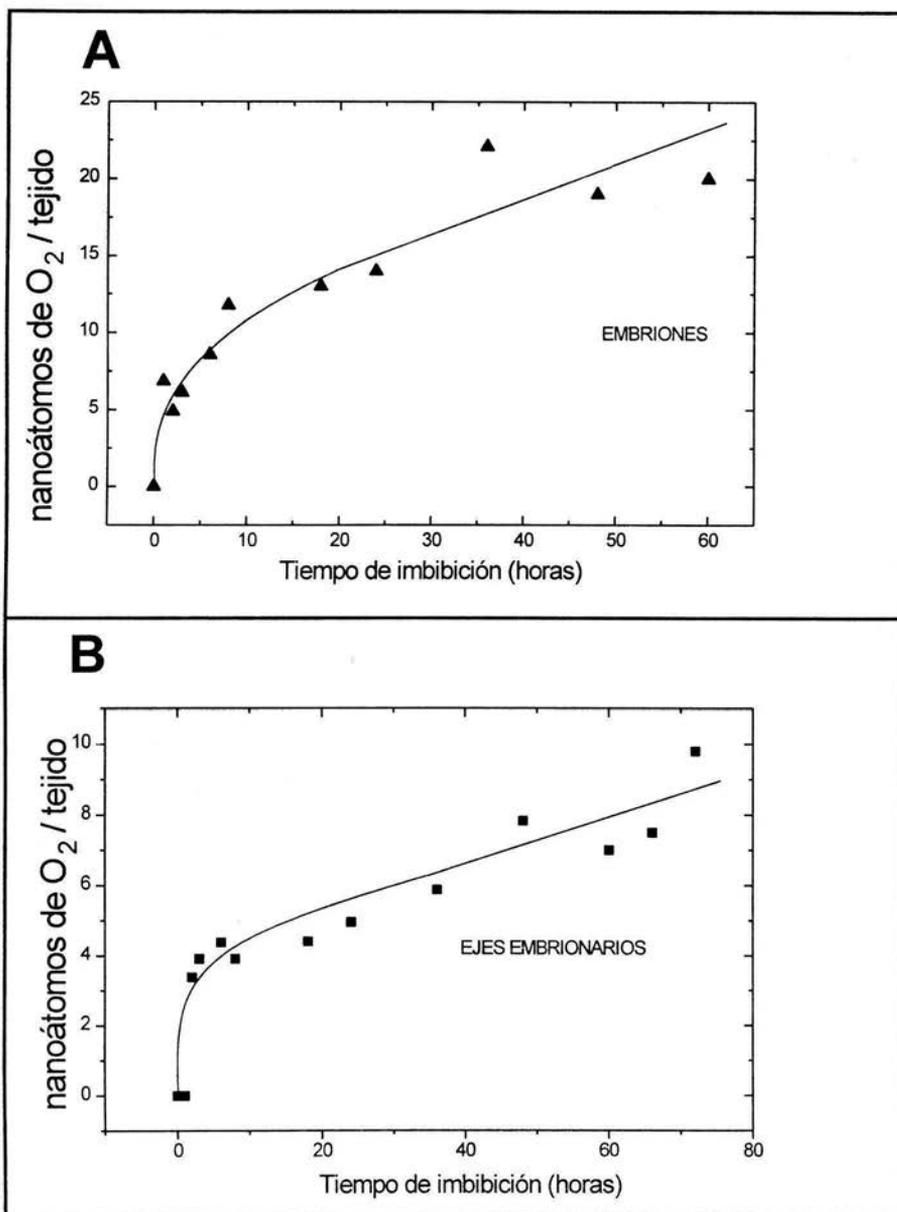


Figura 9. Consumo de oxígeno de embriones y ejes embrionarios de maíz.

imbibición un consumo de 1.187 η átomos O_2 /mg de tejido a diferencia del embrión para el cual hubo un registro de 0.344 η átomos O_2 /mg de tejido. Estos datos indican que hay una gran actividad metabólica en las primeras horas de imbibición de la semilla.

Los parámetros fisiológicos anteriores nos indicaron que los tiempos comprendidos en las primeras 10 horas eran muy interesantes para estudiar cual podría ser la expresión de las actividades de las ATPasas de tonoplasto y de membrana plasmática, pues ese intervalo contenía la fase de entrada abrupta de agua y la re-iniciación de actividades enzimáticas, donde estas enzimas estarían participando de manera importante en el restablecimiento del metabolismo de la semilla. Los tiempos precisos que se escogieron fueron: 0, 1, 2, 3, 6 y 8 h de imbibición.

Actividad de hidrólisis de ATP en fracciones microsomales de embriones y ejes embrionarios.

Se caracterizó la ontogenia de las ATPasas de tonoplasto y de membrana plasmática en las fracciones microsomales de embriones (Fig. 10) y de ejes embrionarios (Fig. 11) durante un curso de tiempo de 0 a 8 h. En dicha fracción se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los diferentes inhibidores específicos para cada enzima: azida, ATPasa de mitocondria; nitrato, ATPasa de tonoplasto y vanadato, ATPasa de membrana plasmática. (La actividad sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total de hidrólisis de ATP y la actividad insensible al inhibidor.) Todos los experimentos fueron hechos tres veces con cada punto por triplicado.

En los embriones de maíz (Fig. 10) encontramos actividad de hidrólisis de ATP por las diferentes enzimas. Las ATPasas de tonoplasto y de membrana plasmática ya presentaban una actividad de 0.56 y 0.365 μ molas de Pi/h/mg respectivamente, al tiempo cero de imbibición (semilla seca). Posteriormente se observa un pico máximo de actividad a las 3 h (2.37 μ molas de la ATPasa de tonoplasto y 1.16 μ molas de la ATPasa de membrana plasmática), por último se registró un decaimiento de la actividad de ambas enzimas. En el caso de la ATPasa de tonoplasto y la ATPasa mitocondrial incluso la actividad decrece a valores inferiores con respecto al tiempo cero. El comportamiento de la ATPasa mitocondrial fue similar al de las otras ATPasas, presentando el pico máximo de actividad a las 3 h (3.2 μ molas de Pi/h/mg).

Por otro lado, en los ejes embrionarios (Fig. 11), también encontramos actividad de hidrólisis de ATP al tiempo cero dada por las ATPasas de tonoplasto, de membrana plasmática y de mitocondria (0.255, 0.445 y 0.68 μ molas de Pi/h/mg respectivamente), el pico máximo de actividad se registró a la hora de imbibición (1.64 μ molas de Pi/h/mg para la ATPasa de tonoplasto, 0.615 μ molas de Pi/h/mg para la ATPasa de membrana plasmática y 2.14 μ molas de Pi/h/mg para la ATPasa mitocondrial). A partir de entonces la actividad decae y se mantiene estable en adelante hasta las ocho horas.

Haciendo un análisis entre los datos de las actividades de ATPasa de embriones y ejes embrionarios, podemos ver que en el caso de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática, los máximos se presentaron a tiempos diferentes: 1 hora en los ejes y 3 horas en los embriones. Además cuantitativamente estos máximos también son diferentes, ya que la actividad máxima en los embriones es de un 45% mayor que la respectiva de los ejes.

Figura 10. Actividad de hidrólisis de ATP en embriones de maíz durante un curso de tiempo de 0 a 8 h.

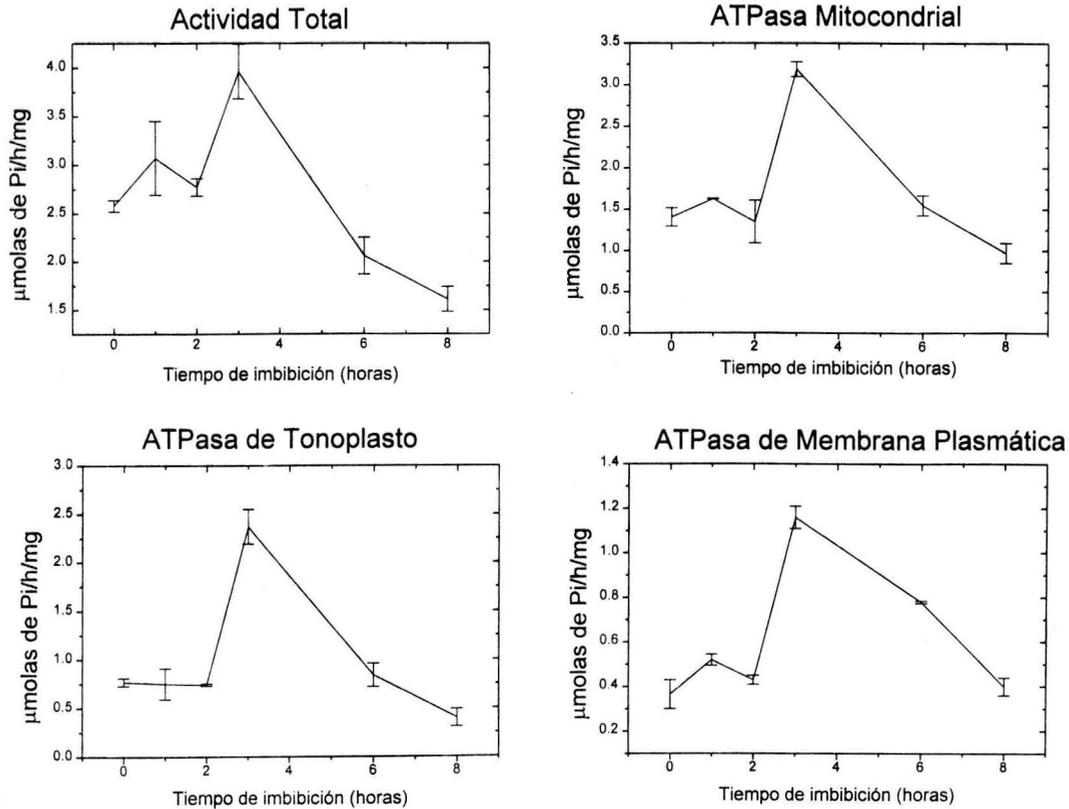
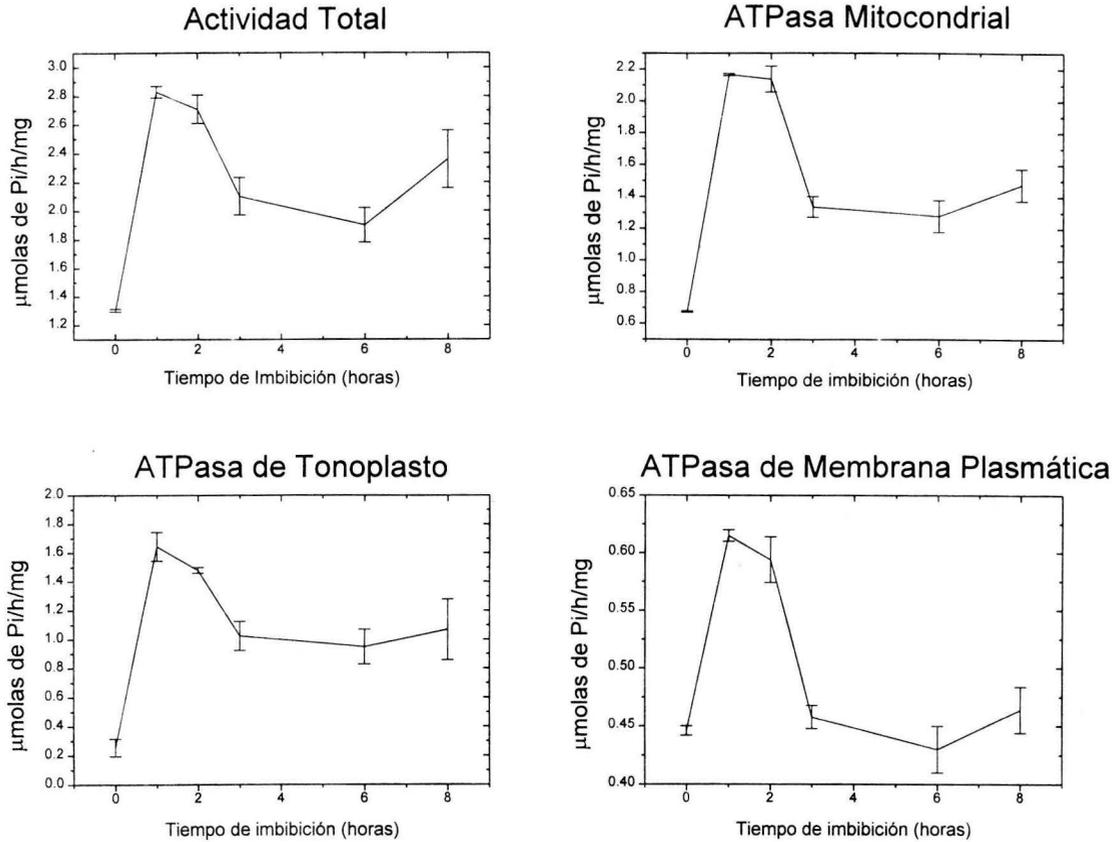


Figura 11. Actividad de hidrólisis de ATP en ejes embrionarios de maíz durante un curso de imbibición de 0 a 8 h.



En el caso de la actividad de la ATPasa del tonoplasto se observaron diferencias semejantes: hay una disparidad en la ocurrencia de los máximos de actividad, de 1 hora para los ejes y de 3 horas para los embriones; en este caso también la actividad máxima de los embriones supera a la de los ejes en un 30%. Curiosamente la actividad de la ATPasa de tonoplasto en los ejes no desciende hasta por debajo de los valores iniciales como en el caso de los embriones, pero se mantiene en los niveles medios entre los valores del máximo y el mínimo (que fué el valor del tiempo cero).

Cuando sumamos las actividades de hidrólisis de ATP de cada una de las diferentes enzimas y la comparamos con la actividad total, estas no coincidieron. La suma de las actividades parciales queda por arriba de la actividad total experimental. (Fig. 12 A y B), este aspecto se retomará en la discusión.

Inmunoréplica en Western de la ATPasa de membrana plasmática en la fracción microsomal de embriones y ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos.

Se hizo la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS 10% de las fracciones microsomales de embriones y ejes embrionarios embebidos 0, 1, 2, 3, 6, y 8 h y la inmunoréplica de ambos geles, donde se detectó a la ATPasa de membrana plasmática con un anticuerpo dirigido contra la porción central de la ATPasa de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. En la inmunoréplica de las fracciones microsomales de los embriones (Fig. 13) encontramos tres bandas de reacción de aproximadamente 90, 85 y 60 KDa. En la inmunoréplica de los ejes embrionarios (Fig. 14) encontramos tres bandas de 98, 95 y 60 KDa, en todos los tiempos.

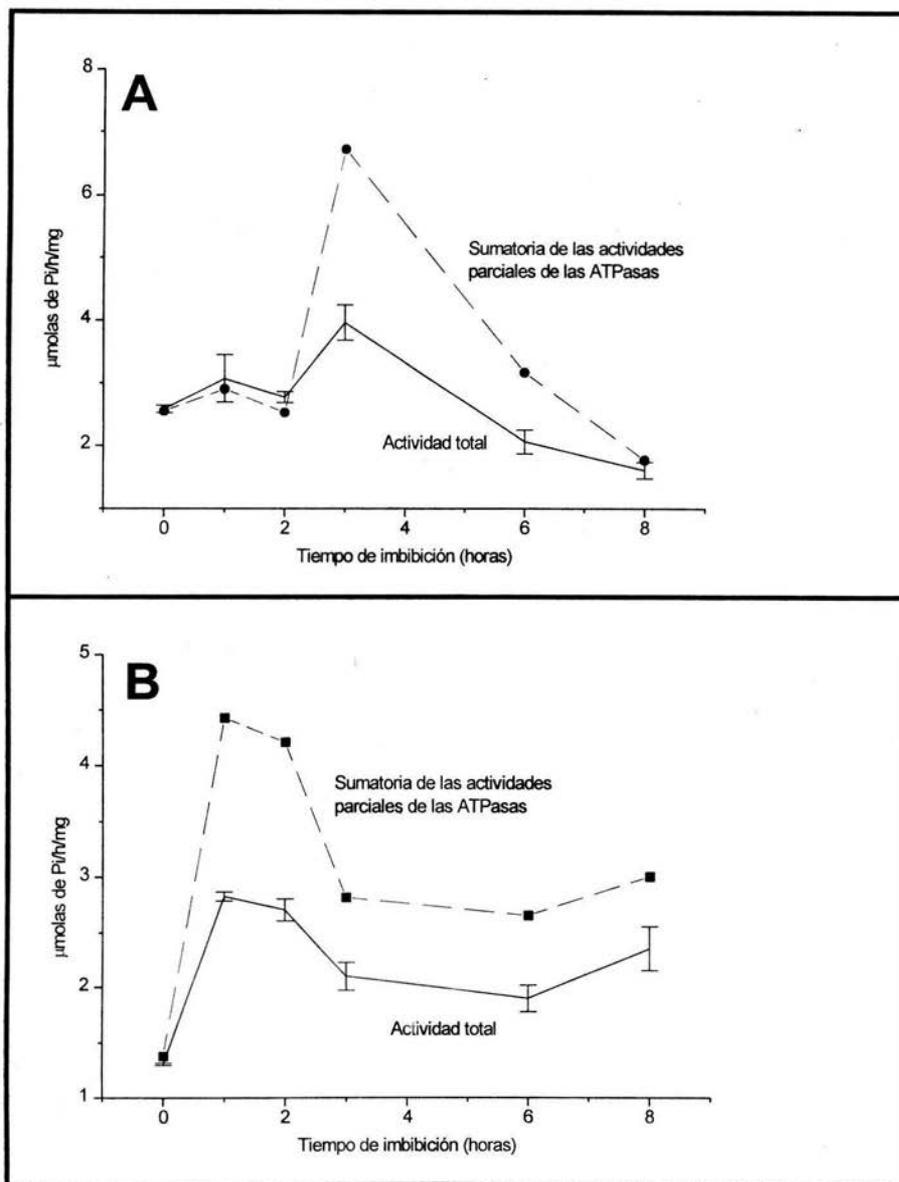


Figura 12. Comparación de la actividad total experimental contra la suma de las actividades parciales de hidrólisis de ATP en embriones (A) y ejes embrionarios (B).

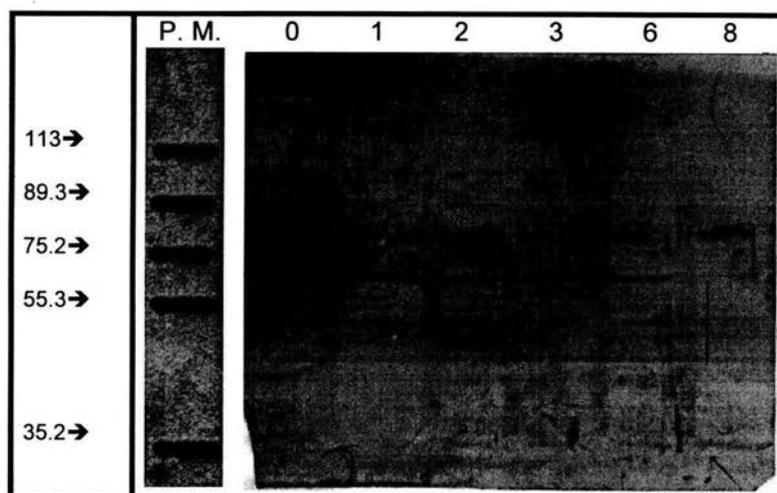


Figura 13. Inmunoréplica en Western de las fracciones microsomales de embriones a los diferentes tiempos de imbibición (0, 1, 2, 3, 6 y 8 h), contra la ATPasa de membrana plasmática. Los pesos moleculares de los estándares se encuentran indicados con las flechas en el primer carril.

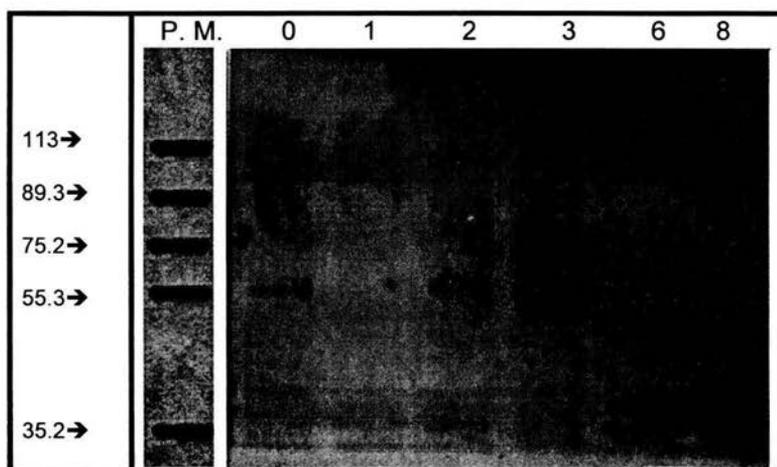


Figura 14. Inmunoréplica en Western de las fracciones microsomales de ejes embrionarios a los diferentes tiempos de imbibición (0, 1, 2, 3, 6 y 8 h), contra la ATPasa de membrana plasmática. Los pesos moleculares de los estándares se encuentran indicados con las flechas en el primer carril.

El haber obtenido varias bandas de reacción pudo deberse a la proteólisis de la ATPasa, por tal razón optamos por usar el método del Western en rejilla (slot blot), donde los fragmentos proteolíticos reaccionarán en una sola banda, lo cual facilitaría un análisis densitométrico para determinar la concentración de ATPasa en las vesículas de los embriones o de los ejes embrionarios de los diferentes tiempos de imbibición.

El análisis densitométrico del Western en rejilla de las preparaciones de embriones embebidos por diferentes tiempos se muestra en la figura 15 A. Como era de esperarse por los ensayos de actividad se detectó proteína en el embrión seco y encontramos que la máxima concentración relativa de la ATPasa se encuentra a las 2 h de imbibición. A partir de las 3 h y hasta las 8 h hay una baja en la concentración de la ATPasa por debajo del nivel inicial. En los ejes embrionarios, figura 15 B, se detectó a la ATPasa también en el tiempo cero y la máxima concentración fué registrada a las 3 h; después de este tiempo el registro cayó también por debajo del tiempo cero.

Microscopía electrónica de la fracción microsomal y la fracción de vesículas de membrana plasmática purificadas por reparto en un sistema de polímeros en dos fases.

Se tomaron fotografías de la fracción microsomal de embriones embebidos 0 y 1 h (figuras 16 A y B). A las 0 h de imbibición (embriones secos) observamos que las vesículas están difusas y aglutinadas por lo que no se distinguen los diferentes tipos de membranas, en contraste a la hora de

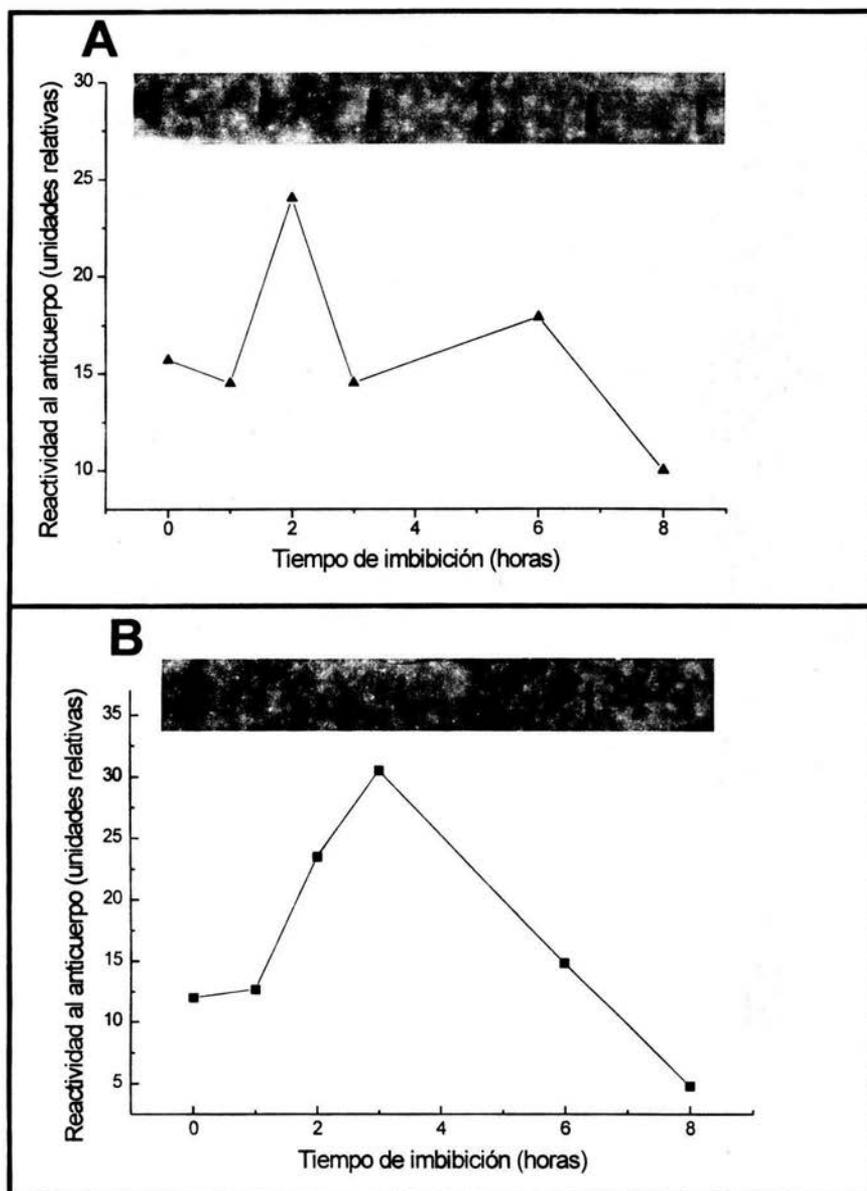


Figura 15. Slot blot y densitograma de la ATPasa de membrana plasmática a diferentes tiempos de imbibición de embriones (A) y ejes embrionarios (B).

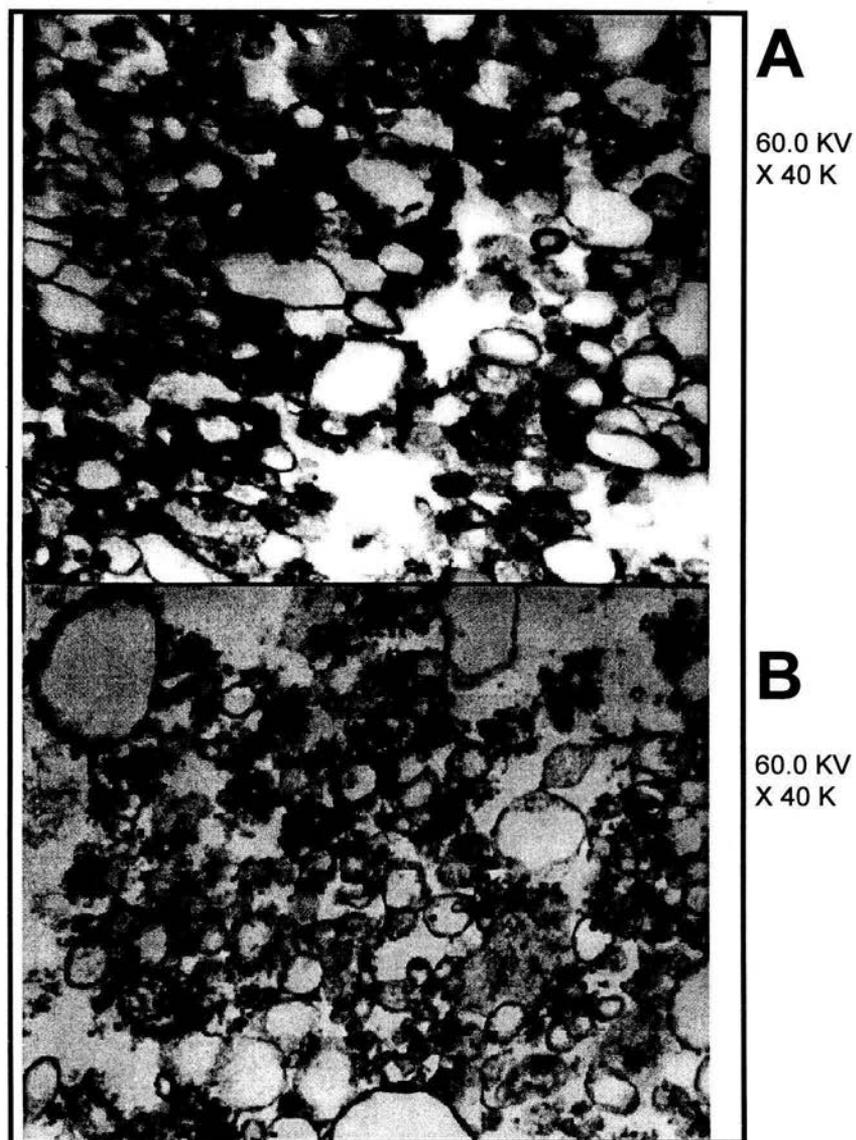


Figura 16. Fotografías al microscopio electrónico de la fracción microsomal de embriones de maíz secos (B) y embriones embebidos 1 h (A).

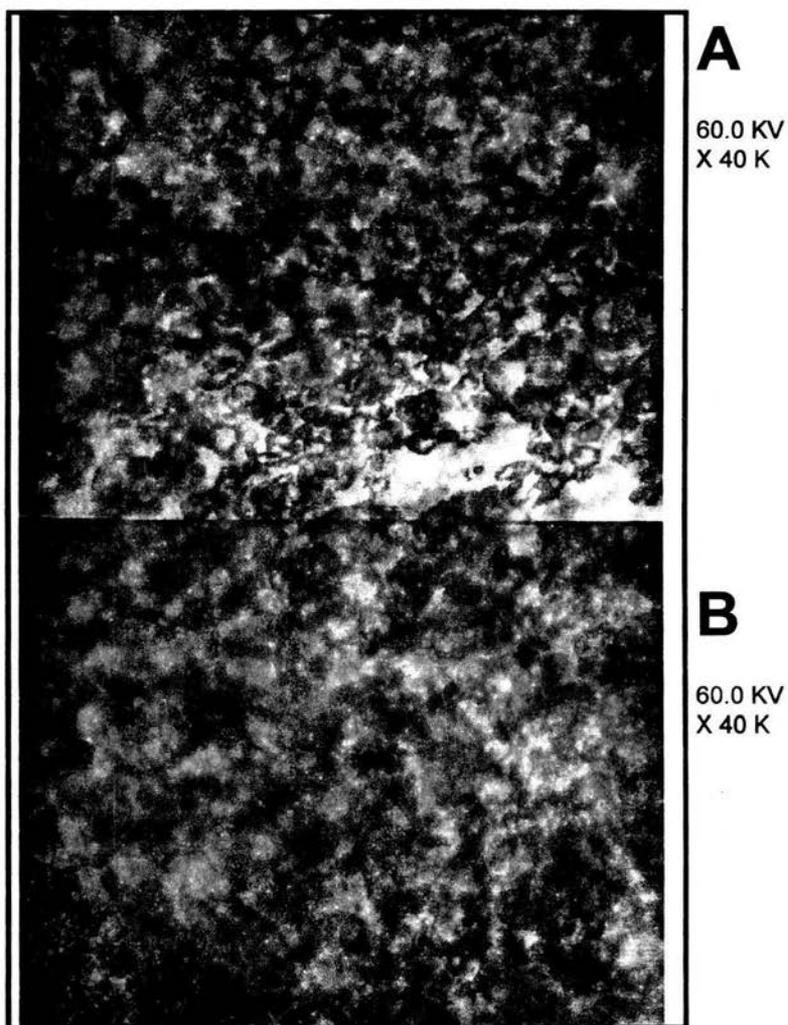


Figura 17. Fotografías al microscopio electrónico de la fracción U2 de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz, purificadas por reparto en un sistema de polímeros en dos fases. Embriones secos (A) y embriones embebidos 1 h (B).

imbibición ya se distinguen los diferentes tipos membranales. En las figuras 17 A y B (0 y 1 h) se muestran fracciones de vesículas de membrana plasmática, purificadas por el método de reparto en un sistema de polímeros en dos fases provenientes de los mismos tiempos de imbibición (0 y 1 h). En ambos tiempos de imbibición encontramos una apariencia muy homogénea de las vesículas.

DISCUSION

Selección de los tiempos para el estudio de la ontogenia de las ATPasas.

Cuando separamos al embrión o al eje embrionario del resto de la semilla no sabemos qué tanto de su estructura es dañada y como esto puede afectar su función. Al hacer una curva de germinación para las tres estructuras (fig. 6), comprobamos que tanto el embrión como el eje embrionario no sufrieron daño alguno que impidiera su desarrollo normal pues todos alcanzan el mismo máximo de germinación. Las diferencias en las cinéticas de germinación de las diferentes estructuras se deben a su accesibilidad al agua y a su potencial mátrico específico. En la semilla observamos una lenta velocidad inicial de germinación, a diferencia del embrión y el eje embrionario, pues para que el agua llegue al embrión de la semilla debe atravesar dos barreras físicas, la testa y el endospermo (lo que inicialmente retrasa la germinación de la semilla).

El proceso de germinación comienza cuando embebemos a la semilla. La absorción del agua por la semilla es esencial para iniciar la germinación. Se reconocen en este fenómeno tres fases (fig. 8); en la primera fase la absorción del agua es un proceso fundamentalmente físico, así que las semillas no viables pueden presentarlo; se considera la segunda fase cuando la semilla alcanza su máxima hidratación y muchas enzimas se encuentran en plena actividad, por lo que en esta fase ocurren importantes cambios metabólicos iniciales para la germinación del embrión; por último, en la tercera fase la semilla termina por germinar, presentando principalmente cambios morfológicos: la radícula y el epicotilo emergen para dar paso posteriormente a la raíz y al tallo

respectivamente (1). Tanto los embriones como los ejes embrionarios (fig. 7) presentan estas tres fases (si bien parece haber una cuarta fase con una pendiente muy parecida a la tercera), teniendo lugar las dos primeras dentro del período de 0 a 8 h de imbibición. El tener sobre todo la segunda fase de hidratación dentro del período de 0 a 8 h nos indicaría indirectamente que en tal período se está reestableciendo la actividad metabólica. Pero para evaluar la actividad metabólica de los embriones y de los ejes embrionarios era necesario usar un criterio fisiológico adicional.

Una prominente característica de la germinación es la rápida aceleración del consumo de oxígeno, lo cual se utiliza como un criterio de reactivación metabólica de la semilla, pues esta función involucra la integración de muchas vías metabólicas. Tres vías aeróbicas se encuentran activas en semillas embebidas: la glicólisis, la vía de las pentosas y el ciclo del ácido cítrico, así como la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa (1, 31 y 32). El consumo de oxígeno de embriones y ejes embrionarios (fig. 9) registró un gran incremento dentro de las primeras 10 h de imbibición encontrándose valores más altos de consumo de oxígeno en ejes embrionarios que en embriones (proporción 4-1). En el trabajo de Ehrenshaft y Brambl (33), se cuantificó el consumo de oxígeno de embriones y ejes embrionarios de maíz dentro de las primeras 6 h de imbibición, y se observó un consumo de oxígeno de embriones a los 17 min de imbibición y de ejes embrionarios a los 8 min, el cual mostró un continuo aumento hasta el término del experimento, siendo más activos los ejes embrionarios que los embriones en proporción 6:1. Nuestros resultados concuerdan con estos. La razón por la cual el eje respira más activamente no está clara. Ehrenshaft y Brambl (33) encontraron que la respiración de los ejes embrionarios fue sensible en un 98% a cianuro, mientras que en los embriones

los componentes insensibles a cianuro de la cadena respiratoria se incrementaron de 14% a los treinta minutos a 34% a las seis horas, posiblemente el escutelo impida el paso del oxígeno obligando al embrión a usar una respiración alternativa con ayuda de componentes insensibles a cianuro. La cadena alterna no tendría la eficacia de la ruta sensible a cianuro.

Al analizar los patrones de toma de agua y consumo de oxígeno es evidente que dentro de las primeras 8 h de imbibición, antes que los embriones y los ejes embrionarios comiencen a germinar, debe haber una gran actividad metabólica llevándose a cabo. Por esta razón se decidió escoger los tiempos de 0, 1, 2, 3, 6 y 8 h, que es un período temprano de la germinación, para estudiar la ontogenia de las ATPasas. De este período total, el lapso de las últimas 6 o 7 h comprendería la fase de restauración metabólica descrita en semillas enteras.

Ontogenia de las ATPasas de membrana plasmática, de tonoplasto y mitocondrial.

Al medir la hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales de embriones (fig. 10) y ejes embrionarios (fig. 11), encontramos que las diferentes ATPasas se encuentran activas al tiempo cero, cuando la semilla ésta seca y el embrión quiescente. Estos resultados concuerdan con muchos trabajos donde se han reportado enzimas activas en semillas secas. Enrenshaft y Brambl (33) reportan actividades de citocromo c oxidasa y de ATPasa mitocondrial, -enzimas indispensables para el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones-, en fracciones mitocondriales de embriones secos de maíz. El tener enzimas potencialmente activas en la semilla seca resultaría muy importante para reactivar expeditamente las diversas vías metabólicas que despertarían a la

semilla de su letargo (32 y 33). Se ha descrito que con la entrada de agua comienza la hidrólisis de los polímeros de reserva. Una vez hidrolizados, sus productos (aminoácidos y sacáridos principalmente) son exportados del endospermo hacia el eje embrionario a través de las diferentes membranas de las células del escutelo y del eje embrionario mismo. Es aquí donde las ATPasas de la membrana plasmática y del tonoplasto deben estar trabajando activamente para establecer el sistema de transporte secundario y el gradiente de pH, que ayuda en el crecimiento de la semilla (9 y 25). Ahora bien, los embriones y los ejes embrionarios al estar aislados del resto de la semilla no tienen el aporte del endospermo ni del escutelo respectivamente, de tal manera que no sabemos cual puede ser la magnitud del transporte secundario, si es igual o menor. Es posible que toda la actividad de los embriones y de los ejes embrionarios sea parte de un programa preestablecido por la semilla desde su desecación en la planta progenitora y que es desencadenado simplemente por la hidratación de los tejidos, sin importar que los embriones y los ejes embrionarios estén dentro o aislados del resto de la semilla. Sin embargo, también es posible que pueda seguir habiendo una necesidad de transporte secundario entre los diferentes tejidos embrionarios que tienen diferentes necesidades de elongación.

Al transcurrir el tiempo de imbibición encontramos que la actividad de las ATPasas tiene un pico máximo a las 3 h en los embriones (fig. 10) y a la primer hora de imbibición en los ejes embrionarios (fig. 11). Este patrón generalizado se debe posiblemente a que en este punto coinciden la expresión de las enzimas sintetizadas durante la maduración de la semilla, que fueron activadas en la imbibición, y la de las enzimas que se deben estar sintetizando *di novo*. Esto podría apoyarse por el hecho de encontrar actividad en los ejes embrionarios y en los embriones secos y por que se ha detectado síntesis de proteínas en

embriones aislados dentro de los 30-60 minutos después de la imbibición, cuando la semilla alcanza el 40% de contenido de humedad (4 y 34). Además, es pertinente mencionar que la ATPasa de membrana plasmática tiene una vida media de 12 min en coleoptilos en crecimiento (35). No obstante, se reconoce la necesidad de una confirmación experimental directa de esta proposición. Después del pico se registra un decaimiento de actividad en todas las ATPasas, lo cual posiblemente sea causa de la degradación de las enzimas.

Otra posibilidad es que el pico de actividad registrado en los embriones y en los ejes embrionarios se deba a que en la semilla seca hay una desorganización del sistema membranal de la célula, originada en el período de desecación natural de la semilla (1). De tal manera que las ATPasas estuvieran insertadas anómalamente en la bicapa en re-organización, adoptando una conformación "hiperactiva", como si estuvieran desacopladas. Con la imbibición, las membranas comenzarían a rehidratarse y estructuralmente se reacomodarían formando las bicapas lipídicas clásicas celulares, las ATPasas entonces se re-arreglarían ganando su funcionamiento normal. Esto estaría apoyado por el hecho de que los picos de actividad aparecen entre 1 y 3 h, tiempo en que tienen lugar el contacto de las estructuras con el agua y la rápida entrada de ésta al tejido (1). Sin embargo en nuestro sistema experimental no se podría observar este fenómeno pues en él usamos carbonil cianido m-clorofenilhidrazona (CCCP), que es un desacoplante, el cual bombea protones en sentido inverso de lo que lo hace la ATPasa manteniendo al máximo la actividad de esta. Una variante de esta hipótesis es que efectivamente la incipiente re-organización membranal, que podría involucrar una composición lipídica transitoria, afectara la actividad de la enzima, con respecto a esto se ha encontrado una gran sensibilidad de la ATPasa de la membrana plasmática al medio lipídico (36).

Los embriones presentaron una mayor actividad de la ATPasa de membrana plasmática (45%) y de la ATPasa del tonoplasto (30%) que los ejes embrionarios. Esto pudo deberse a que el embrión cuenta con la presencia del escutelo.

La actividad total obtenida de la suma de las inhibiciones parciales de las tres ATPasas, no es la misma que la suma experimental -actividad total- (Fig. 12). La explicación más plausible es que los diferentes inhibidores no son tan específicos, como ya se ha reportado (15), o que a las concentraciones que usamos de los diferentes inhibidores no ejercieron el 100% de inhibición, con lo que podría estarse sobreestimando la actividad de las ATPasas.

Inmunodetección de la ATPasa de la membrana plasmática.

En el patrón protéico obtenido en las inmunorélicas en Western (figuras 13 y 14) observamos varias bandas de reacción que se debieron a tres posibles causas: i) reacciones inespecíficas del anticuerpo con otras proteínas pues el anticuerpo está dirigido contra el dominio central de la ATPasa el cual abarca los aminoácidos del 340 al 650 de la proteína de *A. thaliana* (37), dentro de tal porción podría haber epítopes que se parecieran a los de otras proteínas y que reaccionan con el anticuerpo por la exposición prolongada a éste, aunque esto es muy poco probable. ii) baja afinidad del anticuerpo, pues la dilución usada del anticuerpo fué de 1:300, y a concentraciones mayores se obtenía un gran fondo y iii) la proteólisis de la enzima, fenómeno muy marcado y bien documentado (38 y 39). Durante el proceso de fraccionamiento celular y la purificación de la ATPasa, son liberadas enzimas proteolíticas presentes en la semilla. La actividad

de estas proteasas endógenas puede dar resultados engañosos durante el corrimiento electroforético, tales como: desvanecimiento en el patrón de tinción de la proteína sobre el gel, pérdida del peso molecular real del polipéptido y agudos cambios de velocidad en su movilidad específica (38 y 39). Leonard y Gallagher (40) tuvieron problemas al tratar de separar a la ATPasa de membrana plasmática de semillas de maíz en geles de poliacrilamida SDS y se lo atribuyeron a dos causas: a las proteasas endógenas y a la agregación de la proteína, de alto peso molecular, inducida por calentamiento de la muestra. Teniendo más bases experimentales para la tercera opción nos inclinamos a pensar que la causa de nuestras múltiples bandas fué la proteólisis de la proteína. Por tal razón decidimos usar la técnica del Western en rejilla (Slot Blot) que nos daría una localización de los productos de la proteólisis en una sola banda y nos permitiría conocer la concentración relativa de la ATPasa de membrana plasmática en los diferentes tiempos de imbibición.

Al hacer el análisis densitométrico del Slot Blot de embriones (fig. 15 A), se confirmó el patrón de actividad de la ATPasa de membrana plasmática durante el curso de 0 a 8 h de imbibición. Detectamos a la enzima en embriones secos, -la cual es capaz de hidrolizar ATP-. El pico de detección máxima de proteína se ubicó a las 2 h, una hora antes que el pico de actividad (3 h). Este pico de proteína sugiere una síntesis activa de la enzima, pues estaría detectándose por el anticuerpo, junto con la enzima preformada. El desfase de los picos de actividad y proteína se puede deber a que aunque detectamos a la ATPasa no sabemos cuánta de ésta ATPasa que se ha integrado a la membrana después de su formación, se encuentra en condiciones de presentar actividad de hidrólisis de ATP y cuál es su magnitud. La caída de proteína nos habla de una degradación de la enzima preformada o una

disminución en la síntesis *di novo*. O de la síntesis *di novo* de una forma de enzima con más baja actividad. Se puede considerar que la población total de la ATPasa de membrana plasmática está dada por la ATPasa sintetizada *di novo* y por la ATPasa preformada, en una proporción dinámica, que podría ir cambiando en el transcurso del tiempo de imbibición. Para los ejes embrionarios la cinética de detección de la ATPasa fue similar a excepción que el pico de proteína se presentó a las 3 h, una hora después del pico de actividad.

Es posible que la ATPasa de membrana plasmática que se está sintetizando *di novo* sea una isoforma menos activa que la que se encuentra presintetizada en la semilla. Se han reportado varias isoformas de la ATPasa de membrana plasmática en *A. thaliana*, *L. esculentum* y *N. plumbaginifolia* que se expresan en diferentes tejidos y estadios de desarrollo de la planta (19, 21 y 22). Tal vez la isoforma de la ATPasa, almacenada cuando la semilla estuvo perdiendo agua, sea más activa y por eso registremos la elevación inicial de la hidrólisis de ATP. Pero al ir siendo degradada tal ATPasa, la isoforma que la va reemplazando es menos activa, haciendo que disminuya la actividad de hidrólisis de ATP. Algunos experimentos que se podrían realizar para aclarar esta cuestión son: la búsqueda y caracterización de las isoformas en embriones de maíz y la medición de la síntesis *di novo* de la enzima con metionina S³⁵ durante los periodos de tiempo estudiados.

Microscopía electrónica.

En las fotografías de las vesículas de la fracción microsomal de embriones secos (fig. 16 B) se muestra que las vesículas están agregadas y difusas, por lo

que no se distinguen unas de otras, lo cual podría estar relacionado con la desorganización del sistema membranal debido al proceso de desecación natural de la semilla. Muchas de las propiedades de la membrana son alteradas cuando ocurre la desecación, con profundos y posibles efectos sobre la fisiología de la célula. Las membranas están compuestas principalmente de proteínas y fosfolípidos arreglados en un medio fluido, ésta organización molecular es estable por la relación entre los componentes membranales y el agua. Alrededor de un 25% de hidratación arriba del peso seco es necesario para mantener la configuración de la membrana, por abajo de este porcentaje de agua las membranas adquieren una conformación desordenada en la que las enzimas no funcionan normalmente (1). En cambio, a la hora de imbibición (fig. 16 A) se empieza a distinguir un rearrreglo de las diferentes membranas celulares lo cual podría ser parte del proceso de re-organización membranal que va ocurriendo gradualmente tras la entrada de agua a los tejidos embrionarios. Desgraciadamente no tenemos fotografías de tiempos más largos de hidratación, pues se ha reportado que tras la imbibición la integridad de las membranas es incompleta por al menos durante algunos minutos después de la imbibición (1) y en donde esperamos que las membranas terminen de adquirir su conformación normal.

Algo que se desprende de estas micrografías es que ya existen vesículas con características morfológicas parecidas tanto en el tiempo cero como en el de una hora, pues se llegan a obtener vesículas muy semejantes, si bien con condiciones de purificación un tanto diferentes.

CONCLUSIONES

-Existen ATPasas presintetizadas en la semilla quiescente y se encuentran en plena capacidad de hidrolizar ATP. Esto nos hace proponer que el que las enzimas puedan sobrevivir al período de desecación natural de la semilla, es debido a su importancia en el metabolismo inicial de la semilla.

-El pico de actividad enzimática de las ATPasas nos sugiere que:

- i) hay una regulación de las enzimas presintetizadas y las sintetizadas *di novo*, ó
- ii) que la enzima presenta diferentes propiedades catalíticas en los diferentes estados de hidratación.

-El patrón de detección de la ATPasa de membrana plasmática es congruente con su patrón de actividad, aunque el pico de actividad y el de proteína no ocurren en el mismo tiempo. Esta discrepancia puede estar dada por la condición anterior.

BIBLIOGRAFIA

1. Bewley, J. D. and Black M. (1986). *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York. pp 366.
2. Kozłowski, T. T. (1972). *Seed Biology. Vol 1 Importance, Development and Germination*. Academic Press, Inc. London. pp 416.
3. Katherine, E. (1985). *Anatomía Vegetal*. Ed. Omega Tercera edición. Barcelona. pp 779.
4. Murray D. R. (1984). *Seed Physiology. Vol 2 Germination and Reserve Mobilization*. Academic Press, Inc. Australia. pp 295.
5. Darnell, J.; Lodish, H. y Baltimore, D. (1988). *Biología Celular y Molecular*. Ed. Labor España. pp 1175.
6. Harrison, R. and Lunt G. G. (1980). *Biological Membranes. Their Structure and Function*. Blackie Glasgow, London. pp 288.
7. Finean, J. B. and Michell, R. H. (1981). *Membrane Structure*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press Amsterdam. pp 271.
8. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. pp 1013.
9. Baker, D. A. and Hall, J. L. (1988). *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. Logman Scientific & Technical. Great Britain. pp 592.
10. Poole, R. J. (1978). Energy Coupling for Membrane Transport. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 29, 437-460.
11. Nelson, N. (1989). Structure, Molecular Genetics, and Evolution of Vacuolar H⁺-ATPases. *J. Bioenerg. Biomemb.* 21: 5, 553-571.
12. Sze, H.; Ward, J. M. and Lai, S. (1992). Vacuolar H⁺-Translocating ATPases from Plants: Structure, Function and Isoforms. *J. Bioenerg. Biomemb.* 24: 4, 371-381.

13. Sze, H. (1984). H⁺-Translocating ATPases of the Plasma Membrane and Tonoplast of Plant Cells. *Physiol. Plant.* 61, 638-691.
14. Ting, I. P. and Gibbs, M. (1982). *Crassulacean Acid Metabolism*. Waverly Press, Baltimore, Maryland. pp 316.
15. Serrano R. (1990). Plasma Membrane ATPase. In: *the Plant Plasma Membrane*. Eds. Larsson C. and Moller, I. M. Springer Verlag. Berlin. Chapter 6.
16. Serrano, R. (1989). Structure and Function of Plasma Membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40, 61-94.
17. Briskin, D. P. and Hanson, J. B. (1992). How Does The Plant Plasma Membrane ATPase Pump Protons? *J. Exp. Bot.* 43: 248, 269-289.
18. Wach, A., Schlessler, A. and Goffeau, A. (1992). An Alignment of 17 Deduced Protein Sequences from Plant, Fungi, and Ciliate H⁺-ATPase Genes. *J. Bioenerg. Biomemb.* 24: 3, 309-317.
19. Sussman, M. R. and Harper, J. F. (1989). *Molecular Biology of the Plasma Membrane of Higher Plants*. *The Plant Cell.* 1: 953-960.
20. Vara, F. and Serrano, R. (1982). Partial Purification and Properties of the Proton-translocating ATPase of Plant Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 257, 12826-12830.
21. Ewing, N. N.; Wimmers, L. E.; Meyer, D. J.; Cheflat, R. T. and Bennet, A. B. (1990). Molecular Cloning of Tomato Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 94, 1874-1881.
22. Perez, C.; Michelet, B.; Ferrant, V.; Bogaerts, P. and Boutry, M. (1992). Differential Expression Within a Three-Gene Subfamily Encoding a Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Biol. Chem.* 267, 1204-1211.

23. Serrano, R.; Portillo, F.; Monk, B. C. and Palmgrem, M. G. (1992). The Regulatory Domain of Fungal and Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* 146:131-136.
24. Kurkdjian, A. and Guern, J. (1989). Intracellular pH: Measurement and Importance in Cell Activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 271-303.
25. Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of Auxin-Induced Cell Elongation Is Alive and Well. *Plant Physiol.* 99, 1271-1274.
26. Lohse, G. and Hedrich, R. (1992). Characterization of Plasma-Membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* Guard Cells. Modulation by Extracellular Factors and Seasonal Changes. *Planta* 188, 206-214.
27. 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.
28. González P., Sánchez, S. y Gavilanes-Ruiz, M. (1989). A Modified Colorimetric Method for the Determination of Orthophosphate in the Presence of High ATP Concentrations. *Anal. Biochem.* 200, 235-238.
29. Laemlli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
30. Towbin, H.; Staehelin, F. and Gardon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 161, 89-95.
31. Mayer, A. M. and Poljakoff-Mayber, A. (1989). *The Germination of Seeds.* Fourth Edition. Pergamon Press. pp 270.
32. Puntarulo, S. and Boveris, A. (1990). Effect of Natural and Accelerated Aging on the Hydroperoxide Metabolism of Soybean Embryonic Axes. *Plant Sci.* 68, 27-32.

33. Ehrenshaft, M and Brambl, R. (1990). Respiration and Mitochondrial Biogenesis in Germinating Embryos of Maize. *Plant Physiol.* 93, 295-304.
34. Bewley, J. D. and Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. Vol. 1 Development, Germination, and Growth.* Springer-Verlag. pp 307.
35. Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H. and Serrano, R. (1991). Auxin Induces Exocytosis and the Rapid Synthesis of a High-Turnover Pool of Plasma-Membrane H⁺-ATPase. *Planta.* 185, 527-537.
36. Serrano, R., Montesinos, C. and Sánchez, J. (1988). Lipid Requirements of the Plasma Membrane ATPase from Oat Roots and Yeast. *Plant Science.* 56, 117-122.
37. Pardo, J. M. and Serrano, R. (1989). Structure of a Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene from the Plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* Vol. 264: 15, 8557-8562.
38. Pringle, J. R. (1975). Methods for Avoiding Proteolytic Artifacts in Studies of Enzymes and Other Proteins from Yeasts. *Methods Cell Biol.* 12, 149-184.
39. Wu, F. S. and Wang, M. Y. (1984). Extraction of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis from Protease-Rich Plant Tissues. *Anal. Biochem.* 139, 100-103.
40. Gallagher, S. R. and Leonard, R. T. (1987). Electrophoretic Characterization of a Detergent-Treated Plasma Membrane Fraction from Corn Roots. *Plant Physiol.* 83, 265-271.