



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE
LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN EL
PERÍODO DE LA PROTRUSIÓN DE LA
RADÍCULA”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A :
Nora Andrea Gutiérrez Nájera



MÉXICO D. F.

1996

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

TESIS

COMPLETA

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. **BERNAL LUGO IRMA OFELIA**
Vocal Prof. **GAVILANES RUÍZ MARINA**
Secretario Prof. **CASTILLO MARTÍNEZ ALICIA**
1er. Suplente Prof. **AGUILAR RAMÍREZ MANUEL BENIGNO**
2do. Suplente Prof. **CRUZ GARCÍA FELIPE**

Lugar donde se desarrolló el tema: Lab. 101, Depto. de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:



Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Supervisor técnico:



M. en C. Sobeida Sánchez Nieto

Sustentante:



Nora Andrea Gutiérrez Nájera

Pero la sabiduría ... ¿dónde puede hallarse, y dónde está pues el lugar de entendimiento?

El hombre mortal no ha llegado a conocer su valuación, y no se halla en la tierra de los vivientes. La profundidad acuosa misma ha dicho: "¡No está en mí!". El mar también ha dicho: "¡No está conmigo!". Oro puro no se puede dar en cambio por ella, y plata no se puede pesar como precio suyo. No se puede pagar con oro de Ofir, con la rara piedra de ónice y zafiro. Oro y vidrio no se pueden comparar a ella, ni es cambio por ella vaso alguno de oro refinado. Coral y cristal de roca mismos no se mencionarán, pero una bolsa llena de sabiduría vale más que una bolsa llena de perlas...

Pero la sabiduría misma ... ¿de dónde viene?, y dónde, pues, está el lugar del entendimiento?

Ha estado escondido aun a los ojos de todo viviente, y a las criaturas volantes de los cielos ha estado oculta. La destrucción y la muerte mismas han dicho: "Con nuestros oídos hemos oído un informe de ella". Dios es Aquel que ha entendido el camino de ella, y él mismo ha conocido su lugar, por que él mismo mira hasta los mismos cabos de la tierra, bajo los cielos entero él ve

Entonces fue cuando vió la sabiduría y procedió a informar acerca de ella y pasó a decir al hombre:

"¡Mira! El temor de Jehová ... eso es sabiduría, y apartarse del mal es entendimiento"

(Job 28: 12-28).

A Jehová, mi Dios.

A mis padres.

A mis hermanos.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Jehová mi Dios, por el don de la vida y por su ayuda amorosa.

A mi padre por su cariño, disciplina y valiosos consejos, los cuales me han guiado hasta este momento.

A mi madre por su amor, aguante y apoyo incondicional a pesar de los tiempos difíciles.

A mis hermanos: Diana, Lorena y Roberto, porque siempre han estado unidos conmigo animandome a seguir adelante.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz por su excelente asesoría e inapreciable aportación de sus conocimientos para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Sobaida Sánchez Nieto por su gran ayuda y valiosas observaciones en el desarrollo experimental y escrito de esta tesis.

A la QFB. Consuelo Enriquez Arredondo por el apoyo que me prestó en el aprendizaje de técnicas básicas para la realización del trabajo experimental en el laboratorio.

Al Biól. Oscar García Rubio por su amistad y por apoyarme en la realización de esta tesis.

Al Q. Jose Luis Meraz Lira por ser un gran compañero y auxiliarme en la presentación final de la tesis escrita.

A mis queridas compañeras a quienes siempre tengo presentes y con quienes siempre he contado: Maira, Liliana, Mary, Gaby, Blanca y Maripaz.

A todos mis compañeros de la generación de Químicos 92-96 a quienes no olvido aunque de algunos de ellos tengo un grato y cálido recuerdo.

A todos mis compañeros del departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química.

Me faltaría espacio para terminar de agradecer a tantas y tantas personas quienes con su presencia han enriquecido mi vida y mi trayectoria en la carrera de Química.

Por haberme sobrellevado y brindado su ayuda todo lo que quisiera decirles no lo puedo expresar ahora por eso lo digo con esta palabra que encierra mucho: GRACIAS.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CCCP	Carbonil cianuro 3- cloro fenilhidrazona
CTC	Solución de cobre-tartrato-carbonato
ΔpH	Gradiente de pH
$\Delta\psi$	Gradiente eléctrico
$\Delta\mu$	Gradiente electroquímico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOC	Desoxicolato de sodio
DTE o DTT	Ditioeritrol o ditioneitol
EDTA	Etilendiamino tetraacético
H-N	Fracción de homogenado sin núcleos
K_m	Constante de Michaelis
K_i	Constante de inhibición
L_1	Fracción inferior de un sistema de fases que resulta de una primera partición de fases
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato inorgánico
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TLCK	1-1Cloro-3-4-tosilamido-7- amino-3-heptanona-HCl
TPCK	1-1Cloro-3-4-tosilamido-4-2-heptanona
Tris	2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
U_1	Fracción superior de un sistema de fases que resulta de una partición de fases
VMP	Vesículas de membrana plasmática

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Estructura de la semilla. Semilla de maíz	1
1.2 La germinación	3
1.2.1 Fase I	3
1.2.2 Fase II	3
1.2.3 Fase III	5
1.3 La Teoría del crecimiento ácido	6
1.4 Las membranas plasmáticas en plantas	9
1.4.1 Estructura de membranas de plantas	11
1.4.2 Sistemas de transporte de solutos a través de la membrana	15
1.5 La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	17
1.5.1 Estructura	18
1.5.2 Función	21
1.5.3 Papeles fisiológicos	23
2. HIPOTESIS	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y METODOS	28
4.1 Material biológico	28
4.2 Inhibición de embriones y semillas	28
4.3 Determinación de % de germinación	29
4.4 Acumulación de peso húmedo	29
4.5 Obtención de vesículas de membrana plasmática	30

4.6 Medición de la actividad de hidrólisis de ATP	32
4.7 Determinación de fosfato inorgánico	32
4.8 Determinación de proteína	33
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSION	54
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFIA	60

1. INTRODUCCION

1.1 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA SEMILLA DE MAIZ

La semilla es el óvulo fertilizado maduro en las plantas. Es el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de muchas especies vegetales, ya que contiene sustancias nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una nueva planta (Niembro, 1988).

El fruto de la planta de maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una cariopsida y agrícolamente se le conoce como semilla (Reyes, 1990). La semilla de maíz se origina por el proceso de doble fertilización que ocurre en el gametofito femenino y llega a su madurez 40 a 50 días después de la fertilización (Lindsey y Topping, 1993). En la semilla madura se logran distinguir las siguientes partes (Fig. 1):

a) La cubierta seminal o pericarpio: que se encuentra recubriendo a la semilla madura, protegiéndola de daños físicos y bióticos procedentes del exterior. Se le conoce como testa, ollejo o cáscara.

b) La aleurona: Capa de células del endospermo, de naturaleza proteica. Contiene enzimas hidrolíticas, las cuales se usarán en el proceso de movilización de reservas, principalmente del almidón (Ching, 1978; Lindsey y Topping, 1993).

b) El endospermo: que contiene la reserva de nutrientes como son carbohidratos (principalmente almidón), proteínas y lípidos, que serán posteriormente utilizados cuando la germinación comience y hasta que la plántula recién formada se establezca como organismo autótrofo. Es la parte de mayor volumen. Dos regiones bien diferenciables hay en el endospermo suave o harinoso y endospermo duro o cómeo. El endospermo harinoso contiene principalmente almidón mientras que el endospermo cómeo se compone principalmente de hemicelulosa.

I. INTRODUCCIÓN

c) El embrión: Es la planta en miniatura con las estructuras que originan una nueva planta, al germinar la semilla. En el embrión maduro se logran distinguir el eje embrionario que contiene estructuras que darán lugar al tallo y a la raíz en la planta y el escutelo que lo rodea (el cual presenta el cotiledón característico del maíz). En el proceso de la germinación, el escutelo absorberá las sustancias almacenadas en el endospermo, las degradará y transportará hacia el eje embrionario, para lo cual contiene grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. También puede almacenar gránulos de carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque en mucho menor proporción que el endospermo.

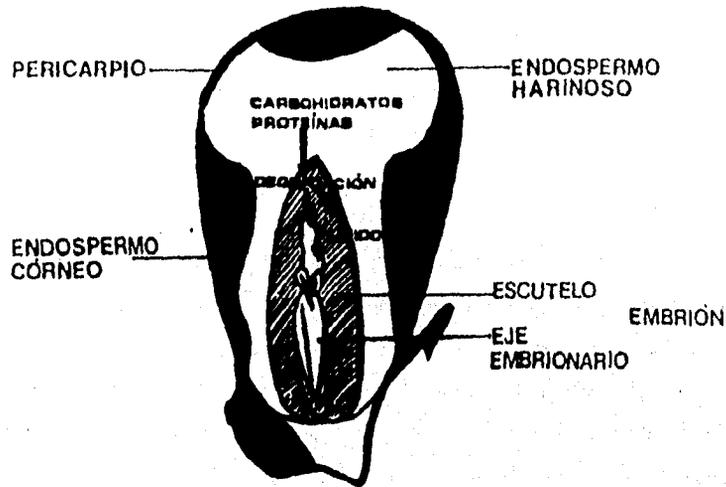


Fig. 1. Corte longitudinal de una semilla de maíz, indicándose las estructuras que la conforman (adaptado de Bewley y Black, 1986).

1.2 LA GERMINACIÓN.

Las semillas no germinan normalmente hasta que han sufrido un considerable período de crecimiento y desarrollo, acumulando reservas y finalmente llegando a secarse. El proceso de germinación comienza con la entrada de agua a la semilla y culmina con la salida de la radícula (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). La absorción de agua o imbibición es un paso esencial en el proceso de la germinación y es un fenómeno que está bien descrito en la literatura. Generalmente se acepta que ocurren en ella tres grandes eventos o fases, los cuales definen claros cambios del metabolismo en la semilla (Fig. 2).

1.2.1 Fase I.

En la primera fase hay una toma rápida de agua, debida a la hidratación de los constituyentes de la semilla, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y organelos, entre otros. Con ello ocurre la reactivación de las moléculas y organelos preexistentes, los cuales fueron tomados durante la maduración de la semilla y subsecuentemente almacenados (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). Tanto semillas viables como no viables presentan esta fase.

1.2.2 Fase II.

Con respecto a la toma de agua, esta fase se caracteriza por tener una toma de agua sin aumento. En esta fase ocurre la síntesis activa de ATP, sustratos, coenzimas, proteínas (enzimas y estructurales), DNA y RNA, necesarios para el alargamiento y división de las células del eje embrionario. Todo ello se realiza a expensas del almacenamiento de carbohidratos (como sacarosa y rafinosa) almacenados en el embrión (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). En esta fase el único cambio morfológico observable es el alargamiento las células, principalmente las de la radícula, dado sólo

I. INTRODUCCIÓN

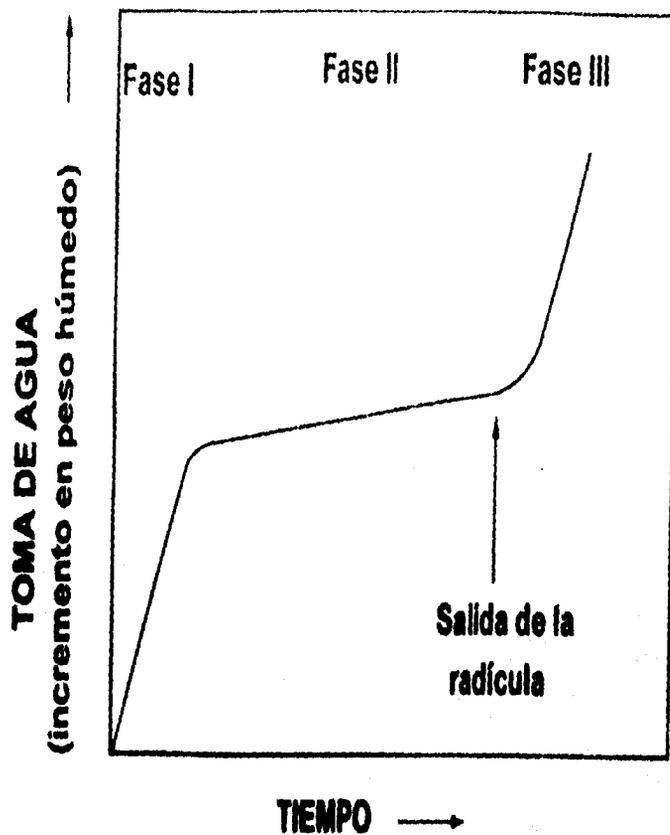


Fig. 2. Perfil trifásico de la toma de agua de semillas en germinación (adaptado de Bewley y Black, 1986).

por el aumento de volumen de las células y no por su división. Los datos indican que conforme la germinación avanza, las sustancias nitrogenadas (proteínas y nucleótidos) y principalmente carbohidratos, ambos localizados en el endospermo, así como los lípidos en el escutelo, son transportados hacia el eje embrionario, pero para ser asimilados por éste, los polímeros deben ser hidrolizados a aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y glicerol respectivamente. Se conoce por ejemplo, que en la semilla de maíz el almidón representa del 70 al 80% de los carbohidratos almacenados en el endospermo y su degradación ocurre por la actividad de las enzimas de la capa de aleurona, las cuales aumentan su actividad o elevan su síntesis por un estímulo exógeno, como es el ácido giberélico. Aunado al marcado incremento en la velocidad de síntesis de proteínas se observa una síntesis activa de nucleótidos y ácidos nucleicos en el eje embrionario de maíz. Esta fase finaliza en el punto de la salida de la radícula de la semilla, lo cual marca también el inicio de la fase III.

1.2.3 Fase III.

En esta fase se reinicia la toma de agua por la semilla y es aquí en donde ocurren los mayores cambios morfológicos del embrión. Se inicia con la salida de la radícula, la cual crece hasta convertirse en la raíz primaria, mientras que en el extremo superior del eje embrionario empieza el crecimiento del tallo o epicotilo y la aparición de las primeras hojas. La aparición de la radícula marca el inicio de la primera división mitótica de las células embrionarias y el crecimiento de ésta ocurre a expensas de los nutrimentos del endospermo; al desaparecer éste y el escutelo, comienza el crecimiento autótrofo de la nueva plántula (Bewley y Black, 1986).

1. INTRODUCCIÓN

1.3 LA TEORÍA DEL CRECIMIENTO ÁCIDO.

Las células de las plantas se alargan irreversiblemente sólo cuando los enlaces de soporte en la pared celular son rotos, este proceso puede estar acoplado con la intercalación de nuevos polímeros de pared celular y el deslizamiento de otros componentes de pared celular (Cosgrove, 1993). Se sugirió que el factor que promovía el aflojamiento de la pared eran iones hidrógeno. Esta idea y subsecuentes datos que la apoyaban dieron realce a la Teoría del crecimiento ácido (Hager et al. 1971, Rayle 1973, Rayle y Cleland, 1970, Rayle y Cleland, 1977), la cual postula que cuando se exponen a auxinas, las células susceptibles excretan protones hacia la pared (apoplasto) a una velocidad acrecentada, resultando en una disminución del pH apoplástico. El pH disminuido en la pared activa el proceso de aflojamiento, pero su naturaleza exacta es desconocida, debido a que la adición de ácido exógeno causa un incremento transiente (1-4 hs) en la velocidad de crecimiento (Fig. 3). La auxina debe también mediar eventos adicionales a la acidificación de la pared para continuar el crecimiento por un período de tiempo extenso. Estos eventos pueden incluir osmoregulación, síntesis de pared celular y mantenimiento de la capacidad de la pared de responder a la inducción del aflojamiento (por acidificación).

La mayor parte de la investigación sobre la teoría del crecimiento ácido de la acción de las auxinas se ha enfocado sobre secciones de tallo y coleoptilo en crecimiento. Pero en otros órganos y en plantas intactas la evidencia no es tan clara ni extensa. La correlación entre excreción de H^+ y el crecimiento de la raíz sugiere que el crecimiento endógeno de este órgano debe ser también mediado por ácido (Moloney *et al.* 1981).

Una variedad de mecanismos podrían, en teoría, llevar a la acidificación de la pared celular inducida por auxina. Sin embargo, la evidencia directa y/o circunstancial ha hecho aceptar que la excreción de H^+ es mediada por la ATPasa de la membrana

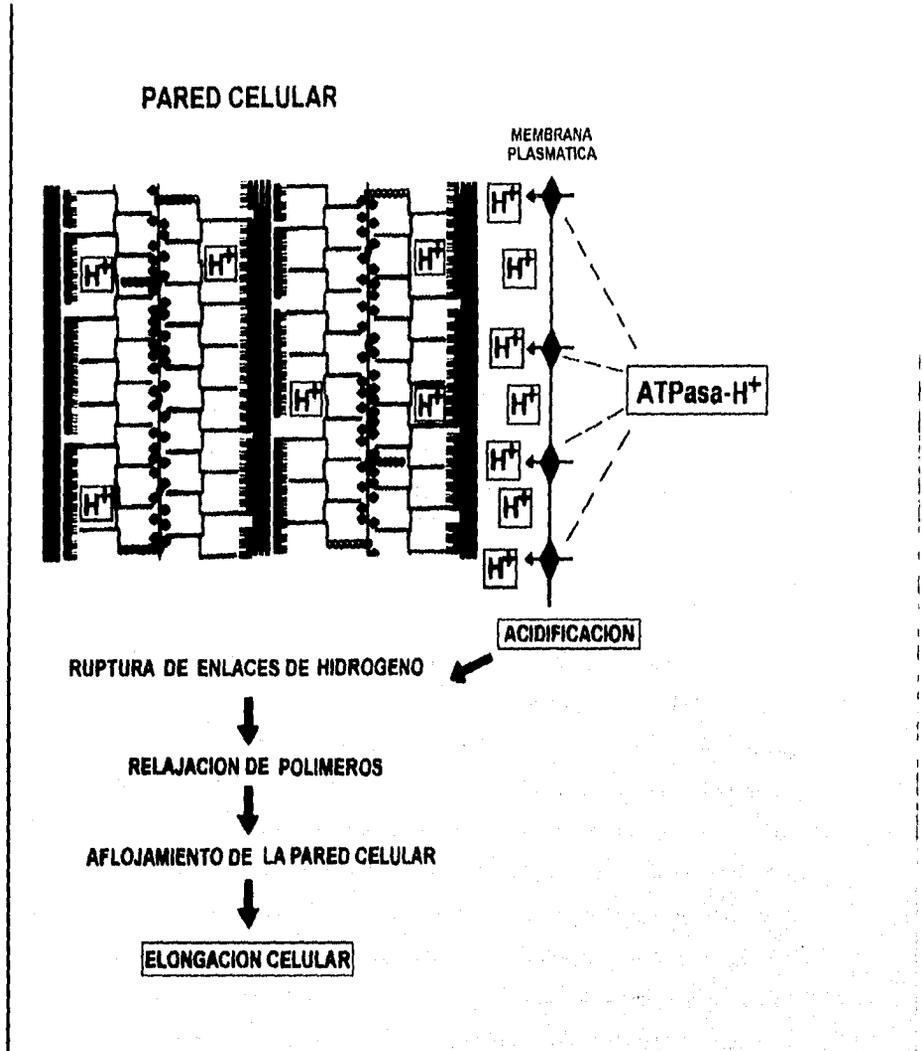


Fig. 3. Eventos que ilustran la Teoría del crecimiento ácido inducido por auxinas.

I. INTRODUCCIÓN

plasmática. Esta hipótesis ha sido apoyada por los experimentos presentados por Hager y colaboradores (Hager *et al.* 1991). Usando mediciones de actividad y un anticuerpo contra una isoforma de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Hager *et al.* (1991) mostraron que el tratamiento con auxina de coleoptilos de *Zea mays* incrementaba la cantidad de ATPasa en la membrana plasmática inmunodetectable. La cicloheximida que es un inhibidor de la traducción del mRNA, es un rápido y potente inhibidor del crecimiento inducido por auxina y disminuye rápidamente el incremento del nivel de la ATPasa (cantidad de proteína) que la auxina había aumentado. Es interesante el hecho de que el crecimiento inducido por fusicoccina no incremente los niveles de la ATPasa de H^+ . Esto indica que el incremento observado en los niveles de ATPasa es una respuesta a auxina y no una respuesta al crecimiento. El mecanismo molecular del incremento inducido por auxina en los niveles de ATPasa detectables por anticuerpo es desconocido. No ha sido demostrado directamente que el incremento en los niveles de ATPasa de H^+ detectable por anticuerpo reflejen y/o sean responsables del incremento en el bombeo de protones.

Se han propuesto maneras alternativas acerca de como la auxina puede estimular a la ATPasa de H^+ . Una forma es causando una reducción en el pH citoplásmico. Debido a que el pH óptimo para la enzima es 6.5, y que el pH citoplásmico normalmente es de 7.2 a 7.5, una reducción en el pH citoplásmico causaría un gran incremento en la actividad de la ATPasa. Tal disminución en el pH citoplásmico en respuesta a una auxina ha sido medido tanto con microelectrodos de pH, como con colorantes fluorescentes de pH y microscopía confocal. Otra posibilidad es que la auxina active a la ATPasa vía fosforilación por una proteína cinasa (Xing, 1996). El efecto de la auxina sería indirecto, posiblemente por vía de un mejoramiento del ciclo inositol trifosfato o por un incremento en el Ca^{2+} citoplásmico (Hager, 1991). Finalmente, un efecto directo de auxina sobre la V_{max} de bombeo de protones dirigido por ATP ha sido reportado en vesículas de membrana plasmática de hoja de tabaco (Rayle y Cleland, 1992). En el caso de los experimentos de Hager, el aumento en la actividad de la ATPasa, sería consistente con un aumento en la V_{max} . Este efecto todavía no ha sido demostrado para algún otro tejido.

Cuando la teoría fué propuesta, se tenía el conocimiento de que otros procesos dependientes de auxinas tales como la exportación de enzimas para el aflojamiento de la pared o de precursores de la pared celular eran también requeridos para sostener el crecimiento (Cleland, 1971). Sin embargo, ahora queda claro que la acidificación inducida por auxina es suficiente para llevar a cabo por lo menos en las primeras pocas horas, el crecimiento inducido por auxina (Rayle y Cleland 1992).

1.4 LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE LAS PLANTAS.

Las membranas biológicas son conjuntos laminares organizados constituidos principalmente por proteínas y lípidos (Stryer, 1988).

Las membranas son distintas en composición como lo son en funciones. Sin embargo tienen en común características como: 1) que todas son estructuras laminares de pocas moléculas de grosor y que forman espacios cerrados entre compartimentos de distinta composición; 2) que constan principalmente de proteínas y lípidos, además de carbohidratos enlazados a lípidos y proteínas; 3) los lípidos de membrana son moléculas relativamente pequeñas que tienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica; 4) constituyen asociaciones moleculares no covalentes; 5) son asimétricas; 6) son estructuras fluidas; 7) ciertas proteínas específicas son mediadoras de funciones características de las membranas. Las proteínas se utilizan como bombas, compuertas, receptores, transductores de energía y enzimas.

1. INTRODUCCIÓN

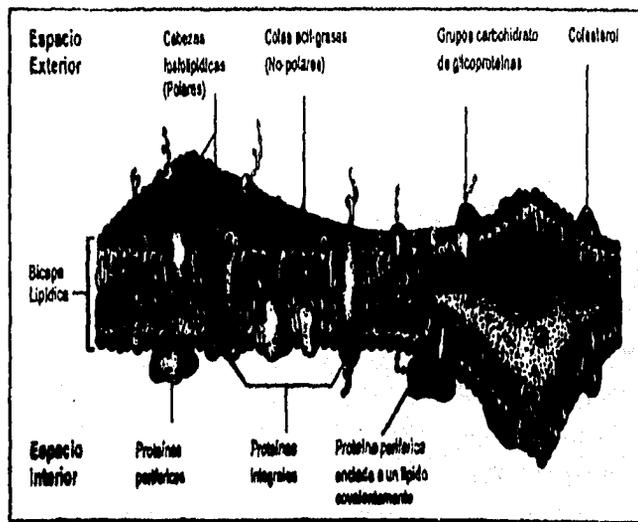


Fig. 4. Modelo actual del mosaico fluido para representar la estructura de la membrana (Lehninger, A.; Nelson, D. and Cox, M. 1993).

En células de plantas superiores, las membranas definen el límite externo del protoplasto viviente y su compartimentación interna en organelos, los cuales incluyen la vacuola central, retículo endoplásmico, mitocondria, plastidios y núcleo. Mientras que la pared celular provee estabilidad mecánica externa y protección a la célula de planta, la membrana celular tiene el importante papel de regular el ambiente químico interno del citoplasma y los organelos para los eventos metabólicos que tienen lugar (Baker, 1988). Este papel está relacionado a la habilidad de las membranas para actuar como barreras selectivas para el libre movimiento de solutos y, por tanto, controlar su tráfico entre el citoplasma y el exterior de la célula o el interior de los organelos. Por funcionar de esta manera, las membranas permiten que las células de la planta mantengan relativamente constante el ambiente citoplásmico, contra el cual puede estar un ambiente externo variable y en algunas ocasiones perjudicial. Una pérdida en la integridad de la membrana generalmente da lugar a la muerte celular.

La habilidad de las membranas de regular el flujo de solutos está íntimamente relacionada con su estructura y la presencia de sistemas de transporte para solutos importantes fisiológicamente.

1.4.1 ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS PLÁSMATICAS DE LAS CÉLULAS DE PLANTAS.

Ha sido conocido que los lípidos y proteínas representan componentes estructurales de las membranas de las plantas. Sin embargo, se decía que estas proteínas se encontraban como una capa delgada sobre la superficie exterior de la membrana y por tanto servía primariamente como un componente estructural más que como componente funcional. Actualmente, las evidencias experimentales han corroborado el modelo del "Mosaico-Fluido" propuesto por Singer y Nicolson en 1972 (Singer, 1992) (Figura 4). Este modelo es el que mejor explica los aspectos tanto estructurales como funcionales de la mayoría de las membranas biológicas.

I. INTRODUCCIÓN

La principal clase de lípidos que compone la membrana de la célula vegetal son los fosfolípidos y los esteroides. Los fosfolípidos de membrana contienen dos cadenas laterales de ácido graso esterificadas al primero y segundo grupos hidroxilo del glicerol, mientras que el tercer grupo hidroxilo está enlazado a un fosfato (ácido fosfatídico) o a un fosfato esterificado con el grupo hidroxilo de otros alcoholes. Los alcoholes comunes de los fosfoglicéridos son la serina, etanolamina, colina, glicerol e inositol. Por tanto los fosfoglicéridos principales son: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y difosfatidilglicerol.

Los ácidos grasos que componen las cadenas laterales del acilo esterificados a las posiciones 1 y 2 son unidades de 16 a 18 carbonos de largo, generalmente, y pueden incluir al ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), y ácido linoléico (18:3) (Larsson *et al.* 1990). Como los fosfolípidos de membrana contienen dominios tanto hidrofóbicos (las cadenas laterales del ácido graso esterificado) como hidrofílicos (grupo fosforilado), estas moléculas son conocidas por ser anfipáticas. En el modelo del mosaico fluido, los fosfolípidos de membrana están arreglados en una bicapa lipídica donde las cadenas laterales aciladas están presentes en el interior de la membrana y las cabezas hidrofílicas (grupos fosforilados) se encuentran hacia el exterior de la membrana (Singer, 1992).

Los esteroides asociados con las membranas vegetales son también anfipáticos, ya que contienen dominios hidrofílicos (hidroxilo) e hidrofóbico (estructura de anillos fusionados). Estas moléculas se orientan dentro de la bicapa lipídica de la membrana de tal manera que sus grupos hidroxilo se asocian con la región exterior hidrofílica y su estructura cíclica compleja se asocia con la región interior hidrofóbica. Mientras que las membranas de plantas contienen sólo cantidades menores de colesterol, esteroides tales como sitosterol, estigmasterol, y campesterol son comunes (Hartmann y Benevise, 1987).

Aunque los modelos más primitivos de estructura membranal visualizaron a la proteína estando en una conformación extendida sobre la superficie de la membrana

(Danielli y Davson, 1935), ahora se tiene el punto de vista de que las proteínas de membrana están en un arreglo globular en asociación con la bicapa lipídica (Figura 4). En término de su asociación o arreglo en la membrana, las proteínas de membrana pueden ser clasificadas como integrales o periféricas (Singer, 1992). Aunque globular en naturaleza, las proteínas periféricas están asociadas con la superficie de la membrana por interacciones electrostáticas y/o puentes de hidrógeno tanto a los grupos cabeza de los lípidos (grupos fosforilados) o a otras proteínas. Cuando son disociadas de la membrana por tratamiento con sales o quelantes, las proteínas periféricas mantienen su conformación nativa en solución y pueden retener su actividad enzimática, si la presentan (Singer, 1992). En contraste, las proteínas integrales están profundamente embebidas en la membrana y se pueden expandir a todo lo ancho de la bicapa lipídica (Singer, 1992). Las proteínas integrales, como los lípidos de membrana mismos, son estructuras anfipáticas teniendo dominios hidrofóbicos e hidrofílicos. Cuando se presentan en la membrana, los dominios hidrofóbicos de las membranas integrales se asocian con el interior no polar de la bicapa lipídica mientras que los dominios hidrofílicos se localizan sobre la superficie de la membrana e interactúan con el agua. A diferencia de las proteínas periféricas, las proteínas integrales no pueden ser removidas de la membrana por simple tratamiento con sales o quelantes. Para remover o solubilizar proteínas integrales de membrana se requiere el uso de moléculas detergentes que rompan las fuertes interacciones entre los dominios hidrofóbicos de la proteína y el interior lipídico (Jain y Zakim, 1987). Aunque se han representado por estructuras globulares indefinidas como en la Fig. 4, debe mencionarse que tanto las proteínas integrales como las periféricas poseen una secuencia primaria de aminoácidos con

estructuras secundarias enroscadas (hélice α) o doblada (hoja plegada β) o enrollada al azar. Para proteínas integrales de membrana, la cadena peptídica (secuencia de aminoácidos primaria) puede tener un número posible de arreglos dentro de la bicapa lipídica. Este arreglo de la cadena polipeptídica de proteínas integrales a través de la membrana es referido como su topología (Jennings, 1989). Una porción singular de la proteína puede solo penetrar parcialmente en la bicapa y entonces salir a la superficie

I. INTRODUCCIÓN

(proteína monotópica) o extenderse a través de toda la bicapa sólo una vez (proteína bitópica). Alternativamente, la cadena peptídica puede cruzar a través de la bicapa lipídica más de una vez (proteínas politópicas). Para proteínas envueltas en el movimiento transmembranal de solutos, el arreglo politópico es el que se observa más generalmente, ya que permite la producción de una vía de proteína atenuada para la conducción de solutos. Las regiones de proteínas integrales que se expanden en la bicapa son α -hélice y contienen aminoácidos con cadenas laterales no polares. Como promedio, el grosor de la bicapa se encuentra entre de 6 y 8 nm, por lo que se necesitan cerca de 20 aminoácidos en una α -hélice para cruzar la membrana de un lado a otro.

Dependiendo de la localización celular, los carbohidratos pueden representar tanto una minoría, relativamente, o un componente significativo de membranas con relación a lípidos y proteína (Larsson *et al.* 1990). Los carbohidratos están asociados a proteínas como glicoproteínas. Sin embargo los glicolípidos pueden también estar presentes en una menor extensión. Los carbohidratos asociados a glicoproteínas contribuyen al arreglo asimétrico de la bicapa, pues están presentes en la cara de la membrana que no está en contacto con el citoplasma.

Una característica clave del modelo del mosaico fluido es que las membranas pueden representar estructuras asimétricas con respecto a la composición de proteína sobre los distintos lados de la membrana. Esta propiedad es absolutamente esencial para la actividad funcional de sistemas de transporte asociados con membranas, ya que se requiere una orientación definida de las proteínas que median estos procesos (Singer, 1992). Aunque está mejor documentada para sistemas en células animales, la asimetría con respecto a la composición lipídica de cada media bicapa de la membrana también ha sido sugerida, al menos para membrana plasmática en plantas, debido a diferencias en puntos isoelectrónicos entre las caras superficiales apoplásticas y citoplásmicas. Mientras que originalmente se pensaba que el movimiento lateral de proteínas en el plano de la membrana era al azar, actualmente parece que la posición y movimiento de proteínas específicas en una membrana puede ser controlado por elementos del sistema

citoesquelético (Traas, 1990). El modelo del mosaico fluido presenta una vista idealizada de una membrana con extensas regiones de lípido y un reducido arreglo de proteínas integrales y periféricas. Sin embargo hay que señalar que membranas de diferentes organelos pueden diferir sustancialmente en el contenido relativo de proteína/lípido (por ejemplo la membrana vacuolar contiene poca proteína y una gran cantidad de lípidos, mientras la membrana mitocondrial interna contiene proteína en un 85% y un bajo contenido de lípidos). Por eso el modelo del mosaico fluido representa un vista generalizada de la estructura de una membrana, misma que puede variar dependiendo del origen de la membrana celular (Briskin, 1994).

1.4.2 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SOLUTOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA.

Para que un soluto entre o salga de la célula o de un organelo interno, éste debe atravesar la membrana plasmática. Dependiendo de la naturaleza del soluto, dos posibles vías para su movimiento a través de la membrana pueden ser posibles:

- a) **Movimiento directo del soluto a través de la membrana.** Si un soluto es suficientemente soluble en lípidos, es posible que éste se mueva directamente a través de la bicapa lipídica (Stein, 1986). Cuando este movimiento tiene lugar por difusión, el movimiento del soluto a través de la membrana se lleva a cabo de regiones de concentraciones altas a más bajas. Aquí la fuerza directriz para el movimiento a través de la membrana es el gradiente de concentración. Adicionalmente al gradiente de concentración del soluto, la presencia de un gradiente eléctrico y/o de pH a través de la membrana plasmática pueden también servir como fuerzas directrices para el movimiento de soluto a través de la bicapa lipídica.

- b) **Movimiento del soluto a través de sistemas de transporte:** Para la mayoría de iones y la mayoría de metabolitos que contienen grupos polares, el medio hidrofóbico del interior de la membrana lipídica representa una barrera

I. INTRODUCCIÓN

significativa para el movimiento directo a través de la membrana. Por ello, el movimiento transmembranal de estos solutos necesariamente involucra la actividad de proteínas que funcionan como sistemas de transporte. La existencia de sistemas de transporte para solutos específicos representa la base de la selectividad para la acumulación de solutos observado en las membranas y vincula ese transporte con la energía metabólica (Baker, 1988). Claramente, la función de los sistemas de transporte específicos en las membranas de las plantas es esencial para procesos tales como la adquisición de nutrientes minerales por las raíces (Clarkson, 1988), el transporte en el floema (Humphreys, 1988) y el transporte de metabolitos dentro y fuera de la célula (Sanders y Slayman, 1989) y de los organelos (Tanner y Sauer, 1989). Para mediar el movimiento transmembranal de un soluto, los componentes de estos sistemas de transporte son proteínas integrales de membrana las cuales pueden estar compuestas tanto de grandes subunidades polipeptídicas aisladas, o de una serie de polipéptidos menores asociados, los cuales colectivamente cruzan la bicapa.

Los sistemas de transporte asociados a las membranas de células vegetales o de otros organismos pueden ser clasificados como: bombas, acarreadores o canales (Sanders y Slayman, 1989; Stein, 1990). Las bombas son sistemas de transporte que acoplan una reacción química de ruptura de enlace con la consecuente liberación de energía, tal como la hidrólisis de ATP, al movimiento transmembranal de un soluto. Entre las bombas asociadas con membranas de plantas se incluye a la ATPasa de H^+ asociada con la membrana plasmática. Las bombas transportadoras frecuentemente son llamadas sistemas de transporte primario debido a que el vínculo de transporte a una reacción metabólica es directo. En contraste, los acarreadores de solutos son sistemas de transporte que median el movimiento de uno o más solutos a través de la membrana sin un directo acoplamiento a una reacción química. Por esta razón los acarreadores generalmente no tienen una actividad enzimática asociada como las bombas. Los acarreadores pueden mediar el movimiento transmembranal de un sólo soluto (uniporte), o el movimiento de un soluto puede estar acoplado al movimiento de

otro soluto tanto en la misma dirección (simporte) o la dirección opuesta (antiporte). En células de plantas, las proteínas transportadoras en simporte (simportadores) o antiporte (antiportadores), están típicamente acoplados al movimiento de H^+ para el transporte de solutos tanto en la misma dirección, como en la opuesta respectivamente. Por otra parte, los uniportes comunmente están involucrados en el transporte de solutos cargados, los cuales se mueven en respuesta al gradiente eléctrico presente a través de la membrana. Los canales son similares a los acarreadores en uniporte (uniportadores), pues median el transporte de un soluto a través de la membrana, la principal diferencia entre estos dos sistemas de transporte es el mecanismo por el cual el movimiento transmembranal tiene lugar. En los acarreadores, el movimiento transmembranal se lleva a cabo por una serie de cambios secuenciales de conformación en la proteína acarreadora, que involucran la asociación o enlazamiento del soluto, su translocación a través de la membrana, y su liberación. Mientras que los acarreadores pueden transportar iones o moléculas orgánicas, los canales participan sólo en el transporte de iones y representan un importante componente de los sistemas de transducción de señales en las células (Emons y Emons 1992; Hedrich y Schroeder, 1989). Debido entonces a que tanto los acarreadores como los canales no acoplan el transporte directamente a una reacción química son denominados sistemas de transporte secundario.

1.5 LA ATPasa DE H^+ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (Sánchez, 1994; Gavilanes *et al.* 1995) es una enzima de localización membranal, con un peso molecular de 100 kDa y funciona transportando H^+ desde el citoplasma hacia el espacio extracelular o apoplástico e hidrolizando ATP. Su actividad tiene consecuencias fisiológicas importantes para la planta: es esencial para el transporte secundario de solutos a través de la membrana, el alargamiento celular y la regulación del pH citoplasmático y extracelular.

1. INTRODUCCIÓN

1.5.1 ESTRUCTURA.

Por estudios efectuados con ATPasa de H^+ de los géneros *Arabidopsis*, *Lycopersicon* y *Nicotiana* se han descrito secuencias que predicen proteínas de 948 a 957 aminoácidos, según la especie y la isoforma, lo que corresponde a un peso molecular aproximado de 100 kDa en geles desnaturalizantes (Palmgren y Christensen, 1994).

Con base en la estructura primaria de esta enzima (secuencia de aminoácidos), se predice una estructura secundaria de la proteína con 8 a 10 segmentos transmembrauales y la mayoría de las regiones hidrofílicas se encuentran hacia la cara citosólica de la membrana (Serrano, 1989).

Con la información obtenida de estudios de modificación química de aminoácidos específicos, la proteólisis controlada y la mutagénesis dirigida, se ha propuesto una estructura de la enzima donde las hélices transmembrauales forman un posible canal hidrofóbico conductor de H^+ . Mientras que la porción citoplásmica de la enzima contiene al sitio catalítico con regiones muy conservadas en las ATPasas tipo P (Fig. 5). Este tipo de ATPasas parece que existen en dos conformaciones que se alternan durante el ciclo catalítico (E_1 y E_2).

La estructura propuesta y los dominios funcionales se muestran en la figura 5. La porción citosólica hidrofílica de la enzima está compuesta por 6 o 7 porciones constituidas por los primeros 67 a 72 residuos del segmento amino terminal (dependiendo de la especie y la isoforma), seguida por una primera asa de 124 aminoácidos que incluye la secuencia TGES, una segunda asa muy grande con 315 aminoácidos, una o dos asas pequeñas que conectan los últimos segmentos transmembrauales y finalmente la porción del carboxilo terminal que contiene entre 108 y 120 aminoácidos (Fig. 5)

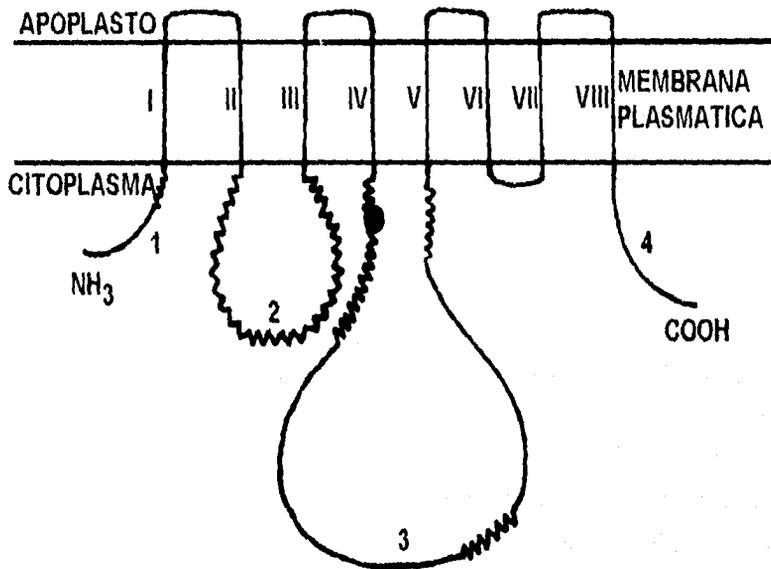


Fig. 5. Representación de los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos de la estructura primaria de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (Gavilanez-Ruiz *et al.* 1995)

1. INTRODUCCIÓN

Es posible que la región del amino terminal no esté involucrada en alguna función dentro de la catálisis, porque es muy variable en cuanto a extensión y a secuencia. La región de la asa inicial contiene la secuencia conservada TGES, una mutación en ella produce la inhibición de la hidrólisis (aunque no la formación) del intermediario. Esto indica que esta región cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado, por ello se le conoce como el dominio de la fosfatasa. El asa mayor, considerada como los dominios de transducción y de cinasa, contiene cinco secuencias conservadas: DKTGILT, KGAP, DPPR, MLTGD y GDGXNDAPALK. La primera contiene al Asp 329 que une covalentemente al Pi durante el ciclo catalítico; las cuatro restantes están involucradas en la unión del ATP (Serrano, 1993). La primera secuencia conservada donde se forma el intermediario fosforilado se localizaría en la apertura citoplásmica del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte de H^+ con la hidrólisis de ATP (Serrano, 1988).

Durante el ciclo catalítico en la conformación E_1 , el dominio de la cinasa está activo pero el dominio fosfatasa no lo está y el sitio de unión del protón en la entrada del canal enlaza H^+ con gran afinidad del lado citoplásmico de la membrana. En la conformación E_2 , el dominio de la fosfatasa está activo mientras que el dominio de la cinasa no y el sitio de unión del protón en la entrada del canal enlaza H^+ con baja afinidad del lado externo de la membrana.

Los datos anteriores indican que las dos primeras asas se encuentran próximas, conformando el sitio catalítico y parte del dominio transduccional. La región del carboxilo terminal es inhibitoria de la reacción de hidrólisis y se cree que por ello puede ser reguladora de la actividad catalítica (Serrano et al. 1992). Los dominios transmembranales de la enzima forman el canal de conducción de los H^+ a través de la bicapa lipídica. Las relaciones topográficas entre los dominios transmembranales de la enzima están pobremente establecidas.

1.5.2 FUNCIÓN.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática cataliza dos reacciones, una vectorial, que es la transferencia de H^+ de un lado a otro de la membrana y otra escalar, que es la ruptura del enlace anhídrido éster del fosfato y del ATP. Ambas reacciones son simultáneas y están acopladas energéticamente entre sí, ya que la primera tiene un ΔG positivo y la segunda uno negativo (Fig. 6). Tanto la hidrólisis de ATP como el bombeo de H^+ se han caracterizado en vesículas de membrana y en la enzima purificada y/o reconstituida en liposomas (Serrano 1988; Serrano 1990).

La actividad de la enzima es medida a veces como hidrólisis de ATP y a veces como bombeo de H^+ . Ambos parámetros son paralelos, presentando valores semejantes de K_m tanto para la hidrólisis de ATP como para la translocación de H^+ . Esta última se realiza en contra de un gradiente de concentración, esto es, los H^+ se transportan desde el citosol, en donde hay una concentración de $0.1 \mu M$ (pH 7) hacia el espacio apoplástico con una concentración de $10 \mu M$ (pH 5).

La enzima es altamente específica para su sustrato, el ATP, más que para otro nucleósido trifosfatado; el ATP en complejo con el Mg^{2+} es el sustrato real de la reacción de hidrólisis. La K_m reportada para la ATP varía entre 0.2 y 1.3 mM. Algunas de las K_m reportadas para ATPasa de membrana plasmática son 3.941 mM, 1.239 mM y 1.5 mM (Sánchez-Nieto *et al.* 1992; Janh, 1996) y para raíz de avena 0.2 mM (Palmgren y Sommarin, 1989). Existen varios inhibidores para la enzima: el ADP que es competitivo y con una $K_i \cong 2mM$; el P_i , no competitivo y con $K_i \cong 20 mM$, los mercuriales, el Cu^{2+} y en particular el VO_4 que es el más usado, con K_i en el rango de 1-5 μM . Existen otros como la eritrocina B (K_i 0.3 - 1 μM), el dietilestilbestrol (DES) y la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD). Desgraciadamente ninguno de ellos es absolutamente específico y pueden también inhibir otras enzimas como fosfatasas u otras ATPasas. También existen

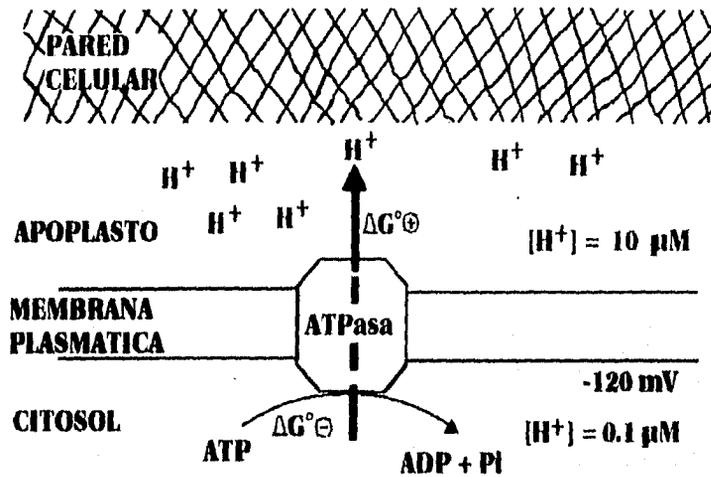


Fig. 6. Esquema que representa la localización de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, las dos reacciones que cataliza, su energética y los gradientes eléctrico y de pH que genera (Gavilanes-Ruiz *et al.* 1995).

1. INTRODUCCIÓN

estimuladores de la ATPasa como las auxinas, la fusicoccina, la siringomicina y el K^+ . El efecto de los lípidos en la actividad de la ATPasa también ha sido explorado. Se ha encontrado que detergentes como el Tritón X-100 y la lisofosfatidilcolina tienen también un efecto activador.

1.5.3 PAPELES FISIOLÓGICOS.

La enzima funciona a nivel molecular transportando H^+ e hidrolizando ATP, generando gradientes eléctricos y de pH ($\Delta\Psi$ y ΔpH respectivamente) a través de la membrana plasmática. Los gradientes electroquímicos de H^+ ($\Delta\mu H^+$) pueden ser utilizados por cualquier célula o por células especializadas para diferentes funciones como son: el transporte secundario, el alargamiento celular en tejidos en crecimiento y flujo de iones en las células guardia que forman los estomas. Aquí se describen algunos de los procesos fisiológicos en los que participa la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

a) Transporte secundario: El movimiento de los sacáridos y aminoácidos a través de la membrana plasmática consiste en sistemas de simporte sacárido/ H^+ y aminoácido/ H^+ específicos, que requieren de una diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) y/o un ΔpH . La fuerza impulsora de este transporte está dada por la acción de la ATPasa como bomba primaria, pues al bombear H^+ al exterior de la célula, genera el $\Delta\Psi$ y aumenta la concentración externa de H^+ , lo cual favorece la entrada de un H^+ acompañando a un azúcar o a un aminoácido a través del acarreador. El transporte de aminoácidos se lleva a cabo a través de cuatro tipos de acarreadores: dos para grupos diferentes de aminoácidos neutros, uno para aminoácidos ácidos y otro para aminoácidos básicos. Todos ellos son acarreadores en simporte aminoácido/ H^+ , altamente dependientes del ΔpH . Los iones se transportan por acarreadores y canales. En ambos mecanismos, la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática contribuye a generar corrientes de H^+ , un potencial de reposo de la membrana y flujos de iones extracelulares. La activación de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en la

I. INTRODUCCIÓN

planta por factores ambientales como el nivel de CO_2 , la humedad, algunas fitohormonas o la luz, producen un flujo de H^+ que hiperpolariza la membrana plasmática, favoreciendo la entrada de K^+ por canales específicos (Becker *et al.*, 1993), esto da inicio a la apertura de estomas en la planta.

b) Regulación del pH celular: La capacidad de transportar H^+ del citoplasma al espacio apoplástico ha sugerido a la ATPasa de H^+ como parte importante de un mecanismo de regulación del pH citoplásmico, el cual tiene un valor entre 7 y 7.5.

c) Elongación celular: Las células de las plantas están rodeadas por una pared resistente pero flexible, hecha de polímeros, que permite el desarrollo de la presión de turgor de la célula y el cambio de su forma. Los polímeros que se entretajan en esta pared celular forman un entramado de varias mallas: una malla de microfibrillas de celulosa entrecruzadas por una matriz de polisacáridos, una malla de pectinas unidas por puentes de calcio y una malla de proteínas entrecruzadas entre sí y con otros componentes de la pared (Cosgrove, 1993). Cuando la célula crece, la pared celular tiene que aflojarse, "relajando" las mallas que la componen para que la célula que encierra pueda aumentar su tamaño. En tejidos de gran crecimiento como el coleoptilo y el tallo, las auxinas son responsables de iniciar este proceso induciendo la excreción de H^+ desde el citoplasma hacia la pared celular. La acidificación producida de alguna manera contribuye al "aflojamiento" de la pared, permitiendo así el alargamiento celular. Este fenómeno se describe en la "Teoría del crecimiento ácido" (Rayle y Cleland, 1992). Como ya se ha explicado en la sección correspondiente a este tema, se han hallado evidencias experimentales que incluyen la medición del efecto de las auxinas y sus análogos en la actividad acidificadora de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, y el efecto de inhibidores de la enzima en el crecimiento de preparaciones de coleoptilos abrasados, esos resultados indican que es esta enzima la que promueve la acidificación de la pared celular (Senn y Goldsmith, 1988) ya que estos compuestos inducen la síntesis e incorporación masiva de la ATPasa a la membrana plasmática (Hager *et al.* 1991).

1. INTRODUCCIÓN

Una de las enzimas que podría estar involucrada de manera importante en el proceso de germinación de la semilla sería la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, puesto que al transportar H^+ crea una diferencia de potencial eléctrico y de pH en la membrana, mismo que puede ser usado para el transporte de nutrimentos hacia las células embrionarias y para la acidificación que se produce en el apoplasto, ocasionando que los componentes de la pared celular se aflojen, éstos dos procesos ayudarían al crecimiento de la célula del embrión en germinación.

2. HIPOTESIS

Si la actividad de bombeo de protones de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática desempeña un papel relevante en la elongación celular durante la germinación, entonces se esperaría un aumento en la actividad de esta enzima durante el período de la protrusión de la radícula, cuando las células del embrión necesitan elongarse.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Medir la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática a tiempos largos de imbibición, cuando la radícula comienza a crecer y hay elongación celular.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer los parámetros de germinación (% de germinación e incremento de peso húmedo) de los embriones de maíz del híbrido H-355 para seleccionar los tiempos óptimos de estudio de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, esto es, los tiempos en donde se inicia la elongación celular.
2. Obtener y purificar vesículas de membrana plasmática por la técnica de reparto de fases, a partir de embriones de maíz embebidos durante los tiempos seleccionados.
3. Medir la actividad de hidrólisis de ATP correspondiente a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en las preparaciones de vesículas de membrana plasmática a los tiempos de imbibición seleccionados.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron embriones de semillas de maíz de los híbridos H-355 (PRONASE, 1993), HS-2 (CP 1994) y A662 (Montecillo, 1989). Los embriones se diseccionaron con una navaja de un sólo filo. Se realizaron las incisiones en la semilla para la separación del embrión del endospermo.

4.2 IMBIBICIÓN DE EMBRIONES Y SEMILLAS.

El material utilizado como pipetas, cajas petri (junto con discos de papel filtro del diámetro de la caja), matraces, etc., se esterilizó a 120 °C en horno o autoclave. También se esterilizó el agua de imbibición en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Las semillas y embriones se desinfectaron de la siguiente manera:

Se lavaron añadiendo una dilución en agua 1:37 de una solución de hipoclorito de sodio comercial con un contenido de 6% de cloro activo y agitando por dos minutos. Se decantó la solución de lavado y posteriormente se enjuagaron con agua bidestilada, agitando dos minutos (dos veces).

Los embriones o semillas desinfectados se transfirieron a las cajas de petri (se añade cada lote a una caja distinta) a las que se les añadieron aproximadamente 10 ml de una solución de cloramfenicol 50 µg/ml preparada con agua estéril, a partir de una solución concentrada del antibiótico en etanol 50 mg/ml. La siembra de semillas y especialmente de embriones procuró realizarse bajo la flama de un mechero Fisher. Tanto la adición de la solución de cloramfenicol, como la siembra, se realizó

4. MATERIALES Y METODOS

en condiciones estériles para evitar la contaminación con hongos o bacterias, especialmente porque algunas incubaciones fueron muy largas.

Las cajas de petri se introdujeron a una estufa con temperatura constante de 29°C para su incubación (en la obscuridad) por los tiempos que se indican más adelante.

4.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN.

Se pesan 60 embriones de maíz en lotes de 20, los cuales se distribuyeron en 3 cajas petri (20 embriones en cada caja) y se registró su peso (para documentar el tiempo cero). Se pusieron a germinar bajo las condiciones descritas en la sección anterior.

El conteo de los embriones germinados se realizó a los distintos tiempos de incubación (4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas). Para semillas se llevó a cabo el mismo proceso. Se consideró germinada una semilla o un embrión cuando la radícula se asomó 1 mm por lo menos de la estructura respectiva.

4.4 ACUMULACIÓN DE PESO HÚMEDO.

Después de la incubación y conteo de embriones germinados (sección anterior), se pesaron dos de los lotes, individualmente, a cada tiempo de incubación (4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72) y se registraron los pesos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.5 OBTENCION DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Procedimiento de homogenización. Se congelaron los embriones con nitrógeno líquido y se homogenizaron con mortero y pistilo preenfriados(15 min.) hasta obtener un polvo fino. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Se transfirió este polvo fino a un recipiente pequeño y se le añadió medio I en una relación de 1g de embrión por 1.5 ml. de medio (El medio I se compone de sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, ATP 1mM, Tris-HCl 70 mM pH 8.0, DTE o DTT* 4 mM, β-mercaptoetanol*15 mM, TPCK* 100 µg/ml, TLCK* 50 µg/ml y quimostatina* 7µg/ml). En seguida se realizó una segunda homogenización con el triturador de tejidos por 4 min a 12 000 rpm. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el residuo se re-homogenizó con la misma relación de tejido:medio. Por último, se combinaron ambos filtrados para posteriormente obtener la fracción membranal. El homogenado se centrifugó a una velocidad de 5000 g por 10 min. El sobrenadante de ésta centrifugación fue denominado fracción de homogenado sin núcleos (H-N). Posteriormente a esta fracción de H-N se le midió cantidad de proteína por el método de Lowry descrito anteriormente.

Para la obtención de vesículas enriquecidas en membrana plasmática se siguió el procedimiento descrito por Larsson *et al.* (1994), buscándose las mejores condiciones para obtener el mayor enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz. El procedimiento es como sigue:

El volumen de fracción de H-N correspondiente a 50 mg de proteína se añadió a una mezcla de fases (que se hizo poco antes de usarse o un día anterior), pesando en la balanza los siguientes componentes:

*Éstos se añadieron justo antes de usarse la solución.

MEZCLA DE FASES.

Conc. Stock	Cantidad	Conc. final
Dextran T-500 20% (p/p)	11.52 g	6.4%
Polietilenglicol 3350 40% (p/p)	5.76 g	6.4%
Sacarosa sólida	3.05 g	330 mM
0.2 KH ₂ PO ₄ pH 7.8	0.675 ml.	5 mM
Agua	aforar a 27g	

Después de agregar la fracción de H-N, se ajustó a una concentración de KH₂PO₄ 5 mM pH 7.8, 330 mM de sacarosa y a un peso de 9 g.

La fracción de H-N más la mezcla de fases se agitó invirtiendo 25 veces el tubo para centrifugarse después a 1500 g por 5 minutos a 4°C. De ésta centrifugación se lograron separar dos fases: La superior (PEG) a la que se le denominó U₁ (constituída preferencialmente por las vesículas de membrana plasmática) y la fase inferior (Dextran), L₁ (constituída por otras vesículas celulares).

Por último, la fracción de U₁ enriquecida en vesículas de membrana plasmática se diluyó 1:1 en sacarosa 250 mM y Tris/HCl pH 7.5 10 mM y se centrifugó a 100,000 g por 3.5 hs. a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 200-500µl de medio II (éste tiene la misma composición que el medio I pero no contiene β-mercaptoetanol), almacenándose en alícuotas de 50-100 µl, a -70°C. Esta fracción es la que se utilizó para medir la actividad de hidrólisis de ATP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP.

Para realizar este ensayo se utilizó un volumen final de medio de hidrólisis de 150 μ l. Este medio contiene sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20mM (pH 7.0), CCCP 7 μ M, ATP/Tris 10 mM (pH 7.0), MgCl₂ 10 mM. Además de lisofosfatidilcolina 100 μ M para los casos en que se indica. También se utilizaron inhibidores específicos para algunas enzimas presentes en la fracción obtenida de vesículas de membrana plasmática. La NaN₃ 1 mM se usó para inhibir a la ATPasa de H⁺ mitocondrial y el Na₂VO₄ 200 μ M para la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

La reacción se inició con la adición de 5-10 μ g de proteína, dejándose proceder por 1, 2 o 3 hs a 30^oC; la reacción se detuvo con la adición de 150 μ l de SDS 24% (99.9% de pureza). La hidrólisis de ATP se midió con la liberación de fosfatos y los resultados se expresaron en nmolPi mg⁻¹h⁻¹. La cuantificación del fosfato liberado se llevó a cabo por el método de González-Romo *et al.* (1992) descrito anteriormente.

4.7 DETERMINACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO.

Para la determinación de fosfato inorgánico se utilizó el método de González-Romo *et al.* (1992). Para realizar el ensayo de determinación de fosfato inorgánico todas las soluciones, así como el material de vidrio que se utilice, deben estar contenidas en recipientes libres de fosfato inorgánico. Esto se logra lavando el material de vidrio con un detergente libre de fosfatos (Extran) y luego sumergiéndolo en ácido sulfúrico concentrado. En este procedimiento se añaden 150 μ l de la muestra con fosfatos o la solución estándar de fosfato de 1 mM de K₂HPO₄ y se afora con agua bidestilada a 150 μ l, se le añaden 150 μ l de SDS al 24% y 300 μ l de mezcla B-C (molíbdato de amonio al 2% y ácido ascórbico al 12%, disueltos por separado en HCl 1 N y mezclados en relación 1:1). La mezcla se incubó de 3-10 min a temperatura ambiente y se agregaron después

450 µl del reactivo E (citrato de sodio 2%, metaarsenito de sodio 2% y ácido acético 2%). Después de 20 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia de las muestras a 850 nm (Fig. 7).

4.8 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Se llevó a cabo el procedimiento que se indica: a 0.9 ml. de agua bidestilada se añadieron de 2-5 µl de la muestra problema (si es homogenado sin núcleos 2 µl , si es fracción de membrana plasmática se añaden 5 µl y 2-5 µl de medio II como blancos). Se añadieron después 0.1 ml de DOC (desoxicolato de sodio) al 0.15 %, seguido por la adición del reactivo A (partes iguales de agua bidestilada, NaOH 0.8N, SDS al 10% y CTC que es una solución de Na₂CO₃ 10%, CuSO₄ 0.1% y K₂C₄H₄O₆ 0.2%). Además de estos reactivos se añadieron 0.5 ml. de reactivo B (1 volumen de reactivo de Folin Ciocalteu más 5 volúmenes de agua bidestilada). Se esperó 30 minutos y se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV160 SHIMADZU a 750 nm. Para la curva estándar de proteína se usaron de 10 a 100 µg de BSA (Albúmina de suero de bovino), siguiéndose el mismo tratamiento indicado para las muestras (Fig. 8).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

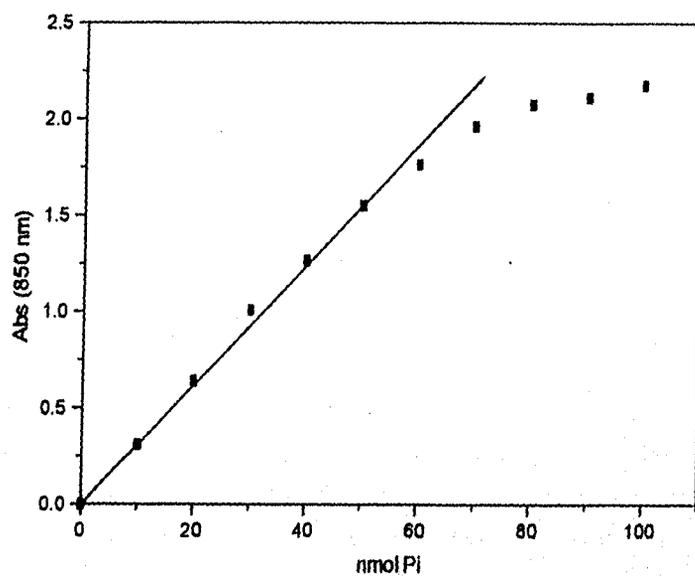


Fig. 7. Curva estándar de determinación de fosfato inorgánico por el método de González-Romo *et al.*

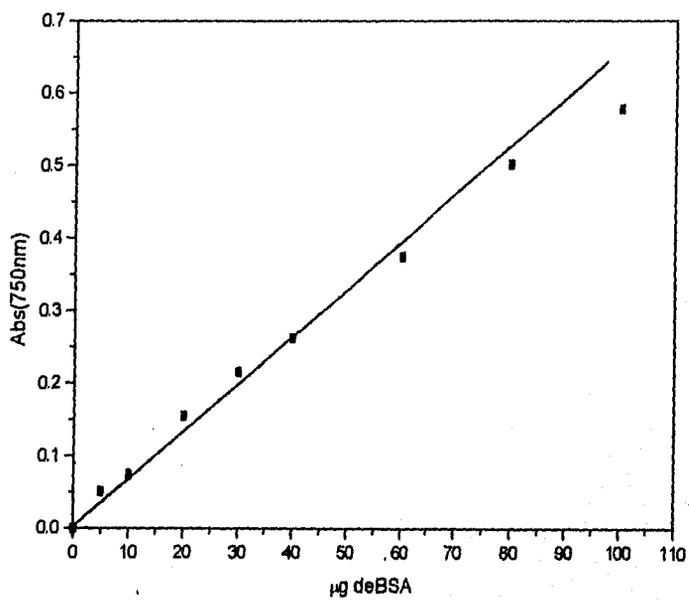


Fig. 8. Curva estándar de determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

5. RESULTADOS

Para estudiar la actividad de la ATPasa a los distintos tiempos de imbibición en el período de salida de la radícula, primero determinamos los tiempos óptimos mediante dos parámetros de germinación: el de viabilidad y el de incremento del peso húmedo de los embriones. Estos dos parámetros se escogieron pues ambos están relacionados con la capacidad de emergencia de la radícula, que es el parámetro fisiológico alrededor del cual queremos estudiar la expresión de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

En el caso de la viabilidad, consideramos que un embrión era viable, si era capaz de germinar. Se consideró que el embrión había germinado, si la radícula presentaba una longitud de 2 mm por lo menos. En el caso del patrón de ganancia de agua, medida por el aumento en el peso húmedo, el establecimiento de las fases I, II y III, nos ayudó a determinar los tiempos alrededor de los cuales se iniciaba el período de elongación de la radícula (final de la fase II y principio de la III).

Los parámetros anteriores se obtuvieron para dos híbridos: el HS-2 y el H-355. En la Fig. 9 se presentan los datos del porcentaje de germinación dependiendo del tiempo de imbibición de los embriones de los dos híbridos. Estos resultados indicaron que los dos híbridos llegaron al 50% de germinación al mismo tiempo (12 horas), sin embargo, en las siguientes 23 horas, el híbrido H-355 germinó a velocidad mayor que el HS-2. Finalmente, a partir de las 35 horas de imbibición, ambos híbridos llegaron al máximo de germinación, que fue del 95% para el híbrido HS-2 y del 100% para el H-355.

En la Figura 10 se muestra la comparación de la ganancia de agua en los mismos híbridos a través de 75 horas de imbibición. En ambas curvas se detectaron las fases clásicas de imbibición I, II y III. Sin embargo, la duración de la fase II es muy diferente para ambos híbridos.

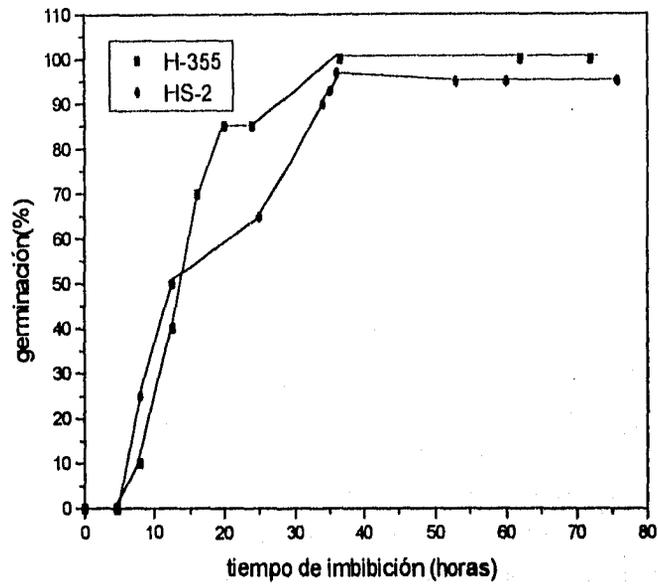


Fig. 9 Viabilidad de embriones. 20 embriones de la línea de maíz H-355 y HS-2, fueron embebidos en cajas Petri según se describe en **Materiales y Métodos**. Los valores son representativos de 3 experimentos diferentes.

5. RESULTADOS

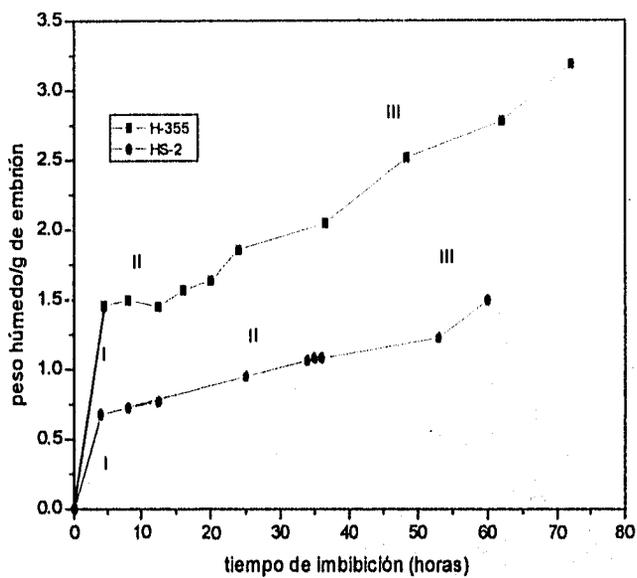


Fig. 10. Cinética de incremento del peso húmedo de embriones de maíz de las líneas H-355 y HS-2. 20 embriones se pusieron a enbeber en cajas Petri según se indicó en **Materiales y Métodos**. Se indican las tres fases de toma de agua. Los valores son representativos de 3 experimentos independientes.

Para el híbrido HS-2 la fase II dura alrededor de las 50 horas, mientras que para el híbrido H-355 la fase III se perfila a partir de las 12 horas. El hecho de que el híbrido H-355 presentara una mayor rapidez en la germinación y una mejor definición de las tres fases en el período de inbibición estudiado, nos permitió seleccionarlo como material biológico en el que llevaríamos a cabo el estudio

También a partir de los datos anteriores se seleccionaron los tiempos cercanos al tiempo de salida de la radícula, que es la región de transición entre la fase II y la fase III en la gráfica de cinética de toma de agua (Fig. 10). Los tiempos seleccionados fueron 18, 19 y 22 horas, además de tiempos de referencia para la comparación de la actividad de ATPasa a 5, 8 y 8.5 horas como tiempos más tempranos.

Para medir la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática como se describe en materiales y métodos (por la medición de hidrólisis de ATP), era necesario establecer si la actividad de ATPasa era lineal con respecto al tiempo en nuestras condiciones de ensayo. Esto era una preocupación, pues dadas las pequeñas cantidades de membranas que se obtienen de los embriones, se recurre a la medición de la actividad por tiempos muy largos, lo cual puede llevar a factores como: agotamiento del sustrato, inhibición de la ATPasa por la acumulación de producto (ADP y Pi son inhibidores competitivo y no competitivo respectivamente), o a una desnaturalización de la enzima.

Para tener esta información se realizó la hidrólisis de ATP de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos y después de agregar la enzima se tomaron alícuotas del medio de reacción, a distintos tiempos: 30 minutos, 1 hora, 1 hora y 30 minutos, 2 horas, 2 horas 30 minutos y 3 horas y se midió el fosfato liberado de la reacción de hidrólisis de ATP por el método de González-Romo *et al.* Según se observa en la gráfica de la figura 11, cuando la actividad es expresada en nmolPi/mg .

5. RESULTADOS

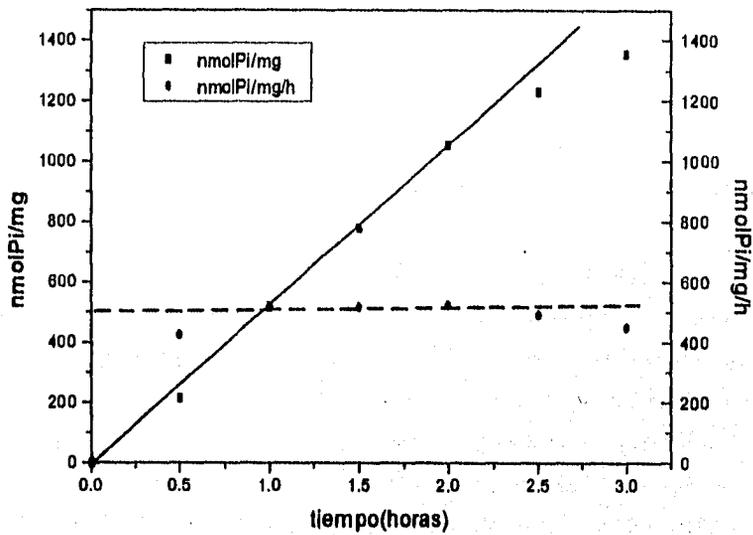


Fig. 11. Hidrólisis de ATP en función del tiempo. Se tomaron alícuotas del medio de reacción de hidrólisis de ATP a diferentes tiempos como se describe en Materiales y Métodos.

El comportamiento fué lineal hasta las 2 horas con 30 minutos, como se esperaba debido a la acumulación del fosfato liberado a medida que transcurre el tiempo. Si la actividad era expresada en nmolPi/mg/h se observaba una relación constante entre la actividad específica de la enzima y el tiempo al que se midió. Esto se interpreta como una liberación de la misma cantidad de fosfato por unidad de tiempo. Esto nos indicó que usando un tiempo de reacción entre 1 y 2 horas, la actividad de hidrólisis de ATP sería lineal con respecto al tiempo en nuestras condiciones ensayo.

De los embriones embebidos a los tiempos seleccionados, se aislaron y purificaron las vesículas de membrana plasmática por el procedimiento descrito por Larsson *et al.* (1994). A las vesículas de membrana plasmática obtenidas se les midió la actividad de hidrólisis de ATP. En este tipo de preparaciones se pueden obtener dos tipos de poblaciones de vesículas con diferentes orientaciones : a) las que tienen el lado citoplásmico con el sitio catalítico de la ATPasa expuesto hacia el exterior y b) las que tienen el lado citoplásmico hacia el interior de la vesícula. Debido a la impermeabilidad de las vesículas a sustratos hidrofílicos como el ATP-Mg, la ATPasa que se encuentra en las vesículas con el sitio catalítico hacia el interior de la vesícula no despliega su actividad *in vitro*. Para exponer todos los sitios catalíticos al sustrato en las preparaciones de membrana, se introducen detergentes como una forma de romper la impermeabilidad de la vesícula al ATP-Mg (Grouzis *et al.* 1987).

Con objeto de que toda la ATPasa presente en nuestras preparaciones manifestara su actividad, se probaron diferentes detergentes: el brij-58, el trítón X-100 y la lisofosfatidilcolina. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla I. La actividad de la ATPasa de membrana plasmática se midió como aquellos valores de hidrólisis de ATP sensible a vanadato, el cual es un inhibidor específico de esta enzima. Con el brij-58 sólo hubo una estimulación de la actividad del 14.5%, a una concentración de 0.015%(p/p) de brij. En el caso de las otras concentraciones probadas, el efecto sobre la actividad de ATPasa sensible a vanadato fué inhibitorio.

5. RESULTADOS

TABLA I

Efecto de detergentes sobre la actividad de ATPasa de membrana plasmática.

Brij-58 %(p/v)	Actividad (nmol Pi h ⁻¹ mg ⁻¹)	% Estimulación
0	987.63	0
0.015	1130.77	14.5
0.02	885.49	-10.34
0.05	678.47	-31.3
0.06	629.8	-36.23

Tritón X-100 %(p/v)	Actividad (nmol Pi h ⁻¹ mg ⁻¹)	% Estimulación
0	892.96	0
0.012	493.37	-44.75
0.015	534.15	-40.18
0.019	636.09	-28.77
0.05	460.75	-48.4

LPC μM	Actividad (nmol Pi h ⁻¹ mg ⁻¹)	% Estimulación
0	892.96	0
18.5	562.69	-36.99
25	595.81	-33.28
75	354.74	-60.27
100	1023.44	14.61
150	579	-35.16

Para el tritón X-100, todas las concentraciones probadas tuvieron un efecto siempre inhibitorio sobre la actividad.

Para la lisofosfatidilcolina, al igual que para el brij-58, sólo hubo una concentración de detergente en la cual hubo una estimulación de la actividad de ATPasa. Esta concentración de 100 μ M dió un 14.61% de estimulación. Las demás concentraciones que se probaron tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa de membrana plasmática.

Para evaluar la purificación de las vesículas de membrana plasmática del híbrido seleccionado (H-355), procedimos a comparar los resultados de la purificación (por reparto en dos fases) con otros dos híbridos utilizados previamente en el laboratorio de los cuales se habían obtenido vesículas de membrana plasmática. Para ello, se realizó una comparación entre la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato y sensible a azida de las vesículas de membrana plasmática purificadas de los híbridos A6 ϕ 2, HS-2 y H-355. Con los dos primeros se habían estado realizando estudios de actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Los resultados de la actividad de hidrólisis de ATP en estos híbridos en presencia y en ausencia de lisofosfatidilcolina se presentan en la Tabla II. En esta tabla se presentan los resultados de los efectos de la adición de vanadato o azida sobre la hidrólisis de ATP, ya que hemos encontrado que en este tipo de preparaciones de vesículas de membrana plasmática dos importantes inhibidores de la hidrólisis de ATP son el vanadato y la azida, los cuales corresponden a las ATPasas de la membrana plasmática y de la mitocondrial respectivamente. Por ello, uno espera que la actividad sensible a vanadato es insensible a azida y viceversa. De esta manera, usando dos condiciones experimentales diferentes (la adición de vanadato en unos ensayos y la de azida en otros, por ejemplo), uno puede tener dos estimaciones de una misma actividad. Así, uno esperaría medir la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática si se mide la sensibilidad a vanadato por una parte y la insensibilidad a azida por otra, por ello ambos valores deben coincidir o por lo menos ser muy cercanos.

5. RESULTADOS

Como se observa, la preparación de vesículas de membrana plasmática de los embriones del híbrido H-355 embebidos 22 horas, presentó una actividad de ATPasa sensible a vanadato de $405.38 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$, la cual está dentro del orden de la actividad presentada por la preparación del híbrido A6 φ 2, mientras que es más alta que la que presenta el híbrido HS-2, y que fueron de 485.14 y 272.47 nmolPi/mg/h respectivamente. El porcentaje de inhibición por vanadato de las preparaciones de los híbridos HS-2 y H-355 se encuentra alrededor del 60% mientras que para el híbrido A6 φ 2 está en 48.5%. Sin embargo, las vesículas obtenidas del híbrido H-355 son de la fracción U₁, la cual está menos pura que la U₂, que es la fracción obtenida de los otros dos híbridos.

Por otra parte, la actividad insensible a azida en el híbrido H-355 fué 549.98 nmolPi $\text{mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, encontrándose entre los valores de actividad insensible a azida de los híbridos A6 φ 2 y HS-2, las cuales fueron 890.74 y 335.73 respectivamente. Los porcentajes de actividad insensible a azida fueron superiores en el caso de los híbridos A6 φ 2 y HS-2, (87.84% y 77.44%), al de H-355 (69.11%). Estos datos muestran que nuestras preparaciones de vesículas de membrana plasmática presentan actividad detectable de ATPasa, la cual en su mayor proporción corresponde a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. En el caso de las preparaciones de vesícula de membrana plasmática del híbrido H-355 se observa en la Tabla II que los valores de porcentaje de actividad sensible a vanadato y los valores de porcentaje de actividad insensible a azida fueron cercanos. Esto nos da certidumbre en la estimación de la actividad, ya que por dos procedimientos diferentes, uno directo (inhibición por vanadato) y uno indirecto (insensibilidad a azida), llegamos a un número semejante. Cabe mencionar que para algunas preparaciones de vesículas de membrana plasmática se realizaron también mediciones de actividad de ATPasa sensible a NaNO₃ (nitrato de sodio), para saber si también se podía encontrar presente la actividad de la ATPasa del tonoplasto y se encontró un valor promedio de 31.6% de actividad de ATPasa sensible a nitrato (9 determinaciones).

5. RESULTADOS

También se realizaron los experimentos de hidrólisis de ATP en presencia de lisofosfatidilcolina como detergente, a una concentración de 100 μM (Tabla II). En las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de los híbridos A6 ϕ 2 y HS-2 no hubo estimulación de la actividad sensible a vanadato, mientras que en las preparaciones del híbrido H-355 hubo una estimulación de la actividad sensible a vanadato del 23%. Sin embargo, los porcentajes de inhibición por vanadato en presencia de lisofosfatidilcolina disminuyeron para las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de los tres híbridos de maíz.

En contraste, sí se observó estimulación en la actividad de ATPasa insensible a azida en las preparaciones de los híbridos A6 ϕ 2 y H-355 en presencia de lisofosfatidilcolina, mientras que casi no hubo un efecto sobre la actividad del híbrido de maíz HS-2. El porcentaje de estimulación para la actividad de las preparaciones de los híbridos A6 ϕ 2 y H-355 fueron de 108% y 22% respectivamente. Los porcentajes de actividad insensible a azida aumentaron para las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de los tres híbridos.

Ya que las preparaciones analíticas del híbrido H-355 proporcionaron datos de actividad de ATPasa de membrana plasmática comparables a los de los otros dos híbridos de maíz con los que ya se había estado trabajando en el laboratorio, pero con un paso menos de purificación, se realizaron preparaciones en mayor escala de los embriones embebidos en agua a los tiempos seleccionados para el estudio de la actividad de la ATPasa. El procedimiento usado fue descrito en materiales y métodos. Los resultados de cuantificación de proteína total del homogenado sin núcleos (H-N) y de la fracción final del reparto de fases, U₁, se muestran en la Tabla III. Como se observa, de una cantidad inicial de 2.5 g. de embriones se obtiene aproximadamente 144.22 mg de proteína en H-N y después del reparto de fases se obtiene una recuperación de proteína de 1.43 mg, cerca

5. RESULTADOS

TABLA II

Comparación de las preparaciones de membrana plasmática de 3 diferentes híbridos de maíz.

Híbrido	Hidrólisis de ATP	
	Sensible a vanadato nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹ (%)	Insensible a azida nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹ (%)
A6♀2*	485.14 (48.6)	890.74 (87.84)
HS-2*	272.47±32.73(62.03)	335.73±49.42(77.44)
H-355**	405.38±89.92(58.48)	549.98±120.93(69.11)

Con lisofosfatidilcolina[†]

Híbrido	Hidrólisis de ATP	
	Sensible a vanadato nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹ (%)	Insensible a azida nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹ (%)
A6♀2*	401.83(21.54)	1852.63(99.32)
HS-2*	232.97±35.66 (51.65)	285.46±74.9 (95.47)
H-355**	498.63±127.65 (51.45)	705.85±48.44 (79.11)

* las vesículas de membrana plasmática son de la fracción U₂.

** las vesículas de membrana plasmática son de la fracción U₁.

[†] lisofosfatidilcolina 100 µM en el medio de reacción de hidrólisis de ATP.

TABLA III

Aislamiento de vesículas de membrana plasmática del híbrido II-355 en escala preparativa.*

Fracción	Volumen	Proteína	%
Homogenado sin núcleos	10,91±1.84ml.	144.22±26.09mg.	100
U ₁	649.6±154.77μl.	1424.81±431.88μg.	0.99

*Para 2.5 g de embriones de maíz

5. RESULTADOS

del 1%. Esta cantidad de proteína obtenida en U_1 era suficiente para poder realizar varias mediciones de hidrólisis de ATP de cada preparación de vesículas de membrana plasmática de los embriones en los tiempos de imbibición seleccionados.

En la Tabla IV se presentan los datos de experimentos representativos obtenidos a partir de la medición de actividad de ATPasa en preparaciones de vesículas de membrana plasmática de embriones embebidos a los tiempos de imbibición seleccionados. En cada uno de los tiempos de imbibición se midió la actividad de ATPasa sensible a vanadato e insensible a azida y se realizaron por lo menos dos determinaciones independientes de actividad. Como se observa en la Tabla, los valores de porcentaje de actividad sensible a vanadato y los valores de porcentaje de actividad insensible a azida son similares en las diferentes determinaciones de actividad.

Los valores promedio de actividad de ATPasa sensible a vanadato, así como sus desviaciones estándar se presentan en la Tabla V y en la fig. 12. Como se observa, a las 5 hs de imbibición la actividad de ATPasa es de $1012.87 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ pero a las 8 hs de imbibición decrece hasta un valor de $518.51 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$. Poco después, a las 8.5 hs de imbibición se incrementa a $1035.13 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ y sigue aumentando a las 18 hs a $1181.93 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$, hasta que se encuentra en un valor máximo a las 19 hs de imbibición, en $1395.1 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$. A partir de aquí comienza a decrecer la actividad, hasta que a las 22 hs se encuentra en un valor de $405.38 \text{ nmolPi mg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

TABLA IV

Medición de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de embriones embebidos 5, 8, 8.5, 18, 19 y 22 hs.

a) Actividad de ATPasa a 5 hs de imbibición.

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	1480.7	67.59	655.46	52.88	938.05	64.04
Sensible a vanadato	1197.4	54.66	907.57	73.22	933.63	63.75

b) Actividad de ATPasa a 8 hs de imbibición

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	1024.39	141.04	607.51	78.88	1577.28	84.4
Sensible a vanadato	449.87	61.94	496.76	64.52	608.89	32.58

c) Actividad de ATPasa a 8.5 hs de imbibición

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	1507.51	98.43	1896.41	87.02
Sensible a vanadato	906.9	59.22	1163.35	53.38

5. RESULTADOS

d) Actividad de ATPasa a 18 hs de imbibición

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	2566.12	81.6	1378.38	67.4	2591.11	100
Sensible a vanadato	1028.93	32.7	1144.15	55.95	1280	49.4

e) Actividad de ATPasa a 19 hs de imbibición

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	2293.22	87.62	3022.83	84.65	1402.78	48.25
Sensible a vanadato	1448.58	55.35	1420.09	39.77	1393.52	47.93

f) Actividad de ATPasa a 22 hs de imbibición

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	562.79	67.04	656.65	87.65	401.26	69.4
Sensible a vanadato	351.75	41.9	379.19	50.62	319.12	56.19

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	708.66	68.88	631.28	159.92	451.44	66.67
Sensible a vanadato	572.44	55.64	342.11	86.67	393.71	58.14

Actividad	nmolPi h ⁻¹ mg ⁻¹	%
Insensible a azida	437.81	55.01
Sensible a vanadato	479.35	60.23

5. RESULTADOS

TABLA V

**Hidrólisis de ATP sensible a vanadato en vesículas de membrana plasmática (U_i)
obtenidas de embriones a diferentes tiempos de imbibición.**

Tiempo(horas)	nmolPi mg ⁻¹ h ⁻¹
5	1012.87±160.34
8	518.51±81.71
8.5	1035.13±128.23
18	1181.93±350.51
19	1395.1±428.52
22	405.38±89.93

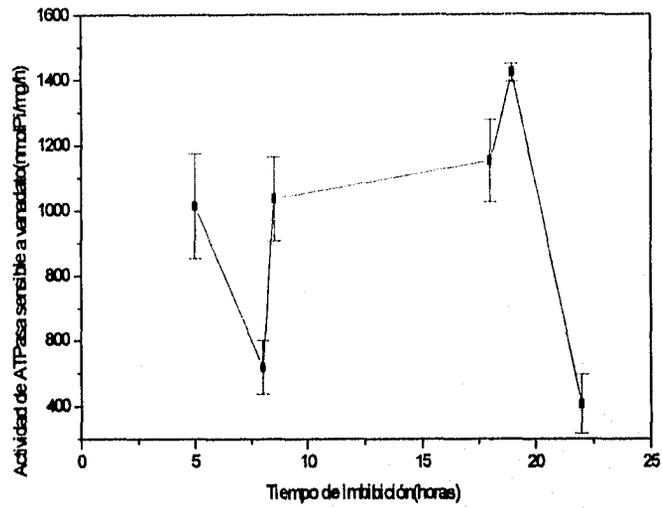


Fig. 12. Perfil de actividad específica de ATPasa de membrana plasmática de embriones de maíz. De los embriones embebidos a los tiempos indicados se obtuvieron las vesículas de membrana plasmática de la fracción U_1 , en las cuales se midió la hidrólisis de ATP sensible a vanadato.

6. DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, durante el desarrollo de la semilla hay una acumulación de reservas, las cuales van a ser utilizadas durante la germinación (misma que termina en la salida de la radícula), y más tarde en el crecimiento del tallo a partir de los materiales de reserva.

El híbrido H-355 presentó un cinética de toma de agua más rápida que el híbrido HS-2, esto puede deberse a factores como diferencias en el contenido de agua del embrión por sus condiciones de almacenamiento o por la composición de las principales reservas que éste contiene, como el almidón (Simon, 1984; Touzard, 1975). Cabe mencionar que en experimentos realizados con semillas de *Vicia faba* (Obroucheva, 1989) se propone que el grado de hidratación promueve procesos fisiológicos que dan lugar a la elongación celular.

La viabilidad del híbrido HS-2 fué muy buena ya que su máximo de germinación fue del 95%, sin embargo la viabilidad del híbrido H-355 mejoró ese máximo de germinación pues llegó a un 100% en el mismo tiempo, probablemente el híbrido HS-2 es más sensible a dañarse durante su extracción de la semilla o bien al almacenamiento. Por estas características, entre otras que se presentarían más adelante, se seleccionó para el estudio el híbrido H-355.

Para los ensayos de medición de actividad el tiempo óptimo de la reacción de hidrólisis de ATP fue de 1-2.5 horas, ya que de acuerdo a nuestros experimentos de actividad vs. tiempo de reacción, no se presentaban factores que pudieran afectar la actividad de la enzima. El problema de medir fosfato liberado de la reacción de hidrólisis a tiempos muy cortos (menores a una hora), era la gran desviación en los resultados de la actividad, debido a la baja concentración de fosfato, lo cual hace más difícil su detección y aumentando así la posibilidad de error. Por otra parte, a

tiempos demasiado largos, debido a la gran acumulación de fosfato liberado, la absorbencia del complejo coloreado se encontraba fuera del rango lineal.

En las preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas a partir de embriones de maíz embebidos, sólo se encontró un 14.61% de actividad oculta (vesículas de membrana plasmática con el sitio catalítico de la ATPasa hacia el interior de la vesícula) tras la adición de lisofosfatidilcolina a una concentración 100 μ M, resultado muy parecido al 14.5% que se obtuvo con brij-58 a una concentración 0.015%(p/p). Con tritón no se observó estimulación, sino al contrario un efecto inhibitorio. Las concentraciones de los detergentes a las que se observó una estimulación son muy parecidas a las concentraciones óptimas reportadas en estudios de latencia de la actividad de ATPasa en vesículas de membrana plasmática: lisofosfatidilcolina 100 μ M (Grouzis *et al.* 1987) y brij-58 0.02% (p/v) (Palgren *et al.* 1990). Como ya se ha comentado, éstos permiten el acceso del ATP por solubilización de la membrana, permitiendo que se manifieste la actividad oculta en vesículas con el sitio catalítico hacia el interior de la membrana. En estudios realizados para observar el efecto de detergentes sobre la actividad de ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, en vesículas con distinta orientación, se muestra que detergentes como el tritón X-100 y Brij-58 pueden inhibir la actividad de hidrólisis de ATP (para estos experimentos el tritón estimuló la actividad sólo a una concentración de 0.015% p/v). Una posible explicación a este fenómeno es que los detergentes puedan remover lípidos esenciales asociados a la región hidrofóbica de la ATPasa, lo cual sugiere una gran sensibilidad a cambios en su medio ambiente lipídico. A diferencia de éstos dos detergentes, se ha postulado que el efecto estimulador de la lisofosfatidilcolina se debe al desplazamiento de elementos estructurales inhibitorios de la actividad de la enzima, mismos que son liberados por la lisofosfatidilcolina, haciendo que su efecto siempre sea activante, aunque, como observamos en nuestros resultados, no se puede descartar que a ciertas concentraciones sea también inhibitorio en membranas con otras composiciones de lípidos membranales.

6. DISCUSIÓN

En las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de embriones del híbrido H-355 utilizadas en este estudio, se obtuvo que el porcentaje de actividad de ATPasa sensible a vanadato (marcador utilizado para medir la pureza de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática) fué aproximadamente del 60%. Además, se encontró que había actividad de ATPasa de partículas submitocodriales y de ATPasa tonoplasto. Esto nos indica que tenemos que llegar a una purificación mayor dado que el método propuesto por Larsson *et al.* (1994) reporta que se puede obtener hasta un 95% de pureza en vesículas de membrana plasmática si realizamos 2 particiones de fase más (llegar a U_3). En nuestro caso, usamos la fracción U_1 porque estaba parcialmente enriquecida en membrana plasmática y los rendimientos nos permitían hacer un gran número de determinaciones.

Como se había mencionado en la introducción, la exposición de semillas secas al agua, da comienzo a una variedad de eventos incluyendo la toma de agua, la activación de la respiración, la síntesis de proteínas, del RNA, etc. Aunque la operación de estos procesos es necesaria para la germinación, éstos no son en sí mismos suficientes para asegurar que la semilla germinará. Al lado de estos eventos, iniciados en las células de la semilla tan pronto como éstas son hidratadas, hay otros que se presentan algún tiempo después de que comienza la imbibición. Entre éstos se encuentra el comienzo de la elongación celular. Se ha relacionado el crecimiento celular en plantas a la necesidad del aflojamiento de la pared celular. Este aflojamiento de la pared celular está vinculado a una acidificación del apoplasto a través de la operación de la ATPasa localizada en la membrana. La iniciación de la salida de la radícula por elongación celular en embriones puede depender de un mecanismo similar. De hecho se ha demostrado experimentalmente que el crecimiento en raíces de maíz requiere de extrusión de protones, la cual puede ser regulada por auxinas (Moloney, 1981). Para saber si lo mismo ocurriría en el alargamiento de las células de la radícula, realizamos la medición de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática en preparaciones de embriones embebidos por tiempos del período de protusión de la radícula, que en nuestro híbrido de maíz fué de aproximadamente 18 hs.

En el laboratorio se habían realizado estudios de la actividad de la ATPasa de membrana plasmática en tiempos cortos de imbibición, de 0 a 7 horas (Sánchez-Nieto, 1994). Los resultados indicaron que en el tiempo cero, cuando los embriones aún no habían sido embebidos, había actividad de ATPasa de H^+ y después de una hora, se presentaba el máximo de actividad de ATPasa, misma que después de este tiempo decreció, llegando a valores aún menores al tiempo cero. Esto sugería que la enzima estaba jugando un papel importante en la reactivación del metabolismo de las células embrionarias. En los resultados mostrados en la Fig. 12 de este trabajo se sigue observando entre 5 y 8 horas de imbibición, durante la fase II de la germinación, una disminución en la actividad aunque a las 8.5 horas se mantiene un valor de actividad cercano a la que se presenta a las 5 horas de imbibición, a estos tiempos ya se ha concluido la fase I donde se presentó la rehidratación de enzimas y sustratos que dieron comienzo a la reactivación del metabolismo, por lo que se estarían llevando a cabo los principales eventos metabólicos de la preparación para la germinación del embrión (Bewley y Black, 1986). Por lo tanto, se esperaría que se mantuviera e incluso aumentara la actividad de la ATPasa a medida que se acerca el período de salida de la radícula. Después de las 8.5 horas comienza a haber un aumento en la actividad de la ATPasa, hasta un máximo a las 19 hs de imbibición, sugiriendo fuertemente que, efectivamente durante este período, de 12 a 19 horas de imbibición que es el período de protrusión de la radícula, la ATPasa puede desempeñar un papel importante en la elongación celular, que va a originar la salida de la radícula.

Es curioso sin embargo, que después de este tiempo comienza a decrecer la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, aún cuando continúa el crecimiento de la radícula. Algo que nos puede dar un indicio de lo que podría estar sucediendo, es la observación de Cleland (1992), sobre el crecimiento inducido por auxina de coleótilos, la cual puede ocurrir a una velocidad rápida por lo menos hasta las 18 horas en los coleótilos de avena, pero el crecimiento ácido termina en un período de tiempo más corto. Aparentemente, durante las primeras 1 o 2 horas después de la adición

6. DISCUSIÓN

de auxina, la elongación que ocurre es inducida por un $\text{pH} < 5$, pero cuando incubaban los coleoptilos en presencia de auxina en buffer de pH 5.5-6 en los primeros 60 - 90 minutos, no se observaba crecimiento. Sólo después de este tiempo comenzaba otro mecanismo, también inducido por auxina, cuyo pH óptimo se encontraba entre 5.5 y 6. El mecanismo de aflojamiento de la pared celular en esa segunda fase no se conoce. Se propone que podría deberse a la actuación de enzimas responsables del aflojamiento de la pared, las cuales generarían nuevos enlaces de soporte. La posibilidad de que el crecimiento inducido por auxina requiera síntesis de pared celular puede constituir una parte esencial del segundo mecanismo del crecimiento inducido por auxina, ya que de hecho la galactosa, la cual se cree que actúa como inhibidor de la síntesis de pared celular, efectivamente también inhibe la segunda fase del crecimiento.

Otros datos que apoyarían la participación de la ATPasa en este proceso, son los derivados de estudios inmunológicos, que reportaron que la ATPasa es abundante en la punta de la raíz y la epidermis con una concentración alta en comparación con las células internas (Parets-Soler *et al.* 1990; Samuels *et al.* 1992). También, es posible que la auxina induzca un incremento en la cantidad de moléculas de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de estos tejidos en particular (las células de la punta, cap, y de la epidermis) según se ha observado en coleoptilos en crecimiento (Hager *et al.* 1991). Si la presencia de la enzima está confinada a éstas células, que constituyen una proporción pequeña de tejido comparada con el resto, es posible que su presencia se "diluya" en experimentos de membranas aisladas, ya que la mayor parte de las membranas plasmáticas obtenidas de la homogenización proviene de las células mesófilas. Este efecto se presentaría en mayor escala a medida que va creciendo la raíz, por eso a las 19 horas cuando la raíz es pequeña, todavía podemos observar el aumento en la actividad de ATPasa, pero a las 22 horas, cuando se ha incrementado el tamaño de la raíz, y por tanto el tejido que no presenta el efecto inducido por auxina, aunque el crecimiento ácido pueda seguir funcionando, la actividad de la ATPasa puede "diluirse" o perderse entre el resto de los tejidos cuyas células no son receptivas a la auxina (Jahn 1996).

7. CONCLUSIONES.

La actividad de bombeo de protones de la membrana plasmática puede ser un contribuyente importante para la elongación celular durante la germinación, ya que se observó un aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en el período de protusión de la radícula cuando culmina la germinación, con respecto a la actividad de ATPasa en tiempos de imbibición cortos.

El hecho de que la actividad de la enzima presente fluctuaciones que correlacionan con procesos metabólicos específicos sugieren que es una enzima importante y altamente regulada.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

8. BIBLIOGRAFÍA

Baker, D. A. y Hall J. L. 1988. Introduction and general principles. En: Solute transport in plant cells and tissues. (Baker, D. A. y Hall J. L. eds.). Loughman Scientific and Technical, U. K. pp. 1-27.

Becker, D., Zeilinger C., Lohse, G., Depta, H. y Hedrich, R. 1993. Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*. 190: 44-50.

Bewley, J. D. y Black, M. 1986. Physiology and Biochemistry of seeds. VI. Development, germination and growth. Springer-Verlag. New York. pp. 306.

Briskin, D. P. y Hanson, J. B. 1992. How does the plant plasma membrane H^+ -ATPase pump protons? *J. Exp. Bot.* 43:269-289.

Briskin, D. P. 1994. Membranes and transport systems in plants: an overview. *Weed Sci.* 42: 255-262.

Ching, T. M. 1978. Metabolism of germinating seed. En: Seed Biology. (Kozlowski T. T. ed.). Vol. II. Academic Press, Inc. New York. pp. 103-218.

Clarkson, D.T. 1988. Movement of ions across roots. En: Solute transport in plant cells and tissues. (Baker, A. y Hall, J. L. eds.). Loughman Scientific and Technical, U. K. pp. 251-304.

Cleland R. E. 1971. Cell wall extension. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 22: 197-222.

Cleland, R. E. 1992. Auxin-induced growth of *Avena* coleoptiles involves two mechanisms with different pH optima. *Plant Physiol.* 99:1556-1561.

Cosgrove, D. J. 1993. How do plant cell walls extend? *Plant Physiol.* 102: 1-6.

Danielli, J. F. y Davson, H. A.. 1935. A contribution to the theory of the permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* 5:495-508.

Emons, A. M. C. y Emons, M. M. A. 1992. Do microtubules orient plant cell wall microfibrils? *Physiol. Plant.* 84:486-493.

Felle, H. y Johannes, E. 1990. The regulation of proton/aminoacid symport in *Riccia fluitans* L. by cytosolic pH and proton pump activity. *J. Exp. Bot.* 41 : 587-592.

Gavilanes-Ruiz, M, Sánchez-Nieto, S., Enriquez-Arredondo M. C. y García-Rubio, Oscar. 1995. Aspectos Moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia* 46: 251-262.

González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. y Gavilanes-Ruiz, M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem.* 200: 235-238.

Grouzis, J. P., Gibrat, R., Rigaud, J. y Grignon, C. 1987. Study of sidedness and tightness to H^+ of corn root plasmalemma vesicles: preparation of a fraction enriched in inside-out vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 903: 449-464.

Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H. y Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H^+ -ATPase. *Planta* 185: 527-537.

Hartmann, M. A. y Beneviste, P. 1987. Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis. *Methods Enzymol.* 148: 632-650.

Hedrich, R. and Schoroder, J. I. 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 539-569.

Humphreys, T. H. 1988. Phloem transport with emphasis on loading and unloading. En: *Solute transport in plant cells and tissues.*(Baker, D. A. y Hall, J. L. eds.). Loughman Scientific and Technical, U. K. pp. 305-345.

Jain, M. K. y Zakin, D. 1987. The spontaneous incorporation of proteins into preformed bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 906: 33-68.

Jahn, T., Johansson, F., Lüthen, H., Volkmann, D. y Larsson, C. 1996. Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of plasma-membrane H^+ -ATPase activity. *Planta*. 199: 359-365.

Jennings, M. L. 1989. Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 999-1027.

Larsson C., Moller, I. M. y Widell, S. 1990. Introduction to the plant plasma membrane - its molecular composition and organization. En: *The plant plasma membrane -*

8. BIBLIOGRAFÍA

Structure, function and molecular biology. (Larsson, C. y Møller, I. M. eds.) Springer-Verlag, Berlín. pp. 1- 15.

Larsson, C., Sommarin, M. y Widell, S. 1994. Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* 228: 451-469.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. y Cox, M. M. 1993. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. pp. 1013.

Lindsey, K. y Topping, J. F. 1993. Embryogenesis: A question of pattern. *J. Exp. Bot.* 44: 359-374.

Moloney, M. M., Elliott, M. C. y Cleland, R. E. 1981. Acid growth effects in maize roots: evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta* 152: 285-291.

Niembro, A. 1988. Semillas de árboles y arbustos. Ontogenia y estructura. Linusa S. A. de C. V. México.

Obroucheva N. V. y Antipova O. V. 1989. Seed hydration as a trigger of cell elongation in bean hypocotyl and radicle. En: Structural and functional aspects of transport in roots. (Loughman, B. C. ed.) Kluwer Academic Publishers. pp. 41-44.

Palmgren, M. G. y Sommarin M. 1989. Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 90:1009-1014.

Palmgren, M. G., Sommarin, M., Ulvskov, P. y Larsson, C. 1990. Effect of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 133-140.

Palmgren, M. G. y Christensen, G. 1994. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 3027-3033.

Parets-Soler A., Pardo, J. M., Serrano, R. 1990. Immunocytolocalization of plasma membrane ATPase *Plant Physiol.* 93: 1654-1658.

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.

- Rayle D. L. 1973. Auxin-induced hydrogen-ion excretion in *avena* coleoptiles and its implications. *Planta* 114: 63-73.
- Rayle, D. y Cleland, R. E. 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant. Physiol.* 46: 250-253.
- Rayle, D. L. y Cleland, R. E. 1977. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr. Top. Dev. Biol.* 11: 187-214
- Rayle, D. L. y Cleland, R. E. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Reyes, P. 1990. El maíz y su cultivo. 1990. A.G.T. ed. México. p. 23
- Samuels, A. L., Fernando, M. y Glass, A. D. M. 1992. Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K nutrition. *Plant Physiol.* 99: 1505-1514.
- Sánchez-Nieto, S., Rodríguez-Sotres, R., González-Romo, P., Bernal-Lugo, I. y Gavilanes-Ruiz, M. 1992. Tonoplast and plasma membrane ATPase from maize lines of high or low vigour. *Seed Sci. Res.* 2: 105-111.
- Sánchez-Nieto, S. 1994. Caracterización de la aparición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México.
- Sanders, D. y Slayman, C. L. 1989. Transport at the plasma membrane of plant cells: a review. En: *Plant membrane transport: the current position.* (Dainty, J., DeMichaelis, M. I., Marré, E. y Rasi-Caldogno, F. eds.) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. pp. 3-11
- Sandstrom, R. P., y Cleland, R. E. 1989. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. *Plant Physiol.* 90: 1524-1531.
- Senn, A. P. y Goldsmith, M. H. M. 1988. Regulation of electrogenic proton pumping by auxin and fusicoccin as related to the growth of *Avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* 88: 131-138.
- Serrano, S. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plant and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 1-28.

8. BIBLIOGRAFÍA

Serrano, S. 1990. Plasma membrane ATPase. En: The plant plasma membrane. (Larsson C. y Møller, I. M. Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 127-153.

Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.

Serrano, R. , Portillo, F., Monk, B. C. y Palmgren, M. G. 1992. The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H^+ -ATPase. *Acta Physiol. Scand.* 146: 131-136.

Simon, E. W. 1984. Early events in germination. En: Seed physiology. Vol. 2. (Murray, D. ed.). Academic Press Australia, Australia. pp. 77-112.

Singer, S. J. 1992. The structure and function of membranes. *J. Membrane Biol.* 129: 3-12.

Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. Tomo I. 3a. ed., Ed. Reverté, S. A., España. p. 289.

Tanner, W. y Sauer, N. 1989. Metabolism-compartmentation-transport. En: Plant membrane transport: the current position. (Dainty, J., DeMichaelis, M. I., Marré, E. y Rasi-Caldogno, F. eds.). Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam. pp. 295-305.

Traas, J. A. 1990. The plasma membrane associated cytoskeleton. En: The plant plasma membrane-structure, function and molecular biology. (Larsson, C. y Møller, I. M. eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 269-292.

Touzard, J. 1975. En: A germinacao des sementes. (Chaussat, R. y Le Deunff, Y. eds.). Secretaria-General da Organizacao dos Estados Americanos, Washington, D. C. pp. 157-170.

Xing, T., Higgins, V. J. y Blumwald, E. 1996. Regulation of plant defense to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Cell.* 8: 555-564.