

23
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

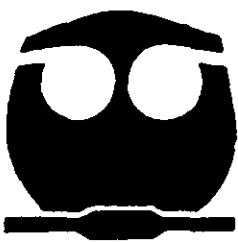


EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

RESPUESTA DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA DE SEMILLAS DE MAIZ EN
DESARROLLO AL ACIDO ABCSISICO Y AL
POTENCIAL OSMOTICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
AURORA LARA NUÑEZ



MEXICO, D. F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

273490

=



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof.	BERNAL LUGO IRMA OFELIA
Vocal Prof.	RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO
Secretario Prof	GARCÍA RAMÍREZ ELPIDIO
1er. suplente Prof.	GUTIERREZ VENEGAS GLORIA
2 ^{do} . Suplente Prof.	ORTEGA MUÑOZ RAQUEL

Trabajo realizado en el laboratorio 115. Conjunto "E". Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. U.N.A.M.

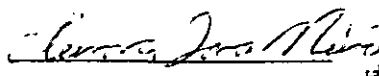
Financiado por D.G.A.P.A., proyecto IN210295

Asesor del Tema:



DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

Sustentante:



AURORA LARA NÚÑEZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la enorme ayuda, conocimientos, confianza y paciencia que el Doctor Rogelio Rodríguez me brindó. Así mismo agradezco la generosa ayuda y amistad de Mireya Rodríguez y Carlos Mujica.

Quiera dar las gracias especialmente a la doctora Rosario Muñoz Clares por su paciente ayuda, sus observaciones realizadas acerca de este trabajo y por haber permitido que parte del mismo se realizase en su laboratorio. Así mismo deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio 115 y 102, en especial a Ricardo, Lilián y Erick.

Finalmente quiero agradecer a D.G.A.P.A., proyecto IN210295 por el apoyo brindado para la realización de este trabajo y a la UNAM por haberme permitido ser parte de esta institución.

DEDICATORIAS.

Dedico este trabajo a mis padres, en especial a mi mamá por su valiente lucha y por su vida, y también a mis hermanos Isolda, Manuel, Rogelio, Odette, Gerardo, Arturo y Luis Felipe, sin cuya ayuda este jamás se hubiese consolidado.

Este trabajo también es una dedicatoria a mis amigos de toda la vida Karina Arenas y Francisco García Mellado por ser su amistad un maravilloso regalo; a mis amigos de la carrera que me apoyaron en todo momento y cuya amistad se volvió el mayor de los reconocimientos después de nueve semestres: Andrés Bobadilla, Milton Altúzar, Omar Rangel, Gladys Balcázar, Jesús Recillas y Olivia González.

A todos ellos con mi más grande cariño.

Aurora Lara

TABLA DE CONTENIDO

1	Abreviaturas	7
2	Resumen	8
3	Introducción	9
4	Antecedentes	15
4.1	Anatomía de la semilla de maíz	15
4.2	Maduración de la semilla de maíz	17
4.3	El ácido abscísico y el potencial osmótico	19
4.3.1	Ácido abscísico	19
4.3.2	Potencial osmótico	21
4.3.3	Importancia del ABA y el potencial osmótico en el desarrollo y germinación de las semillas .	22
4.4	Principales reservas que se acumulan en las semillas	24
4.4.1	Carbohidratos	25
4.4.2	Proteínas	26
4.4.3	Triglicéridos	27
4.4.4	Fitina	29
4.4.5	Otros compuestos	29
4.5	Proceso de acumulación de reservas en semillas	30
4.5.1	Síntesis de almidón	33
4.5.2	Síntesis de triacilglicéridos	36
4.5.3	Síntesis de proteínas	37
4.6	Revisión del proceso metabólico de la degradación de la sacarosa y su partición en diferentes vías metabólicas.	39
4.7	Relación entre las enzimas piruvato cinasa y PEPC	41
4.7.1	La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa	41
4.7.1.1	Características moleculares de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa	43
4.7.1.2	Regulación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa	44
4.7.2	Enzima piruvato cinasa	47
4.7.2.1	Regulación de la enzima piruvato cinasa	48
5.	Hipótesis	50
6.	Objetivos	51
6.1	Objetivos generales	51
6.2	Objetivos particulares	52
7.	Materiales y métodos	53
7.1	Materiales	53
7.1.1	Material biológico	53
7.2	Métodos	53
7.2.1	Extracción e incubación de embriones	53
7.2.1.1	Obtención de la enzima cruda	55
7.2.2	Determinación de la actividad enzimática	56
7.2.2.1	Ensayo de actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa	56
7.2.2.2	Ensayo de actividad de la piruvato cinasa	56
7.2.3	Extracción y separación de lípidos	57

7.2.4	Extracción de proteína	58
7.2.5	Determinación de proteína	59
7.2.5	Electroforesis desnaturalizante	60
7.3	Análisis de datos cinéticos	61
8.	Resultados	62
8.1	Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa	62
8.1.1	Ensayo de saturación	62
8.1.2	Ensayo de inhibición por malato	65
8.1.3	Isoenzimas de fosfoenolpiruvato carboxilasa	68
8.1.4	Síntesis de fosfoenolpiruvato carboxilasa	71
8.2	Enzima piruvato cinasa	72
8.2.1	Ensayo de termosensibilidad	72
8.2.2	Ensayo de saturación	74
8.3	Efecto de la fosfomicina en fosfoenolpiruvato carboxilasa y en piruvato cinasa	77
8.3.1	Efecto de la fosfomicina sobre fosfoenolpiruvato carboxilasa	78
8.3.2	Efecto de la fosfomicina sobre la piruvato cinasa	79
8.4	Efecto de la fosfomicina sobre la partición de carbono	82
9.	Discusión de resultados	85
10.	Conclusiones	89
11.	Referencias	90
12.	Anexos	96
12.1	Equipo	96
12.2	Reactivos	96

1. ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
BPO	Bajo potencial osmótico
DTT	Ditiotreitol
Gluc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GS	Glutamina sintetasa
GOGAT	Glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa.
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl-piperizin-N'-(2-etanosulfónico)
Km	Constante de Michaelis-Menten
MDH	Enzima málico deshidrogenasa
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido.
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa
3-PGA	3-fosfoglicerato
PK _C	Piruvato cinasa citosólica
PK _P	Piruvato cinasa plastidial
Rubisco	Enzima bifosfato de ribulosa carboxilasa/oxidasa
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
T ₀	Tiempo cero
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática, 1 UI = 1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Proteína}^{-1}$

2. RESUMEN

Las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato cinasa juegan un papel importante en la regulación del metabolismo carbonado en semillas de maiz en desarrollo. Aunque no es posible a la fecha emitir una afirmación categórica, este trabajo aporta evidencias que indican que la mayor aportación de carbono que es modificado por la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa es destinado finalmente hacia la síntesis de proteínas, mientras que el carbono que es asimilado y modificado por la enzima piruvato cinasa tiene como destino final formar parte de los lípidos sintetizados como reserva dentro de los embriones de maiz. La acumulación de lípidos o proteínas en los embriones de maiz depende, en gran medida, del medio que rodea al embrión, de tal manera que si hay un potencial osmótico bajo y ácido absícico en el medio, el patrón que presenta el embrión será netamente embriogénico y por lo tanto habrá mayor cantidad de síntesis de lípidos y algunas proteínas, mientras que si el embrión se encuentra en un medio diluido tiende a germinar y se sintetizan entonces mayor cantidad de ciertas proteínas, pero en general habrá menor síntesis de lípidos y proteínas debido a que se presenta un intercambio dinámico y constante de estos componentes sin reportar acumulación, respondiendo a las necesidades de crecimiento y formación de tejido para dar origen a la plántula.

3. INTRODUCCIÓN:

Las semillas son la fuente más importante de aceites y de proteínas de origen vegetal empleados en el mundo para el consumo humano, animal y para la producción de alimentos procesados. Su alto contenido de reservas nutritivas (Tabla 1) está destinado a garantizar el establecimiento de la siguiente generación. Por ello, el estudio de los procesos de síntesis de reservas en la semillas reviste una gran importancia para el ser humano.

TABLA 1. COMPOSICIÓN APROXIMADA DE ALGUNOS CEREALES EMPLEADOS EN LA ALIMENTACIÓN.

	Contenido promedio (%).		
	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Cebada	12	3	76
Maiz	10	5	80
Avena	13	8	66
Centeno	12	2	76
Trigo	12	2	75

(Bewfey & Black, 1994)

El cereal que mayor importancia reviste en la dieta del mexicano es el maíz, ya que es el alimento que aporta más beneficios nutritivos por unidad de precio en nuestro país, además de dar identidad a la gastronomía nacional (Bourges, 1996). Lo anterior es gracias a su alto contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas (Tabla 1). Así, la comprensión de los procesos involucrados en la síntesis y acumulación de las reservas de las semillas posee una gran importancia.

El desarrollo de las semillas de las plantas superiores se puede dividir convenientemente en tres fases. En la primera, el cigoto presenta una fase rápida de división y diferenciación celular que culmina con el establecimiento de los diferentes tejidos embrionarios y demás tejidos que rodean al embrión (consultar figura 1 y apartado 4.1). El embrión permanece relativamente pequeño durante esta primera fase, aprovechando los nutrimentos que aporta la planta madre para su crecimiento, con poca o ninguna acumulación de compuestos de reserva. La segunda fase involucra expansión celular acelerada, sin división celular y se acompaña por la acumulación de diversos compuestos de reserva en los distintos tejidos ya formados de la semilla (lípidos y proteínas principalmente en el embrión y carbohidratos como almidón principalmente en el endospermo de semillas de maíz. Tabla 2). Esta segunda fase está acompañada de una abundante acumulación del fito-regulador ácido abscísico (ABA) y de una disminución significativa del potencial osmótico de los tejidos de la semilla (Finkelstein & Somerville, 1989; Bewley & Black, 1994). La tercera fase de desarrollo de la semilla es la desecación, acompañada por la síntesis de proteínas y carbohidratos especializados, cuya presencia ha sido asociada con la protección de las subestructuras y componentes celulares en el estado seco, particularmente las membranas (Bewley & Black 1994).

Además de una serie de reservas menores, todas las semillas contienen las tres clases de reservas mayoritarias dentro de los diferentes tejidos de las mismas: lípidos, proteínas y carbohidratos, aunque sus proporciones relativas varían de acuerdo a factores genéticos y ambientales (Bewley & Black 1994).

TABLA 2. COMPOSICIÓN DE RESERVAS ALMACENADAS EN DIFERENTES PARTES DE UNA SEMILLA DE MAÍZ

Tipo de reserva	Grano entero (%)	Endospermo (Almidón y capa aleurona, %)	Embrión (incluyendo el escutelo, %)
Almidón	74	88	9
Lípidos	4	<1	31
Proteína	8	7	19

Tomado de Bewley & Black, 1994.

Así, entre los aspectos más interesantes y que podrían tener más impacto biotecnológico, se encuentran los mecanismos mediante los cuales las semillas son capaces de canalizar los nutrimentos aportados por los tejidos maternos hacia las diferentes reservas y que se traduce en que ciertas semillas acumulen principalmente lípidos y proteínas y otras acumulen grandes cantidades de carbohidratos. Desafortunadamente, este aspecto ha recibido poca atención porque, entre otras cosas, el metabolismo vegetal posee una plasticidad superior al metabolismo animal, la cual sólo recientemente estamos empezando a comprender (Sugiharto & Sugiyama, 1992; Suzuki *et al*, 1994; Plaxton, 1996).

Como es pues de esperarse, durante el desarrollo de las semillas la partición del carbono involucra una muy compleja interacción entre procesos metabólicos y seguramente requiere de la regulación concertada de numerosas enzimas. Como se ha dicho, el carbono asimilado por las semillas proviene de la planta madre y llega principalmente en forma de sacarosa. Este nutrimento debe ser parcialmente degradado y los productos de esta degradación deben ser repartidos para servir

en la generación de energía, para la asimilación de nitrógeno que soporta la síntesis de proteínas y como fuente de esqueletos carbonados para la síntesis de otros carbohidratos y lípidos.

Uno de los metabolitos intermediarios en el proceso de degradación del carbono asimilado y que posee una importancia central es el fosfoenolpiruvato (PEP; Davies, 1979; Turpin, 1990; vease apartados 4.5. y 4.6). Este compuesto, puede ser aprovechado por al menos tres diferentes enzimas.

Una de las enzimas, cuyo sustrato es el PEP, es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), que juega un papel anaplerótico en todos los tejidos vegetales (O'Leary, 1982). Su participación en el relleno del ciclo de Krebs es una función íntimamente ligada a la asimilación de nitrógeno, a la síntesis de aminoácidos y se ha propuesto que podría aportar esqueletos carbonados también para la síntesis de lípidos (Smith *et al.*, 1992; Rajender, Neelam & Plaxton, 1992; Podestá & Plaxton, 1994a y 1994b). Además, esta enzima ha sido involucrada en un buen número de funciones metabólicas (Blulfert *et al.*, 1982; Chollet *et al.*, 1996), entre las que se cuenta su importante papel en el metabolismo fotosintético de muchas plantas (Edwards & Huber, 1981; O'Leary 1982).

La PEPC es una enzima ubicua de las plantas que cataliza la β -carboxilación de fosfoenolpiruvato en presencia de un catión divalente como Mg^{2+} para producir oxaloacetato y P_i . Esta enzima es particularmente abundante en células mesofilicas de hojas de plantas C_4 y CAM, en las que cumple un papel fotosintético. Las propiedades y funciones de esta enzima en plantas C_3 y tejidos no fotosintéticos como las semillas en desarrollo (Khayat *et al.*, 1991) han sido

menos estudiadas que las de las isoenzimas presentes en los tejidos fotosintéticos de las plantas C₄ y CAM (Sangwan, Singh & Plaxton, 1992).

Por otro lado, el PEP es también el sustrato de la enzima piruvato cinasa (PK). La PK es una enzima clave en la ruta glicolítica que cataliza la síntesis irreversible de piruvato y ATP a partir de PEP y ADP. El piruvato producido por la PK puede ser metabolizado por diferentes vías anabólicas o ser oxidado en las mitocondrias para generar energía. En todos los eucariotes, la PK se halla en el citosol, pero en las plantas, la PK se halla también en plástidos (Gottlob-McHugh *et al.*, 1992). La actividad de la piruvato cinasa está representada por al menos dos isoenzimas, que se localizan en el citoplasma, en el interior de los diferentes tipos de plástidos y, posiblemente, en el espacio intermembranal de este organelo también (Blakeley *et al.*, 1992; Blakeley & Dennis, 1993; Dennis & Blakeley, 1993; Wan *et al.*, 1993; Negm *et al.*, 1995). La producción de ATP por la PK hace a esta reacción energéticamente más provechosa para la célula que la catalizada por su competidora la PEP carboxilasa. La PK ha sido propuesta como una enzima reguladora del paso final de la glucólisis (Duggleby y Dennis, 1973; Plaxton, 1996), pero el significado de la presencia de isoenzimas de esta actividad en varios compartimentos celulares sigue presentando importantes interrogantes. Tanto la PEPC, como la PK están presentes en el citoplasma y seguramente deben regularse en forma concertada para controlar la partición de carbono durante la producción *de novo* de proteínas y lípidos. Adicionalmente, se ha demostrado que los plástidos vegetales pueden intercambiar PEP con el citoplasma, lo que significa que este transporte y/o la PKp deben ser parte de esta regulación simultánea del consumo de PEP.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los procesos involucrados en la regulación del flujo de carbono hacia la síntesis de proteínas y lípidos de reserva se investigaron en este trabajo algunas de las características de las actividades de PEPC y de PK presentes en las semillas inmaduras de maíz.

Debido a que las semillas en desarrollo en la fase de acumulación de reservas se encuentran diferenciadas a nivel tisular, cuando el embrión se aísla de su ambiente original y se incuba en un medio artificial, es posible manipular la composición del medio de manera que los procesos de síntesis de lípidos se detengan o se mantengan según se desee (Rodríguez-Sotres y Black, 1994; Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997). La actividad de los procesos de síntesis y acumulación de lípidos es paralela a otros procesos de acumulación de reservas (Finkelstein y Somerville, 1989). Nosotros decidimos aprovechar esta herramienta y comparar los posibles cambios que ocurren en la actividad y/o en las propiedades de la PEP carboxilasa y la PK en función del estado metabólico de los embriones aislados; para así obtener información que nos permitiera profundizar nuestro conocimiento de la posible función y el papel de estas enzimas, durante esta etapa del ciclo de vida de la planta.

4. ANTECEDENTES:

4.1 ANATOMÍA DE LA SEMILLA DE MAÍZ.

Desde el punto de vista botánico la semilla de la planta de maíz se conoce como cariósida y es el óvulo fecundado, desarrollado y maduro. La semilla está compuesta por cuatro partes principales; pericarpio, embrión, endospermo y pedúnculo.

El pericarpio forma la cubierta del fruto y se forma a partir de las paredes del ovario siendo, por tanto, de origen materno. El pericarpio rodea a toda la semilla y está constituido por varias capas (figura 1): el pericarpio exterior, una capa intermedia de restos de células de pared delgada y el pericarpio interior. Este último está formado por células intermedias, células cruzadas y células tubulares.

En el interior de las semillas de los cereales encontramos al endospermo que es el principal tejido de reserva de la semilla. Este se encuentra rodeado por una monocapa de células ricas en proteína, carentes casi por completo de almidón y con apariencia granular llamada aleurona. Por lo general, la capa de aleurona rodea al grano por completo y presenta paredes celulares gruesas.

Inmerso en el endospermo se encuentra el embrión de la semilla que está formado por los tejidos primordiales de los órganos y aparatos de la planta adulta. Las semillas de cereales tienen en su embrión una planta en miniatura con su radícula, cubierta por la coleoriza; una plúmula con tres a cinco hojas primordiales, cubierta por el coleóptilo y el escutelo o cotiledón, que es el tejido embrionario de

reserva. La mayor parte de la reservas acumuladas en las semillas de los cereales se deposita en el endospermo y en el escutelo embrionario.

Durante la germinación, la plántula se desarrolla a partir del embrión nutriéndose gracias a la movilización de las reservas, en tanto el aparato fotosintético llega a establecerse.

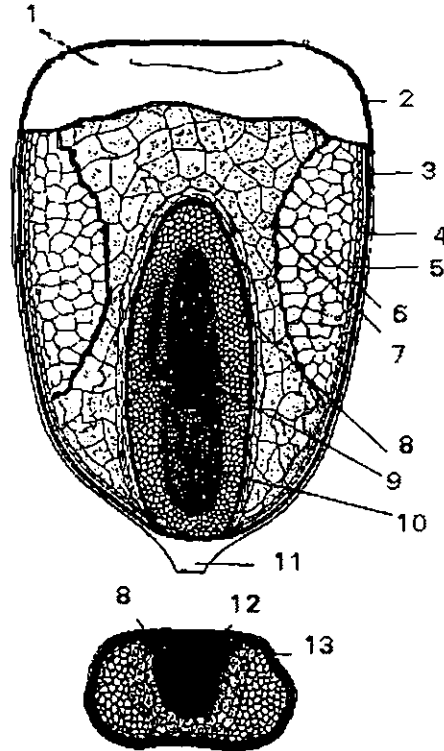


Figura 1. Corte longitudinal y transversal de la semilla de maíz. Las partes que lo constituyen son las siguientes: 1) Pericarpio, 2) Epidermis, 3) Mesocarpio, 4) Cubierta de semilla (testa), 5) Capa de aleurona, 6) Endospermo córneo, 7) Endospermo farináceo, 8) Escutelo, 9) Plúmula, o Tallo y Hojas rudimentarios, 10) Radícula o raíz primaria, 11) Pedúnculo, 12) Eje embrionario, 13) Pericarpio (Tomada de Hosney, 1992).

4.2 MADURACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ.

De una manera general, el desarrollo de la semilla se puede dividir en tres etapas: histodiferenciación, expansión celular y desecación. Después de la fecundación del cigoto el núcleo de la oosfera se fusiona con un núcleo espermático e inicia una serie de divisiones sucesivas para dar lugar al embrión, en tanto que el núcleo secundario (diploide) es fecundado por un segundo núcleo espermático para dar lugar al endospermo (triploide). Las células del cigoto dan lugar a los diversos tejidos embrionarios, mientras que el tejido que constituye al endospermo se diferencia para dar lugar al endospermo almidonoso y a la capa de aleurona (Bewley & Black, 1994). La división y diferenciación celular en el embrión cesa generalmente en etapas tempranas del desarrollo de las semillas, lo que marca el final de la histodiferenciación e inicia la segunda fase. Esta segunda fase, llamada de expansión celular, se caracteriza por un aumento en el tamaño de las células y por el depósito de compuestos de reserva en los tejidos de almacenamiento (Bewley & Balck, 1994). La actividad de los procesos biosintéticos de esta segunda fase disminuye gradualmente conforme se reduce el contenido de agua de la semilla y se llega entonces a una fase final de secado de la semilla. Esta última fase está acompañada de una acumulación de proteínas y carbohidratos especializados que confieren estabilidad a las estructuras celulares, particularmente a las membranas (Jiag & Kermodé, 1994).

Un número importante de los eventos metabólicos en el desarrollo de las semillas son, en términos generales, anabólicos. Mientras las reservas se acumulan el embrión aumenta de tamaño, pero se retiene la típica forma

embrionaria debido a que este crecimiento se sustenta sólo en la expansión de las células ya existentes (Boesenwinkel & Bouman, 1995). En esta segunda fase el eje permanece relativamente corto, no mostrando signos de elongación desproporcionada.

La fase final de secado termina con el desarrollo de la semilla y ésta última entra en el estado de inactividad o latencia característico de la semillas deshidratadas. A pesar de que las semillas histodiferenciadas poseen ya el potencial para germinar y continuar con el programa de establecimiento de la plántula, esto no sucede mientras la semilla se encuentre en la planta madre en condiciones normales. Un factor importante que contribuye a impedir la germinación precoz es el bajo potencial osmótico que se produce por la desecación de la semilla. Por otro lado, la fase de expansión y secado se acompañan de acumulación de ácido abscísico (ABA); este fitorregulador se ha descrito como un factor capaz de estimular la acumulación de las reservas (Kermode, 1990; Skriver & Mundy, 1990; Bewley & Black, 1994; Rodríguez-Sotres & Black, 1994; Pacheo-Moisés *et al.*, 1997), como promotor del establecimiento de latencia y dormancia y como un potente inhibidor de la germinación (Kermode *et al.*, 1989). Otras fitohormonas que pueden influir en la regulación del desarrollo de la semillas son las auxinas, gibberelinas y citocininas, aunque no parecen tener un papel durante la fase de acumulación de reservas, sino que participan en los procesos de embriogénesis y durante la germinación (Bewley & Black, 1994).

4.3 EL ÁCIDO ABSCÍSICO Y EL POTENCIAL OSMÓTICO

La observación de que los embriones inmaduros son capaces de germinar rápidamente cuando se separan de la semilla y se colocan en un medio diluido (Mayer & Poljakoff, 1989) permitió proponer la existencia de factores o señales que regulan el desarrollo de los embriones (Kermode, 1990). Esto es, el ambiente de la semilla *in planta* restringe la germinación y promueve la acumulación de compuestos de reserva en el embrión en desarrollo, ya que contiene una combinación de reguladores de crecimiento, nutrientes, sustancias osmóticamente activas y porque proporciona un confinamiento físico. Estos factores son, por ello, candidatos para regular la germinación de la semilla.

4.3.1 ÁCIDO ABSCÍSICO

La fitohormona conocida como ácido abscísico (ABA) (ácido 2-cis,4-trans abscísico; ó ácido [S]-5-[Hidroxi-2,6,6-trimetil-4-oxociclohexa-2-en-1-o]-3-metil-[2Z,4E]-pentadienoico) juega un papel importante en el desarrollo y germinación de las semillas de las plantas. El compuesto natural y activo es su isómero (+)-S-ABA. Su fórmula condensada y su estructura se muestra en la figura 2.

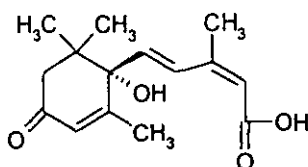


Figura 2. Estructura del ácido abscísico. $C_{15}O_4H_{20}$.
Peso fórmula 264,31 g/mol.

El ácido abscísico ha sido detectado en una gran variedad de plantas y habitualmente se presenta en concentraciones de 0.01 a (0.0378-3.78 μM) hasta 4 ppm (15 μM). Los niveles de ABA se ven incrementados en tejidos sometidos a estrés osmótico generado por desecación, sal o frío (Henson, 1984, Mohapatra y col., 1988; Moons *et al*, 1997) y durante las etapas intermedias y/o tardías del desarrollo de las semillas. El ABA se ha involucrado en la estimulación de la acumulación de reservas, mientras que en etapas posteriores actúa para prevenir la germinación precoz (Koornneef *et al.*, 1984; Walker-Simmons, 1987; Groot & Karssen, 1992; Balsevich *et al*, 1994). En el inicio del desarrollo de la semilla el contenido de ABA es extremadamente bajo o indetectable. Conforme avanza el desarrollo, se eleva hasta llegar a un nivel máximo que se alcanza en un periodo correspondiente a un medio o un tercio de tiempo contado a partir de que inicia la maduración de la semilla y entonces declina a un valor bajo poco antes de que cese la acumulación de reservas, acompañándose o precediendo a la pérdida de agua (Jones & Brenner, 1987). La disminución de ABA libre es debida a su degradación y/o a su conversión a formas conjugadas y, al menos en parte, su distribución en la semilla parece estar determinada por la diferencia de pH entre la cubierta de la semilla y el embrión (Black, 1991).

4.3.2 POTENCIAL OSMÓTICO.

Cuando existe una barrera física formada por dos compartimentos diferentes en las que el paso de iones a través de estas se ve restringido, como es el caso de las membranas biológicas, se presenta un flujo de moléculas de agua de un compartimento a otro que tiende a restablecer el equilibrio químico. Este flujo neto de moléculas de agua de un compartimento a otra se halla asociado a una fuerza por unidad de área perpendicular al flujo, que recibe el nombre de presión osmótica. Si de un lado de la membrana se presenta una concentración de solutos distinta a la del lado opuesto, la solución con mayor concentración tendrá un potencial hídrico (el potencial químico del agua) menor (más negativo); así, el agua se difundirá siguiendo la dirección de este potencial de modo que aumente la presión hidrostática en el compartimento de menor potencial hasta igualar la suma de presiones hídrica y osmótica en ambos lados de la membrana (Salisbury & Ross, 1991).

Cuando una planta es expuesta a una condición de baja disponibilidad de agua, las células deben ceder agua de su interior. Estas células pueden sufrir plasmólisis por excesiva pérdida de agua. Sin embargo la mayoría de las células vegetales son capaces de desplegar respuestas de ajuste osmótico que consisten en la síntesis y acumulación de altas concentraciones de osmolitos biocompatibles que al reducir el potencial hídrico interno reducen la pérdida de agua y mantienen la turgencia de las células (Johnson *et al*, 1997).

Así, un componente del ambiente que rodea al embrión durante su desarrollo es la disponibilidad de agua. Este ambiente parece estar altamente regulado. Se

sabe, por ejemplo, que el endospermo líquido en el cual se encuentran los embriones tiene potenciales osmóticos muy negativos. Dicha condición se establece, por un lado debido a la acumulación de grandes cantidades de macromoléculas y carbohidratos solubles y por otro, gracias a la evaporación de agua que sufre la semilla. Dado que las células vegetales responden naturalmente a los cambios de potencial osmótico, este factor es un lógico candidato para participar en la regulación del estado metabólico del embrión en desarrollo (Kermode, 1995). En este sentido se conoce que el potencial osmótico que experimentan los embriones de trigo en la fase intermedia del desarrollo es menor a -1.5 MPa (Morris *et al.*, 1991) en tanto que para la alfalfa es aproximadamente de -1.6 MP (Xu, *et al.*, 1990).

4.3.3 IMPORTANCIA DEL ABA Y EL POTENCIAL OSMÓTICO EN EL DESARROLLO Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.

Entre los posibles candidatos para regular la embriogénesis y la germinación, el ácido abscísico (ABA) y el potencial osmótico negativo (BPO) han sido los más estudiados. No sólo son estos factores capaces de inhibir la germinación prematura de los embriones cigóticos (Koornneef *et al.*, 1984; Walker-Simmons, 1987; Groot & Karssen, 1992; Balsevich *et al.*, 1994) sino que se sabe que la adición de ABA a concentraciones fisiológicas y la presencia de agentes osmóticos en los cultivos *in vitro* de callos embriogénicos es un pre-requisito para que la formación de embriones somáticos de maíz proceda normalmente (Emons, *et al.*, 1993). La germinación de embriones inmaduros aislados puede detenerse

también al ser incubados en un medio de bajo potencial osmótico aún en la ausencia de ABA (García-Maya *et al.*, 1990; Kermode, 1990).

En muchas especies se observa una alta velocidad de acumulación de reservas coincidente con un pico de acumulación de ABA (Ackerson, 1984) lo que sugiere que los embriones *in planta* se conservan en expansión por el efecto del ABA acumulado en su interior. Se ha encontrado que a los embriones aislados se les pueden mantener en su estado de desarrollo al incluir ABA en el medio de incubación (Kermode, 1990). Hay varias evidencias que indican cómo el ABA puede estar involucrado en este proceso. Una acción mayoritaria de ABA en semillas y otras partes de la planta es la regulación de la expresión genética; por un lado, a través de la inducción de los genes de diferentes tipos de proteínas de reserva y enzimas asociadas a los procesos de almacenamiento de nutrimentos (Lin & Ho, 1986; Skriver & Mundy, 1990) y, por otro, mediante la inhibición de la expresión de genes que codifican para ciertas enzimas degradativas (Dommes & Northcole, 1985; García-Maya *et al.*, 1990).

Por ejemplo, se ha demostrado que tanto el ABA como un bajo potencial osmótico inducen y mantienen la capacidad de los embriones aislados de las semillas de trigo (Rodríguez-Sotres & Black, 1994) y maíz (Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997) para sintetizar y acumular lípidos de reserva. En este caso el efecto parece deberse a la inducción de una mayor actividad de las aciltransferasas de retículo endoplásmico responsables de este proceso, sin que se halla demostrado que la mayor actividad esté ligada a una expresión incrementada de los genes correspondientes (Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997).

Se desconoce si el ABA y un potencial osmótico bajo actúan mediante un

mecanismo común, pero ambos son capaces de producir el efecto global de la inhibición de la germinación en embriones aislados. En otros tejidos vegetativos de la planta se ha demostrado que la síntesis de ABA es estimulada por el déficit hídrico (Salisbury & Ross, 1991). Sin embargo, la inhibición de la síntesis de ABA por fluoridona (un inhibidor de la síntesis de ABA) no es suficiente para impedir que los embriones aislados de la semilla de trigo respondan a la reducción del potencial osmótico *in vitro* (García Maya *et al*, 1990). También, se ha propuesto que el ABA induce un incremento en la rigidez de las paredes celulares, lo cual significaría que el ABA podría actuar a través de una reducción de la entrada de agua hacia las células (Schopfer & Plachy, 1985). Posiblemente, esta interrogante podrá resolverse en un futuro cercano dado que las vías de transducción de las señales de ABA y del potencial osmótico ya se han comenzado a elucidar (Wu *et al*, 1997).

4.4 PRINCIPALES RESERVAS QUE SE ACUMULAN EN LAS SEMILLAS.

La mayoría de las semillas maduras contienen cantidades importantes de al menos dos tipos de reservas, localizadas en tejidos embrionarios y/o extra-embrionarios. El embrión maduro de maíz contiene una cantidad abundante de proteínas y lípidos, mientras que el endospermo que le rodea contiene grandes cantidades de almidón y una importante cantidad de proteínas. La función natural de los diferentes tipos de reserva es la de servir como alimento durante las etapas tempranas de la germinación para proporcionar las fuentes de carbono, nitrógeno y energía que la plántula requiere antes de iniciar su crecimiento autotrófico

(Bewley & Black, 1994). Sin embargo, como ya se mencionó en la introducción, es en sus reservas nutritivas en donde radica el gran valor de las semillas para la humanidad.

En la tabla 2 (página 11) se presenta el porcentaje en la composición de reservas almacenadas en diferentes partes de una semilla de maíz.

A continuación se describen con mayor detalle las características generales de las reservas más importantes presentes en las semillas.

4.4.1 CARBOHIDRATOS.

El almidón es el carbohidrato que se halla más comúnmente en las semillas, aunque también carbohidratos como la hemicelulosa, amiloides, celulosa, pectinas, mucilagos y otros di- y trisacáridos se pueden encontrar presentes.

El almidón se sintetiza en un tipo de plástido llamado amiloplasto, presente en las semillas de los cereales. El almidón se encuentra en dos formas: amilosa y amilopectina. Ambas formas del almidón son polímeros de glucosa y se diferencian por el número y tipo de ramificaciones que poseen. En los cereales, el principal sitio de síntesis y almacenamiento del almidón es el endospermo y puede llegar a representar entre un 67 y un 75 % del peso seco de la semilla madura (Bewley & Black, 1994). También, se deposita el almidón en el embrión y el pericarpio durante las fases tempranas del desarrollo, pero sólo en forma transitoria (Sivak & Preiss, 1995)

4.4.2 PROTEÍNAS.

Las proteínas de reserva en las semillas se depositan en cuerpos proteicos y esta se clasifican en grupos de acuerdo a su solubilidad: 1) las albúminas, que son solubles en agua; 2) las globulinas, que son solubles en soluciones salinas diluidas; 3) Las prolaminas, que son solubles en mezclas alcohol-agua y 4) las glutelinas, que se disuelven en ácidos o bases diluidos. En las semilla de maíz las prolaminas (zeínas) y las glutelinas se depositan en el endospermo, en tanto que, las globulinas se depositan en el embrión. La síntesis de las proteínas de reserva está fuertemente regulada en función del tejido, del estadio de desarrollo de la semilla y de la disponibilidad de nitrógeno, azufre y fotosintatos. (Shewry, 1995).

En la tabla 3 se muestra la composición proteica aproximada de la semilla de maíz. Así mismo, se presenta la composición de otras semillas importantes en la alimentación humana para hacer posible una comparación.

TABLA 3. COMPOSICIÓN DE FRACCIONES PROTEÍCAS DE ALGUNOS CEREALES.

Composición (%) *				
Cereal	Albúmina	Globulina	Prolamina	Glutelina
Trigo	9	5	40(gliadina)	46(glutenina)
Maiz	4	2	55(zeina)	39
Cebada	13	12	52(hordeina)	23(hordenina)
Avena	11	56	9(avenina)	23
Arroz	5	10	5(aryzina)	80(aryzenina)
Sorgo	6	10	46	38

(Bewley & Black, 1994) * Los nombres entre paréntesis indican el nombre común de la proteína más abundante en el cereal en cuestión.

4.4.3 TRIGLICÉRIDOS.

Las semillas también acumulan cantidades importantes de lípidos. Los principales lípidos que se almacenan en las semillas son los triglicéridos (TAG), los cuales consisten de un esqueleto de glicerol con ácidos grasos esterificados en sus tres hidroxilos. Algunas semillas pueden también contener cantidades apreciables de fosfolípidos, glicolípidos, ceras y esteroides (Harwood, 1980).

Entre las reservas que se depositan en la etapa intermedia de la maduración de las semillas, se encuentran los lípidos (tabla 1), que se acumulan en tejidos como cotiledones (lino, colza (*Brassica napus*), girasol), el endospermo (ricino) y en el escutelo (maíz, trigo, cebada). En el caso de las semillas de gramíneas, como el maíz, la cebada y el trigo, hay también una pequeña proporción de lípidos en el eje embrionario y en la capa de aleurona.

TABLA 4. COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS MÁS ABUNDANTES EN LOS ACEITES COMERCIALES DE VARIAS FUENTES VEGETALES.

Especie	Palmitico (16:0)	Esteárico (18:0)	Oléico (18:1)	Linoléico (18:2)	Linolénico (18:3)
Girasol	6	4	26	64	0
Maiz	12	2	24	61	<1
Soya	11	3	22	54	8
Algodón	27	3	17	52	0
Cacahuete	12	2	50	31	0

(Bewley & Black, 1994)

A diferencia de los glicerolípidos de membrana, los lípidos de reserva o triacilglicéridos (TAG) no tienen una función estructural, sino que son casi exclusivamente una forma de reserva de carbono y de energía. Los lípidos de reserva de las semillas difieren notablemente en su composición (Gurr, 1980), dado que los acilos que substituyen al esqueleto de glicerol difieren notablemente en su estructura química y en su abundancia relativa en las tres posiciones del esqueleto del glicerol (Weber *et al*, 1992). Entre los ácidos grasos más frecuentes en los TAG se encuentran ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (16:0), pero casi siempre predominan los insaturados, tales como el ácido oleico (18:1 Δ^9), el linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) y el α -linolénico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$). En la tabla 4 se muestra la composición aproximada en porcentaje de aceite comercial de maíz. Sin embargo, muchos aceites vegetales contienen cantidades importantes de otros ácidos grasos que son exclusivos de este grupo de moléculas. Así, encontramos aceites que contienen ácidos grasos de cadena muy larga (Behénico 20:1, erúcico 22:1, araquidónico 24:3 y otros), ácidos grasos con hidroxilos laterales (ricinoléico 18:0:19-OH), con dobles enlaces en posiciones inusuales (petroselinico 18:1 Δ^6), triples enlaces (ácidos grasos acetilénicos) y otras muchas variantes. La función de dichos compuestos no ha sido del todo clarificada, pero se piensa que podrían tener propiedades aleloquímicas (Bao *et al*, 1998).

4.4.4 FITINA

La fitina es una mezcla insoluble de sales de potasio, magnesio y calcio del ácido mio-inositol hexafosfórico (ácido fítico) y aunque está presente en cantidades relativamente pequeñas en comparación con otras reservas, es una fuente importante para la semilla de fosfatos y elementos minerales (Witkowski *et al*, 1997). A pesar de esto, plantas de *Arabidopsis* transformadas con fitinas no acumulan fitina y las semillas son normales (Patricia Coello, comunicación personal, 1999).

4.4.5 OTROS COMPUESTOS.

Hay una gran cantidad de componentes minoritarios presentes en las semillas, aunque no se les puede considerar estrictamente como compuestos de almacenamiento, ya que no todos ellos se movilizan durante la germinación o el crecimiento subsecuente. Entre estos se encuentran ciertos alcaloides, los cuales pueden proteger a las semillas de ser ingeridas por insectos y animales; los fitoesteroles; aminoácidos no proteicos, que sí pueden ser aprovechados como una fuente de nitrógeno durante la germinación; glucósidos y compuestos fenólicos como cumarinas, ácido clorogénico y sus derivados que pueden inhibir la germinación de la semilla que los contiene o de semillas vecinas (Bewley & Black, 1994).

4.5. PROCESO DE ACUMULACIÓN DE RESERVAS EN SEMILLAS DE MAÍZ.

Después de haber presentado una breve revisión de los compuestos principales de almacenamiento es conveniente presentar una breve descripción del metabolismo que sustenta su acumulación en la semilla y la información disponible acerca de los procesos regulatorios que determinan cómo se reparte el carbono que ingresa a la semilla para dar lugar a los diferentes tipos de reservas. Esta presentación se enfocará al metabolismo de los esqueletos de carbono y a la producción de energía, ya que son los puntos de interés para el presente trabajo.

La fuente de carbono más importante para las semillas de gramíneas es la sacarosa, ya que representa el 85% del carbono total que entra a la semilla. Esta azúcar es importada desde los tejidos fotosintéticos hacia la semilla en desarrollo siendo descargada en las terminales del floema localizadas en la base del grano, en la región llamada pedicelo. Desde ahí, células de transferencia especializadas facilitan la movilización de este recurso desde el tejido materno a la región externa del endospermo en desarrollo. Para facilitar este proceso la sacarosa es desdoblada en glucosa y fructosa por las invertasas presentes en el apoplasto del pedicelo y en las células del endospermo. Las células del endospermo emplean las hexosas generadas principalmente para la biosíntesis de almidón, como fuente de carbono y energía, para proveer otras vías biosintéticas, o bien, para generar nuevamente sacarosa que pueda ser exportada para mantener el desarrollo de las células más interiores y del embrión (Bewley & Black, 1994).

Además de la fuente de carbono, las semillas reciben un aporte de nitrógeno

principalmente como asparagina, glutamina y pequeños péptidos que son transportados desde la planta madre (Bewley & Black, 1994). La formación de otros aminoácidos ocurre dentro de los granos en desarrollo en donde el grupo amino proviene de estos aminoácidos precursores, mientras que los esqueletos de carbono son proporcionados por los carbohidratos translocados. La rapidez de síntesis de proteínas de almacenamiento puede ser controlada por la rapidez a la cual la glutamina y asparagina son asimiladas, por la capacidad de los tejidos para sintetizar otros aminoácidos, o por el aporte de los esqueletos carbonados requeridos en este proceso.

En los últimos años, se ha propuesto que algunas hormonas y particularmente el ABA juegan un papel importante en la regulación del flujo de fotosintatos hacia las semillas en desarrollo.

Dado que la mayor parte del carbono que ingresa a la semilla entra como una sola molécula, una pregunta inmediata es: ¿qué determina el tipo y la cantidad de cada una de las reservas acumuladas en las semillas?

Para empezar, se sabe que la síntesis de tales reservas se lleva a cabo en diferentes compartimentos celulares. Por ejemplo, el almidón y los ácidos grasos se sintetizan en plástidos, mientras que las proteínas se sintetizan principalmente en el citosol y retículo endoplásmico. De todo ello, se deduce que la degradación de la sacarosa debe estar sujeta a un control estricto que garantice una repartición adecuada de carbono entre todos los procesos que lo demandan. Sin embargo, todavía se sabe poco acerca de cómo ocurre el control de tal repartición. Adicionalmente, estos mecanismos actúan de un modo distinto en cada tejido, por ejemplo, los plástidos del embrión de maíz son muy activos en la producción de

ácidos grasos, mientras que aquellos presentes en el endospermo se dedican mayoritariamente a la síntesis de almidón (Bewley & Black, 1994). De hecho, la mayor parte de los tejidos que acumulan almidón no acumulan muchos lípidos y visceversa.

Es evidente que la actividad relativa de las diferentes enzimas involucradas en metabolizar la sacarosa debe estar íntimamente relacionada con la redistribución del carbono. En la modulación de tales actividades pueden estar involucrados diferentes procesos de activación e inhibición de ciertas proteínas, pero seguramente, también será necesaria la regulación de la expresión de ciertos genes. Desafortunadamente, existe muy poca información al respecto y la información de la que se dispone hasta la fecha se refiere más a la regulación de los pasos finales de utilización del carbono por diferentes vías que a la regulación del metabolismo básico que permite al carbono de la sacarosa ser convertido a precursores útiles para cada una de estas vías (Plaxton, 1996).

Finalmente, el medio ambiente también puede tener influencia sobre la composición de las semillas. Por ejemplo, en el caso de la composición de los aceites, se ha reportado que la temperatura puede influir de manera importante en la proporción relativa de ácidos grasos insaturados que se acumulan (Deng & Scarth, 1998; Kojima, 1998).

4.5.1 SÍNTESIS DE ALMIDÓN.

En tejidos no fotosintéticos, la síntesis de almidón se inicia en el organelo proplástido con la formación de uno o más gránulos de almidón en el endospermo. Después hay un incremento gradual en el tamaño del gránulo hasta que el amiloplasto maduro se llena por completo (figura 3). Si bien, la síntesis de almidón ocurre principalmente en el amiloplasto, los precursores de esta reserva pueden ingresar al plástido como hexosas, hexosas fosfato, triosas fosfato, fosfoenolpiruvato e incluso, como piruvato; ya que, el plástido es capaz de incorporar mediante diversos transportadores todos estos compuestos (figura 4) y se piensa que posee las enzimas para realizar gluconeogénesis (Batz *et al*, 1992).

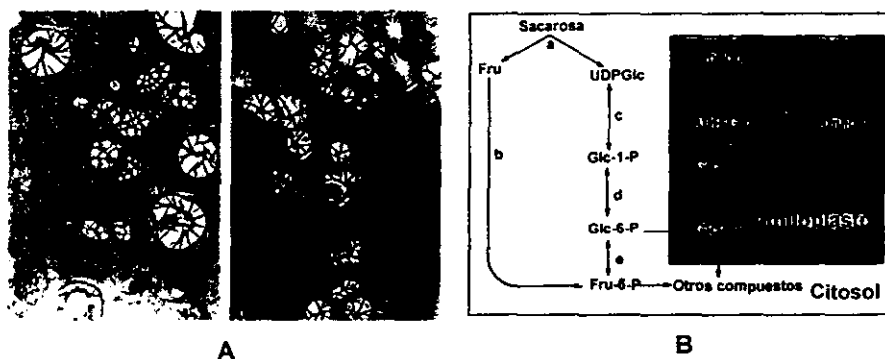


Figura 3. A) Fotomicrografía de transmisión de electrones de baja amplitud de algunas partes de tres células de endospermo de maíz. En estas fotomicrografías se puede apreciar los gránulos de almidón acumulados en el endospermo. Tomadas de: Shannon *et al*, 1998. B) Esquema simplificado de la síntesis de almidón en sistemas vegetales. Las letras minúsculas representan a las siguientes enzimas: a: Sacarosa-UDP-glucotransferasa; b: hexocinasa; c: UDPGlc 1c pirofosforilasa; d: fosfoglucomutasa; e: hexosa fosfato isomerasa; f: translocador hexosa-fosfato; g: ADPGlu pirofosforilasa; h: almidón sintetasa; i: enzima ramificadora de almidón. Las abreviaciones se indican a continuación: Fru: Fructosa; UDPGlu: uridina difosfato glucosa; Glu-6-P: glucosa-6-fosfato; ADP-Glu: Adenina difosfato glucosa. (Bewley & Black, 1994).

Por otro lado, las azúcares pueden ser empleadas en el citoplasma para la síntesis de di-, tri- y tetrasacáridos, lo cual significa que los amiloplastidos deberán competir con el citoplasma para poder sintetizar almidón. Estudios del metabolismo carbonado en hoja demuestran que la relación fosfato/triosas fosfato y los niveles de fructosa-2,6-bifosfato son importantes para determinar los niveles de fotosintátos que se almacenan como almidón y los que se exportan o acumulan como oligosacáridos (Sabularse & Anderson, 1981). Sin embargo, la información disponible sobre esta partición en las semillas en desarrollo es aún incompleta (Bewley & Black, 1994).

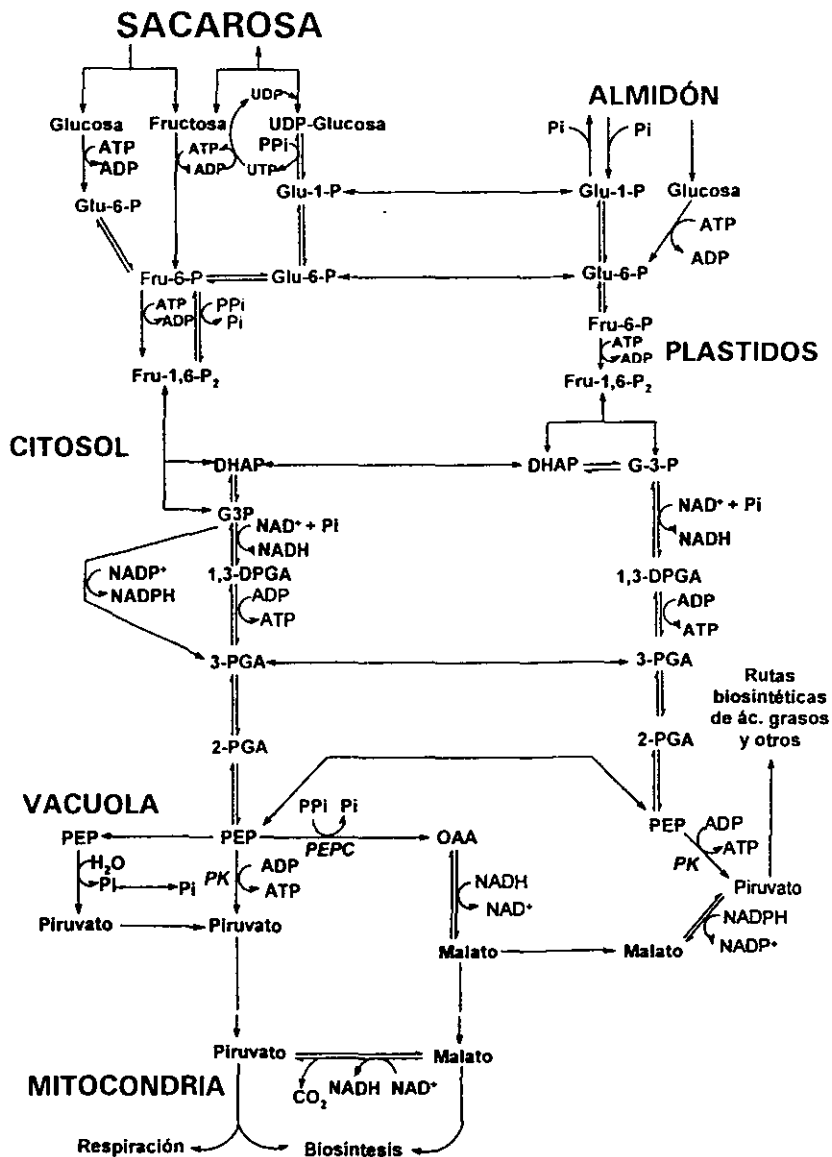


Figura 4. Vías metabólicas que se relacionan con el metabolismo de los carbohidratos. Las únicas enzimas indicadas son: *PK* piruvato cinasa; *PEPC* fosfoenolpiruvato carboxilasa. Las demás enzimas se omiten para hacer más clara la figura (Plaxton, 1996). Las abreviaciones son como sigue: Glu-1-P, glucosa-1-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; OAA, oxaloacetato.

4.5.2 SÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS.

De manera amplia, la síntesis de TAG se puede dividir en tres partes: 1) producción del esqueleto del glicerol; 2) formación de ácidos grasos; 3) esterificación del glicerol para dar origen a los TAG (Bewley & Black, 1994).

La sacarosa al penetrar a la semilla en desarrollo se convierte en hexosas fosfato y triosas fosfato a través de las reacciones de la glicólisis. La síntesis de ácidos grasos ocurre en los plástidos utilizando acetil-CoA que puede ser generado por reacciones glicolíticas en este organelo. Por ejemplo, se sabe que la actividad de algunas enzimas glicolíticas tales como enolasa y piruvato cinasa en plástidos de las semillas se incrementa durante el periodo de acumulación de triglicéridos lo cual plantea la posibilidad de que estas enzimas jueguen un papel importante en la regulación de la síntesis de TAG. Además, como se ha mencionado antes, los plástidos tienen varios transportadores que les permitirían importar carbono del citoplasma en diferentes formas (Ernes & Tobin, 1993). Se ha demostrado que los leucoplastos aislados de semillas de colza son capaces de sintetizar una buena cantidad de ácidos grasos a partir de malato, menos con piruvato y menos aún con acetato (Smith *et al.*, 1992). Pero se ignora realmente cuál es el precursor empleado "*in vivo*".

Consecutivamente, para que los ácidos grasos puedan ser incorporados a los triglicéridos deben ser exportados del plástido. Recientemente, se ha demostrado que la salida de ácidos grasos del plástido, se estimula si se administran hexosas a los plástidos aislados (Eastmond & Rawsthorne, 1998). Esta evidencia sugiere que la disponibilidad de azúcares es necesaria para que los plástidos continúen

produciendo y exportando ácidos grasos. Sin embargo, aún se desconoce si estas hexosas son la única fuente de esqueletos de carbono requeridas para la síntesis de lípidos y se ignora qué factores limitan el consumo de carbono por los plástidos a fin de garantizar una síntesis de proteínas adecuada.

Por último, aunque los detalles relativos a la regulación de la síntesis de TAG son en gran medida ignorados, se ha demostrado que el ABA y un bajo potencial osmótico (BPO) son necesarios para que los ácidos grasos y los triglicéridos se acumulen en los tejidos embrionarios de las semillas en desarrollo de trigo (Rodríguez-Sotres y Black, 1994) y maíz (Pacheco-Moisés *et al*, 1995). Pacheco-Moisés y colaboradores (1997) también demostraron que las enzimas encargadas de incorporar los ácidos grasos al esqueleto de glicerol se encuentran más activas cuando los embriones están en presencia de ABA y un BPO, lo cual sugiere que los niveles de estas enzimas deben jugar un papel importante en limitar el flujo de carbono hacia los aceites.

4.5.3 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

En general, la síntesis de la mayoría de las proteínas de almacenamiento de una semilla en particular inicia en tiempos similares, durante el periodo de maduración y la mayoría de las proteínas se acumulan con la misma rapidez.

En la cebada, trigo y maíz las proteínas de almacenamiento mayoritarias son las prolaminas, las cuales son altamente insolubles y se localizan en el endospermo, principalmente. En el de maíz, las principales prolaminas son las zeínas que se depositan en cuerpos proteicos conforme avanza el desarrollo. Por

su parte, el embrión contiene cantidades importantes de globulinas además de sus reservas lipídicas (Bewley & Black, 1994).

La síntesis de las proteínas de reserva ocurre en ribosomas estrechamente asociados al retículo endoplásmico que posteriormente son procesadas y depositadas en vacuolas recubiertas que eventualmente se convierten en los llamados cuerpos proteicos (Bewley & Black, 1994).

La síntesis de proteínas en las semillas de reserva requiere de un aporte continuo de aminoácidos, pero los principales nutrimentos que la semilla recibe de la planta madre son tan sólo sacarosa, glutamina y algunos péptidos, como ya se ha mencionado anteriormente. De modo que la semilla debe metabolizar el carbono y nitrógeno y retransformarlos en los diversos aminoácidos que requiere. Este proceso involucra esqueletos carbonados del ciclo de Krebs (Dennis y Turpin, 1992) y, en consecuencia, este ciclo debe ser activamente rellenado por la reacción anaplerótica catalizada por la enzima PEPC.

La síntesis de cada proteína de reserva ocurre en un periodo discreto y no a través de toda la etapa de desarrollo; las proteínas de reserva se acumulan sólo en la semilla y, casi siempre, abundan en los tejidos embrionarios como el escutelo, el eje embrionario y los cotiledones. Por lo tanto, hay una fuerte regulación temporal y espacial de la síntesis de proteínas de reserva y de la expresión de sus genes (Domínguez & Cejudo, 1996). Además, se sabe que las proteínas de reserva deben ser procesadas y depositadas en los cuerpos lipídicos. Este proceso está regulado de manera tejido específica, porque la síntesis de las proteínas no necesariamente se traduce en acumulación de las mismas (Le *et al.*, 1998; Picardt, 1998).

4.6 REVISIÓN DEL PROCESO METABÓLICO DE LA DEGRADACIÓN DE LA SACAROSA Y SU PARTICIÓN EN DIFERENTES VÍAS METABÓLICAS.

Como ya se ha descrito antes, la principal fuente de carbono de las semillas en desarrollo es la sacarosa. En las figuras 5 y 8 se presentan las vía metabólicas a través de las cuales la sacarosa podría estar siendo degradada. En estos esquemas se puede apreciar el papel central de PEP como un metabolito clave en la degradación de los azúcares (Davies, 1979). Por ello, las enzimas que emplean este sustrato son enzimas clave en el metabolismo de los vegetales y deben estar estrechamente reguladas. Tal es el caso de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Chollet, 1996) y de la piruvato cinasa (Plaxton, 1996), las cuales posiblemente desempeñan un papel importante en la partición de carbono hacia los diferentes compuestos de reserva al generar diferentes intermediarios. La PEPC en este caso aportaría oxaloacetato e indirectamente malato, que pueden ser necesarios para rellenar el ciclo de Krebs, lo que a su vez resulta fundamental para la formación *de novo* de numerosos aminoácidos (Quy *et al*, 1991). La PK aporta piruvato, que puede ser oxidado hasta acetato, precursor clásico de la respiración mitocondrial (Edwards *et al*, 1998) y requerido para la biosíntesis de ácidos grasos (Eastmond & Rawsthorne, 1998). Ambas enzimas son de alta capacidad, esto es, que su actividad parece ser muy alta a comparación de la cantidad disponible de sustrato (Adams & Rinne 1981). Lo que plantea interrogantes acerca del control de su actividad.

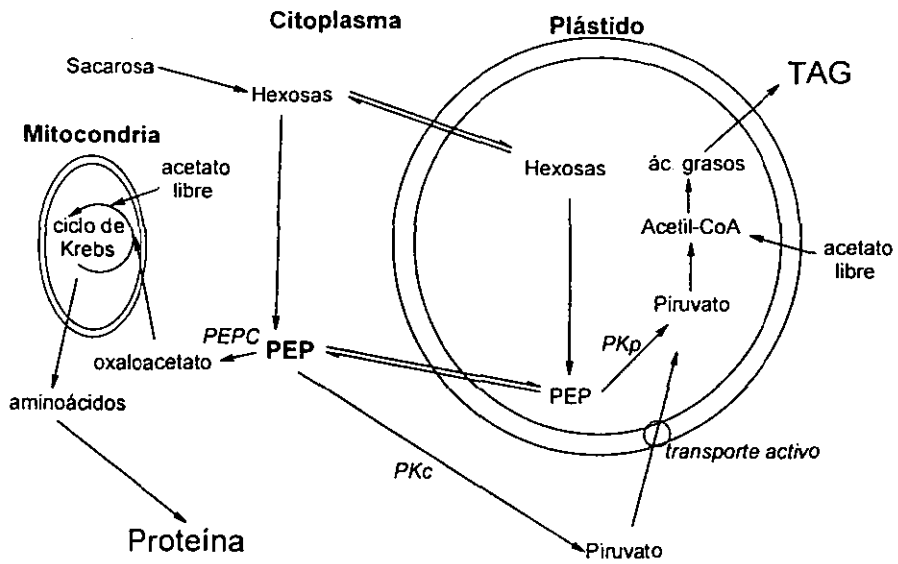


Figura 5. Esquema de degradación de la sacarosa y su posible uso para la síntesis *de novo* de algunos compuestos de almacenamiento.

4.7 RELACIÓN ENTRE LAS ENZIMAS PIRUVATO CINASA Y PEPC.

4.7.1 LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (EC 4.1.1.31) es una enzima ubicua citosólica que se encuentra en plantas superiores y también está ampliamente distribuida en bacterias, cianobacterias y algas verdes. Cataliza la β -carboxilación irreversible de fosfoenopiruvato (PEP) en presencia de HCO_3^- y Mg^{2+} para producir oxaloacetato (OAA) y P_i y, así, se relaciona íntimamente con el metabolismo C_4 del ácido dicarboxílico en las plantas. La reacción que cataliza la PEPC se describe en la figura 6.

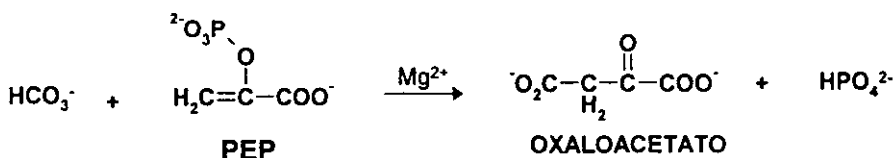


Figura 6. Reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Como ya se ha mencionado, junto a su papel cardinal en la fijación inicial de CO_2 atmosférico durante la fotosíntesis de plantas C_4 y CAM, la PEPC realiza funciones anapleróticas (Latzko y Kelly, 1983; Schuller et al., 1990) en una variedad de sistemas no fotosintéticos tales como la asimilación de N en hojas C_3 , formación y germinación de semillas y maduración de frutas al contribuir con ácidos orgánicos de cuatro carbonos para la síntesis *de novo* de aminoácidos necesarios para que estos procesos se lleven a cabo. Las isoformas de PEPC también juegan un papel especializado en células guarda en el metabolismo del

carbono durante la apertura de estomas y células guarda, en la formación de precursores de diversos ácidos orgánicos y en la fijación de N_2 en nódulos de leguminosas (Chollet, Vidal y O'Leary 1996). Además, se han propuesto otras funciones para la enzima PEPC en plantas C_3 : (a) regulación de pH celular y balance catiónico (Deroche y Carrayol, 1988, Latzko y Kelly, 1983), (b) producción de ácidos dicarboxílicos usados como sustrato respiratorio por bacteroides y nódulos de raíz en leguminosas (Sanwan, Singh y Plaxton 1992), (c) proveer una ruta alternativa, independiente de ADP, para la glucólisis en condiciones de deficiencia de fosfato inorgánico en el suelo (Theodorou et al, 1991). En este último caso, el oxaloacetato formado puede ser reducido a malato a través de la enzima malato deshidrogenasa, o transaminado a aspartato. El malato puede ser convertido entonces a piruvato a través de la reacción de la enzima málica.

Muchos tejidos de planta, incluyendo nódulos de raíz de leguminosas, callos diferenciados y semillas en desarrollo contienen altos niveles de PEPC. Esta enzima puede jugar un papel importante al dirigir el carbono del paso terminal de la glucólisis hacia la síntesis y alterar substancialmente el manejo de los esqueletos carbonados en el tejido en respuesta a las necesidades propias de ésta.

4.7.1.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

La mayoría de las PEPC de plantas que hasta la fecha se han estudiado presentan una masa molecular de aproximadamente 400 kDa y están constituidas por cuatro subunidades idénticas de 100-110 kDa, es decir, esta enzima es un homotetrámero (Ting & Osmond, 1973; Marês & Leblová, 1980). Aun cuando la PEPC puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vitro* (Wu & Wedding, 1985; Stiborová & Leblová, 1986; Wagner & col., 1987) la forma activa es el homotetrámero, siendo el dímero poco activo y el monómero totalmente inactivo.

La estructura primaria de la PEPC ha sido determinada a partir de la secuenciación de los genes y/o del mRNA que codifican para esta proteína en diversos tejidos de varias plantas superiores, algas y bacterias (Lepinicc *et al.*, 1993). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos indica que la mitad de la molécula de la enzima correspondiente al C-terminal está conservada a lo largo de la escala filogenética, en tanto que la mitad N-terminal, que parece estar involucrada en la regulación, es variable (Rajagopalan *et al.*, 1994).

Se ha documentado que la enzima PEPC de hoja y algunas formas recombinantes son altamente susceptibles a la proteólisis limitada en la zona cercana al extremo N-terminal durante la extracción y subsecuente purificación (Duff *et al.*, 1995). La eliminación del extremo N-terminal elimina la susceptibilidad a la fosforilación *in vitro* de la enzima y su sensibilidad al efector alostérico negativo L-malato, por lo que se ha requerido del empleo de inhibidores de proteasas (principalmente quimostatina) para preservar la integridad de la enzima durante su extracción y purificación (Zhang *et al.*, 1995).

4.7.1.2 REGULACIÓN DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

La actividad de varias isoformas de PEPC de planta está sujeta a control alostérico por una variedad de metabolitos que son efectores positivos, entre los que se encuentran la glucosa-6-fosfato (G6P) (Tovar *et al.*, 1997) la fructuosa-1,6-bifosfato, el 3-fosfoglicerato, las triosas-fosfatadas y la glicina (Andreo *et al.*, 1987; Duff *et al.*, 1995); así como también, esta enzima está modulada por los inhibidores alostéricos negativos L-malato (Andreo *et al.*, 1987; Duff *et al.*, 1995) y L-Aspartato (Chollet, Vidal y O'Leary 1996). Lo cual indica la existencia de más de un sitio regulatorio en la molécula de la enzima (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Chollet *et al.*, 1996; Tovar-Méndez *et al.*, 1997). Se ha encontrado que la PEPC de hoja está sujeta a un fuerte control por fosforilación *in vitro* que altera la actividad y/o la sensibilidad a malato en ensayos con condiciones cercanas a las fisiológicas. Se ha documentado que tal efecto de regulación es causado por cambios en el estado de fosforilación reversible de un solo residuo de serina cercano al extremo N-terminal. También, se presenta la regulación por fosforilación reversible en PEPC de tejidos no fotosintéticos (Chollet *et al.*, 1996). En estudios con PEPC con hoja de sorgo se ha establecido que la fosforilación del dominio N-terminal no sólo provoca que la enzima sea considerablemente menos sensible al inhibidor L-malato sino también es más sensible a ser activada por G-6-P, por lo cual se propone que ambos metabolitos participan *in vivo* en la regulación de la PEPC. Estos dos metabolitos poseen efectos antagónicos ya que la presencia de uno de ellos provoca la insensibilización de la enzima hacia la acción del otro (Donkin *et al.*, 1982; Colombo *et al.*, 1993). Como ya se mencionó,

la enzima PEPC es una proteína homotetramérica y la cooperatividad que presenta puede tener origen en la existencia de interacciones múltiples entre los sitios catalíticos, entre sí y/o con uno o varios sitios alostéricos regulatorios diferentes al sitio activo, uno de los cuales puede unir al PEP. (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al*, 1997, 1998). El efecto activador de algunos análogos estructurales de PEP sobre la PEPC de tipo C₄, tales como el fenilfosfato (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990) y la fosfomicina (Mujica-Jiménez *et al*, 1998) se explica por su unión al sitio alostérico activador para la glucosa-6-fosfato. De entre estos activadores, destaca por su potencia la fosfomicina, antibiótico muy soluble en agua de bajo peso molecular, cuya estructura se muestra en la figura 7.

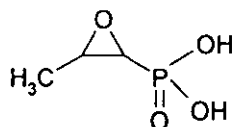


Figura 7. Estructura de la fosfomicina.

La fosfomicina tiene la fórmula condensada C₃H₇O₄P, con una masa molecular de 138.06. En su forma pura se presenta como cristales con un punto de fusión de 94° C, es soluble en agua y benzilamonio. Este análogo del PEP es un antibiótico producido por cepas de *Streptomyces* (Hendlin *et al*, 1969).

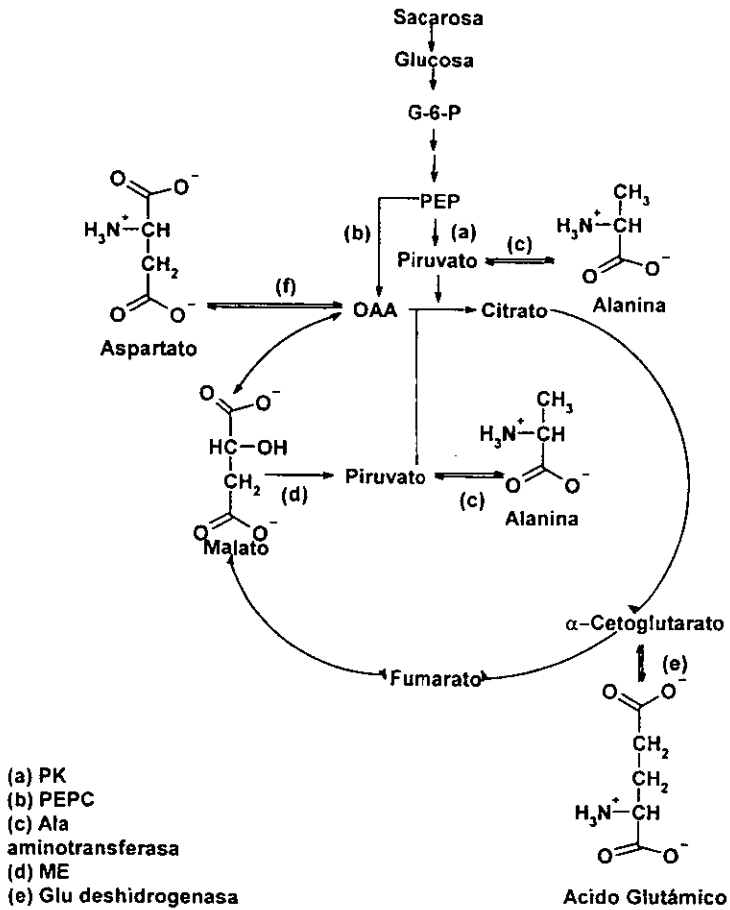


Figura 8. Ciclo de Krebs y reacciones relacionadas con la biosíntesis de algunos aminoácidos. Las abreviaciones empleadas para las enzimas son las siguientes: (a) PK: piruvato cinasa; (b) PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; (c) Ala aminotransferasa: Alanina aminotransferasa; (d) ME: Enzima málico deshidrogenasa; (e) Glu deshidrogenasa: Glucosa deshidrogenasa. Edwards *et al*, 1998.

4.7.2. ENZIMA PIRUVATO CINASA.

La piruvato cinasa (PK; ATP-piruvato 2-O-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40) es una enzima clave en la ruta glucolítica. Cataliza la síntesis irreversible de piruvato y ATP a partir de PEP y ADP utilizando el Mg^{2+} y el K^+ como cofactores (es decir, cataliza una fosforilación a nivel sustrato). La reacción catalizada por esta enzima se muestra en la figura 9.

El producto, piruvato es metabolizado por algunas rutas biosintéticas o es oxidado en la mitocondria. En todos los eucariotes la PK se halla en el citosol, pero en las plantas, la PK se localiza también en plástidos. Las PK citosólica y plastidial (PK_C y PK_P respectivamente) difieren significativamente en su peso molecular y características cinéticas y son proteínas no relacionadas inmunológicamente (Gottlob *et al*, 1992). La enzima probablemente existe *in vivo* como un heterotetrámero compuesto de dos tipos de subunidades similares pero no idénticas, con un peso molecular de 57 y 56 kDa (Hu & Plaxton, 1996).

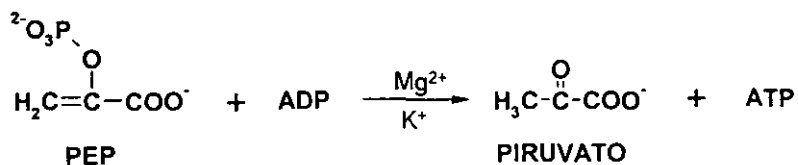


Figura 9. Reacción catalizada por la enzima piruvato cinasa.

La enzima PK_P es lábil al calor y se ha reportado que es eliminada completamente a 55°C, en un periodo de tiempo aproximado de cinco minutos, mientras la PK_C es termoestable (Gottlob *et al.*, 1992).

Se han propuesto condiciones que requieren de una regulación especialmente cuidadosa de la actividad de la PK_C en la ruta glicolítica.

(I) En la germinación anaeróbica. Conversión masiva de triacilglicerolos de almacenamiento en sacarosa, la cual es absorbida por los cotiledones del embrión en crecimiento. Este proceso involucra la conversión gluconeogénica de PEP (derivado del ciclo glioxílico, malato deshidrogenasa y PEP carboxicinas) a hexosa fosfato en el citosol, donde cantidades apreciables de PK_C coexisten y su actividad de estar regulada negativamente (Podestá & Plaxton, 1991).

(II) En un medio anóxico. La reducción de cociente de [PEP]/[piruvato] *in vivo* sugiere que los tejidos vegetales expuestos a condiciones de bajo oxígeno poseen mayor actividad de PK en el citoplasma (Podestá & Plaxton, 1991).

4.7.2.1 REGULACIÓN DE LA ENZIMA PIRUVATO CINASA

Hay evidencias substanciales que indican que esta enzima es el sitio de control primario del flujo glicolítico en el citosol de la planta (Plaxton, 1996). Esta enzima a su vez regula por retroalimentación negativa a la fosfofructocinasa debido a que, en plantas, el PEP es un potente inhibidor de esta última enzima (Podestá y Plaxton, 1992). Así, la reducción en los niveles de PEP, que resulta de un aumento en la actividad de PK, estimula a la enzima fosfofructocinasa.

Esta enzima juega un papel adicional importante al regular, junto con la PEPC, el suministro de esqueletos carbonados requeridos para la asimilación de NH_4^+ por GS/GOGAT, ya que el glutamato, producto primario de la asimilación por GS/GOGAT, es un potente inhibidor de la PK_C (Podesta & Plaxton, 1991, 1992).

Además, se ha reportado que la PK_C de semillas de ricino es inhibida por ATP, AMP, isocitrato, 2-oxoglutarato, malato, 2-fosfoglicerato, 2,3-bifosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, glicerol-3-fosfato, oxalato, citrato y fosfoglicolato, aunque aún no se han encontrado activadores para esta enzima (Hu & Plaxton, 1996).

Un análogo estructural del sustrato PEP, el fenilfosfato, muestra un efecto de inhibición sobre la enzima PK: la inhibición por fenilfosfato con respecto a PEP es competitiva a una concentración saturante o subsaturante de ADP; la acción del fenilfosfato se explica por su unión al sitio de unión para PEP y no parece ser capaz de unirse al sitio de unión para ADP (Podestá & Plaxton, 1992), este comportamiento contrasta con el ya descrito para la PEPC.

5. HIPÓTESIS

Cambios relativos en la síntesis de proteína y lípidos, tales como los que acompañan a la incubación de los embriones inmaduros en medios que no contengan ABA y/o un BPO se traducirán en cambios detectables de los niveles de actividad y/o las características bioquímicas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o de la piruvato cinasa. Así mismo, la alteración provocadas en el balance entre estas actividades afectará la síntesis relativa de proteínas y lípidos en las semillas tratadas.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

- Determinar los cambios en la actividad y/o en las características de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) que puedan ocurrir cuando los embriones de maíz cambien su estado metabólico y dejen de acumular lípidos y proteínas de reserva, así como correlacionar el patrón de partición de carbono de la semilla con la actividad de esta enzima y de la enzima piruvato cinasa (PK).

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar si el ácido abscísico (ABA) y/o un bajo potencial osmótico (BPO) modifican la actividad y/o la afinidad por el sustrato de la enzima PEPC extraída de embriones de maíz en desarrollo.
- Determinar si el ABA y/o un BPO alteran la sensibilidad de la PEPC al inhibidor malato.
- Determinar si el ABA y/o un BPO alteran la actividad y/o las características de las isoenzimas cloroplástica y citoplásmica de la piruvato cinasa extraída de embriones de maíz en desarrollo.
- Explorar el efecto que la fosfomicina tiene sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato cinasa extraída de las semillas en desarrollo de maíz.
- Determinar si la adición de fosfomicina al medio de incubación de los embriones inmaduros de maíz es capaz de alterar la síntesis de proteínas y/o de triglicéridos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 MATERIALES

El [¹⁴C]-acetato empleado fue de obtenido de NEN Dupont. Los amortiguadores y las sustancias químicas para realizar la electroforésis se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (San Luis Missouri, USA). El manitol se obtuvo de Mallinckrodt, las placas de silica gel de Aldrich (San Luis Missouri, USA) y los solventes de Merck. En el anexo-2 se adiciona una tabla con reactivos y sustancias también empleados para la realización de este trabajo.

7.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Los experimentos descritos en este trabajo se realizaron con semillas de maíz (*Zea mays* L.) provenientes de elotes frescos recién cosechados (la edad fisiológica de los elotes con que se trabajó fue de 18 a 24 días después de la polinización) conseguidos en Xochimilco y transportados en condiciones que asegurasen su frescura.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 EXTRACCIÓN E INCUBACIÓN DE EMBRIONES.

Para extraer los embriones las mazorcas de elote se sumergieron durante 30 minutos en un medio con PEG (polietilen glicol 6000) al 16% (p/v) e hipoclorito de sodio al 1%, transcurrido el cual se lavaron tres veces en una solución estéril de PEG al 16% (p/v).

A fin de simular *in vitro* las condiciones que rodean al embrión de maíz en el grano *in planta*, se determinó el pH del ambiente que rodea al embrión (el endospermo) empleando un microelectrodo de superficie tipo calomel saturado calibrado con estándares de pH de 7.0 y de 10.0.

Se extrajeron los embriones con una espátula en condiciones asépticas y se incubaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL que contenían 3 mL de un medio con manitol 0.5 M, sacarosa 60 mM, ABA 10 μ M y Hepes-KOH pH 7.2, 5 mM. Los embriones se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad, con agitación constante (50 rpm). Los lotes de embriones se pesaron al principio y al final de cada incubación.

Los embriones se incubaron por 48 horas, renovando el medio cada 24 y se sometieron a los diferentes tratamiento, incubándolos en los medios siguientes:

- B medio con amortiguador Hepes-KOH 5mM, pH 7.2
- BA medio B más ABA 10 μ M
- BS medio B más sacarosa 60 mM
- BM medio B más manitol 0.5 M
- BSM medio B más sacarosa 60 mM y manitol 0.5 M
- BSA medio B más sacarosa 60 mM y ABA 10 μ M
- BSMA medio con amortiguador Hepes-KOH 5mM, pH 7.2, Sacarosa 60mM, Manitol 0.5 M, y ABA 10 μ M.

Para evaluar si había cambios en la síntesis de lípidos al incubar a los embriones en un medio con fosfomicina, los embriones incubados en un medio BSMA por 48 horas se transfirieron a un medio B ó BSMA, se incubaron por otras 24 horas y se les renovó el medio al que se le añadió fosfomicina 25 mM. Debido

a que la fosfomicina es una molécula relativamente grande e hidrofílica para asegurarnos de que esta penetrase al tejido embrionario se incluyó al medio de incubación de los embriones en el tratamiento correspondiente y se sometió a vacío de manera intermitente cada dos segundos por 30 segundos. El periodo de incubación en esta ocasión fue de 12 horas. Finalmente, a cada tratamiento se le agregó 2.5 μCi /matraz de [^{14}C]-acetato se incubó por 4 horas, tras las cuales se lavaron los embriones con acetato de sodio 0.3 M. Los embriones así tratados se almacenaron en 1 mL de metanol a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta la extracción de TAG

7.2.1.1 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA CRUDA.

Los embriones tratados se molieron en un mortero previamente enfriados con la mano del mismo y en un medio que contenía Hepes-KOH 100 mM, pH 7.3, Quimostatina (100 μg /mL), Leupeptina (100 μg /mL), Benzamidina 2 mM, DTT, PMSF 1mM, glicerol al 10% MgCl_2 10 mM, arena de mar y PVP (polivinil pirrolidina) al 0.02%. Cuando se determinó la sensibilidad de PEPC a malato, se incluyó en el medio 10 mM malato de sodio, de acuerdo a lo descrito por Chollet *et al* (1996). El homogenado obtenido se centrifugó a 15000 rpm por 10 min. y el sobrenadante se empleó para las determinaciones de actividad de las enzimas PEPC y PK.

Para ensayar la fracción de actividad de piruvato cinasa resistente al tratamiento térmico (PKc), el extracto crudo se sometió a calentamiento en un rango de 55 a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante diez minutos (Gottlob *et al*, 1992).

7.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

7.2.2.1 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

Para determinación de la actividad, se acopló con la reacción catalizada por PEPC a la que lleva a cabo la enzima malato deshidrogenasa, midiendo espectrofotométricamente la desaparición de NADH a 340 nm. El medio de ensayo contenía: PEP entre 0.005 y 2 mM, malato entre 0 y 2 mM, NADH 0.2 mM, NaHCO₃ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y Malato deshidrogenasa 2 U/mL, en el amortiguador: TEA-HCl 100 mM pH 7.3. La reacción se inició agregando el extracto crudo (50 µL en 1 mL final) y se registró la absorbancia a 340 nm a intervalos de 1 segundo durante 50 segundos en un espectrofotómetro Beckman DU-7500, a una temperatura de 30°C. Una unidad de actividad de PEPC corresponde a la desaparición de 1 µmol de NADH por minuto en estas condiciones.

7.2.2.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PIRUVATO CINASA.

La reacción catalizada por la PK se determinó acoplando su reacción a la desaparición de NADH catalizada por la lactato deshidrogenasa. El medio de ensayo contenía: amortiguador imidazol-HCl 50 mM pH 6.5; PEP 0.001 a 0.5 mM, fosfomicina 0 a 5 mM, KCl 20 mM; MgCl₂ 10 mM; BSA 0.2 mg/mL; DTT 2 mM; NADH 0.15 mM; ADP 1 mM y lactato deshidrogenasa 2 U/mL. El ensayo se inició mediante la adición de 50 µL/mL del extracto y se siguió la absorbancia a 340 nm

en un espectrofotómetro Beckman DU-7500 a 30 °C. Para determinar la actividad fue necesario realizar un blanco para eliminar la posible interferencia por fosfatasas, empleando para ello el mismo medio sin ADP. De tal manera que la actividad total de la enzima en estudio es el resultado de la diferencia entre aquella determinada en el medio con ADP y la obtenida en el medio sin ADP. Una unidad de actividad de PK es equivalente a 1 μ M de NADH oxidado por minuto en las condiciones descritas.

7.2.3 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE LÍPIDOS.

Los lípidos se extrajeron al homogenizar los embriones en un mortero con una pequeña cantidad de NaCl (200-400 mg) y 3 mL de cloroformo-metanol 1:1. Una alícuota de este homogenado inicial se transfirió a un vial de centelleo y se mezcló con líquido de centelleo para determinar la radioactividad total incorporada. El resto del homogenado se completó a 6 mL con cloroformo:metanol (1:1) y se les añadieron 5 mL de la solución de NaCl 1%, con 0.1% ZnSO₄. La mezcla anterior se agitó, se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos y se recuperó la fase orgánica. Una alícuota se empleó para la determinación de la radioactividad incorporada en lípidos totales y el resto se empleó para separar las diversas fracciones lipídicas.

500 μ L de la solución clorofórmica de los lípidos totales recuperados se evaporaron y se redisolviéron en 500 μ L de hexano; 150 μ L se aplicaron a una placa de cromatografía en capa fina y se eluyó con una mezcla de 75 partes de hexano, 25 partes de éter etílico y 1 parte de ácido acético glacial. La mancha

correspondiente a los TAG se detectó mediante tinción con vapores de Yodo de acuerdo con la posición de estándares y fue raspada para determinar la radioactividad incorporada.

Los restantes 350 μ L de solución hexánica de lípidos se separaron en capa fina realizando una primera elución con la mezcla citada arriba seguida de una segunda elución a 90° con una mezcla de 4 partes de cloroformo, 2 partes de metanol, 2 partes de ácido acético glacial y una parte de agua desionizada. Las placas de cromatografía bidimensional fueron colocadas en la oscuridad frente a una placa de película radiográfica "Hyperfilm™ ECL™ High performance chemiluminiscence film" y se guardaron en la oscuridad a -70° C por un mes, tras lo cual se revelaron para observar el patrón de marca radioactiva de los diferentes lípidos.

7.2.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.

Para extraer la proteína total, los embriones se homogeneizaron en un mortero con 5 mL de 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM de DTT, 1% de dodecil sulfato de sodio, 0.5% Tween 20, 0.15 M NaCl y 2 M de Urea. El homogenado obtenido se centrifugó a 10 000 g durante 10 min. y al sobrenadante obtenido se le añadieron 25 mL de acetona con 0.1% de HCl. esta mezcla se agitó e incubó durante 12 horas a 4 °C. La proteína precipitada fue recuperada por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y lavada con 15 mL de dietileter para extraer los lípidos remanentes. En seguida, se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador

para electroforesis (Tris-HCl 100 mM pH 6.8 con 50 mM DDT, 1% de dodecil sulfato de sodio, 2 M de Urea y 0.2% de Tween 20).

7.2.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

El contenido de proteína de las muestras se estimó con el ácido bicinchonínico de acuerdo con el método propuesto por Smith, *et al.*, (1985), usando albúmina sérica bovina como estándar. El reactivo de trabajo se preparó al mezclar 50 vol. de reactivo A (1% de sal sódica de ácido bicinchonínico, 2% de carbonato de sodio, 0.16% de tartrato y 0.95% de bicarbonato de sodio) con 1 vol. de reactivo de sulfato de cobre al 4%. Se prepararon la curva patrón y las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 565 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 640.

7.2.6 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE

Para realizar la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), con una concentración al 8% (p/v) de acuerdo con Laemmli (1970) se preparó el gel de acuerdo a la tabla 5.

TABLA 5. PREPARACIÓN DE UN GEL PARA ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN SDS (SDS-PAGE), SEGÚN LA RECETA PROPUESTA POR LAEMMLI (1970), CON LIGERAS MODIFICACIONES.

Solución	Gel separador (8% de acrilamida)	Gel apilador
30% acrilamida, Bis-acrilamida 2.7%	2.7 mL	1.072 mL
Amortiguador para gel separador ¹	2.5 mL	
Amortiguador para gel apilador ²		2 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.08 mL
Agua	4.6 mL	4.75 mL
Persulfato de amonio*	0.1 mL	0.07 mL
TEMED*	0.006 mL	0.01
Volumen final *	10 mL	10 mL

* Se añaden después de degasificar la solución con vacío por un periodo de 15 min.

1 poner aquí la composición de los medios. En nuestro caso el amortiguador de gel contenía además 2 M de urea y 1% de Tween-20.

2 ibidem.

El gel se formó entre dos placas de vidrio y se le permitió polimerizar, una vez cargados las muestras en el gel, éste corrió a 70 mV y 100 mA por tres horas. El gel se reveló por inmersión en solución de azul de Coomassie en metanol al 50% y ácido acético al 10% y se destiñó en ácido acético al 7% (v/v) y metanol al 5% (v/v). Los geles así obtenidos pueden conservarse en una solución de ácido acético al 5%.

Para revelar el gel con proteínas radioactivas se hizo lo siguiente: una vez obtenido el gel se puso en una solución de ácido acético al 10% (v/v) y etanol absoluto al 30 % (v/v) por una hora o por toda la noche con agitación. Luego, el gel se lavó con agitación en 3 volúmenes de solución de ácido acético, 0.4% (p/v)

de PPO, 15% (v/v) de etanol absoluto y 30 % (v/v) de xileno 55 % (v/v) por una hora; seguido de al menos 2 lavados con 10 volúmenes de agua desionizada. El gel tratado se secó al aire prensándolo entre dos hojas de papel celofán dulce, previamente remojado en 2% (v/v) de glicerol (100%) y 25 % (v/v) de metanol. (Rodríguez-Penagos, 1991).

Una vez secos los geles se colocaron sobre una placa radiográfica y se guardaron en las oscuridad por una semana a -70°C , al final de la cual se reveló la película.

7.3 ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS.

Los datos obtenidos a partir de las curvas de saturación por el sustrato fueron ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1).

$$v = \frac{V_{MAX}[S]}{K_M + [S]}$$

Ecuación 1. Modelo de Michaelis y Menten. La K_M representa la constante de Michaelis-Menten y la $[S]$ representa la concentración del sustrato.

$$v = \frac{v_0 I_{50}}{I_{50} + [I]}$$

Ecuación 2. Inhibición de la actividad enzimática. $[I]$ representa la concentración del inhibidor y v_0 la velocidad inicial e I_{50} , la concentración inhibitoria media.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N (y_{i(\text{calculado})} - y_{i(\text{experimental})})^2 / \sigma_i^2$$

Ecuación 3. χ^2 . Valores de parámetros que minimizan la suma del cuadrado de la desviación de los valores experimentales con respecto a los valores calculados; donde N es el número de observaciones y y son los datos del eje dependiente (que contempla los valores experimentales). Incluye la expresión de la desviación estándar de los datos individuales.

8. RESULTADOS

Como paso inicial en el estudio objeto de esta tesis se realizaron diferentes ensayos para caracterizar a las actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato cinasa presentes en los embriones inmaduros de maíz (de 18 a 24 días después de la polinización). También se llevaron a cabo experimentos en donde a los embriones extraídos de la semilla inmadura de maíz se les incubó con [^{14}C]-acetato, como precursor radioactivo, y se analizó el patrón de la partición de carbono entre lípidos y proteínas en medios diferentes que inducen en el embrión estados metabólicos diferentes.

8.1 ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

8.1.1 ENSAYO DE SATURACIÓN.

Se realizaron experimentos preliminares, en los que se intentó caracterizar los cambios en la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, que pudiesen acompañar al cambio en el estado metabólico de los embriones de maíz, cuando estos son aislados e incubados en varias condiciones. Así, se determinó la actividad de esta enzima variando la concentración de su sustrato PEP y manteniendo fija las concentraciones de Mg^{2+} (5 mM) y HCO_3^- (0.2 mM). Los ensayos se realizaron con el extracto crudo obtenido de embriones de maíz incubados por 24 horas, en un medio con amortiguador HEPES-KOH 5 mM pH 7.2 (B), o en un medio con amortiguador HEPES-KOH 5 mM pH 7.2, sacarosa 60 mM,

manitol 0.5 M y ácido abscísico 10 μ M (BSMA). Con el propósito de reducir el posible estrés ocasionado al separar los embriones de su medio original (Pacheco-Moisés et al, 1997) se incubaron siempre todos los embriones por 48 horas en un medio BSMA. Los tratamientos identificados como tiempo cero (T_0) son aquellos correspondientes a los embriones al final de este periodo inicial de tratamiento. Al finalizar este periodo de incubación se inició una incubación final por 24 horas más en los diferentes medios que se mencionaran posteriormente). En la Figura 1, se muestran las curvas de saturación por PEP obtenida para la actividad de PEPC extraída de los embriones tratados. Los datos en la figura 1 fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1) y los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 1. Debido a que las variaciones en los valores de actividad específica obtenidos con diferentes lotes de embriones fueron relativamente grandes aquí solo se presentan los datos que resultaron más representativos de la tendencia general.

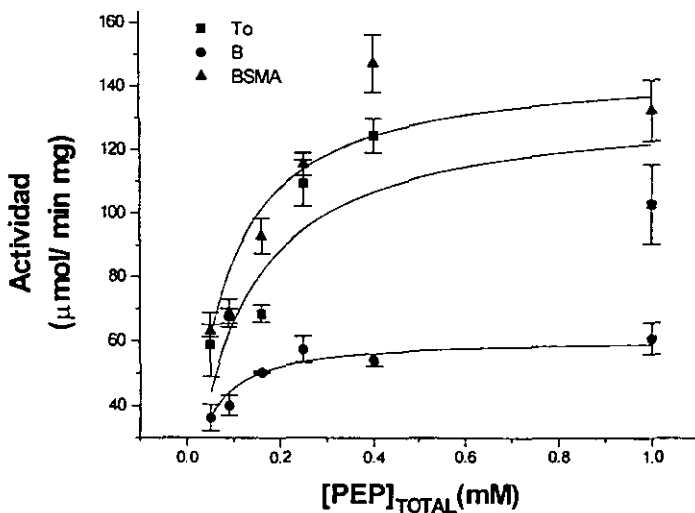


Figura 1. Saturación de la enzima PEPC por PEP de extractos de embrión incubados en distintas condiciones: (●) B: amortiguador HEPES-KOH 5 mM, pH 7.2, (▲) BSMA: amortiguador HEPES-KOH 5 mM, pH 7.2, sacarosa 60 mM, manitol 0.5 M y ácido abscísico 10 μM y (■) To, embriones al inicio de la incubación. Cada determinación se realizó al menos por duplicado y cada experimento se repitió más de tres veces. Los símbolos representan la media y la barras el error estándar de cada determinación. Las líneas se trazaron mediante el ajuste de los datos a la ecuación 1.

TABLA I. Parámetros cinéticos de la saturación por PEP de la enzima PEPC, según el modelo de Michaelis y Menten*.

Condición	K_m (mM)	V_{max} (μmol/ min mg)	K_m/V_{max} (min mg/ μmol)	V_{max}/K_m (μmol/ min mg mM)	$1/K_m$ (1/mM)
To	2.6×10^{-4}	123 ± 16	100.00	65 ± 34	1.89 ± 0.47
B	8.2×10^{-6}	63 ± 2	51.22	40 ± 7	1.57 ± 0.28
BSMA	1.7×10^{-4}	156 ± 15	126.82	90 ± 29	1.73 ± 0.52

* A partir de los datos presentados en la figura 1.

** Se calculó a partir de la ecuación 3, apartado 7.3. Una valor inferior de 10^2 para este caso se considera que se obtuvo un buen ajuste estadístico.

De los parámetros reportados en la tabla 1 se observa que hay una ligera disminución en la V_{max} y en la K_s para PEPC de embriones incubados en el medio diluido (B), lo que indica que hay una reducción en la cantidad de proteína o en su constante catalítica, mismo que posiblemente pueda compensarse por aumento en la afinidad de esta enzima por su sustrato PEP. Los dos efectos anteriores resultan en una alteración pequeña en la constante de especificidad de la PEPC (V/K) extraída de los diferentes tratamientos. Es evidente que las diferencias observadas son el reflejo de las diferencias en las necesidades metabólicas de las células embrionarias bajo las dos condiciones empleadas y la enzima extraída de los embriones incubados en medio diluido y sin ABA es más afín por el sustrato, si bien su eficiencia catalítica no es significativamente diferente de la obtenida en los otros dos tratamientos.

8.1.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN POR MALATO.

Dado que uno de los metabolitos importantes en la regulación de la actividad de la PEPC es el malato (Chollet, Vidal y O'Leary 1996), decidimos evaluar la sensibilidad a este inhibidor de la enzima PEPC presente en los extractos crudos de los embriones incubados en medios distintos. Con el fin de realizar un análisis más detallado de los diversos componentes presentes en los medios de incubación anteriormente descritos, se diseñaron seis condiciones diferentes. Así, se emplearon los tratamientos B, BS, BA, BM, BSM y BSA (las iniciales indican las siguientes adiciones al medio: B, Amortiguador HEPES-KOH pH 7.2; S, sacarosa

60 mM; A, ácido abscísico 10 μ M y M, manitol 0.5 M). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ajuste de los mismos a la ecuación 2, que permite calcular la concentración inhibitoria media, o I_{50} . Para determinar las curvas de inhibición por malato para la enzima PEPC, se empleó una concentración de PEP de 0.15 mM en el medio de ensayo, esta concentración de sustrato está por encima de la K_M determinada anteriormente (Tabla 1). Los parámetros cinéticos correspondientes se encuentran en la Tabla 2.

TABLA 2. Parámetros cinéticos de la enzima PEPC. Inhibición por malato.

Embrionario	K_M (mM)	Constante de Michaelis-Menten (mM)	I_{50} (μ M)
B	5.7×10^{-2}	2.74 ± 0.15	61.8
BS	1.2×10^{-2}	1.58 ± 0.068	35.7
BA	1.2×10^{-1}	3.56 ± 0.22	80.3
BM	3.3×10^{-1}	3.4 ± 0.35	76.7
BSM	1.4×10^{-1}	2.8 ± 0.22	63.2
BSA	5.0×10^{-2}	2.04 ± 0.13	46.1
To	6.26×10^{-2}	4.43 ± 0.34	100.0

Se calculó a partir de la ecuación 3, apartado 7.3. Una valor inferior de 10^2 para este caso se considera que se obtuvo un buen ajuste estadístico.

De estos resultados se puede apreciar una menor disminución en la I_{50} para malato, de la actividad de PEPC de los embriones incubados en los medios B, BS y BA con respecto a la actividad al PEPC de los embriones de To y los incubados en BM, BSM, BSA. Este cambio no resulta muy claro, debido a la magnitud de los errores estándar obtenidos. El cambio observado parece sugerir que en las condiciones en que la enzima proviene de embriones incubados en los medios B, BS y BA la enzima se encuentra menos fosforilada (vease apartado 4.7.1.2), sin embargo, hay que recordar que, al menos la actividad detectada en los embriones

incubados en B, presenta una menor afinidad por el PEP, lo que también puede explicar este resultado.

Debido a que no es posible decir de manera concluyente que efectivamente hay un cambio significativo en la sensibilidad ante malato por PEPC de embriones incubados en los distintos medios, decidimos emplear los mismos medios ya empleados anteriormente para determinar la sensibilidad ante malato, es decir, B y BSMA, y compararlos con el tiempo cero. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 2 y los parámetros cinéticos correspondientes en la tabla 3.

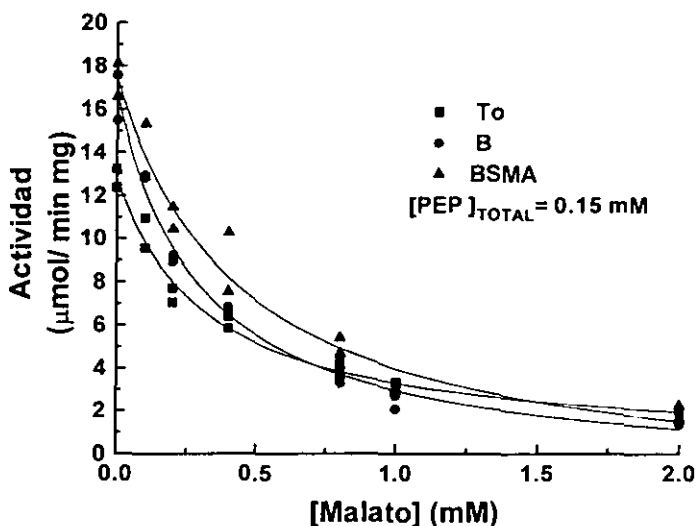


Figura 2. Inhibición de la enzima PEPC por malato de extractos de embrión incubados en distintas condiciones: (●) B: amortiguador HEPES-KOH 5 mM, pH 7.2, (▲) BSMA: amortiguador HEPES-KOH 5 mM, sacarosa 60 mM, manitol 0.5 M y ácido abscísico 10 μM y (■) To, embriones al inicio del experimentos. La concentración de PEP fue de 0.15 mM, y de Mg^{2+} de 5 mM. Para detalles ver texto.

TABLA 3. Parámetros cinéticos de la enzima PEPC. Inhibición por malato.

Medio	K_m	V_{max}	I_{50}	V_0
To	3.17×10^{-07}	13.0 ± 0.4	100	320 ± 55
B	4.66×10^{-07}	16.7 ± 0.5	128.4	300 ± 43
BSMA	1.15×10^{-06}	17.4 ± 0.7	133.8	450 ± 11

V_0 indica la velocidad obtenida a partir de la ecuación 2 y representa la velocidad de la enzima cuando la concentración del inhibidor es igual a cero.

En este último experimento se obtuvo una I_{50} para malato ligeramente menor para la actividad de PEPC extraída de embriones incubados en un medio B, en comparación a la observada en los embriones incubados en BSMA. Sin embargo, la magnitud de las diferencias es muy inferior a la que esperaríamos si la enzima presentara un grado de fosforilación marcadamente diferente en ambas condiciones (Chollet, 1996).

También, se intentó determinar si existía alguna diferencia en la sensibilidad frente a glicina y glutamina, en la actividad de PEPC extraída de los embriones incubados en los medios ya descritos, pero los resultados obtenidos no indican que haya cambios en dicha sensibilidad (datos no mostrados).

8.1.3 ISOENZIMAS DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

A fin de investigar si los cambios en la afinidad por PEP detectados en la actividad de PEPC se podían explicar por un cambio en el patrón de isoenzimas presentes en el embrión, se analizaron dichos extractos mediante electroforesis nativa y mediante la técnica de "Western Blot". Ésta última se realizó detectando la

proteína correspondiente con anticuerpos anti-PEPC desarrollados frente a un péptido sintético (presente exclusivamente en la PEPC tipo C₃ de maíz) y con anticuerpos anti PEPC tipo C₄ (desarrollados frente a la PEPC purificada de hojas de maíz). Los anticuerpos empleados no presentan cruzamiento entre sí. Las bandas observadas en los geles se cuantificaron por medio de densitometría láser. Las imágenes de los geles nativos se presentan en la figura 3 y revelan que no hay diferencias importantes en el peso molecular de la proteína activa PEPC. Las diferencias en la actividad total tampoco se aprecian en estos geles. Esto no sorprende, ya que las diferencias reportadas en la tabla 1 no son lo suficientemente grandes para detectarse por este método.

Cuando se analizó la presencia de la proteína PEPC en una SDS-PAGE y por medio de la técnica de "Western blot", el anticuerpo anti PEPC C₄ permitió identificar 2 bandas, con pesos moleculares aparentes de 70 y 100 kDa, respectivamente; pero el anticuerpo anti-PEPC C₃ sólo reconoce una banda de 70 kDa. En la figura 4 se muestran los datos del análisis densitométrico, estos resultados revelan que los embriones incubados en medio diluido y en ausencia de ABA (medio B) presenta un patrón de bandeo diferente a los demás, ya que no presentan la banda que reacciona con el anticuerpo anti PEPC tipo C₃ y poseen un nivel mayor de la banda de 100 kDa revelada con anticuerpo anti C₄. Estos datos parecen apoyar la existencia de diferencias a nivel de la proteína PEPC, en aquellos embriones que fueron incubados en condiciones en las que la síntesis de lípidos se detiene (medio B) y correlacionan con el hecho de que este extracto presenta diferencias a nivel de las constantes cinéticas.

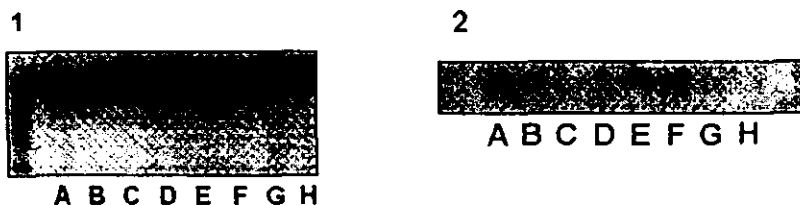


Figura 3. Gel de electroferesis nativo revelado por actividad de la enzima PEPC. Los carriles A, B, E y F corresponden a los embriones en medio B, mientras que C, D, G y H corresponden a embriones incubados en medio "BSMA". En el panel 1 se aprecia la actividad resultante de cargar en el carril una cantidad equivalente a 0.28 unidades de embrión en los carriles A, B, C y D, mientras que los carriles E, F, G y H representan la actividad de 37 μ L de un extracto crudo de tejido embrionario en amortiguador de extracción 1:2 p/v. El carril a la izquierda del carril A corresponde a marcadores de peso molecular. El gel del panel 2 se realizó de igual manera que el gel del panel 1 pero cargando en cada carril un cuarto de las cantidades aplicadas en el gel del panel 1.

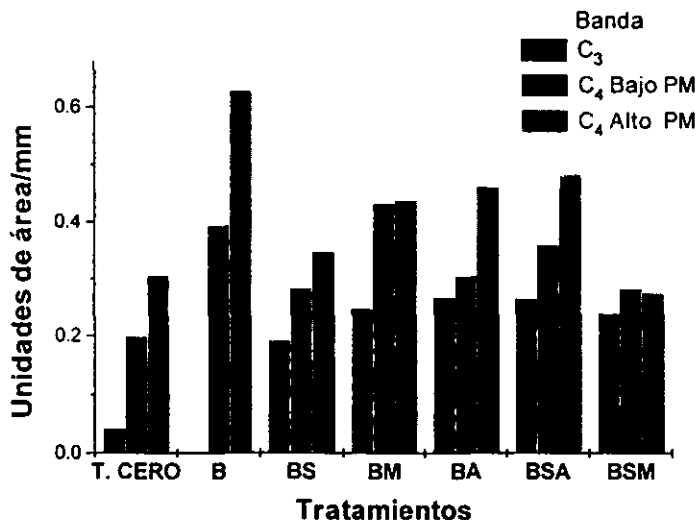


Figura 4. Densitometría del Western Blot para PEPC de hoja de maíz y de embriones de maíz incubados en los medios descritos en la tabla 2 (B, BS, BM, BA, BSA y BSM, To). Las bandas correspondientes al tratamiento BSMA no se muestran, son semejantes a las que presenta el tratamiento B.

8.1.4 SÍNTESIS DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

Con el propósito de determinar si las diferencias observadas hasta ahora se podían explicar por cambios en el nivel de síntesis de la enzima PEPC, varios lotes de embriones se incubaron en los tratamientos descritos en la tabla 3 (B, BS, BA, BM, BSA y BSM) y al término de dicha incubación se les alimentó con 200 μCi de metionina-[^{35}S]. Los embriones se molieron en un mortero para extraer la proteína total y precipitarla con acetona-HCl (vease material y métodos). La proteína recuperada se analizó mediante electroforesis desnaturizante, se transfirió a papel de nitrocelulosa y reveló con anticuerpos anti-PEPC C_4 , para identificar las bandas de PEPC; las bandas reveladas se cortaron del papel y la radioactividad incorporada se contó mediante centelleo líquido. Los resultados se muestran en la figura 5 normalizados con respecto a la cantidad total de marca incorporada en la proteína del embrión. Contrario a lo que se hubiera esperado, los embriones incubados en medios diluido (B) no presentan una velocidad de síntesis superior a los demás tratamientos; antes bien, los únicos tratamientos en los que se observó un nivel de síntesis de PEPC ligeramente mayor fueron aquellos que contenían ABA, este resultado coincide con lo reportado por Rodríguez-Penagos y colaboradores (J. Plant Physiol., 1999, en prensa), quienes reportan que la actividad de PEPC responde a la presencia de ABA en las hojas de maíz sometidas a diversos tratamientos.

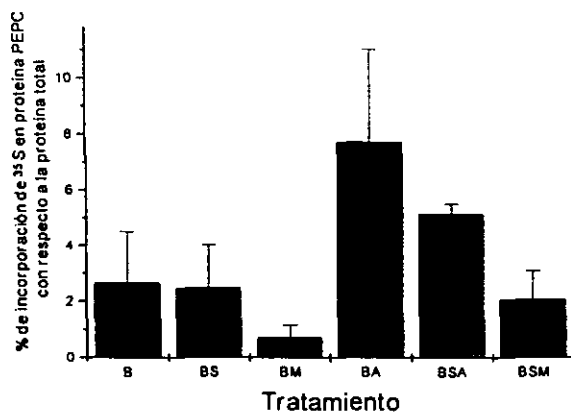


Figura 5. Acumulación de proteína PEPC con respecto a la proteína total sintetizada por embriones de maíz incubados en los distintos medios descritos en la tabla 2.

8.2 ENZIMA PIRUVATO CINASA.

8.2.1 ENSAYO DE TERMOSENSIBILIDAD.

Como ya se describió en el apartado 4.7.2, la enzima piruvato cinasa en plantas superiores presenta por lo menos dos isoenzimas, una citoplásmica (PKc) y otra plastidial (PKp); esta última es termolábil, mientras que la primera es termorresistente (Gottlob-McHugh *et al*, 1992). A fin de determinar las condiciones adecuadas para inactivar selectivamente la PKp, se sometió un extracto crudo preparado a partir de embriones inmaduros de maíz recién aislados a un tratamiento térmico de 55°C, por diferentes periodos de tiempo, tras lo cual, la proteína precipitada se eliminó por centrifugación y se cuantificó la actividad de PK remanente en el sobrenadante. Los resultados que se presentan en la figura 6

indican que después de 5 minutos de incubación a 55 °C, la actividad remanente es termoestable y, en consecuencia, esta actividad debe corresponder a la de la PKc.

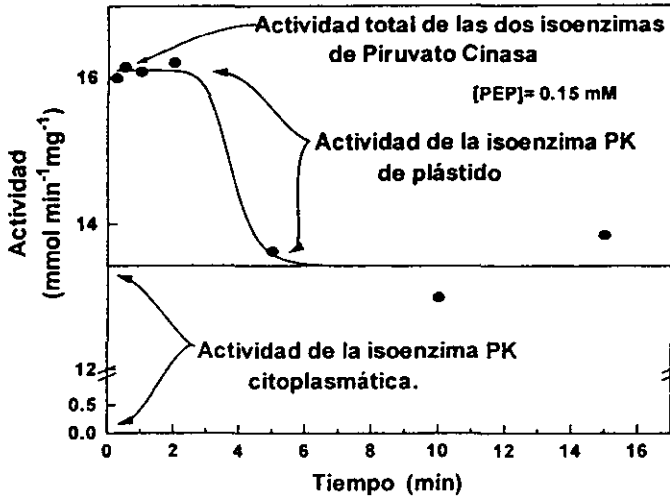


Figura 6. Curva de inactivación térmica de una de la actividad de piruvato cinasa presente en extractos crudos preparados con embriones inmaduros recién aislados de la semilla de maíz.

A fin de demostrar que la actividad es termoestable en los sobrenadantes tratados por 5 minutos a 55 °C, se sometió un extracto a un primer tratamiento térmico a 55 °C por 5 minutos, se centrifugó para eliminar la proteína precipitada y se sometió al sobrenadante a un segundo ciclo de calentamiento y centrifugación, bajo las mismas condiciones. Los resultados son consistentes con la presencia de una proteína termolábil y una fracción termoestable, ya que la actividad que se recupera después del primer ciclo, permanece igual en un segundo ciclo de calentamiento y centrifugación.

8.2.2 ENSAYO DE SATURACIÓN

Para determinar si los cambios fisiológicos que se presentan en los embriones cuando se incuban en un medio diluido y sin ABA (media B), estaban acompañados de cambios en la actividad de las enzimas PKp y PKc; se determinaron los perfiles de saturación por PEP para la actividad de piruvato cinasa de los extractos crudos de embriones de maíz incubados en los medios B, BSMA y To; antes y después de tratar dichos extractos por 5 minutos a 55 °C, seguidos de centrifugación. Las curvas de saturación por PEP obtenidas para las isoenzimas cuando los embriones se incubaron en BSMA se muestran en la figura 7. La curva de actividad para la PKp se determinó mediante la diferencia punto a punto de la actividad de PK total menos la actividad adjudicada a la PKc, es decir, la resistente al tratamiento térmico.

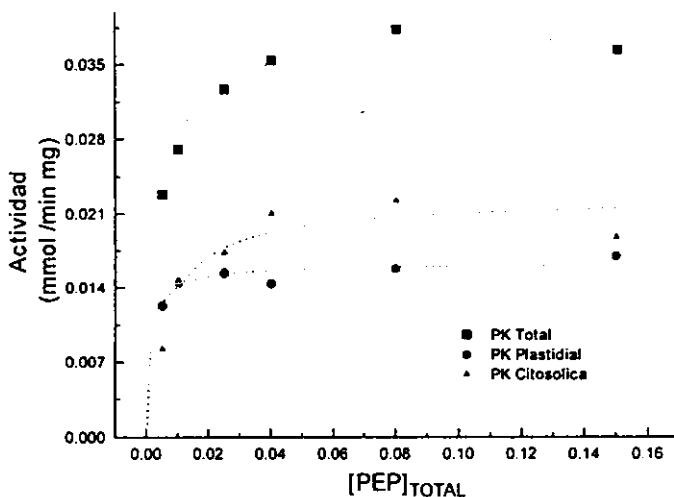


Figura 7. Curva de saturación para las isoenzimas de piruvato cinasa. La actividad de la isoenzima plastidial es el resultado de la diferencia de la actividad total (sin tratamiento térmico) menos la actividad de la isoenzima citosólica (con tratamiento térmico). El extracto se obtuvo a partir de embriones de maíz incubados por 48 horas en un medio BSMA.

Las líneas de la figura 7 se dibujaron mediante el cálculo de los parámetros del modelo de Michaelis y Menten que mejor describen los puntos experimentales y dichos valores se presentan en la tabla 4. La tabla 4 también incluye los parámetros correspondientes a las actividades de PKc, PKp y PK total determinados con los extractos de los embriones tatados en los medios To y B. Las curvas correspondientes a estos últimos dos tratamientos se omitieron de la figura 7 para facilitar la interpretación de los datos.

TABLA IV. Parámetros cinéticos de las isoenzimas de PK de embriones de maíz incubados en distintos medios.

Tratamiento	Actividad (µg/min/mg)	Relativo (%)	n
PK Total To	24.69 ± 0.71	100	3.68 ± 0.64
PK Total B	43.64 ± 2.32	100	1.48 ± 0.81
PK Total BSMA	38.26 ± 0.85	100	3.68 ± 0.49
PKp To	5.16 ± 0.59	21	8.70 ± 4.23
PKp B	10.27 ± 1.75	24	7.84 ± 5.92
PKp BSMA	16.18 ± 0.49	42	1.50 ± 0.48
PKc To	21.43 ± 0.63	87	3.20 ± 0.61
PKc B	33.88 ± 2.51	78	2.30 ± 1.03
PKc BSMA	22.28 ± 1.58	58	6.31 ± 2.15

^a PKc, fracción de actividad correspondiente a la PK citoplasmática; PKp, fracción de actividad correspondiente a la PK plastidial.

^b con respecto al valor de PK total del tratamiento correspondiente.

La actividad de la PK plastidial se determinó por diferencia de la actividad total de PK menos la actividad de la PK después del tratamiento.

Las observaciones más significativas que se derivan de los datos presentados en la tabla 4 son:

Primera, la velocidad máxima de la isoenzima de PKp es mucho menor que la de PKc en todos los tratamientos.

Segunda, la afinidad por el sustrato PEP de la PK extraída de los embriones incubados en el medio B es mayor a la que presentan los embriones tratados en BSMA o los de To. Esto se puede observar en los valores de la PK total y de la PKc, ya que los valores obtenidos para PKp presentan una incertidumbre demasiado grande, posiblemente por haber sido determinados indirectamente.

Tercera, la actividad de pK total (actividad determinada del extracto sin tratamiento térmico) presente en los extractos de embriones del tratamiento B es

ligeramente superior a la actividad presente en los extractos de los embriones tratados en medio BSMA y de To. Sin embargo, la variabilidad propia de los datos hace pensar que esta diferencia no es significativa.

8.3 EFECTO DE LA FOSFOMICINA EN FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA Y EN PIRUVATO CINASA.

Reportes recientes indican que, el análogo del fosfoenolpiruvato fosfomicina es capaz de activar a la enzima PEPC (Mujica-Jiménez *et al.*, 1998). Por otro lado, no se contaba con alguna evidencia de si este análogo estructural tiene efecto sobre la piruvato cinasa. Sin embargo, el fenilfosfato es otro análogo estructural del PEP con efecto activador sobre PEPC (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990) y éste si presenta un efecto de inhibición sobre la enzima piruvato cinasa (Podestá & Plaxton, 1992). Se sabe además que la PEPC de semillas, es también sensible al activador glucosa-6-fosfato, sitio sobre el que actúan los análogos de PEP (Tovar-Méndes *et al.*, 1997; Mujica-Jiménez *et al.*, 1998). Por lo tanto, decidimos confirmar el posible efecto diferencial que fosfomicina parecía poseer sobre las enzimas PEPC y PK de plantas y aprovechar dicho efecto, para explorar si la alteración de la actividad de estas enzimas inducidas por el análogo, en caso de darse, podía reflejarse en un cambio en el patrón de síntesis de proteínas y lípidos de reserva en los embriones incubados *in vitro*.

8.3.1 EFECTO DE LA FOSFOMICINA SOBRE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

Como un primer paso, se determinó la actividad de la PEPC en extractos crudos obtenidos a partir de embriones de maíz aislados de las semillas inmaduras (18-24 ddp). Esta actividad se midió en el medio de ensayo descrito en material y métodos, pero manteniendo la concentración de PEP constante en 0.15 mM y variando la concentración de fosfomicina. En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos en este experimento, los cuales fueron ajustados a la ecuación 1 y los parámetros obtenidos de dichos ajustes se muestran en la Tabla 5.

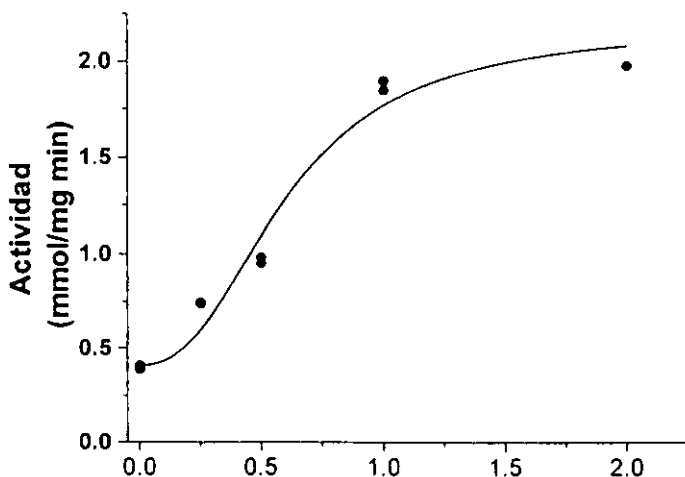


Figura 8. Activación por fosfomicina de PEPC en extractos crudos de embriones de maíz en desarrollo. Las determinaciones se realizaron a una concentración fija de sustrato PEP de 0.15 mM. La activación se calculó como la diferencia con respecto al valor en ausencia de activador, dividida por éste último valor.

TABLA 5. Parámetros cinéticos de la activación por fosfomicina sobre la enzima PEPC de embriones de maíz. Los valores se obtuvieron a partir de los datos presentados en la figura 8.

Parámetro	Valor	Desviación Estándar
k_1	6.7×10^{-4}	
k_2	0.289	± 0.068
k_3	813	± 407

Los resultados de la figura 8 y la tabla 5 indican que la fosfomicina es también capaz de activar a la forma de PEPC que está presente en los embriones de maíz durante el periodo de expansión.

8.3.2 EFECTO DE LA FOSFOMICINA SOBRE LA PIRUVATO CINASA.

En seguida, se determinó el efecto que la fosfomicina pudiera tener sobre la actividad de PK presente en los extractos crudos obtenidos de los embriones inmaduros de maíz. En este caso, dado que la actividad de la enzima plastidial era relativamente poca y para no complicar el experimento, el estudio se realizó sólo con los extractos no sometidos a tratamiento térmico.

En la figura 9 se presentan los resultados de este experimento, que se realizó empleando extractos de embriones de maíz recién preparados y con una concentración de PEP de 0.15 mM. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación 2 y los parámetros cinéticos resultantes se presentan en tabla 6.

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

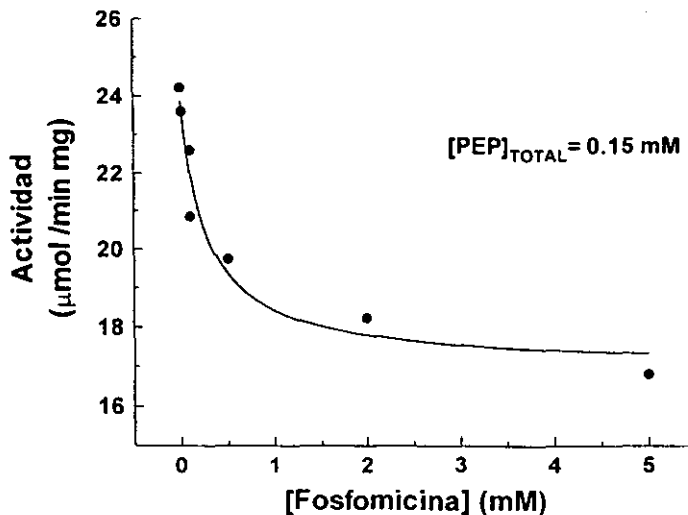


Figura 9. Inhibición de la actividad total de piruvato cinasa por fosfomicina en extractos crudos obtenidos de embriones inmaduros de maíz. La concentración de PEP en el medio de reacción fue de 0.15 mM

TABLA 6. Parámetros cinéticos de la inhibición de la enzima piruvato cinasa de embriones de maíz por fosfomicina. Los valores se obtuvieron a partir de los datos presentados en la figura 9.

Parámetro	Valor	Error
K_i	6.1×10^{-7}	
K_m	23.9 ± 0.56	
$K_{0.5}$	2.65 ± 1.33	
V_{max}	17 ± 0.73	

El efecto de inhibición que la fosfomicina presenta sobre la PK, es relativamente pobre, ya que la inhibición resultó parcial. Cabe la posibilidad de que la fosfomicina presente un efecto diferencial sobre las actividades de PKc y PKp. Sin embargo, un estudio más detallado de esta inhibición está más allá de los intereses del presente trabajo.

En cualquier caso, es claro que la fosfomicina si tiene un efecto diferencial sobre las enzimas PEPC y PK y, por tanto, puede ser empleada para estudiar el posible papel metabólico de estas proteínas *in vivo*.

8.4 EFECTO DE LA FOSFOMICINA SOBRE LA PARTICIÓN DE CARBONO.

Para obtener evidencias que pudieran indicarnos el posible papel de las actividades de PEPC y PK en los embriones de maíz en desarrollo, decidimos incubar estos embriones en presencia y ausencia de fosfomicina, después de haberlos incubado en dos medios distintos (B y BSMA). Ya que, como se ha mencionado anteriormente, estas condiciones modifican el comportamiento de los embriones que pasan de un estado metabólico dedicado a la síntesis de compuestos de reserva (BSMA), a un estado metabólicamente menos activo y que eventualmente deriva en la germinación de estos organismos vegetales. Así, los embriones fueron incubados por 24 horas en los medios indicados y de cada tratamiento se formaron dos lotes, que se incubaron por 12 h. más en el mismo medio con o sin 25 mM fosfomicina. Al final de esta segunda incubación se añadieron 5 μ L de acetato marcado con ^{14}C (1 μ Ci) y, tras 4 h. de incubación finales, se cuantificó la radioactividad incorporada en proteína y en lípidos. Para separar y determinar la radioactividad incorporada específicamente en la fracción de TAG, los lípidos totales se fraccionaron mediante cromatografía de capa fina y la mancha correspondiente a los TAG se raspó y se contó mediante centelleo líquido. En la figura 10 se puede observar la incorporación de ^{14}C en los lípidos

sintetizados en el periodo de tiempo en el cual se incluyó la marca al llevarse a cabo la incubación. En esta gráfica se puede apreciar primero, que hay mayor incorporación de ^{14}C en los lípidos provenientes de aquellos embriones incubados en el medio que contenía sacarosa, manitol, ABA y amortiguador (Fig. 9 BSMA y BSMAF) y, segundo, que la presencia de fosfomicina se traduce en una reducción en los niveles de marca incorporada en la fracción de lípidos totales (Fig. 9 BF y BSMAF).

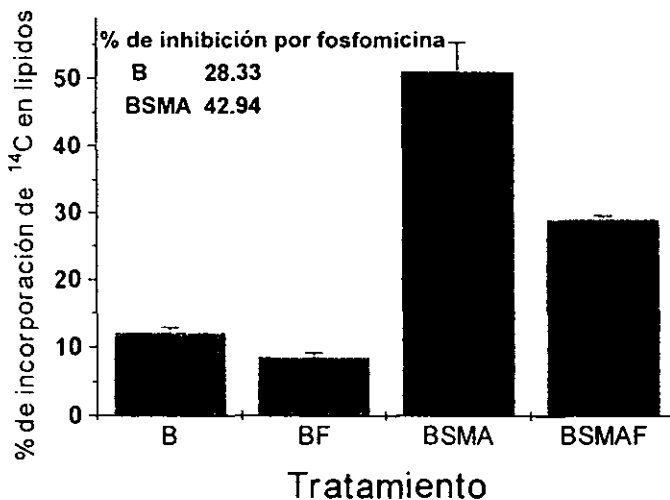


Figura 10. Incorporación de acetato- ^{14}C en los lípidos totales extraídos de los embriones de maíz incubados como sigue: 24 h. en un medio con amortiguador HEPES-KOH pH. 7.2, seguidas por 12 h. sin (B) o con (BF) 25 mM fosfomicina. O bien, 24 h. en un medio con amortiguador, sacarosa (30 mM), manitol (500 mM) y ABA (1 μM), seguidas por 12 h. sin (BSMA) o con (BSMAF) 25 mM fosfomicina. El 100% de radioactividad para esta serie de experimentos (Fig. 10, 11 y 12) equivale a $6.4 \cdot 10^4$ DPM.

En contraste, la figura 11 muestra que la incorporación de ^{14}C en las proteínas sintetizadas durante el periodo de incubación con marca radioactiva es menor en aquellos embriones incubados en un medio sin fosfomicina (Fig. 10 BF y BSMAF). Pero, como antes, la mayor síntesis de proteínas se presenta en los medio que contiene sacarosa, manitol, ABA y amortiguador (Fig. 10 BSMA y BSMAF).

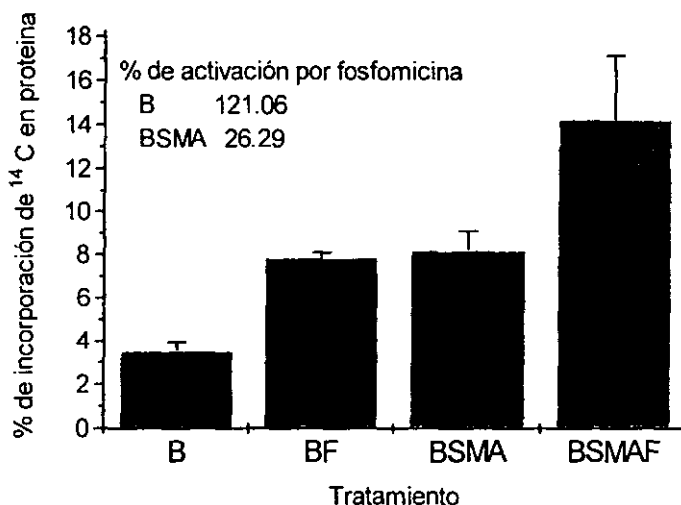


Figura 11. Incorporación de acetato- ^{14}C en la proteína total extraída de los embriones de maíz incubados como sigue: 24 h. en un medio con amortiguador HEPES-KOH pH. 7.2, seguidas por 12 h. sin (B) o con (BF) 25 mM fosfomicina. O bien, 24 h. en un medio con amortiguador, sacarosa (30 mM), manitol (500 mM) y ABA (1 μM), seguidas por 12 h. sin (BSMA) o con (BSMAF) 25 mM fosfomicina. El 100% de radioactividad fue $6.4 \cdot 10^5$ DPM.

Finalmente, la gráfica de la figura 12 muestra la incorporación de ^{14}C en la fracción de lípidos de reserva (TAG) sintetizados en las condiciones ya descritas. Este resultado, contra lo que indica el patrón de incorporación de ^{14}C en lípidos totales, señala que la fosfomicina no se tradujo en una reducción en la síntesis de

TAG, en aquellos embriones incubados en medio B (Fig 11 BF vs. B) y sólo afectó negativamente dicha síntesis en los embriones que se encuentran más activos en la síntesis de estos compuestos (Fig. 11 BSMAF vs. BSMA).

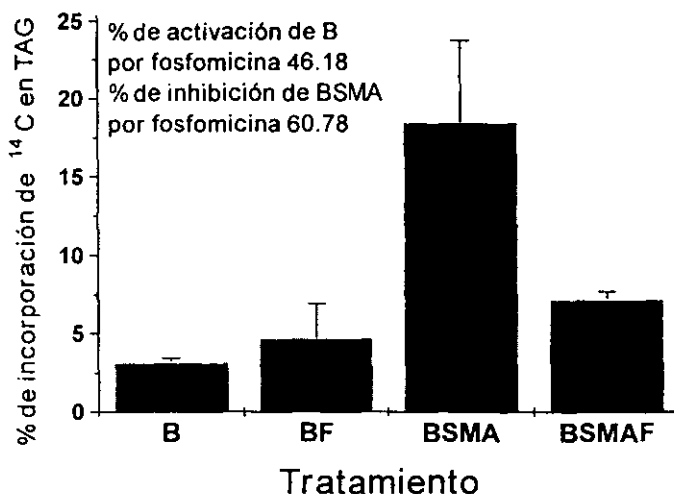


Figura 12. Porcentaje de incorporación de ¹⁴C (marca incorporada en forma de acetato marcado) en los TAG. El medio B corresponde a embriones incubados en amortiguador HEPES-KOH pH. 7.2; El medio BF aparte de contener el amortiguador contiene 25 mM de fosfomicina; El medio M contiene el amortiguador, sacarosa, manitol y ABA como se describe en el texto; el medio MF contiene lo mismo que M mas 25 mM de fosfomicina. El 100% de radioactividad fue $6.4 \cdot 10^5$ DPM.

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Cuando los embriones prematuros son aislados de su ambiente natural e incubados en un medio diluido, como el empleado aquí (10 mM MES-KHO, pH 5.5), su capacidad para sintetizar y acumular reservas se reduce considerablemente, a menos que el medio contenga ABA y/o presente un bajo potencial osmótico (Finkelstein & Sommerville, 1989; Bewley y Black, 1994; Bewley *et al.*, 1997; Rodríguez-Sotres y Black, 1994; Pacheco-Moisés *et al.*, 1997). En un medio diluido, las constantes cinéticas de la PEPC presente en los embriones de las semillas de maíz cambian ligeramente, en comparación con los embriones incubados en presencia de ABA y un bajo potencial osmótico (Tabla 1). Este resultado, si bien pudiera considerarse de poca importancia, podría ser suficiente para modificar los flujos metabólicos *in vivo* dado que se trata de una enzima que está siempre en competencia con la PK citoplásmica por el sustrato común PEP. Lo anterior es de particular importancia, dado que la afinidad por PEP de la PK (Tabla 4) es superior al de la PEPC (Tabla 1). Esto, aunado al hecho de que la PEPC es una actividad que debe encontrarse funcionando muy por debajo de sus capacidad, ya que las concentraciones de PEP citoplásmico están muy posiblemente por debajo de la Km para PEP de esta enzima (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares 1987; Doncaster & Leegood 1987; Leegood & von Caemmerer, 1988; Stitt & Heldt, 1985 y Stitt & Heldt, 1985) y también debe recordarse que la actividad de PK medida en este mismo sistema no se modificó substancialmente entre las dos condiciones.

La reducción observada en la afinidad de la PEPC por el sustrato PEP en los embriones incubados en BSMA con respecto a los embriones incubados en B (apartado 8.1.1) parece sugerir la presencia de una isoforma diferente de PEPC, ya que no se encontraron cambios grandes en la sensibilidad de esta enzima al inhibidor malato que pudieran apoyar un cambio en el estado de fosforilación. Tampoco se encontraron cambios substanciales en el peso molecular de la proteína nativa (fig. 3), pero los resultados de los geles desnaturizantes analizados mediante inmunodetección (fig 4) mostraron diferencia en los patrones de bandeo que pudieran apoyar esta propuesta. Sin embargo, para clarificar este punto se requerirá más investigación. Al respecto, resulta interesante el que sólo se detectaron diferencias en los niveles de síntesis de la proteína PEPC cuando el medio fue adicionado con ABA (fig. 5). Este resultado parece indicar que si hay un cambio en las isoformas de PEPC presentes, la síntesis de la nueva isoforma debe estar compensada por una reducción en la síntesis de la isoforma inicial, o el recambio de esta proteína es muy rápido en las condiciones estudiadas.

En cualquier caso, el cambio observado en la actividad de la PEPC podría ser suficiente para proponer que un mayor flujo de PEP es canalizado hacia ácidos C₄, en condiciones en las que las semillas cambian hacia el estado de baja acumulación de reservas. Dado que en estas últimas condiciones la síntesis de ácidos grasos disminuye considerablemente (Pacheco-Moisés *et al.*, 1997) y dado que la síntesis de proteínas es requerida en ambas condiciones, podemos proponer que la PEPC es más importante para la síntesis de aminoácidos. Esta propuesta es contraria a la hecha por Smith *et al.* (1992) que propone que la PEPC está íntimamente ligada con el metabolismo de la síntesis de lípidos, pero

concuenda con el papel anaplerótico de la PEPC en otros tejidos (Latzko y Kelly, 1983; Schuller *et al*, 1990). Adicionalmente, se ha propuesto que la PK desvía el carbono principalmente hacia la síntesis de lípidos en otros tejidos de la planta (Edwards *et al*, 1998).

Debido a la complejidad del metabolismo carbonado en los vegetales, resulta difícil determinar con seguridad la ruta exacta que sigue el carbono para llegar a una cierta macromolécula. En el caso de la PK y la PEPC, esto es especialmente difícil, ya que los leucoplástos pueden convertir cualquiera de ambos compuestos en ácidos grasos (Smith *et al.*, 1992), porque ambos compuestos pueden servir para la síntesis de diversos aminoácidos (Davies, 1979; Dennis & Miernyk, 1982).

El efecto de la fosfomicina sobre la actividad de PEPC demuestra que la PEPC de semillas de maíz debe poseer un sitio alostérico activador para glucosa-6-fosfato con características similares a las que presenta el sitio existente en la PEPC C₄ de esta planta (Mujica-Jiménez *et al.*, 1998). En contraste, pero no sorprendentemente, la PK es inhibida por este compuesto (fig. 9 y tabla 6). La inhibición encontrada fue de tipo parcial y es probable que las dos isoenzimas presentes en las células vegetales, es decir PKp y PKc tengan diferente sensibilidad a este inhibidor, lo que explicaría la parcialidad de la inhibición observada. Sin embargo, los datos presentados en este trabajo son insuficientes para afirmarlo con certeza.

En favor de la propuesta hecha anteriormente, cuando los embriones fueron tratados con fosfomicina, la síntesis de lípidos se redujo (fig 10) y la síntesis de proteínas aumentó (fig. 11). Este resultado indica que la actividad de PEPC puede estar desviando el flujo hacia la síntesis de proteínas, en tanto que la síntesis de

lípidos requeriría que la enzima PK aportase piruvato. Esto estaría sucediendo, independientemente de que los embriones mantuviesen su alta velocidad de acumulación de reservas o en las condiciones que prevalecen cuando se les incuba en medios diluidos. Sin embargo, cuando los embriones se encontraban en esta última condición, la síntesis de triglicéridos observada, sin bien limitada, no fue afectada por la presencia de la fosfomicina. Este resultado no es fácil de interpretar a la luz de los datos disponibles, pero nos recuerda que la interpretación presentada será válida siempre que la fosfomicina no tenga otros efectos colaterales sobre el metabolismo de la planta, lo cual no ha sido aún estudiado en detalle. Entre otras cosas, PEP es un metabolito central en el metabolismo de las plantas (Davies, 1979) y es factible que otras enzimas vegetales puedan ser reguladas a través de este metabolito, lo que significaría que la fosfomicina podría estar afectando el metabolismo vegetal a nivel de múltiples enzimas.

10. CONCLUSIONES:

Los embriones de maíz que se encuentran acumulando reservas activamente poseen una forma de PEPC que podría competir con desventaja con la enzima PK *in vitro*. Esta situación se modifica en los embriones incubados en medios diluidos, ya que la afinidad de la PEPC por PEP aumenta, lo que sugiere que la síntesis de lípidos requiere de la actividad de PK.

La forma de PEPC con menor actividad por PEP no parece ser el resultado de un cambio en el estado de fosforilación, pero, no se cuenta con evidencia suficientes para asegurar que no se trata de algún otro tipo de modificación postraducciona, ya que la velocidad de síntesis de la proteína no cambia notablemente.

La adición de fosfomicina al medio de incubación de los embriones se traduce en un cambio en los patrones de síntesis de lípidos y proteínas que es consistente con una mayor importancia de la PEPC en la síntesis de aminoácidos y una mayor contribución de la PK a la partición del carbono hacia la síntesis de lípidos.

11 REFERENCIAS

- Ackerson, RC 1980. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 35:403-413.
- Andreo CS, González DH & Iglesias AA. 1987. Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation. *FEBS Lett.* 213:1-8.
- Bao X, Pollard M & Ohlrogge J. 1998. The biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*. *Plant Physiology.* 118:183-190.
- Baselvich JJ, Cutler AJ, Lamb N, Friesen LJ, Kurz EU, Perras MR & Abrams SR. 1994. Response of cultured maize cell to (+)-Abscisic acid, (-)-Abscisic acid, and their metabolites. *Plant Physiol.* 106:135-142.
- Batz O, Scheibe R & Neuhaus HE. 1992. Transport processes and corresponding changes in metabolite levels in relation to starch synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) etioplasts. *Plant Physiol.* 100, 184-190.
- Bewley, JD & Black M 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York, London.
- Black M. 1991. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. En: Abscisic acid, physiology and biochemistry. W. J. Davies and H. G. Jones, eds. Bios Scientific Publisher. Oxford, U. K.
- Blakeley SD & Dennis DT 1993. Molecular approaches to the manipulation of carbon allocation in plants. *Can J Bot* 71:765-778.
- Blakeley SD, Ko K & Dennis DT. 1992. Plastid specificity and novel characteristics of import and processing of pyruvate kinase into leucoplasts and chloroplasts (abstract No. 150). *Plant Physiol.* 99:S-25
- Brulfert, J, Kluge, M, & Queirosz O. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a key enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21: 803-804.
- Boesenwinkel FD & Bouman F. 1995. The seed: structure and function. De: Seed development and germination. Editado por Kiegel J & Galili G. Marcel Dekker Inc. pp 1-24.
- Bourges H. 1996. Los alimentos y la dieta. En: Nutriología médica. Editado por Casanueva E, Kanfer M, Pérez Lizaur AB y Arroyo P. De. médica Panamericana.
- Colombo SL, Pairoba CF & Andreo CS. 1996. Inhibitory effect of shikimic acid on PEP carboxylase activity. *Plant Cell Physiol.* 37: 870-872
- CRC (1980). Handbook of chemical and physics constants. Lide, R. D. ed. 61 ed. pp D245-D246. Boca Raton U. S. A.
- Chollet R, Vidal J, & O'Leary ME. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47: 273-298.
- Davies DD. 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Annu Rev. Plant Physiol.* 30:131-158.
- Deng X & Scarth R. 1998. Temperature effects on fatty acid composition development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Journal of the american oil chemists society* 75(7): 759-766 .
- Dennis DT & Blakeley SD. 1993. Resource allocation in developing oilseeds. In SL MacKenzie, DC Taylor, eds, Seed Oils for the future. American Oil Chemists Society Press, Champaign, IL, pp 26-34.
- Dennis DT & Miernyk JA. 1982. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 27-50.
- Doncaster HD & Leegood RC. 1987. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase

- activity in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:82-87
- Deroche ME & Carrayol E. 1988. Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Plant Physiol.* 74:775-82.
- Domínguez F & Cejudo J. 1996. Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. *Plant Physiol.* 112(3):1211-1217.
- Dommes, J & Northcole, DH. 1985. The action of exogenous abscisic and gibberellic acids on gene expression in germinating castor beans. *Planta.* 165: 513-521.
- Donkin ME, Taffs J & Martin ES. 1982. A study of the in-vitro regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the epidermis of *Commelina communis* by malate and glucose-6-phosphate. *Planta* 155: 419-422.
- Duff SMG, Andreo CS, Pacquit V., Lepiniec L, Sarath G, et al. 1995. Kinetic analysis of the non-phosphorylated, in vitro phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp 8) forms of intact recombinant C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* 228:92-95.
- Duggleby RG & Dennis DT. 1973. Pyruvate kinase, a possible regulatory enzyme in higher plants. *Plant Physiol.* 52:312-317.
- Eastmond PJ & Rawsthorne S. 1998. Comparison of the metabolic properties of plastids isolated from developing leaves or embryos of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* 49(324):1105-1111.
- Edwards GE & Huber SC 1981. The C₄ pathway. In *The biochemistry of plants*. Vol 8. edited by M.D. Hatch and N.K. Boardman. Academic Press. New York. pp 237-281.
- Edwards S, Nguyen BT, Do B & Roberts JKM. 1998. Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the Krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol* 116:1073-1081.
- Emes MJ & Tobin AK. 1993. Control of metabolism and development in higher plant plastids. *Int Rev Cytol* 145:149-216.
- Emons CMA, Smallo-Droppers A & Van der Toorn C. 1993. The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 142:597-604.
- Finkelstein R & Somerville C. 1989. Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus*. *Plant Sci* 61:213-217.
- García-Maya M, Chapman JM & Black M. 1990. Regulation of α -amilasa formation and gene expression in the developing wheat embryo. Role of abscisic acid, the osmotic environment and gibberelin. *Planta* 181:296-303.
- Gottlob-McHugh S, Rajender SS, Blakeley SD, Vanlergerghe GC, Ko K, Turpin DH, Plaxton WC, Miki BL & Dennis DT. 1992. Normal growth of transgenic tobacco plants in the absence of cytosolic pyruvate kinase. *Plant Physiol.* 100: 820-825.
- Groot SPC & Krassen CM. 1992. Dormancy and germination of abscisic acid -deficient tomato seeds. *Plant Physiol.* 99:952-958.
- Gurr MI. 1980. The biosynthesis of triacylglycerols In PK Stumpf & EE Conn (eds) *The biochemistry of plants*, vol 4, 205-248. *Academic Press. New York.*
- Harwood JL. 1980. Plant acyl lipids structure, distribution and analysis. En *The biochemistry of plant*. Vol 4 de PK Stumpf. *Academic Press. New York* . pp 2-256.
- Hendlin et al. 1969. *Science* Vol 166 Pag 122.
- Henson IE. 1984. Effects of atmospheric humidity on abscisic acid accumulation and water status in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) *Ann. Bot. (London)* 53: 1-11.
- Hoseney RC. 1992. *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Ed Acribia. pp 10.
- Hu Z & Plaxton WC. 1996. Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase

- from leaves of the castor plant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **333**: 298-307.
- Jiang L & Kermode, RA.** 1994. Role of desiccation in the determination of expression of genes for storage proteins. *Seed Science Res.* **4**: 149-173.
- Johnson RW, Asokanathan PS & Griffith M.** 1997. Water and sucrose regulate canola embryo development. *Physiologia Plantarum* **101**(2):361-366
- Jones CT.** 1976. A new pathway for the synthesis of fatty acid: a role for PEP carboxylase in lipogenesis. *FEBS Lett.* **63**:77-81.
- Jones RJ & Brenner ML.** 1987. Distribution of abscisic acid in maize kernel during grain filling. *Plant Physiol.* **83**: 905-909.
- Kermode AR.** 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination Crit. rev. *Plant Sci.* **9**, 155-195.
- Kermode AR, Dumbroff EB & Bewley, JD** 1989. The role of maturing drying in the transition from seed development to germination. VII. Effects of partial and complete desiccation on abscisic acid levels and sensitivity in *Ricinus communis* L. seed. *J. Exp. Bot.* **40**:303-313.
- Khayat E Dumbroff EB & Glick BR.** 1991. The synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in imbibing sorghum seeds. *Biochem Cell Biol.* **69**: 141-145.
- King, RW.** 1982. Abscisic acid in seed development. En: The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination, 99, 157-185. Khan, AA de. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- Kojima M, Suzuki H, Ohnishi M & Ho S.** 1998. Effects of growth temperature on lipids of Adzuki bean cells. *Photochemistry* **47**(8):1483-2487
- Koornneef M, Reuling G & Karssen CM.** 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **61**:377-383.
- Kruger NJ.** Carbohydrate synthesis and degradation 59-76 in *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman, London, 1992. Edited by Dennis DT & Turpin DH.
- Laemmi, UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Latzko E & Kelly GJ** 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. Veg.* **21**:805-815.
- Le H, Browning KS & Gallie PR.** 1998. The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *Journal of Biological Chemistry.* **273**(32)20084-20089.
- Leegood RC & von Caemmerer S.** 1988. The relationship between contents of photosynthetic metabolites and the rate of photosynthetic carbon assimilation in leaves of *Amaranthus adulis* L. *Planta* **174**: 253-562.
- Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gadal P & Crétin C.** 1993. Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. *Plant Mol. Biol.* **21**:487-502.
- Lin LS & Ho TH.** 1986. *Plant Physiol* **82**:289-297.
- Mayer AM & Poljakoff MA.** 1989. The germination of seeds. 4th ed, Pergamon Press. Oxford.
- Marês, J & Leblová S.** 1980. Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica* **14**: 25-31.
- Mohapatra SS, Poole RJ & Dhindsa RS.** 1988. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa, *Plant Physiol.* **87**: 468-473.
- Moons A, Prinsen E, Bauw E & Van Montagu M.** 1997. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* **9**: 2243-2259.
- Morris PC, Jewler PC & Bowles DJ** 1991. Changes in water relations and endogenous

- abscisic acid content of wheat and barley grains and embryos during development. *Plant Cell Environ.* **14**:443-446
- Mujica-Jiménez C, Castellanos-Martínez A & Muñoz-Clares RA. 1998. Studies of the allosteric properties of maize leaves phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator. *Biochemica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology* **1386**(1):132-144.
- Negem FB, Corel FA & Plaxton WC. 1995. Suborganellar localization and molecular characterization of nonproteolytic degraded leukoplast pyruvate kinase from developing castor oil seeds. *Plant Physiol* **109**: 1461-1469.
- O'Leary ME. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Annu Rev. Plant Physiol.* **33**:297-315.
- Pacheco-Moises F. 1997. Estudio de la regulación de la síntesis de Triacilglicerol por Acido Abscisico y el potencial osmótico en embriones de maiz en desarrollo. Tesis de doctorado. Facultad de química, UNAM. p. 92.
- Pickardt T, Zierwagen B, Schade V, Ohi L, Baumlein H & Meixner M. 1998. Developmental regulation and tissue-specific expression in two different seed promoter GUS-fusion in transgenic lines of *Vicia narbonensis*. *Journal of Plant Physiology* **152**(6):621-629.
- Plaxton WC. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu rev. Plant Physiol Mol Biol.* **47**:185-214.
- Podestá FE & Plaxton WC. 1991. Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem. J.* **279**:495-501.
- Podestá FE & Plaxton WC. 1992. Plant cytosolic pyruvate kinase: a kinetic study. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1160**: 213-220.
- Podestá FE & Plaxton WC. 1994a. Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* **194**: 374-380.
- Podestá FE & Plaxton WC. 1994b. Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* **194**: 381-387
- Quy LV, FoyerCh & Champigny ML. 1991. Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol* **94**:1476-1482.
- Rajender SS, Neelam S, & Plaxton WC. 1992. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating castor oil seeds. *Plant Physiol.* **99**:445-449.
- Rodríguez-Penagos Mireya. 1991. Actividad de I-Amilasa en aleuronas de semillas de trigo deterioradas. Tesis de maestría. Facultad de química, UNAM.
- Rodríguez-Sotres R & Black M. 1994. Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos. *Planta* **192**: 9-15.
- Rodríguez-Sotres R, López-Pozos R & Muñoz-Clares RA. 1987. Further studies of the short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* **129**:191-199.
- Rodríguez-Sotres R & Muñoz-Clares RA. 1990. Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Archives of biochemistry and biophysics.* **276**: 180-190.
- Sabularse DC & Anderson RL. 1981. D-fructose-2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator from inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase. *Biochem Biophys Rev Commun.* **103**:848-55.

- Sangwan RS, Singh N & Plaxton WC. 1992. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating castor oil seeds. *Plant Physiol.* **99**: 445-449.
- Schopfer, P & Plachy, C. 1985. Control of seed germination by abscisic acid. *Plant Physiol.* **77**: 676-686.
- Schuller KA, Plaxton WC, & Turpin DH 1990. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*. Properties associated with replenishment of tricarboxylic acid. Intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* **94**: 1429-1435.
- Shannon JC, Pien FM, Cao H & Liu KC. 1998. Brittle-1, an Adenylate Translocator, Facilitates Transfer of Extraplasmidial Synthesized ADP-Glucose into Amyloplasts of Maize Endosperms *Plant Physiol* **117**: 1235-1252.
- Shewry RP 1995. Cereal seed storage proteins. En Seed development and germination. Kigel K. y Galili, G. eds. pp 45-72. *Marcel Dekker, Inc.*
- Sivak NM & Preiss J. 1995. Starch synthesis in seeds. En Seed development and germination. Kigel K. y Galili, G. eds. pp 275-332. *Marcel Dekker, Inc.*
- Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT & Turpin DH. 1992. Malate- and Piruvate-dependent fatty acid synthesis in leukoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiol.* **99**: 1233-1238.
- Smith KP, Krohn IH, Hermanson TG, Mallia GHF, Provenzano DM, Fujimoto KE, Goek MN, Olson JB & Klenk CD. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.
- Skriver, K. & Mundy J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant cell.* **2**: 503-512.
- Stiborová M & Leblková S. 1985. Activation of maize (*Zea mays*) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: Effects of pH and Mg^{2+} . *Photosynthetica* **19**: 177-182.
- Stitt M & Heldt HW. 1985a. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-biphosphate. Intracellular metabolite distribution and properties of the cytosolic fructose biphosphatase in leaves of *Zea mays* L. *Planta* **164**, 179-188.
- Stitt M & Heldt HW. 1985b. Generation and maintenance of concentration gradients between the mesophyll and bundle sheath in maize leaves. *Biochem Biophys Acta.* **808**, 400-414.
- Sugiharto B & Sugiyama T. 1992. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiol* **98**: 1403-1048.
- Suzuki Y, Créatin C, Omata T & Sugiyama T. 1994. Transcriptional and posttranscriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize. *Plant Physiol.* **105**: 1223-1229.
- Theodorou ME, Elfrifi IR, Turpin DH & Plaxton WC 1991. Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **95**: 1089-1095.
- Ting YP & Osmond CB 1973. Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C_3 and C_4 plants. *Plant Physiol.* **57**: 906-910.
- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C & Muñoz-Clares RA. 1997. Desensitization to glucose-6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyrodoxal 5'-phosphate. *Biochem Biophys Acta* **1337**:207-216.
- Tovar-Méndez A, Rodríguez-Sotres R, López-Valentin DM & Muñoz-Clares RA. 1998. Re-examination of the roles of phosphoenolpyruvate and Mg^{2+} in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate

- carboxylase from leaves of *Zea mays*. Effects of the activators glucose-6-phosphate and glycine. *Biochem J* 331:
- Turpin DH, Boyha Fc, Smith RR, Feil R, Horsey AK & Vanlerberghe GC.** 1990. Regulation of carbon partitioning to respiration during ammonium assimilation by the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* 93:166-175.
- Wagner R González DH, Podestá FE & Andreo CS.** 1987. Changes in the quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 164:661-666.
- Walker-Simmons M.** 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 61: 377-383.
- Wan J, Dennis DT & Ko K.** 1993. Localisation and targeting specificity of leucoplast pyruvate kinase (abstract No 849). *Plant Physiol* 120:S-148
- Watson SA & Ramstad PE.** Editors. Corn: Chemistry and technology. American Association of cereal Chemist, Inc. 1987.
- Weber N, Taylor DC & Underhill W.** 1992. Biosynthesis of storage lipids in plant cell and embryo cultures. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Vol 45. 99-131 Ed A Fiechter. Berlin.
- Witkowski-ETF, WeiersbyeWitkowski-IM, Przybylowicz-WJ & MesjaszPrzybylowicz-J** 1997. Nuclear microprobe studies of elemental distributions in dormant seeds of *Burkea africana*. *NUCLEAR-INSTRUMENTS-AND-METHODS-IN-PHYSICS-RESEARCH-SECTION-B-BEAM-INTERACTIONS-WITH-MATERIALS-AND-ATOMS* 130 (1-4):381-387.
- Wu MX & Wedding RT.** 1985. Temperature effects on phosphoenolpyruvate carboxylase from CAM and C₄ plant. *Plant Physiol.* 85: 497-501.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R & Chua NH.** 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-Ribose in plants *Science* 278(5346):2126-2130.
- Xu N & Bewley JDL.** 1995. Temporal and nutrition factors modulate responses to abscisic acid and osmoticum in their regulation of storage protein synthesis in developing seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *J. of Exp. Bot.* 46: 675-686.
- Zhang XQ, Li B & Chollet R.** 1995 In vivo regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant physiol* 108:1561-68.

12 ANEXO

12.1. EQUIPO

Agitador magnético Thermolyne
Ultracentrífuga Sorvall
Potenciómetro Beckman
Refrigeradores a 4°C
Congeladores de 0°C, -20°C y -70°C
Equipo de electroforesis Hoefer Scientific
Equipo de ultracentrifugación Nalgene
Cámara de transferencia semihúmeda Pharmacia LKB
Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con baño recirculante de agua a temperatura controlada
Transiluminador de luz blanca
Computadoras Balanza analítica Ohaus
Vortex Thermolyne
Cámara de agitación orbital con temperatura controlada Lab Line instruments

12.2.-REACTIVOS

ABA (Ácido abscisico) Sigma
Ácido acético Merck
Acido clorhídrico Merck
Acrilamida Sigma
Alcohol 96% Merck
Arena de mar Sigma
Azul brillante de Coomasie G-250 Beringer
Azul brillante de Coomasie R-250 Beringer
Bis-acrilamida Sigma
BSA (Albúmina sérica bovina) Gibco BRL
Cloruro de potasio Sigma
Cloruro de sodio Sigma
EDTA (ácido dinitrotetraacético) Merck
Glicerol Merck
Glicina Sigma
Hepes (N-(2-Hidroxi-etil)piperi-zina-N'-{ácido 2-etanosulfónico}) Sigma
Hidróxido de potasio Sigma
Hidróxido de sodio Sigma
 β -mercaptoetanol sigma
Metanol Merck
NAD⁺ (nicotinamida-adenina-Dinucleótido) Sigma
Película radiográfica Amersham Life Science
Polietilenglicol 6000 sigma
Sacarosa Merck
Tris (Hidroximetil-aminometano) Sigma
Tween 20 Sigma