



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

POSIBLE PAPEL METABOLICO DE LOS ACIDOS DE 3 Y 4 CARBONOS PRODUCTO DE LA GLUCOLISIS DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA

T E S I S

296913

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

ERIC EDMUNDO HERNANDEZ DOMINGUEZ



MEXICO, D. F.

EMPLEOS PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

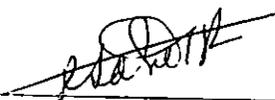
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado Asignado

Presidente	Prof.	RAÚL AGUÍLAR CABALLERO
Vocal	Prof.	HOMERO HERNÁNDEZ MONTES
Secretario	Prof.	ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
1er suplente	Prof.	JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
2º suplente	Prof.	JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

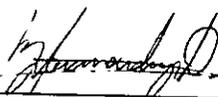
Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 115 del Conjunto "E". de la Facultad de Química en el Departamento de Bioquímica U.N.A.M.

Asesor del tema:



Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Sustentante:



Eric Edmundo Hernández Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres su valiosa amistad y todos los conocimientos y enseñanzas brindadas para la realización de este trabajo. También agradezco especialmente a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto su ayuda y amistad

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Aurora, Llian y Ricardo por su amistad. Así mismo agradezco a la Dra. Marieta y al Dr Armando su generosa ayuda y a todas las personas de los laboratorios 104 y 105 de Fisiología Celular, 115 y 101 del edificio "E" Facultad de Química

Y finalmente agradezco el financiamiento de este proyecto a PAPIT-DGAPA-UNAM
IN224098

Dedicatoria

Doy gracias a Dios por este tiempo y por todo

Dedico con mucho cariño esta tesis a mis padres Francisco y Patricia a mi hermano Ivan y a mi abuelita Leonor por el gran apoyo, paciencia y cariño que me han brindaron durante todo este tiempo de estudios.

Este trabajo también se lo dedico a todos mis amigos y en especial a Edgar como gratitud a su valiosa amistad

Tabla de Contenido

1. Abreviaturas	6
2. Resumen	7
3. Introducción	8
4. Antecedentes	10
4.1 Anatomía y principales reservas de la semilla de maíz	10
4.1.1 Anatomía de la semilla de maíz	10
4.1.2 Principales reservas en las semillas	12
4.1.2.1 Carbohidratos	13
4.1.2.2 Proteínas	16
4.1.2.3 Lípidos	16
4.2 Desarrollo del grano de maíz	20
4.2.1 Metabolismo de los carbohidratos	22
4.2.2 Síntesis de proteínas	35
4.2.3 Biosíntesis de lípidos	37
4.2. El ácido abscísico y el potencial osmótico	40
4.2 La germinación	43
5. Hipótesis	45
6. Objetivos	45
6.1 Generales	45
6.2 Particulares	45

7. Materiales y Métodos	47
7.1 Materiales	47
7.1.1 Material Biológico	47
7.1.2 Equipos	47
7.1.3 Reactivos	47
7.2 Métodos	48
7.2.1 Aislamiento e incubación de los embriones	48
7.2.2 Extracción y separación de lípidos	49
7.2.3 Extracción y cuantificación de proteína	50
7.2.4 Medio básico y enzimas de digestión	51
7.2.5 Obtención de los protoplastos	51
7.2.6 Incorporación de malato-[¹⁴ C] y acetato-[¹⁴ C] en los protoplastos	52
8. Resultados	53
9. Discusión	66
10. Conclusiones	72
11. Bibliografía	73

1. Abreviaturas

ABA	Acido Abscisico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
G3P	Glicerol-3-Fosfato
MDH	Malato deshidrogenasa
MES	Acido (2-[N-morfolino]etanosulfonico)
OAA	Oxalacetato
PDC	Complejo Piruvato Deshidrogenasa
PEG	Polietilenglicol
PK	Piruvato Cinasa
PEPC	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PVP	Polivinilpirrolidon
RE	Reticulo Endoplasmico
RER	Reticulo Endoplasmico Rugoso
SDS	Dodesil sulfato de sodio
TAG	Triacilgliceroles
TLC	Cromatografía de Capa Fina
TCA	Ciclo del Acido Tricarboxilico
TTP	Transportador de Triosas Fosfato

2. Resumen

En las semillas, la demanda de intermediarios para suplir las necesidades biosintéticas de los tejidos vegetales requiere que la ruta glucolítica sea regulada de manera adecuada ya que sus intermediarios son precursores de esas rutas biosintéticas. Aunque se desconoce los mecanismos precisos de esa regulación las enzimas piruvato cinasa (PK) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) juegan un papel importante en la regulación de la glucólisis. En este trabajo se demuestra que los esqueletos carbonados de los compuestos C4 son utilizados preferentemente para la síntesis de proteínas, mientras que los C3 se emplean con preferencia en la síntesis de ácidos grasos, los cuales se acumulan como triacilgliceroles (TAG), en los embriones de maíz.

3. Introducción

Aproximadamente el 70% de todo el alimento para consumo humano proviene directamente de los cereales. Por su alto contenido de reservas nutritivas (Tabla 1) el hombre los emplea como una fuente de alimento. Sin embargo, en la actualidad además de ser utilizados como comestibles sirven como materia prima en procesos químicos industriales representando una parte importante de los nutrientes en la dieta de los animales que son criados para el consumo humano.

Tabla 1 Reservas contenidas en los principales granos de consumo humano (Tomado de Bewley and Black, 1994).

CEREAL	Cantidad promedio (%)		
	PROTEINA	LIPIDOS	CARBOHIDRATOS
Cebada	12	3	76
Maíz	10	5	80
Avena	13	8	66
Centeno	12	2	76
Trigo	12	2	75

La producción de aceites por las plantas es de gran importancia para la industria agrícola (Harwood, 1998; Murphy, 1994). Los datos indican que la producción mundial de aceites y grasas de origen vegetal sobrepasan los 70 millones de toneladas (Gunstone, Harwood and Padley, 1994) y esto es de considerable interés, ya que la posible manipulación genética de las plantas puede servir para incrementar la producción o para alterar la cantidad y/o calidad de los triacilgliceroles (TAG) acumulados (Harwood, 1998; Murphy, 1994, Ohlrogge, 1994). En estos momentos ya existen algunas cosechas transgénicas con alteraciones en los lípidos de reserva (Kinney *et al.*, 1998; Knutson and

Knauf, 1998). Sin embargo, uno de los obstáculos más grandes que la ingeniería genética enfrenta es la carencia de un conocimiento profundo del metabolismo vegetal y de la manera en que este se regula (Bewley and Black, 1994; Slabas and Fawcett, 1992).

El maíz es el cereal que mayor importancia tiene en México, 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). Junto con el trigo y el arroz constituye uno de los recursos naturales renovables más relevantes en toda la historia de la humanidad. Es por ello que se desea investigar los mecanismos mediante los cuales las semillas de maíz son capaces de canalizar los nutrimentos por los tejidos maternos hacia las diferentes reservas, así como conocer los eventos bioquímicos y moleculares que regulan a tal proceso.

Se sabe que la fuente más abundante de carbono para las semillas son los azúcares solubles (Weber *et al.*, 1997), de lo que se deduce que la glucólisis puede tener un papel central en la partición de este carbono. Así, un conocimiento de la regulación de esta ruta en los tejidos de las semillas nos ayudaría a identificar los puntos de control de la utilización del carbono (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1999).

4. Antecedentes

4.1 Anatomía y principales reservas de la Semilla de Maíz

4 1.1 Anatomía de la Semilla de Maíz

La semilla de maíz es una carióspside (del griego *karuon*, nuez y *opsis*, aspecto) y es el resultado de la fertilización, en la cual un gameto masculino se une al óvulo, formando un cigoto que comienza a dividirse para formar el embrión, un segundo gameto masculino se une a los dos núcleos polares formando el endospermo el cuál es un núcleo de triple fusión. Debido a que contiene las reservas nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una planta completa, la semilla constituye el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de la mayoría de las especies vegetales (Reyes-Castañeda, 1990).

El grano esta constituido principalmente por tres diferentes tejidos (Fig. 1): embrión, endospermo y pericarpio. El pericarpio se desarrolla del tejido ovular, tiene como tal las características genéticas de la planta madre y es una especie de saco formado por muchas capas, que son de considerable importancia para la semilla, porque muchas veces es la única barrera de protección contra el ambiente externo y los organismos patógenos.

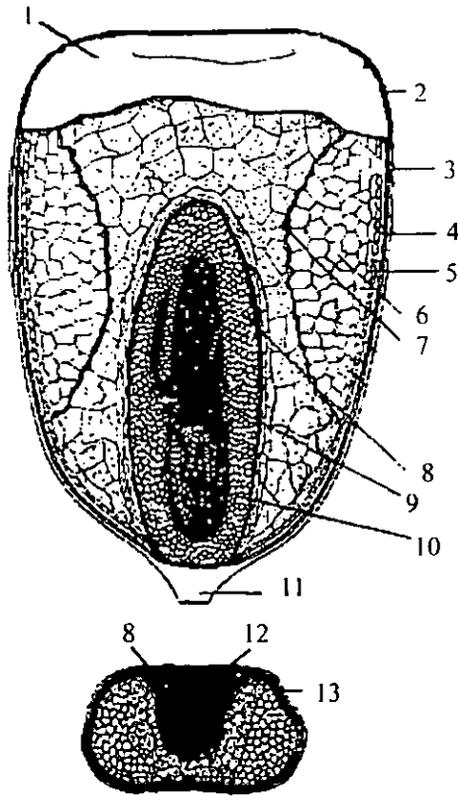


Fig.1 Corte longitudinal y transversal de la semilla de maíz. Las partes que lo constituyen son las siguientes: 1) Pericarpio, 2) Epidermis, 3) Mesocarpio, 4) Testa, 5) Capa de aleurona, 6) Endospermo cristalino, 7) Endospermo farináceo, 8) Escutelo, 9) Plúmula, o tallo y hojas rudimentarios, 10) Radícula o raíz primaria, 11) Pedúnculo, 12) Eje embionario, 13) Pericarpio. (Tomado de Hoseney, 1992).

El endospermo (que se origina de la triple fusión) es un tejido de almacenamiento rico en almidón, por lo que es el principal tejido de reserva de la semilla. Este se encuentra rodeado por una capa de células de pared gruesa ricas en proteínas carentes casi por completo de almidón y con apariencia granular, llamada aleurona, que al parecer puede ser responsable en la liberación de las enzimas necesarias en la movilización de reservas. El endospermo con una gran capacidad de retención de agua

puede jugar un doble papel: el de proveer de reservas al embrión para la germinación y el de regular el balance de agua en el embrión durante la germinación.

El embrión se encuentra situado en el seno del endospermo, el cual dará lugar a una nueva planta, está formado por el escutelo y el eje embrionario. El escutelo está fuertemente adherido al endospermo y es un tejido de almacén de lípidos y proteínas durante la maduración, además, es la fuente inicial de las enzimas que hidrolizan las reservas del endospermo en la germinación. En el eje embrionario se pueden distinguir al coleóptilo, que es el tejido que protege a los primordios foliares; al mesocótilo (nudo escutelar) que es la zona de inicio de las raíces adventicias y a la capa terminal que, es una estructura esponjosa que permite la unión del embrión al ote.

4.1.2 Principales Reservas en las Semillas

En adición a los constituyentes normales encontrados en todos los tejidos de las plantas, las semillas contienen cantidades extras de sustancias de reserva, como una fuente de alimento o sustento para la planta durante el crecimiento temprano (Bewley and Black, 1994), Estos son principalmente carbohidratos, lípidos y proteínas, en conjunto con otras reservas menores como fuentes de minerales y vitaminas.

La mayoría del alimento de reserva puede ser depositado dentro del embrión, en el endospermo y ocasionalmente en otros tejidos. En muchas semillas las reservas pueden estar localizadas en diferentes tejidos y distribuidas desigualmente, en el grano del maíz, la región rica en lípidos y proteína está en el embrión mientras que el almidón se encuentra dentro del endospermo (Tabla 2).

Tabla 2 Composición (%) de las reservas almacenadas en los diferentes componentes de la semilla de Maíz. (Tomado de Bewley and Black, 1994).

Reserva	Grano entero	Endospermo	Embrión
Almidón	74	88	9
Lípidos	4	<1	31
Proteínas	8	7	19

4.1.2.1 Carbohidratos

Los carbohidratos son componentes esenciales de los organismos vivos y son, de hecho, la clase más abundante de moléculas biológicas. En muchas semillas los carbohidratos constituyen la mejor forma de almacenamiento de reservas. Las unidades básicas de los carbohidratos se conocen como monosacáridos. Muchos de estos compuestos se sintetizan a partir sustancia más simples en un proceso llamado gluconeogénesis. Otros son el producto de la fotosíntesis, que es la combinación de CO_2 y H_2O impulsada por la energía de la luz mediante la cual las plantas y algunas bacterias forman hidratos de carbono.

El almidón es el carbohidrato más comúnmente encontrado en las semillas, es una mezcla de glucanos que las plantas acumulan como su principal reserva alimenticia. El endospermo es su principal sitio de almacenamiento y de síntesis en los cereales (65-75% del peso seco de la semilla madura) aunque también se deposita en forma transitoria en el embrión y en el pericarpio durante las fases tempranas del desarrollo (Sivak and Preiss, 1995). En el citoplasma de las células se acumula en forma de gránulos insolubles constituidos por α -amilosa y por amilopectina (50-75% de amilopectina y 20-25% de amilosa). La α -amilosa (Fig. 2) es un polímero lineal que consta de varios millares de restos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ con una conformación enrollada helicoidalmente, que se agrega de modo irregular.

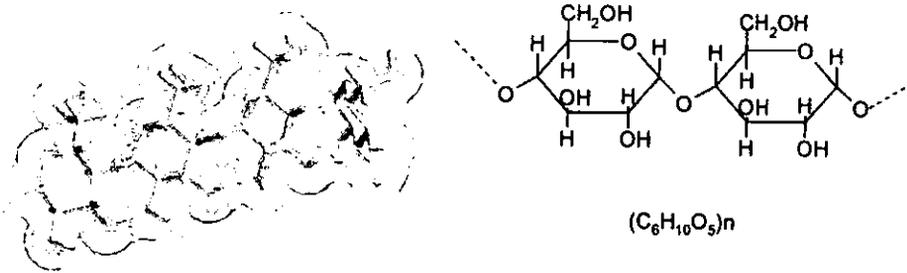


Fig. 2 Estructura de la amilosa. La imagen de la izquierda representa un modelo de varillas de la amilosa en la que las sombras señalan el radio de Van der Waals de los átomos. (Tomado de Joyce J. Diwan).

La amilopectina (Fig. 3) está constituida por una cadena central de restos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$, pero es una molécula ramificada, con puntos de ramificación $\alpha(1-6)$ cada 24 a 30 restos de glucosa. Las moléculas de amilopectina contienen hasta 10^6 restos de glucosa, lo que las sitúa entre las moléculas de mayor tamaño que aparecen en la naturaleza. El almacenamiento de glucosa en forma de almidón reduce en gran medida las grandes presiones osmóticas intracelulares que se registrarían de su forma monomérica ya que, idealmente, la presión osmótica es proporcional al número de moléculas de soluto en un volumen determinado.

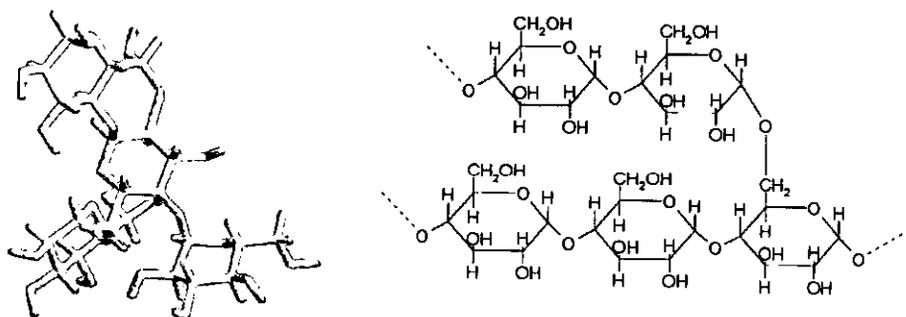


Figura 3 Estructura de la amilopectina. La figura de la izquierda representa un modelo de varillas de la estructura tridimensional de la amilopectina. Para apreciar con mayor claridad la ramificación de la cadena no se incluyeron los radios de Van der Waals. (Tomado de Joyce J. Diwan).

4.1.2.2 Proteínas

Las proteínas que son metabólicamente inactivas son consideradas como proteínas de reserva y son frecuentemente localizadas en organelos especiales llamados cuerpos proteicos. Estos tienen un diámetro entre 0.1 a 25 μ m y están rodeados, al menos durante el desarrollo, por una sola membrana. En los tejidos de reserva de algunas semillas maduras, la membrana está incompleta o no está presente, permitiendo que las proteínas estén dispersas en el citoplasma, aunque esto es relativamente poco común.

Las proteínas de reserva son sintetizadas en el retículo endoplasmico (ER) principalmente en el retículo endoplasmico rugoso (RER) y son transportadas por vesículas hacia la vacuola, donde se acumulan en los cuerpos proteicos (Buttose. 1963, Mollonhaver and Moore. 1980).

En el maíz, las prolaminas (solubles en mezclas alcohol-agua) son las proteínas de reserva más abundantes y se depositan en el endospermo. Generalmente, presentan un alto contenido de prolina y ácido glutámico pero son deficientes en lisina y contienen bajos niveles de triptófano.

4.1.2.3 Lípidos

Los lípidos que se encuentran en las semillas consisten en su mayor parte en mezclas de triacilgliceroles (TAG, Fig. 4) que se acumulan como pequeñas gotas subcelulares llamadas cuerpos lipídicos (Frey-Wyssling *et al.*, 1963; Yatsu and Jacks, 1972; Gurr *et al.*, 1974; Appelqvist, 1975; Bergfeld *et al.*, 1978; Kleining *et al.*, 1978;).

Estas sustancias apolares, insolubles en agua, pero solubles en una variedad de solventes orgánicos incluyendo éter y cloroformo, son triésteres de ácidos grasos y del glicerol. (Fig. 4 y 5).

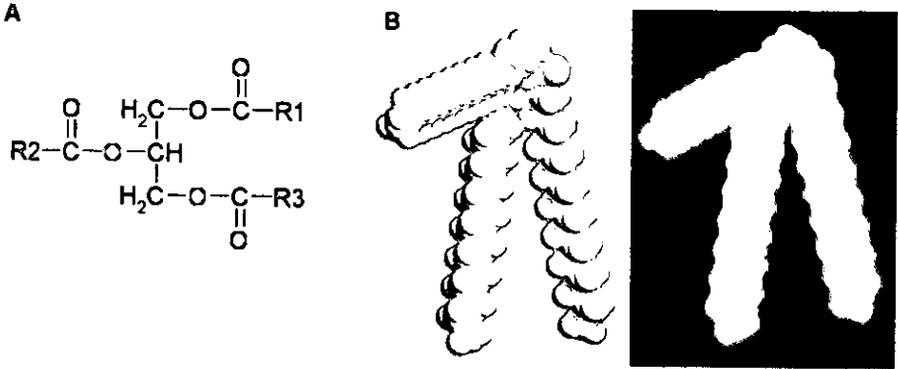


Figura 4 Estructura general de los TAG. (a) en donde R1, R2 y R3 son colas hidrocarbonadas de ácidos grasos las cuales pueden ser diferentes o de un mismo tipo de ácido graso como la triestearina o triesteroilglicerol que contiene tres restos de ácido esteárico (b) aquí representada en un modelo espacial relleno. (Tomado de Tom Zamis).

Los TAG difieren según la identidad y colocación de sus restos de ácido graso que son ácidos carboxílicos con cadenas laterales hidrocarbonadas largas. En las plantas superiores, los restos de ácidos grasos predominantes son los de las especies de C16 y C18 (palmítico, oleico, linoleico y esteárico, Tabla 3).

Tabla 3 Composición de los ácidos grasos presentes en los aceites comerciales de origen vegetal. (Tomado de Bewley and Black, 1994).

Especie	Palmítico (16:)	Estearico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Linolénico (18:3)
Girasol	6	4	26	64	0
Maíz	12	2	24	61	<1
Soya	11	3	22	54	8
Algodón	27	3	17	52	0
Cacahuete	12	2	50	31	0

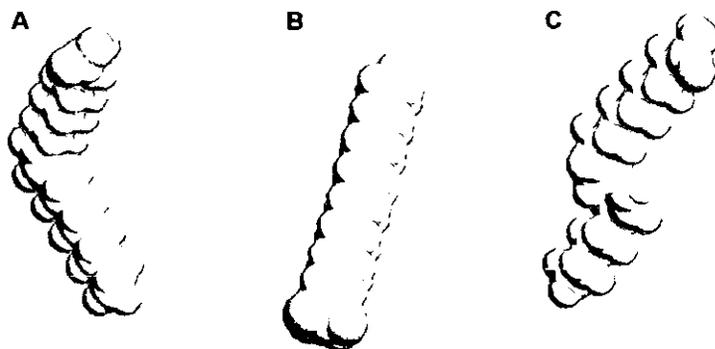


Figura 6 Representación espacial realista de los ácidos grasos. Ácido oleico (A) ácido esteárico (B) ácido linoleico (C). Átomos de oxígeno (rojo). Átomos de carbono (gris). Átomos de hidrógeno (blanco). (Tomado de Library of 3-D Molecular Structures).

Los TAG funcionan de almacenamiento de energía y son, por tanto, la clase de lípidos más abundantes, aun cuando no son componentes de membranas biológicas. Esto se debe a que están menos oxidados que los carbohidratos o las proteínas y de aquí que su rendimiento de energía en la oxidación sea significativamente mayor. Además, los lípidos, al ser sustancias apolares, se almacenan en forma anhidrida mientras que el

glucógeno se encuentra hidratado. Por esta razón, muchas especies de plantas sintetizan lípidos en sus semillas en desarrollo que actúan como una reserva de energía para la germinación.

La acumulación de lípidos en las semillas y en las frutas es un proceso muy bien caracterizado (Calvin, 1963; Gurr *et al.*, 1972; Privett *et al.*, 1973; Norton and Harris, 1975). Como un principio general, durante el desarrollo de la semilla, la acumulación sigue un modelo que puede ser dividido en tres pasos desde la fertilización hasta la maduración de la semilla:

Durante la primera fase, después de la fertilización, sólo están trazas de TAGs presentes en la semilla. Los lípidos de membrana (fosfolípidos y glicolípidos) son los principales constituyentes. La segunda fase corresponde al comienzo del depósito de lípidos y de la gradual acumulación de TAG en un contexto de más activo crecimiento de la semilla. La acumulación de TAG es gradual, pero se incrementa muy rápidamente en un corto tiempo, generalmente a la mitad del desarrollo. En paralelo, la cantidad y proporción de ácidos grasos se incrementa drásticamente. Durante este periodo los fosfolípidos y glicolípidos son sintetizados también, aunque en una menor proporción (menos del 10% del contenido total de lípidos). Al final de la segunda fase, los TAG son los componentes predominantes de los lípidos. Finalmente, durante la tercera fase del desarrollo la acumulación cesa.

4.2 Desarrollo del grano de maíz

Como ya se menciona, el desarrollo de las semillas (Fig. 6) puede ser dividido en tres etapas claras en las que predominan eventos específicos del desarrollo: diferenciación tisular del grano, llenado del grano y la desecación. La diferenciación es el resultado de la división celular en el que ocurre un tremendo incremento en la actividad sintética conforme muchos de los tejidos estructurales de la semilla se forman. Es un periodo de rápido desarrollo celular. Esta etapa viene seguida por un periodo durante el cual los fotosintatos son translocados desde la planta madre hacia las células jóvenes y forman reservas de carbono y nitrógeno (almidón, lípidos, proteínas de almacenamiento).

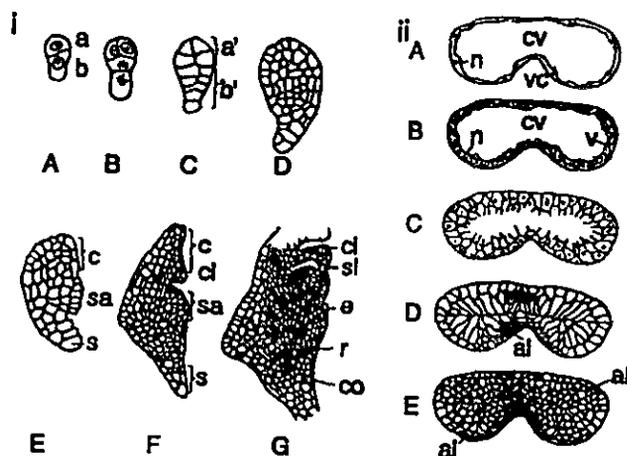


Fig. 6 Desarrollo de la semilla en los cereales. (i) El desarrollo del embrión se inicia (A) con una primera división en la que se produce un ápice (a) y una célula basal (b) ambas células forman derivados (a' y b') respectivamente. Después numerosas divisiones (D-E) dan lugar a pequeñas regiones delimitadas, las cuales formarán el cotiledón (c), la punta del tallo (sa), siendo posteriormente evidente (G) el inicio del tallo; la primera hoja (sl) y el inicio de la raíz (r). (ii) Desarrollo del endospermo. Desarrollo de la región media del saco embrionario resultando en (A) nuclear (n) división con la formación de la pared celular; núcleo en el citoplasma rodeado por una vacuola central (cv). El pliegue ventral es evidente (vc). (B) El núcleo sufre múltiples divisiones mitóticas y varias vacuolas (v) aparecen en el citoplasma. (C) células del endospermo aparecen formando una pared hacia el interior de la vacuola. (D) La formación de células continúa (al).

en el endospermo. Un gran número de células son formadas (como 100000) que se dilatarán más tarde para almacenar reservas (almidón y proteínas). Las primeras células de la capa de aleurona (a) sobre el área plegada se crean. (E) la diferenciación de la capa de aleurona se propaga lateralmente desde el pliegue central para juntarse con la otra región. (Tomado de Bewley and Black, 1994).

El llenado del grano se caracteriza por un rápido incremento en el peso seco y una lenta disminución en el contenido de humedad. El llenado de la semilla viene seguido por la maduración durante la cual la semilla pasa por una serie de alteraciones físicas y químicas esenciales para la producción de una estructura capaz de tolerar largos periodos de latencia, tras lo cual debe de germinar y crecer.

Con la fase final de secado termina el desarrollo de la semilla y esta última entra en el estado de inactividad o latencia característico de la semilla deshidratada. 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, las etapas de llenado y secado se acompañan de acumulación de ácido abscísico (ABA); este fitoregulador se ha descrito como un factor capaz de estimular la acumulación de reservas (Kermode, 1990; Skriver and Mundy, 1990; Bewley and Black, 1994; Rodríguez-Sotres and Black, 1994 Pacheco-Moisés *et al.*, 1997), como promotor del establecimiento de latencia y dormancia y como un potente inhibido de la germinación (Kermode *et al.*, 1989).

4.2.1 Metabolismo de los carbohidratos

El metabolismo es el proceso global a través del cual los sistemas vivos adquieren y utilizan energía libre para realizar sus diferentes funciones. Este proceso se realiza acoplando las reacciones exergónicas de oxidación de nutrientes a los procesos endergónicos necesarios para mantener el estado vital.

El metabolismo degradativo se caracteriza por su capacidad de transformar un gran número de sustancias diferentes (Carbohidratos lípidos y proteínas) en intermediarios comunes. Por el contrario la biosíntesis lleva a cabo el proceso opuesto: un número reducido de metabolitos, sirven de materia de partida para sintetizar una gran variedad de productos.

La ruta de la glucólisis (Fig. 7) está presente en casi todos los organismos y consiste de una secuencia lineal de reacciones enzimáticas esenciales. La ecuación de balance global clásica de la glucólisis se muestra en el esquema 1.

Esquema 1. Reacción global de la glucólisis. (Tomado de Dennis and Turpin, 1997).



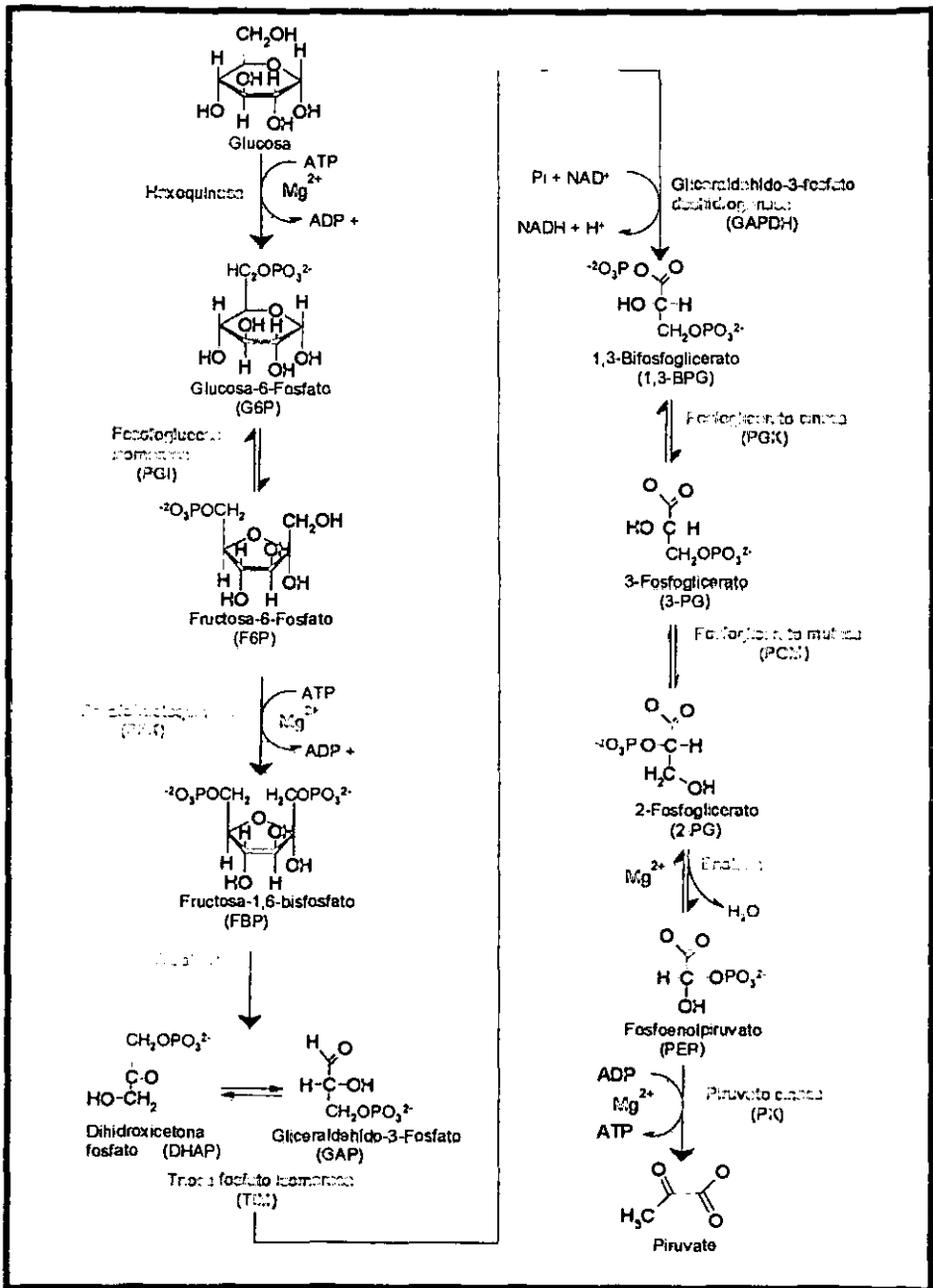


Figura 7 La Glucólisis en Plantas.

Esta simple ecuación sugiere que la glucólisis funciona sólo para producir ATP y poder reductor en forma de NADH por la oxidación de glucosa a piruvato; sin embargo, el flujo de carbono requerido para satisfacer la biosíntesis necesaria en las plantas es grande porque las plantas son autotróficas y pueden sintetizar todos los componentes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Es por ello, que la principal función de la ruta glucolítica en las plantas es la de proveer intermediarios para las rutas biosintéticas.

En las semillas, cuando una gran cantidad de compuestos de reserva son sintetizados el mayor flujo de carbono entra al plástido y puede suplir las necesidades de estas rutas; así, es posible localizar muchas actividades glucolíticas en los plástidos marcando una diferencia fundamental en la organización y el control del metabolismo.

La demanda de intermediarios para suplir las necesidades biosintéticas de los tejidos vegetales requiere que la regulación de la ruta glucolítica responda a los requerimientos de intermediarios que son los precursores de las rutas biosintéticas. Esto en contraste con los animales, donde la mejor función de la glucólisis es cubrir las necesidades energéticas de la célula (Fig. 8). El mecanismo por el cual la glucólisis es regulada en los tejidos vegetales no está muy bien entendido, pero se ha distinguido por presentar un mayor grado de flexibilidad (Black *et al.*, 1987) en comparación con otros organismos y por ser capaz de mantener el flujo de carbono a un nivel en ausencia de alguna de las enzimas de la ruta (Gottlob-Mehung *et al.*, 1992). Esto, como resultado de dos características importantes: primero, existen pasos de la glucólisis que pueden ser catalizados por diferentes enzimas y segundo, como se mencionó anteriormente muchos tejidos pueden incluir en el plástido algunas de las enzimas glucolíticas y mediante el uso de transportadores de membrana proporcionar un intercambio de los intermediarios con el citosol.

Es aceptado de manera general, que la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato por la fosfofructoquinasa (PFK) y fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato mediante la piruvato cinasa (PK) son los primeros pasos para la regulación, aunque análisis del control del flujo sugieren que otros pasos son importantes, como el mediado por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) una enzima citosólica que convierte el PEP de la glucólisis en oxaloacetato (OAA). Así el PEP puede tener dos destinos diferentes: (Fig. 8) la formación de piruvato o la síntesis de OAA.

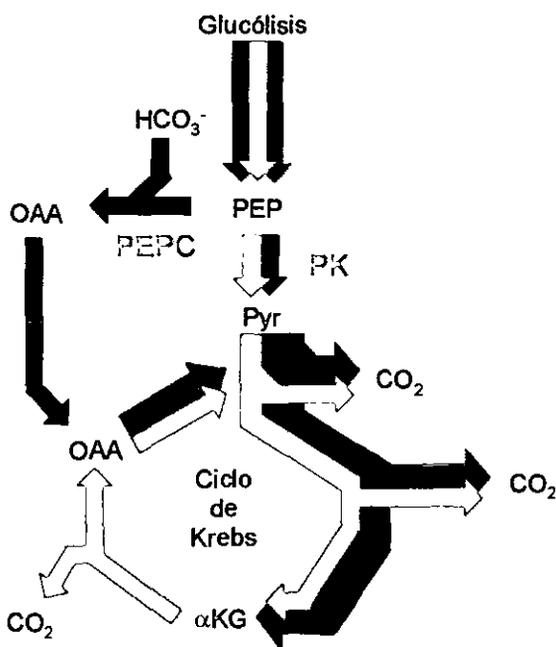


Figura 8 Representación esquemática de la estequiometría requerida para mantener la actividad catabólica (□) o anabólica (■). En esta figura se ilustra la reacción anaplerótica de la PEPC para reemplazar el OAA de los intermediarios del ciclo de Krebs durante la biosíntesis y la reacción catalizada por la PK la cual compete con la PEPC por su sustrato. (Tomado de Dennis and Turpin, 1997).

En las células animales, la PFK es la principal enzima responsable de controlar el flujo de carbono para la glucólisis. Esta enzima es regulada por el estado energético de la célula por los niveles de ATP y ADP o AMP, es activada por fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6-bP) y esta indirectamente bajo control hormonal. De la misma forma, el producto de la reacción, fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6-bP), activa a la PK, permitiendo esta activación de la PFK impulsar la ruta de la glucólisis hacia delante. En contraste, la PK de las plantas no es afectada por la F1,6-BP, y por lo tanto la activación de la PFK no puede tener el mismo impacto en la ruta (Fig. 9)

En las células de las plantas el control es mucho más complejo por la presencia de isoenzimas de la PFK presentes en el plástido y en el citosol. La enzima plastidial proporciona carbono de la poza de hexosas fosfato hacia la poza de pentosas fosfato/triosas fosfato en el organelo, mientras que la enzima citosólica lleva a cabo esta función en el citoplasma. De las dos enzimas, la forma plastidial es altamente regulada y es similar a la enzima de bacterias (Garland and Dennis, 1980). Ambas isoenzimas son fuertemente inhibidas por PEP o por metabolitos relacionados como es gliceraldehído 3-fosfato (Garland and Dennis, 1980), sugiriendo que la ruta es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa (Fig. 9). Esta retroalimentación negativa puede involucrar al TPT permitiendo al metabolismo del plástido interactuar con el que existe en el citosol.

En contraste a los efectos del PEP, el fosfato inorgánico es un poderoso activador de ambas isoenzimas de la PFK. Así se ilustra el papel central del transportador de triosas fosfato en el metabolismo de las plantas. Altas concentraciones de fosfato en un compartimento indican que las triosas fosfato fueron transportadas fuera de este, señalando una necesidad de rellenar la poza de triosas fosfato. En cloroplastos, la poza

de triosas fosfato puede ser rellenada por la fotosíntesis. En plástidos no fotosintéticos y durante la oscuridad, esta función es realizada por la ruptura del almidón y la glucólisis.

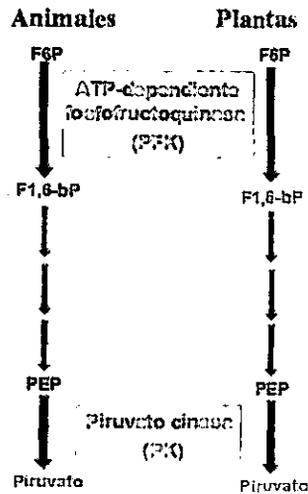
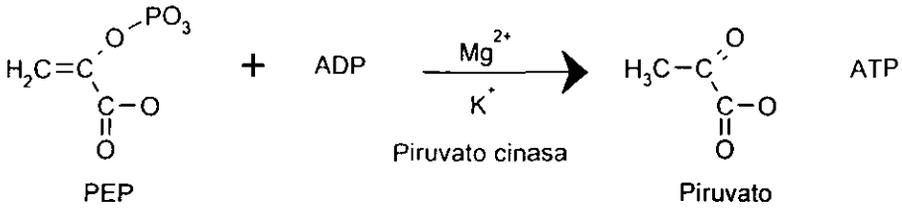


Figura 9 Regulación de la glucólisis en células de plantas y animales. En animales esta es una regulación de arriba hacia abajo por la activación de la PK por la fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6bP). Esta activación no ocurre en plantas. En lugar de eso, se da una regulación del abajo hacia arriba debido a la inhibición de la PKF por PEP. (Tomado de Buchanan Gruissem and Jones, 2000).

La piruvato cinasa (PK, EC 2.7.1.40) que cataliza la formación irreversible de piruvato a partir del fosfoenolpiruvato con la concomitante síntesis de ATP del ADP es uno de los pasos de conservación de energía y uno de los caminos que puede seguir el PEP (esquema 2).

Esquema 2. Reacción catalizada por la enzima Piruvato cinasa (E.C. 2.7.1.40).



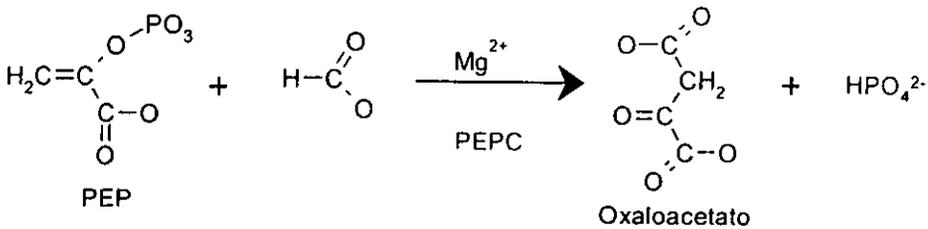
En todos los eucariotes la PK se halla en el citosol, pero en las plantas, la PK también se localiza en los plástidos. Tanto la enzima plastidial como la citosólica han sido aisladas (Ireland *et al.*, 1980). La PK citosólica y la plastidial difieren significativamente en su peso molecular y características cinéticas y son proteínas no relacionadas inmunológicamente (Gottlob *et al.*, 1992). De ahí que un factor importante en el control de la partición de carbono en la glucólisis sea el hecho de la ramificación de la ruta al nivel de fosfoenolpiruvato (figura 8).

La enzima citosólica en algunos tejidos de plantas es un homotetrámero con una subunidad aproximada a 55kDa (Plaxton, 1996). En otros casos se ha reportado que la enzima puede ser un heterotetrámero (Plaxton, 1996). El homotetrámero de semillas de ricino ha sido purificado y hay evidencias substanciales que indican que esta enzima es el sitio de control primario del flujo glucolítico en el citosol de las plantas, ya que es inhibida por una gran variedad de productos finales del metabolismo como ATP, AMP, isocitrato, 2-oxoglutarato, malato, 2 fosfoglicerato, 2,3-bifosfoglicerato, 3 fosfoglicerato, glicerol-3-fosfato, oxalato, citrato y fosfoglicolato (Podesta and Plaxton, 1994) aunque no se han encontrado activadores para esta enzima (Hu and Plaxton, 1996). Por otro lado, en otros tejidos la enzima está regulada por los productos finales de la biosíntesis de aminoácidos como son glutamato y glutamina (Podesta and Plaxton 1994).

Se ha sugerido que la forma plastidial de la PK provee ATP para la biosíntesis dentro del organelo. Esto es sustentado por la observación que la forma plastidial se incrementa con relación a la citosólica durante el desarrollo de las semillas en crucíferas (Sangwan *et al.*, 1992). En semillas oleaginosas una gran actividad de síntesis de ácidos grasos ocurre en el plástido durante el desarrollo, un proceso que requiere una gran cantidad de ATP.

Como ya se ha mencionado la PEPC (EC 4.1.1.31) cataliza la β -carboxilación irreversible de PEP a OAA y P_i en presencia de HCO_3^- y requiere Mg^{2+} para su actividad (Bandurski, 1955; esquema 3).

Esquema 3. Reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31)



El OAA producido por la PEPC es reducido a malato por la malato deshidrogenasa citosólica (MDH) e importado dentro de la mitocondria donde entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) también conocido como el ciclo de Krebs. De esta manera la PEPC cumple un papel muy importante reponiendo los intermediarios del TCA para realizar funciones que se denominan como anapleróticas (rellenar, del griego: *ana*, hasta arriba y

plerotikos, llenar), lo que a su vez resulta fundamental para la formación *de novo* de numerosos aminoácidos (Quy *et al.*, 1991). Así, la enzima juega un papel central en la regulación de la partición del carbono hacia los diferentes compuestos de reserva en las semillas.

La PEPC está plenamente distribuida en plantas y microorganismos, teniendo un papel crucial en el metabolismo del carbono y nitrógeno (Latzko and Kelly 1983). En plantas C4 y CAM es importante en la generación de NADPH, la regulación del pH y la electroneutralidad, además de realizar funciones de fijación de CO₂ atmosférico durante la fotosíntesis, (Andreo *et al.* 1987). La enzima es un tetramero, compuesto por subunidades de 100 a 110 kDa y varias isoformas pueden ser detectadas en plantas C4 y CAM; además, 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 alostericos regulatorios diferentes al sitio activo (Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Mendez *et al.*, 1997, 1998). A pH fisiológico la PEPC es activada por su substrato Mg-PEP (Tovar-Méndez *et al.*, 1998), azúcares fosforilados (Coombs *et al.*, 1973; Wong and Davies, 1973) y aminoácidos neutros (Nishikido and Takanashi, 1973; Bandarian *et al.*, 1992), y es inhibida por ácidos dicarboxílicos (Huber and Edwards, 1975). La enzima también es controlada por fosforilación en un residuo de Ser en la posición N-terminal (Jio and Chollet, 1988) que causa una reducción en la sensibilidad a los ácidos dicarboxílicos (Jiao and Chollet, 1988; Echeverría *et al.*, 1994) y un incremento en la afinidad por PEP (Duff *et al.*, 1995) o Mg-PEP (Tovar-Mendez *et al.*, 1998).

La PEPC está presente en semillas de diferentes especies (Hedley *et al.*, 1975; Flinn 1985; Smith *et al.*, 1989; Sangwan *et al.*, 1992; González *et al.*, 1998) siendo importante en la biosíntesis de aminoácidos. La enorme correlación encontrada entre actividad PEPC y la concentración de las proteínas de reserva en la semillas de soya (Sugimoto *et al* 1989) indican que la PEPC podría ser el paso limitante en la acumulación de proteínas.

Por otro lado, estudios en plástidos aislados de semillas de ricino (Smith *et al.*, 1992) indican que la sacarosa que es importada a las células del endospermo se metaboliza hasta PEP en el citosol, y aquí, puede tener dos destinos: la PK puede catalizar su conversión a piruvato y atravesar al plástido, o bien, puede ser carboxilado por la PEPC a OAA y, con la acción de la MDH, convertirse en malato y cruzar la membrana del plástido. De esta manera estos autores (Smith *et al.*, 1992) sugieren que el malato proporciona "*in vivo*" carbono y poder reductor para la síntesis de ácidos grasos durante el desarrollo de la semilla (figura 10).

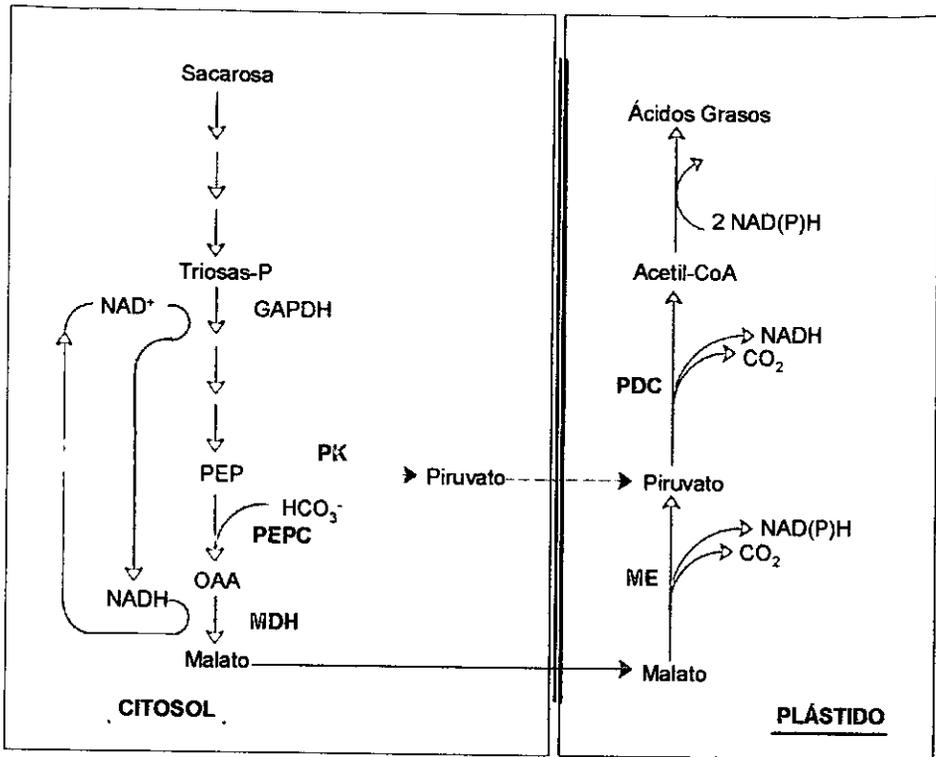


Figura 10 Modelo Propuesto para la utilización del malato y el piruvato durante la síntesis de ácidos grasos en endospermo de semillas de ricino. Las abreviaciones empleadas para las enzimas son las siguientes PK: piruvato cinasa; PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH: malato deshidrogenasa; ME: Enzima málico; PDC: Complejo piruvato deshidrogenasa. (Tomado de Smith *et al.*, 1992).

Ya se ha mencionado algo acerca de la participación de la glucólisis y del TCA en la regulación del metabolismo de carbono. Sin embargo, existen otras rutas como la vía de síntesis de almidón que participan de manera importante en el metabolismo de las semillas en desarrollo.

En la síntesis del almidón, (Fig 11) la sacarosa es transportada a la semilla desde la planta donde es convertida a fructosa y uridil difosfoglucosa (UDPGlu) por la sacarosa-UDP-glucosiltransferasa (Sacarosa sintetasa) La fructosa es fosforilada a fructosa-6-P por la Hexoquinasa, que es convertida a glucosa-6-P por la Hexosa fosfato isomerasa mientras que la UDPGlu se convierte a Glucosa-1-P y esta, por la acción de una Mutasa, a glucosa -6-P.

Estos pasos en la biosíntesis del almidón son completados en el citoplasma y tiene el propósito de convertir la sacarosa en hexosas fosfato. La Glucosa-6-P ahora puede entrar al plástido para completar la síntesis del almidón, En la membrana del amiloplastido, se encuentra un intercambiador que es utilizado para introducir la Glucosa-6-P a cambio de P_i. La glucosa 6-P es isomerizada a Glucosa-1-P y, posteriormente, convertida a ADPGlu por la ADPGlu-pirofosforilasa. (EC 2.7.7.27).

Poco se ha observado acerca de la regulación de la síntesis del almidón en células no fotosintéticas. Pero se conoce que la ADPGlu-pirofosforilasa de muchos tejidos es inhibida por fosfato mientras que es activada por 3-fosfoglicerato. (Preiss, 1991). Sin embargo, algunas observaciones indican que otras reacciones de la vía de síntesis pueden contribuir en la regulación (Smith *et al.*, 1995), en virtud de que en las espigas de trigo en desarrollo se da una disminución de la actividad de la enzima almidón sintetasa, acompañado por una reducción proporcional de la síntesis de almidón.

Considerando la relativa contribución de cada paso en la síntesis del almidón la regulación de la ruta puede ser complicada debido a que las plantas contiene múltiples formas de ADPGlu-pirofosforilas, almidón sintetasa y enzimas ramificantes que difieren

en sus propiedades moleculares y cinéticas. Se plantea que esta diversidad responde a las diferencias entre especies respecto a las características fisicoquímicas y no moleculares que se observan en el almidón de diversos orígenes (Bewley and Black, 1994).

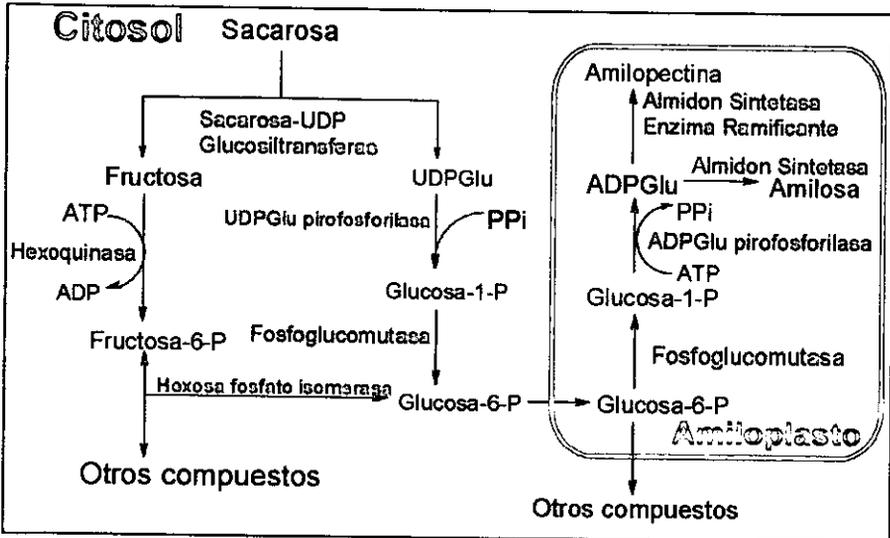


Figura 11 Esquema de la síntesis de almidón a partir de sacarosa en sistemas vegetales, mostrando los compartimentos involucrados. (Tomado de Bewley and Black, 1994).

4.2.2 Síntesis de Proteínas

Las proteínas de reserva como ya se mencionó anteriormente son sintetizadas en los ribosomas estrechamente asociados con el RE y su síntesis 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 síntesis de nuevas proteínas, éstas atraviesan la membrana del RE donde, por su naturaleza hidrofóbica, se agregan en pequeñas partículas. El paso a través de la membrana es facilitado por un péptido hidrofóbico que actúa como una señal presente en el amino terminal de la proteína naciente, sin embargo al mismo tiempo que se transloca la proteína, esta señal es removida por una actividad proteolítica presente en la cara interna de la membrana del RER (Fig. 12).

Además de la remoción del péptido señal, las proteínas de reserva sufren en su paso a través del RE y el aparato de Golgi, una serie de modificaciones que incluyen cortes proteolíticos y glucosilaciones. Finalmente son enviadas a su destino final en vesículas lisas o en vesículas cubiertas de clatrina, las cuales se fusionan con vacuolas especializadas que más tarde se convierten en cuerpos proteicos (Bewley and Black, 1994).

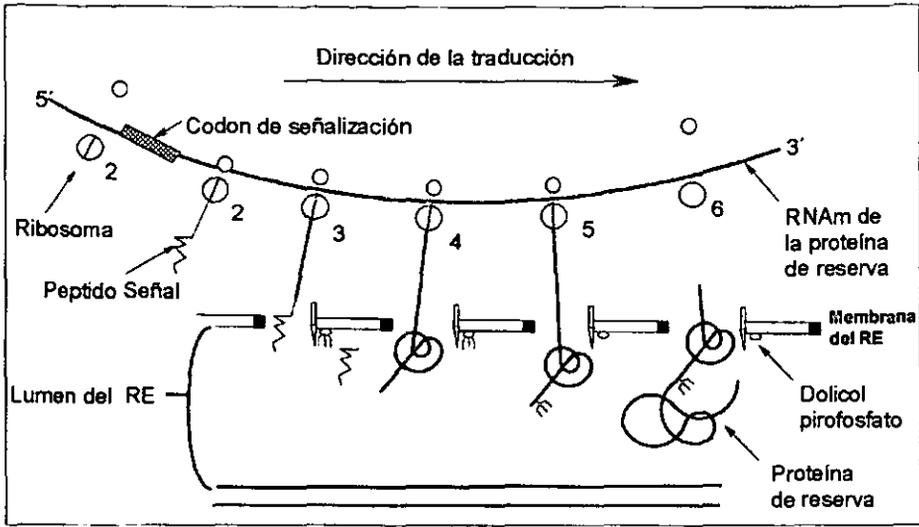


Figura 12 Síntesis de proteínas de reserva. En el que se muestra una representación simplificada del paso de las proteínas de reserva a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER). Un péptido señal se une al amino terminal (2,3) de la proteína nascente. Posteriormente una actividad peptidasa localizada en la cara interna de la membrana del RER libera el péptido señal (4). El proceso de traducción continúa (5). Al final algunas proteínas sufren glucosilaciones en el interior del RER por la transferencia de un oligosacárido del dolicol pirofosfato (6). (Tomado de Bewley and Black, 1994).

En el endospermo de maíz, diferentes clases de prolaminas (zeínas) son depositadas dentro de los cuerpos proteicos en el momento en que este se desarrolla. Encontrándose que en los cuerpos proteicos recién formados solo las β y γ -zeínas están presentes, pero más tarde en el interior de los cuerpos proteicos estos se llenan con α -zeínas, y las β y γ -zeínas son desplazadas para formar una capa fina alrededor de la periferia de los cuerpos proteicos cuando se acerca el final de la maduración. Encontrado solo una pequeña cantidad de β y γ -zeínas embebidas con α -zeínas en el interior de los cuerpos proteicos maduros.

4.2.3 Biosíntesis de Lípidos

La síntesis de TAG (Fig. 13) en plantas se da a través de la ruta de Kennedy (Kennedy 1961), ésta se puede dividir en tres partes: producción del esqueleto del glicerol; formación de ácidos grasos y esterificación del glicerol para dar origen a los TAG (Bewley & Black, 1994).

Dos alternativas rutas han sido planteadas para la síntesis del glicerol-3-fosfato (G3P). Por un lado, este puede ser formado por la oxido-reducción de dihidroxiacetona fosfato con el consumo de NADH. La dihidroxiacetona fosfato reductasa esta presente tanto en el plástido como en el citosol. La otro ruta involucra la fosforilación directa del glicerol por la acción de una glicerol cinasa (Gurr, 1980).

El acetil-CoA es el precursor de la síntesis de ácidos grasos. El plástido como la mitocondria pueden sintetizar acetil-CoA, ya que contienen una piruvato deshidrogenasa que oxida el piruvato a acetil-CoA, acompañado por la reducción de NAD. Por otro lado el plástido cuenta con una actividad de acetil-CoA sintetasa dependiente de ATP y que utiliza acetato para la síntesis de acetil-CoA. El origen del acetato no esta claro, pero puede ser formado a partir del piruvato por la piruvato deshidrogenasa mitocondrial o también puede formarse a través del citrato por una citrato liasa.

La formación de los ácidos grasos se inicia en los plástidos con la síntesis de malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa. En la carboxilación de acetil-CoA la biotina actúa como un aceptor transitorio del HCO_3^- . La biotina está unida covalentemente por el grupo carboxilo al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la acetil-CoA carboxilasa (E.C. 6.4.1.2). El malonilo posteriormente es transferido de la CoA a la proteína acarreadora de acilo (ACP) que es una proteína ácida pequeña (9 KDa) que contiene un grupo prostético (fosfopanteína) para formar maloni-ACP. Esta reacción está catalizada por una malonil-CoA-ACP transacilasa específica. Entonces se da un acoplamiento irreversible del grupo acetilo del acetil-CoA al $\text{C}\beta$ del grupo malonilo del malonil-ACP por medio de la β -cetoacil-ACP sintetasa III para formar el acetoacetil -ACP con la liberación de CO_2 . Por dos pasos de reducción, usando NADPH y NADH y una deshidratación, el acetoacetil-ACP es convertido a butiril-ACP (un acil C4 completamente reducido). La condensación del butiril-ACP con otra molécula de malonil-ACP, seguido de una reducción resulta en un acil-ACP de 6C. Esta secuencial adición de 2C unidades continua hasta alcanzar 16C (16:0 palmitoil-ACP) o 18C (18:0 estearil-ACP). El ácido palmítico o esteárico pueden ser liberados o el estearil-ACP puede ser desaturado a oleoil-ACP siendo liberado el ácido oleico (18:1).

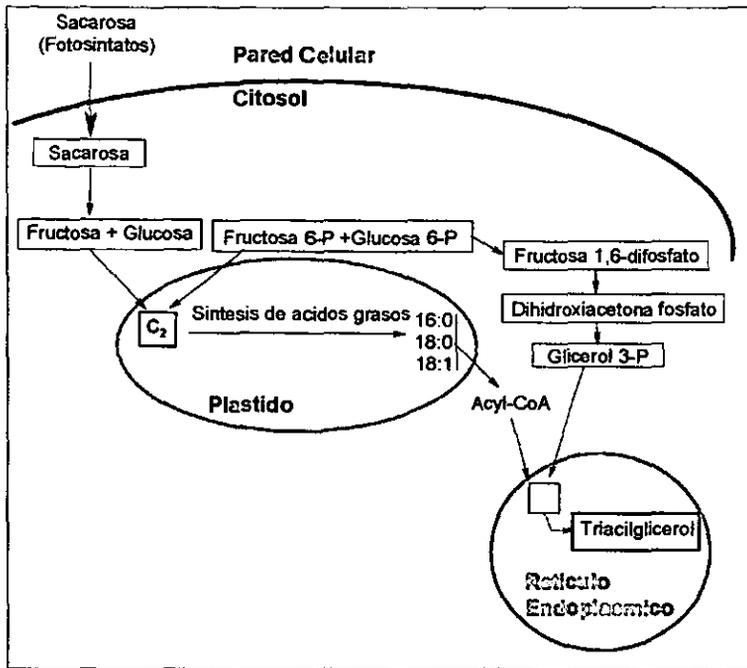


Figura 13 Biosíntesis de triacilglicérol a partir de sacarosa. Se muestran los compartimentos celulares involucrados. (Tomado de Stump, 1990)

El último paso en la síntesis de triacilglicérol se da en el RE y comienza con la formación del ácido fosfatídico (fosfatidato;sn-1,2 diacilglicérol 3-fosfato) a partir del glicerol fosfato y dos ácidos grasos con la participación de dos enzimas (Yamashita *et al.*, 1972; Tamai and Lands, 1974). La primera enzima una glicerol-fosfato aciltransferasa (GPAT, E.C.2.3.1.15), conduce la acilación del *sn*-glicerol 3-fosfato a la posición *sn*-1 para formar el ácido lisofosfatídico. En algunas plantas este primera acilación usualmente ocurre a velocidades mucho menores que el segundo paso de acilación (Bafor *et al.*, 1990). El ácido lisofosfatídico es el sustrato para la segunda enzima, 1-acilglicerol 3-fosfato aciltransferasa (LPAAT, E.C. 2.3.1.51), que completa la acilación a la posición *sn*-2 con la formación del ácido fosfatídico. La selectividad por el sustrato de las

aciltransferasas a sido estudiado en muchos casos y se ha observado que tiene una gran influencia en la calidad de TAG acumulados (Frentzen and Wolter, 1998; Knutzon and Knauf, 1998).

La enzima fosfatidasa (fosfatidato fosfatasa. E.C.3.1.3.4) cataliza la ruptura del ácido fosfatídico para producir el diacilglicerol y el fosfato inorgánico. La enzima fosfatidasa en semillas oleaginosas es una enzima ligada a la membrana y está localizada en la misma fracción microsomal que contiene todas las otras enzimas involucradas en la síntesis de TAG a partir del glicerol fosfato y acil-CoA (Barron and Stumpf, 1962; Stymne *et al.*, 1983; Ichihara, 1984).

El ultimo paso en la biosíntesis de los TAG es la acilación del 1,2-diacilglicerol en la posición *sn*-3 y ésta es catalizada por una diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT, E.C. 2.3.1.20) en numerosos reportes se ha sugerido que la DAGAT puede ser una enzima que limite la velocidad para la acumulación de TAG (Griffiths *et al.*, 1988, Ichihara *et al.*, 1988; Griffiths and Harwood, 1991). Las evidencias bioquímicas, no indican alguna participación del plástido en el ensamblaje de los TAG en semillas ricas en aceites (Cao and Huang, 1986).

4.2.4 El ácido abscísico y el potencial osmótico

Cuando el embrión es extraído de la semilla en desarrollo el crecimiento embriogenético es detenido y ello puede permitir que ocurra un crecimiento precoz de tipo germinativo (desarrollo de la planta). Esto implica que en las semillas intactas existen

ciertos factores que permiten suprimir la germinación. El ácido abscísico (ABA, Fig.14) es una hormona que ha sido directamente implicada como un inhibidor de la germinación precoz (Kornnef *et al.*, 1984; Walker-Simmons, 1987; Groot and Karssen, 1992; Balsevich *et al.*, 1994), así como en la estimulación de la acumulación de reservas debido a la observación de que en muchas especies (ejemplo trigo, calabaza soya) cuando se presenta una elevada acumulación de reservas al tiempo que se observa un alto contenido de ABA (Ackerson, 1994; King, 1976, 1982; Quebedeaux *et al.*, 1976).

El ABA puede estar presente en una gran variedad de semillas inmaduras, tales como en los cotiledones de soya (Schussler *et al.*, 1987), haba (Dathe and Sembdner, 1984), en el embrión y endospermo de maíz (Jones *et al.*, 1987). Sin embargo, se encuentra en mayor concentración en los ejes embrionarios de soya (Hein *et al.*, 1984) y maíz (Jones *et al.*, 1987).

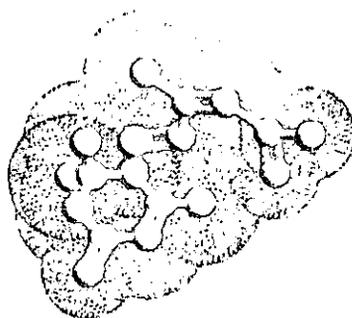
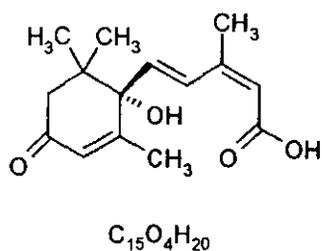


Figura 14 Estructura de la fitohormona conocida como ácido abscísico (ABA) (ácido 2-*cis*,4-*trans* abscísico; o ácido [S]-5-[1-hidroxi-2,6,6-trimetil-4-oxociclohexa-2-en-1-*o*]-3-metil-[2Z,4E]-pentadienoico). El compuesto natural y activo es el isómero (+)-S-ABA.

La concentración de ABA en los tejidos está determinada por el balance entre la biosíntesis y la degradación, mientras que su distribución al parecer depende de la diferencia de pH entre la cubierta de la semilla y el embrión (Black *et al.*, 1991). 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 un nivel máximo 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 and Brenner, 1987).

Dado que las células vegetales responden naturalmente a los cambios en el potencial osmótico, se presume que este factor participa también en la regulación del metabolismo del embrión en desarrollo (Kermode 1995). Esto se manifiesta, cuando la germinación es detenida en embriones inmaduros debido a un bajo potencial osmótico y en ausencia de ABA (Finkilstein and Croch 1987; Obendorf and Wattlaufer 1984; Kermode 1990). Se cree que el ABA y un bajo potencial osmótico no necesariamente actúan por el mismo mecanismo, pero ambos posiblemente actúan previniendo la entrada de agua, el bajo potencial osmótico por reducir el gradiente de potencial de agua y el ABA posiblemente por prevenir la distensión de la pared celular (Schopfer and Plachy 1985).

Está claro que muchos procesos o características típicas de las semillas en desarrollo, como los relacionados con la acumulación de reservas en el embrión y el endospermo (Bewley and Black) son regulados por ABA y/o el potencial osmótico (Kermode 1990; Kríver and Mundy 1990). Por ejemplo, se ha demostrado que tanto el ABA como un bajo potencial osmótico inducen y mantiene la capacidad de los embriones aislados de las semillas de trigo (Rodríguez-Sotres and Black, 1994) y maíz (Pacheco-Mosiés, *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 aciltransferesas del retículo

endoplásmico, responsables de este proceso, sin que se halla demostrado que la mayor actividad este ligada a una expresión incrementada de los genes correspondientes (Pacheco-Moisés *et al.*, 1997). Sin embargo, aunque los mecanismos para conocer los efectos del ABA o el potencial osmótico han recibido considerable atención existe poca información acerca de cómo estos factores regulan la expresión de genes y, quizá algunos eventos metabólicos.

4.2.5 La germinación de la semilla

La dispersión de las semillas es el método mas extensamente utilizado en la agricultura debido a su gran eficiencia. La germinación de las semillas puede ser definida como una serie de eventos que tienen lugar cuando la semilla seca es embebida en agua resultando en un incremento de la actividad metabólica y en la iniciación de la elongación del eje embrionario.

La germinación de las semillas ha sido dividida en cuatro eventos: la imbibición en agua, formación o activación de los sistemas enzimáticos, transporte y síntesis de nuevos materiales a partir de los componentes de reserva y la aparición de la radícula con el eventual crecimiento de la planta.

La germinación de la semilla se inicia con una rápida absorción de agua durante la primera parte de la imbibición, que es independiente de la actividad metabólica, pero depende de las condiciones exteriores como es la textura y composición de la semilla y el grado de compactación y humedad en el suelo. Una rápida captación de agua se produce

debido al potencial osmótico negativo (concentración de solutos) de las células de la semilla y a la que se opone la presión de la pared celular que es positiva. Posteriormente, una segunda captación de agua junto con la emergencia y la elongación de la radícula da como resultado de la división celular (Bewley and Black 1985). Esto es fomentado por la disminución en el potencial osmótico de las semillas debido a la hidrólisis de las reservas almacenadas. Durante esta fase grasas, proteínas, carbohidratos, compuestos con fósforo y otros materiales de reserva en el endospermo y escutelo son transformadas en sustancias químicas simples, que se transportan a los puntos de crecimiento del eje embrionario, en donde se sintetizan nuevos compuestos para apoyar a la germinación de la semilla.

Cabe mencionar que durante el proceso de la germinación numerosas enzimas como lipasas, proteasas, fosfatasas, hidrolasas, carboxipeptidasas y otras enzimas son activadas o sintetizadas *de novo* (Mayer and Poljakoff-Mayber 1989; Bernier and Ballance 1993; Bewley and Black 1985; Bernhardt *et al.*, 1993, Cocucci and Negrini 1991; Washio and Ishikawa 1992). Es decir, en algunos casos se da la activación de las enzimas preexistentes que acompaña a la hidratación de las semillas o en otros, la síntesis *de novo* es producto de la traducción de los RNA mensajeros presentes o recién sintetizados. Además, evidencias experimentales sugieren que el proceso de síntesis o de activación de estas enzimas esta regulado por sustancias que actúa como promotores o inhibidores de crecimiento (Bewley and Black 1985, Lewak 1985, Lalonde and Saini 1992, Sharma *et al.*, 1992; Whitehead and Nelson 1992; Cocucci and Negrini 1991; Kovac *et al.*, 1993; Ni and Bradford 1993; Gallego *et al.*, 1991; Kermodé *et al.*, 1992;).

5. Hipótesis

Los embriones inmaduros de maíz utilizarán mas eficientemente el acetato para la síntesis de lípidos como el en la síntesis de proteínas.

6. Objetivos

6.1 Generales

- ❖ Conocer el patrón de partición de carbono en las semillas inmaduras de maíz cuando se utiliza el malato o el acetato como precursores para la síntesis de lípidos y proteínas, y observar como los cambios metabólicos que ocurren en los embriones por la adición de ácido abscísico y un bajo potencial osmótico se relacionan con esta partición.

6.2 Particulares

- ❖ Conocer si el malato es un donador importante de esqueletos carbonados en la biosíntesis "*in vivo*" de lípidos.

5. Hipótesis

Los embriones inmaduros de maíz utilizarán mas eficientemente el acetato para la síntesis de lípidos como el en la síntesis de proteínas.

6. Objetivos

6.1 Generales

- ❖ Conocer el patrón de partición de carbono en las semillas inmaduras de maíz cuando se utiliza el malato o el acetato como precursores para la síntesis de lípidos y proteínas, y observar como los cambios metabólicos que ocurren en los embriones por la adición de ácido abscísico y un bajo potencial osmótico se relacionan con esta partición.

6.2 Particulares

- ❖ Conocer si el malato es un donador importante de esqueletos carbonados en la biosíntesis "*in vivo*" de lípidos.

- ❖ Determinar si el ácido abscísico y un potencial osmótico negativo modifican la utilización de malato como una fuente de carbono durante la síntesis de lípidos y/o proteínas

- ❖ Determinar si los protoplastos del embrión de maíz inmaduro aislados son metabólicamente funcionales

- ❖ Conocer si el acetato es un buen precursor de carbono en la síntesis de proteínas en los embriones inmaduros del maíz

- ❖ Obtener mayor conocimiento sobre el papel que juegan el ABA y un bajo potencial osmótico en la acumulación de reservas en los embriones inmaduros de maíz

- ❖ Establecer las posibles correlaciones y diferencias de los conocimientos que se tienen, de cómo se está dando la partición del carbono disponible en las semillas inmaduras hacia la biosíntesis de los lípidos y proteínas

7. Materiales y Métodos

7.1 Materiales

7.1.1 Material biológico

Se emplearon embriones de Maíz (*Zea mays*) recién aislados de las semillas frescas e inmaduras de maíz.

7.1.2 Equipos

Balanza analítica, Ohaus
Cámara de agitación con temperatura controlada, Lab Line Instruments
Congelador de -20°C , Nieto
Congelador de -70°C , Forma Scientific
Densitómetro de fosforescencia inducida, Storm, Molecular Dynamics
Microscopio optico, Olimpus
Micro osmometro, Micro-Osmette Precision system, Natick, Mass. USA
Parrilla con agitación magnética, Thermolyne
Potenciómetro, Conductronic
Refrigerador a 4°C , America
Vortex, Thermoline

7.1.3 Reactivos

Ácido acético $-1\text{-}[^{14}\text{C}]$, Amersham Pharmacia Biotech
Ácido acético, Merck, o J.T. Baker.
Ácido L-málico $-U\text{-}[^{14}\text{C}]$ (sal de sodio), Amersham Pharmacia Biotech
Ácido L-málico, Sigma Chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Ácido Abscísico (ABA), Sigma chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Ácido clorhídrico, Merck
Alcohol 96% Grado técnico, Merck
Alcohol absoluto, Merck
Arginina, Sigma Chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Albúmina sérica bovina (BSA), Boehringer Mannheim
Celulasa Onozuka R-10, Yakult Honsha Co.
Cloroformo, J.T. Baker R.A.
Cloruro de sodio, J.T. Baker R.A.
Éter etílico, J.T. Baker R.A.
Glucosa, Sigma chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Hidróxido de sodio, Reactivos Monterrey QP.
Hidróxido de potasio, J.T. Baker R.A.

Hexanos, J. T. Baker R A
Macerozyme, Yakult Honsha Co.
Manitol, Merck Purísimo
Metanol, Merck Q.P.
Ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico), (MES) Reserch Organies Inc.
Nitrógeno gaseoso 99.99%, Infra de México.
PEG (Polietilenglicol 6000), Sigma Chemical Co., San Louis Missouri, USA.
PVP-40, Sigma Chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Sacarosa, J.T. Baker
Dodecil sulfato de sodio (SDS), Merk Purísimo.
Sulfato de zinc, Reactivos Monterrey QP.
Urea, Sigma Chemical Co., San Louis Missouri, USA.
Xilanasa de *Trichoderma Viride*, Fluka Biochemika.

7.2 Métodos

7.2.1 Aislamiento e incubación de los embriones

La extracción de los embriones se realizó en condiciones estériles para lo cual la mazorca se sumergió durante 15 minutos en una solución 16 % de polietilen glicol 6 000 (PEG) conteniendo hipoclorito de sodio al 1 %; posteriormente, se lavó el elote con una solución estéril de PEG 16 % para eliminar el hipoclorito de sodio. Los embriones se extrajeron de las semillas con una espátula, dentro de una campana de flujo laminar y se les depositó en una solución conteniendo: ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico)-KOH (MES) 10 mM, pH 5.5; sacarosa 30mM, 500 mM de manitol y ácido Abscísico (ABA) 10 μ M; tras lo cual, con el fin de estandarizar el estado fisiológico de los mismos, se les incubó con agitación (50 rpm) por 48 horas a 25 °C (cambiando el medio cada 24 h). Posteriormente, lotes de 5 a 8 embriones se incubaron por 24 horas a 25 °C y 50 rpm en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 2.5 mL de un medio conteniendo alguna de las siguientes mezclas de reactivos:

Medio I BSMA	Medio MES KOH 10 mM, pH 5.5, sacarosa 30 mM, manitol 500 mOsmoles, ABA 10 μ M
Medio II BS	Medio MES KOH 10 mM, pH 5.5, sacarosa 30 mM,

Se prepararon 8 matraces de los cuales 4 contenían el medio BSMA y los restantes el medio BS. Después de las 24 horas de preincubación dos matraces provenientes de cada tratamiento fueron incubados con 5 μ L de acetato-[¹⁴C] (1mCi) y los dos restantes con 5 μ L de malato-[¹⁴C] (1mCi) por 4 horas a una temperatura 25 °C y a 50 rpm. Pasado el tiempo de incubación con los precursores radiactivos los embriones fueron lavados con una solución 15 mM de acetato y 15 mM de malato no radiactivos. Los embriones así tratados fueron almacenaron a -70 °C para realizar posteriormente la extracción de lípidos y proteínas.

7.2.2 Extracción y separación de los lípidos

Los lípidos se extrajeron empleando la metodología reportada por Rodríguez-Sotres y Black (1993), en la cual, se homogeneizan los embriones con 1mL de metanol en un mortero a 4°C Una alícuota de 10 μ L se transfirió a un vial y se mezcló con 3mL de líquido de centelleo para determinar la radiactividad total incorporada, al volumen restante se le adicionaron 2 mL de metanol, 3 mL de cloroformo y 5mL de una solución acuosa

conteniendo 1 % de NaCl y 0.1 % de ZnSO₄. La mezcla se agitó y centrifugó por 10 minutos a 1 000 X g por 5 minutos, se eliminó la fase superior, se tomó una alícuota de la fase orgánica para conocer la cantidad de radiactividad incorporada a los lípidos totales y el resto de esta fase se empleó para separar los diferentes tipos de lípidos

Una alícuota de la solución clorofórmica recuperada se evaporó con nitrógeno y los lípidos se concentraron en un pequeño volumen el cual se aplicó a una placa de cromatografía de capa fina la cual se luyó en dos pasos; primero con una mezcla de cloroformo metano ácido acético agua (85:15:10:3.5) y una vez alcanzada la mitad de la placa se sacó de la cámara y se dejó evaporar el solvente. Mas tarde se corrió con una segunda mezcla conteniendo 70 partes de hexano, 30 partes de éter etílico y 1 parte de ácido acético. Después de evaporado el solvente, los diferentes tipos de lípidos fueron detectados por exposición de la placa durante 3 días en una pantalla de Europio y con la ayuda del densitómetro de fosforescencia inducida (Storm, Molecular Dynamics) se determinó la radiactividad incorporada en los lípidos. Se utilizó aceite de oliva disuelto en cloroformo como estándar y con ayuda de los vapores de yodo se determinó la localización de las diferentes clases de lípidos.

7.2.3 Extracción y cuantificación de proteína

Para extraer las proteínas, de los embriones se homogeneizaron estos siguiendo el método descrito por Pacheco-Moisés y *col.* (1997). Para ello, se emplearon 4 embriones que se homogeneizaron con ayuda de un mortero en una solución 0.1M Tris - HCl (pH7.4), 5 mM de ditiotreitól (DTT), 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.5% Tween 20, 0.15M NaCl y 2 M de urea. Se tomó una alícuota de 100 μ L para conocer la

radiactividad total incorporada, el resto del homogeneizado se centrifugó a 10 000Xg por 10 minutos y al sobrenadante se le adicionaron 25 mL de acetona con 0.1 % de HCl. La mezcla se agitó por 12 horas a 4 °C, la proteína fue recuperada por centrifugación a 10 000Xg 10 minutos, el sobrenadante se descartó y la proteína fue lavada con 15ml de éter para extraer los lípidos remanentes. El sedimento final se resuspendió en 1mL de medio para electroforesis que consta de 100mM Tris-HCl pH 6.8, 50 mM de ditiotreitól (DTT), 1% SDS, 0.2% Tween 20 y 2 M de urea. Una alícuota de 500 μ L de esta solución se depositó en un vial de centelleo con 3 mL de líquido de centelleo y se determinó la radiactividad de esta fracción.

7.2.4 Medio básico y enzimas digestivas

El medio básico de incubación contiene glucosa 2%(p/v), 10 mM de ácido (2-[N-morfolino]-etanosulfónico)-KOH (MES), pH 6.5; 10 mM de Arginina, 3 mM CaCl_2 y 0.5 % (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA). Las enzimas digestivas de la pared celular se emplearon a las concentraciones siguientes: 0.25 % (p/v) de Xilanasa, 2.0 % (p/v) Celulasa Onozuka R-10 y 0.25 % (p/v) Macerozyme R-10. El medio con las enzimas digestivas (mezcla de digestión) se centrifugó a 1 000 rpm por 5 min., el sobrenadante resultante se ajustó a una osmolaridad entre 850-900 mOsmoles con manitol (p.m. 182.17g/mol), para lo que se empleó un Osmómetro semiautomático Micro-Osmette (Presition system, Natick, Mass. USA).

7.2.5 Obtención de protoplastos

40 embriones recién aislados (aproximadamente 50 mg de peso fresco) se incubaron por 2 horas con agitación (50 rpm) en 10 mL del medio básico (850-900 mOsm.) a temperatura ambiente. Después, los embriones se picaron finamente con bisturí y los fragmentos se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en 10 mL de la mezcla de digestión, sin agitación. Al terminar los protoplastos se separaron del tejido remanente por filtración usando mallas con una abertura de poro de 100 μm y 15 μm de diámetro, respectivamente. En seguida, los protoplastos se concentraron por centrifugación (aproximadamente a 65 X g) durante 5 minutos y se les resuspendió en un volumen pequeño de medio básico a 850mOsm.

7.2.5 Incorporación de malato-[^{14}C] y acetato-[^{14}C] en los protoplastos.

Los protoplastos concentrados se tomaron con pipeta Pasteur en condiciones estériles y se repartieron en volúmenes iguales en dos tubos de ensayo con tapa. En uno de ellos se adicionaron 5 μL de acetato-[^{14}C] (1 mCi) y en el otro se colocan 5 μL de malato-[^{14}C] (1 mCi). Los dos tubos se incubaron sin agitación por 1 hora a 28 °C. Después del tiempo de incubación se lavaron con medio básico ajustado (850 mOsm.) conteniendo 10 mM del precursor no radiactivo. Los tubos se centrifugaron (65X g) y el sobrenadante se descartó, los protoplastos se resuspendieron en un volumen pequeño de medio básico ajustado (850 mOsm.) y una alícuota de cada muestra se depositó en un vial con 3 mL de líquido de centelleo y se cuantificó la incorporación tanto de acetato-[^{14}C] como de malato-[^{14}C] al interior de la célula mediante un contador de centelleo líquido.

El resto de las muestras se mezcló con 2 mL de cloroformo metanol 1:1 y con 200 μ L de solución acuosa de NaCl 0.15 M. Se recuperó la fase de cloroformo más pesada y se determinó la radioactividad incorporada a los lípidos.

Para cuantificar la proteína, 50 μ l de la suspensión de protoplastos se mezcló con una solución que contenía 0.1 M de Tris-HCl, pH7.4, 5 mM de DTT, 1 % de SDS, 0.5 % de Tween 20, 0.15 M de NaCl y 2 M de urea hasta alcanzar 0.5 mL. La mezcla se agitó y se le adicionó 1 mL de acetona con 0.1 % de HCl. La agitación se continuó por 12 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, la proteína fue colectada por centrifugación a 10 000 X g por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado, el sedimento fue lavado con 1.2 mL de éter para extraer los lípidos remanentes y el precipitado final fue suspendido en 1 mL de medio para electroforesis, el cual contenía: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50 mM DTT, 1 % SDS, 0.2 % Tween 20 y 2 M urea. La suspensión fue depositada en un vial de centelleo que contenía 3 mL de líquido de centelleo y se midió la radioactividad contenida en ella.

8. Resultados

Con el fin de determinar el aporte de carbono y el posible flujo de este a las diferentes reservas sintetizadas durante el desarrollo de los embriones inmaduros del maíz se evaluó la capacidad de estos para sintetizar lípidos y proteínas, alimentándolos con acetato-[14 C] o malato-[14 C].

El resto de las muestras se mezcló con 2 mL de cloroformo metanol 1:1 y con 200 μ L de solución acuosa de NaCl 0.15 M. Se recuperó la fase de cloroformo más pesada y se determinó la radioactividad incorporada a los lípidos.

Para cuantificar la proteína, 50 μ l de la suspensión de protoplastos se mezcló con una solución que contenía 0.1 M de Tris-HCl, pH7.4, 5 mM de DTT, 1 % de SDS, 0.5 % de Tween 20, 0.15 M de NaCl y 2 M de urea hasta alcanzar 0.5 mL. La mezcla se agitó y se le adicionó 1 mL de acetona con 0.1 % de HCl. La agitación se continuó por 12 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, la proteína fue colectada por centrifugación a 10 000 X g por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado, el sedimento fue lavado con 1.2 mL de éter para extraer los lípidos remanentes y el precipitado final fue suspendido en 1 mL de medio para electroforesis, el cual contenía: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50 mM DTT, 1 % SDS, 0.2 % Tween 20 y 2 M urea. La suspensión fue depositada en un vial de centelleo que contenía 3 mL de líquido de centelleo y se midió la radioactividad contenida en ella.

8. Resultados

Con el fin de determinar el aporte de carbono y el posible flujo de este a las diferentes reservas sintetizadas durante el desarrollo de los embriones inmaduros del maíz se evaluó la capacidad de estos para sintetizar lípidos y proteínas, alimentándolos con acetato- ^{14}C o malato- ^{14}C .

En la figura 1 se muestra la incorporación de los precursores radioactivos a los lípidos totales cuando los embriones se incuban en los diferentes tratamientos.

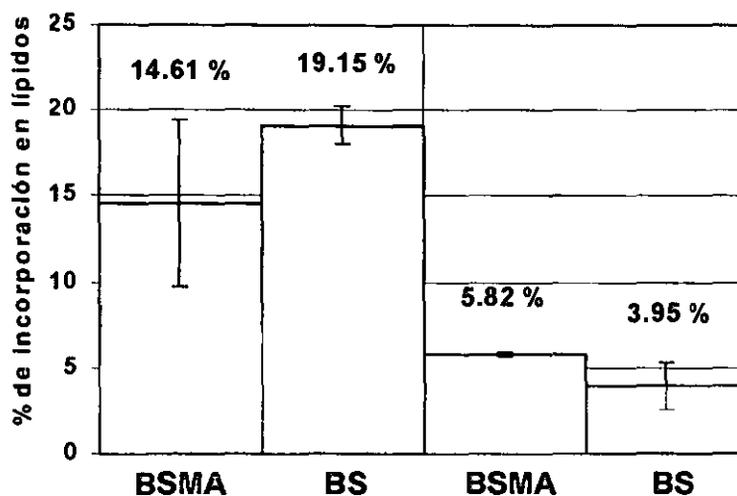


Figura 1 Incorporación de acetato-[¹⁴C] (□) y malato-[¹⁴C] (□) en los lípidos totales extraídos de embriones de maíz inmaduros. Los medios BS contiene MES-KOH 10 mM, pH 5.5, sacarosa 30 mM, y los BSMA manitol 500 mOsmoles, ABA 10 μM MES KOH 10 mM, pH 5.5, sacarosa 30 mM.

Los resultados de estos experimentos muestran claramente que la marca radiactiva proveniente del acetato-[¹⁴C] es incorporada en una mayor proporción la biosíntesis de lípidos; lo anterior es cierto tanto en los embriones que se mantuvieron en condiciones de desarrollo, por la adición de ABA y el mantenimiento de un bajo potencial osmótico (medio BSMA), como en los incubados en un medio diluido (medio BS) que, como se ha demostrado en numerosas semillas, lleva eventualmente al establecimiento de un patrón germinativo (Finkelstein and Somerville, 1989; Bewley and Black, 1994). Por el contrario, el malato-[¹⁴C] es empleado en menor proporción por los embriones para la

síntesis de lípidos por lo que la mayor parte de este precursor debe ser empleado para otras necesidades de la célula. Así la diferencia que existe de aproximadamente de 10 unidades porcentuales en la incorporación de acetato-[¹⁴C] en comparación al malato-[¹⁴C] en ambas condiciones de incubación. Indican que los mecanismos generales que determinan el destino final del carbono se mantienen operando independientemente de que el patrón de desarrollo se mantenga o se encamine hacia su salida germinativa.

Se investigó la distribución de la marca radioactiva en los diferentes tipos de lípidos por medio de la cromatografía en capa fina. La figura 2 muestra que el acetato se localiza preferentemente en los TAG, que son los principal lípidos de reserva para las semillas. Cuando se analizó la marca procedente del malato este mostraba un bajo porcentaje de incorporación en los TAG, confirmandose que este no es un buen precursor para la síntesis los lípidos durante la maduración o al tiempo que se daba la germinación y que su empleo en la síntesis de ácidos grasos es aún menos eficiente, ya que estos son precursores de glicerolípidos y los TAG son los glicerolípidos que se acumulan más rápidamente durante este periodo del desarrollo (Bewley and Black, 1994).

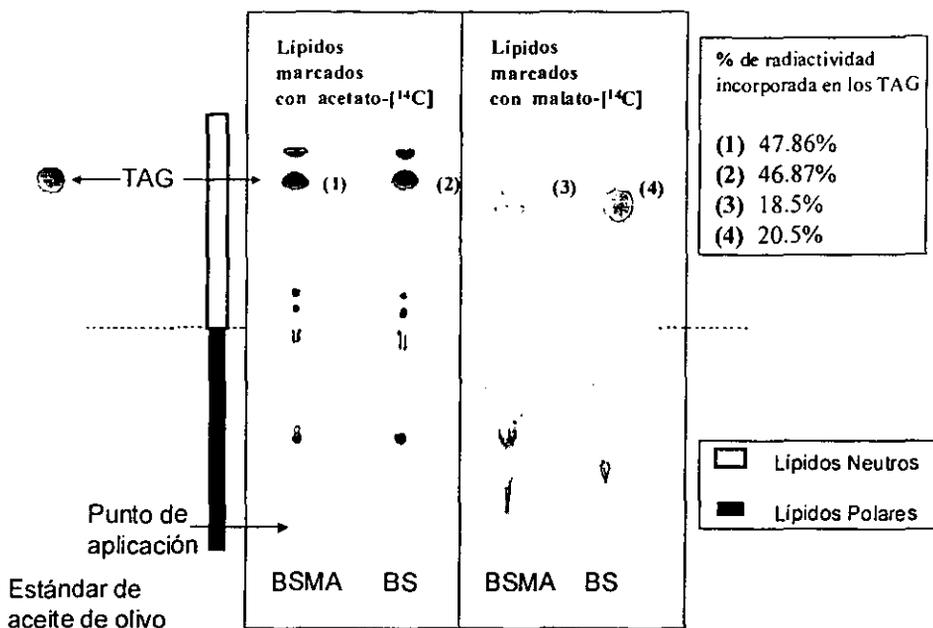


Figura 2. Cromatografía en capa fina de los lípidos extraídos revelada por autoradiografía. Para lograr obtener el mismo número de cuentas (~50000 CPM) la placa se sobrecargó en los carriles donde se aplicaron las muestras para los lípidos marcados con malato- ^{14}C causando el extraño patrón de corrimiento aquí presentado. Un estándar de aceite de oliva revelado con vapores de yodo se utilizó para determinar la posición de los TAG.

Dado que no es empleado con eficiencia para la síntesis de lípidos, la alternativa era que este compuesto pudiese ser utilizado para la síntesis de otros compuestos como pueden ser aminoácidos, terpenoides o esteroides o bien ser empleado como fuente de energía. Apoyados en evidencias previas que sugerían un papel para el malato en las reacciones anapleróticas, decidimos investigar la primera de las posibilidades al incubar los embriones con malato- ^{14}C . Los embriones incubados y marcados, como se describe en la sección 7.2.1 de materiales y métodos, fueron procesados para determinar la incorporación de este precursor en proteínas.

Se muestra la figura 3 que, en contraste con lo observado en la síntesis de lípidos (figuras 1 y 2), se observa que el malato es un mejor precursor para la síntesis de aminoácidos. También se observa que esta incorporación es mucho mayor en los embriones incubados un medio diluido (BS), condición que, lleva eventualmente hacia la germinación precoz de los embriones y que, por tanto, debe estar asociada a un importante cambio general de la fisiología, seguramente asociado a cambios en el patrón de síntesis de proteínas, tales como fosfatasa (Mayer and Poljakoff-Mayber 1989), amilasas (García-Maya and Black, 1991; Bernier and Ballance 1993; Bernhardt *et al* 1993), carboxipeptidasas (Washio and Ishikawa 1992), lipasas, proteasas, y otras enzimas que son sintetizadas de novo (Bewler and Black 1985; Cocucci and Negrini 1991).

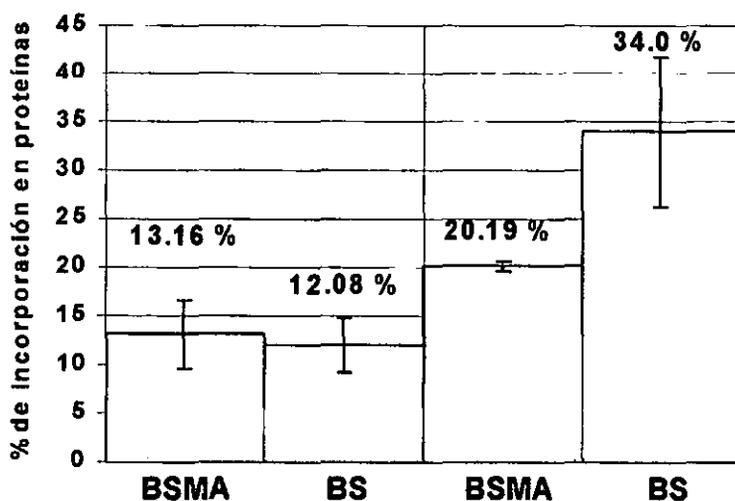


Figura 3 Incorporación de acetato-¹⁴C (□) y malato-¹⁴C (□) en proteínas soluble total extraídas de embriones de maíz inmaduros.

Como era de esperarse, los datos de la figura 3 muestran además que el acetato fue empleado de manera más eficiente que el malato en la síntesis de proteínas.

Para investigar si la organización de los tejidos representaba algún tipo de barreras para que los precursores radiactivos se transportaran eficientemente al interior de las células, se decidió repetir este tipo de trazado radiactivo en células desprovistas de la pared celular. Para ello, fue necesario establecer las condiciones para el aislamiento de protoplastos de los embriones de las semillas inmaduras, ya que no se encontraron en la literatura reportes sobre el aislamiento de protoplastos de este tejido en específico. Debido a la ausencia de una pared celular rígida y a la consecuente exposición de la cara externa de la membrana celular a todo tipo de solutos, los protoplastos son un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte e incorporación de diversas moléculas, que permiten estudiar la regulación del metabolismo. Además, en este sistema es posible realizar el análisis de cada experimento a tiempos más cortos.

Con el propósito de encontrar las condiciones óptimas de aislamiento de los protoplastos que nos permitieran contar un número suficiente de ellos, se prepararon diferentes mezclas de digestión en diferentes concentraciones de enzimas. El tiempo de incubación se mantuvo fijo en 4 horas a 28°C para los primeros experimentos. Los resultados de los diferentes tratamientos se muestran en la tabla No. 1

Tabla No.1 Combinaciones empleadas en la mezcla de digestión. El tiempo de incubación para todos los tratamientos fue 4 horas.

Mezcla de digestión	Celulasa (%)	Macerozyme (%)	Xilanasa (%)	Protoplastos obtenidos (Nº/mL)
1	2	2	0.0	1×10^4
2	2	0.5	0.0	2×10^4
3	4	0.5	0.0	4×10^4
4	4	0.25	0.0	3×10^4
5	4	0.5	0.5	5×10^4
6	5	0.5	0.5	0.0

Los resultados en la tabla No.1 muestran que independientemente de la concentración de enzimas utilizadas el numero de protoplastos recuperados es similar. Observaciones al microscopio, revelaron una gran cantidad de células rotas y fragmentos subcelulares libres (datos no mostrados). Una disminución de la concentración de Macerozyme hasta un 0.5% (mezcla No. 2) permitió mejorar el rendimiento de protoplastos. Se sabe que las preparaciones de enzimas utilizadas para degradar los componentes de la pared celular contienen impurezas como proteasas que pueden afectar al numero de protoplastos obtenidos, posiblemente esto explique el aumento del rendimiento con la disminución de la concentración de Macerozyme utilizada. Para la mezcla de digestión No. 3 se aumentó la cantidad de celulasa para acelerar la digestión esto mejoró la producción de protoplastos. Una pequeña disminución en la concentración de Macerozyme 0.25% (mezcla de digestión No. 4) no mejoró el número de protoplastos por lo que consideramos que la concentración óptima de Macerozyme para estos experimentos iniciales se encontraba alrededor de 0.5%. La mezcla No. 5 con un 4% de celulasa 0.5% de Macerozyme y la adición en 0.5% de xilanasa produjo una mejora en la cantidad de protoplastos recuperados, la adición de cantidades mayores de Xilanasa no produjo mejoras (datos no mostrados). Se observó que concentraciones del 5% de celulasa (Mezcla No.6) son perjudiciales, lo cual se podría explicarse, nuevamente, por el

efecto nocivo de las proteasas u otros agentes tóxicos presentes en las preparaciones comerciales de estas enzimas.

Para conocer el tiempo óptimo de la digestión enzimática y aumentar el número de protoplastos obtenidos la mezcla No. 5 fue incubada por diferentes tiempos, y los resultados se muestran en la tabla No. 2.

Tabla No. 2 Efecto del tiempo de incubación sobre la cantidad de protoplastos obtenidos.

Tiempo (h)	Protoplastos obtenidos (Nº/mL)
2	1×10^4
3	2×10^4
4	5×10^4
5	1×10^4

Las mezclas contenían 4% de Celulasa, 0.5% de Macerozyme y 0.5% de Xilanasas. Todas fueron incubadas a 28°C.

Los datos sugirieron que digestiones en tiempos alrededor de las 2 y 3 horas no permiten obtener un desprendimiento apropiado de la pared celular, ya que se observaron al microscopio células agrupadas y una cuenta baja de protoplastos. Tiempos de incubación tan largos como de 5 horas provocaron la ruptura de los protoplastos, posiblemente por el cambio en la osmolaridad del medio de digestión como resultado de la liberación del material celular o por la actividad de las proteasas presentes en las preparaciones comerciales de enzimas o por las procedentes del propio tejido. Por lo que, los mejores rendimientos se obtuvieron a tiempos de 4 horas de incubación. Tomando en cuenta lo anterior, se pensó que si se reducía la concentración de enzimas, sería posible aumentar el tiempo de la digestión y quizá se recuperase mayor número de protoplastos, para hacer sencillo el procedimiento experimental, se decidió emplear un tiempo de

incubación de 15 h, el cuál permitiría dejar la digestión por la noche y recuperar la células en la mañana, con tiempo suficiente para realizar los experimentos deseados. El resultado de esta experiencia se muestra en la tabla No 3.

Tabla No 3 Nuevas condiciones de incubación para la obtención de protoplastos.

Celulasa (%)	Macerozyme (%)	Xilanasa (%)	Tiempo (h)	Protoplastos obtenidos (Nº/mL)
2	0.25	0.25	-15	7×10^4

De estos resultados se puede apreciar un ligero aumento en el rendimiento en numero protoplastos a pesar de que la concentración de las enzimas disminuyó en comparación con los datos presentados anteriormente. La observación de que a tiempos tan largo no se presentaran los mismos efectos en la disminución del rendimiento como en los experimentos anteriores es consistente con la existencia de proteasas y/o factores tóxicos, que al ser disminuidos permitiesen la sobrevivencia de las células por más tiempo, dando al final, un mejor rendimiento.

Estas condiciones resultaron ser apropiadas para recuperar el mayor número de protoplastos que nos permitieron realizar experimentos de incorporación de marcadores radioactivos con [14 C].

En la figura 4 se muestran los protoplastos obtenidos bajo las condiciones de la tabla No. 3 observándose que las células desprovistas de pared celular adoptan una forma esférica y debido a que son parte de tejidos en desarrollo, muestran tamaños los cuales oscilan entre 30 y 80 μ m.



Figura 4 Observación de protoplastos de embriones de las semillas inmaduras del maíz mediante microscópica óptica en contraste de fases.

Comparando nuestros protoplastos con los obtenidos de otras fuentes vegetales (Figura 5) podemos notar que existe una mayor semejanza entre nuestros protoplastos (a) y los obtenidos a partir de raíces de maíz (c), esto se constata por que presentan un citoplasma altamente denso conteniendo una gran cantidad de organelos que le dan una apariencia granular y que es característico de tejidos no fotosintéticos. Mientras que en los protoplastos de las otras fuentes (b, d y e) es evidente la presencia de una gran

vacuola que disminuye la apariencia granular y no permite apreciar con claridad a otros organelos, esta morfología es característica de las células fotosintéticas.

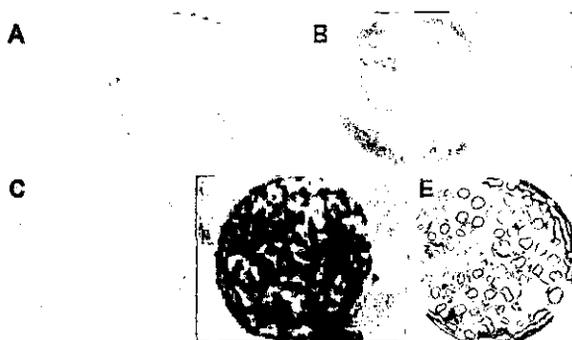


Figura 5 Observaciones microscópicas de protoplastos de diferentes sistemas biológicos: a) embriones inmaduros de maíz, b) remolacha dulce, c) raíz de maíz d)caña de azúcar e) hojas de petunia.

Para comparar los resultados obtenidos con los embriones de las semillas inmaduras se observó el efecto de adicionar acetato- $[^{14}\text{C}]$ y malato- $[^{14}\text{C}]$ por diferentes periodos de tiempo, al medio de incubación de los protoplastos. Este resultado, es también una buena evidencia de la viabilidad, ya que al ser el proceso de síntesis de lípidos y proteínas tan complejo, es poco probable que se observase síntesis de estas macromoléculas en células cuya estructura y metabolismo presentasen daño severo. Los datos se muestran en las figuras 6 y 7.

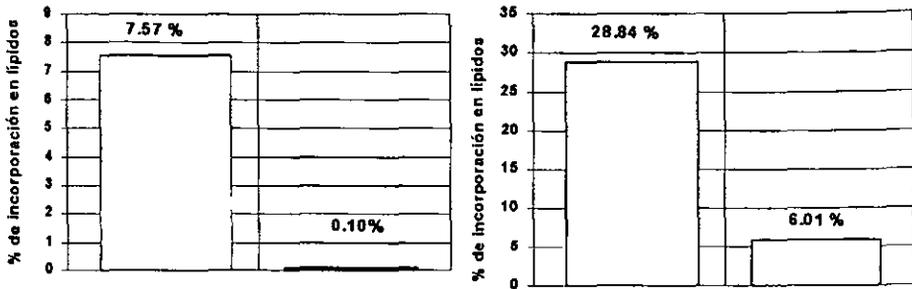


Figura 6 Incorporación de acetato-[¹⁴C] (□) y malato-[¹⁴C] (□) en los lípidos totales extraídos de protoplastos obtenidos de los embriones de maíz inmaduros. Los protoplastos fueron incubados por 30 minutos (izquierda) y 1 hora (derecha) con los compuestos radiactivos a 28 °C.

Como era de esperarse las gráficas muestran que los protoplastos incorporan los compuestos radiactivos lo cual indica que las células eran funcionales. Ya que estos resultados son semejantes a los obtenidos con los embriones enteros se sugiere que la eliminación de la pared celular, no es el factor responsable de la incorporación diferencial de estos compuestos en lípidos (figura 6) y proteínas (figura 7).

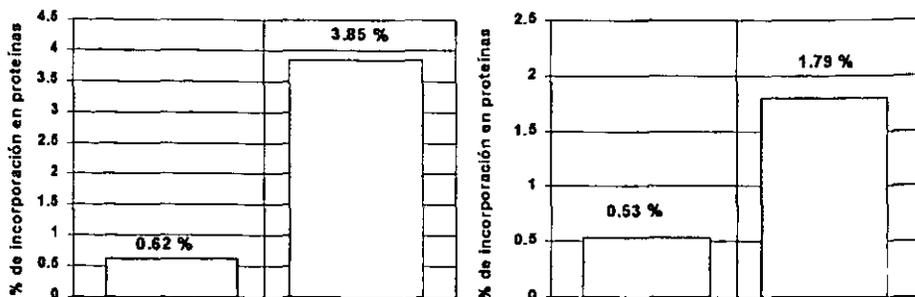


Figura 7 Incorporación de malato-[¹⁴C] (□) y [¹⁴C] acetato (□) en proteína total extraída de protoplastos obtenidos de embriones de maíz inmaduros. Los protoplastos fueron incubados a 28°C durante 30 minutos (izquierda) y 1 hora (derecha).

9. Discusión

Es bien reconocido que la sacarosa es la principal fuente de carbono empleada por las semillas de maíz para cubrir sus necesidades biosintéticas durante su desarrollo. Sin embargo surge la pregunta - ¿Cómo se está particionando ésta para suministrar todo el carbono durante la biosíntesis en la semilla?

Si se observa la composición de las semillas de maíz nos damos cuenta que el endospermo almacena principalmente almidón mientras que en el embrión se encuentran como componentes mayoritarios los lípidos y las proteínas (Bewley and Black 1994). Esto nos indica que en el endospermo del maíz, la sacarosa proveniente de las hojas está siendo utilizada preferentemente hacia la síntesis del almidón por un mecanismo no bien conocido pero que los datos disponibles sugieren que la sacarosa es convertida a hexosas fosfato en el citoplasma y se introducen en el plástido (Newhaus y Emes, 2000), sitio en el que se sintetiza y acumula el almidón (Dennis, *et al.*, 1997). Sin embargo, el embrión presenta un comportamiento distinto, por que en él las proteínas y los lípidos son más abundantes y la acumulación de almidón es escasa y transitoria (Leprince *et al.*, 1990), por lo que la sacarosa, además de servir como fuente de energía, está siendo transformada principalmente en proteínas y triacilgliceroles. Dado que la síntesis de aminoácidos requiere esqueletos de carbono en forma de diversos ácidos orgánicos, mismos que se obtienen, principalmente del ciclo de Krebs (Heldt, 1997), mientras que la síntesis de ácidos grasos requiere carbono en forma de acetato, la conversión de sacarosa en estos compuestos deberá proceder a través de la glucólisis, vía metabólica que está casi en su totalidad presente tanto en el citoplasma, como en el plástido (Plaxton, 1996), posteriormente, el carbono deberá ser dirigido hacia la mitocondria ó

hacia el plástido. El flujo hacia la mitocondria podría darse a través del antiporte malato/OH⁻, o a través de otros intercambiadores de tri y dicarboxilatos, ya que si bien, estos últimos no siempre representan intercambio neto de carbono, si pueden canalizar oxoglutarato, acetoacetato y citrato, que servirían a las vía de síntesis de aminoácidos (Dennis *et al.*, 1997). Por otro lado, el camino por la vía plastidial requiere la existencia de un intercambio de metabolitos entre el citoplasma y este organelo, este intercambio es indispensable en cualquier caso, ya que la síntesis de ácidos grasos ocurre en su totalidad en los plástidos (Ohlrogge y Jaworsky, 1997). Desafortunadamente, la caracterización de los transportadores de la membrana de los diferentes tipos de plástidos presentes en las plantas, dista mucho de ser completa y no ha sido sino hasta recientemente, que dicha caracterización ha despertado el interés de la comunidad científica, siendo el caso de los cloroplastos el mejor estudiado (Joyce *et al.*, 1998) y quedando aún mucho por investigar en referencia a los plástidos de otros tejidos (Newhaus y Emes, 2000; Newhaus y Wagner, 2000). Al respecto se sabe que los cloroplastos presentan un intercambiador de 2-oxoglutarato por malato y otro que intercambia oxaloacetato por malato con gran afinidad por oxaloacetato (Woo *et al.*, 1987), sin embargo, estos tipos de transportadores no podrían afectar la partición de carbono, ya que no involucran una ganancia o pérdida neta de carbono para el cloroplasto. En cambio, se ha reportado que los plástidos pueden intercambiar varias hexosas fosforilados por fosfato (Flügge, 1999), lo que si representa una ganancia de carbono y mantiene el balance de fosfato entre ambos compartimentos; como también se reportó la existencia de un intercambiador de malato por fosfato en leucoplastos de semillas de colza (*Brassica napus*) en desarrollo (Eastmond *et al.*, 1997). Este último intercambiador podría aportar carbono en forma de malato para la síntesis de lípidos dentro del plástido, ya que se ha demostrado que estos organelos son capaces de emplear malato como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos "*in vitro*" (Smith

et al., 1992). De esta manera deben existir mecanismos, aún no identificados, capaces de compensar el flujo de fosfato para restaurar el balance del mismo entre los organelos, ya que se ha demostrado que dicho balance es fundamental para regular varios procesos citoplásmicos y plastidiales. A pesar de ello, nuestros resultados no apoyan que el flujo de malato hacia el interior del plástido sea una fuente importante de carbono para la biosíntesis de lípidos, ya que su incorporación en estos compuestos fue muy inferior a la observada con acetato (Fig. 1) contrariamente a lo observado en estudios *in vitro* para plástidos aislados de semilla de ricino (Smith *et al.*, 1992). Por otra parte, este resultado no puede atribuirse a que la penetración del malato al interior del tejido estuviese limitada por la pared celular, ya que el comportamiento de los flujos de malato hacia lípidos y proteínas fue semejante en células aisladas, desprovistas (Fig. 6). Resultados recientes de nuestro laboratorio, no publicados, indican que los plástidos aislados de las semillas de maíz no presentan la actividad de intercambio malato/fosfato, al menos en las condiciones empleadas para medir el transporte.

El conocer si el malato o el acetato son o no buenas fuentes de carbono para la síntesis de lípidos y/o de proteínas estriba en que como ya se ha mencionado un punto control y de ramificación de la vía glucolítica, en el citoplasma, se da al nivel de PEP. Este puede ser empleado para la generación de piruvato, con ganancia de energía (en forma de ATP), o bien ser carboxilado a malato, reacción que en principio sería anaplerótica, (O'Leary, 1982; Rodríguez-Penagos and Muñoz-Clares, 1999). El hecho de que cuando añadimos malato de manera exógena durante el periodo de almacenamiento de reservas o cuando era estimulada la germinación precoz en los embriones y observamos que la mayor parte de la radiactividad incorporada estaba presente en las proteínas (figuras 3 y 7), indica que la síntesis de malato en estos tejidos tiene en verdad una función anaplerótica y no contribuye a la síntesis de lípidos, como habían propuesto Smith y col.

(1992) y Eastmond y col. (1998). Esto implicaría que, al menos en el caso del maíz, la captura de PEP por la PEP carboxilasa para producir malato dirigiría el carbono hacia la mitocondria y favorecería su incorporación en aminoácidos. Lo que concuerda con los cambios observados en las actividades de la PEP carboxilasa y la Piruvato cinasa en semillas de maíz en desarrollo que son sometidas a condiciones que detienen la acumulación de reservas (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1999). En concordancia con estas observaciones, la incorporación de malato-[¹⁴C] en proteínas fue más notoria en los embriones que se incubaron en ausencia de ABA y de un bajo potencial osmótico, factores que mantienen el patrón de acumulación de reservas (Fig. 3).

Además, los datos de las figuras 1 y 6 nos indican que sólo una pequeña cantidad de carbono proveniente del malato se dirige a la síntesis de lípidos, lo que indica que si el malato entra al plástido ya sea como tal o como algún otro intermediario útil para la síntesis de lípidos, este no es empleado para dicho fin y, posiblemente, salga nuevamente para ser aprovechado en otras vías metabólicas. En cualquier caso, esto apoya la propuesta de que hay poca participación de la PEPC en la biosíntesis de lípidos (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1999). Según los datos de las figuras 1 y 6, la utilización de malato para la síntesis de proteínas no se modifica con el cambio en el estado metabólico de los embriones.

Un análisis detallado de la distribución de la radiactividad en los lípidos (figura 2) indica que para los embriones tratados con acetato una mayor proporción de la marca incorporada en lípidos totales, se encuentra en los TAG, en comparación con lo observado para malato. De manera que si el malato puede servir como precursor para la síntesis de lípidos, es muy probable que estos no sean glicerolípidos y por tanto, podrían

ser, por ejemplo esteroides y/o otros lípidos terpénicos, cuya síntesis puede darse en el citoplasma y en el plástido por igual (Nes and McKenan, 1997).

Si consideramos que los carbonos que fluyen a través de la reacción catalizada por la PEP carboxilasa son dirigidos hacia la síntesis de proteínas, el carbono que se dirige hacia la síntesis de lípidos deberá pasar de fosfoenolpiruvato a piruvato en la reacción catalizada por la PK. Esta enzima compite con la PEP carboxilasa en el citoplasma, pero además existe una isoforma plastidial, que puede representar más de la mitad de la actividad extraída en la semilla (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1999). Para evaluar la importancia de este flujo, consideramos que la mayor parte del piruvato convertido por la PK, debería terminar en forma de acetil-CoA, ya que tanto en el plástido como en la mitocondria existen actividades de piruvato deshidrogenasa elevadas. Dado que se sabe que los plástidos poseen una acetil-CoA sintetasa bastante activa, el acetato podría ser convertido en acetil-CoA, para luego ser empleado en la síntesis de los ácidos grasos (Kang and Rawsthorne, 1996). El acetato también podría ser incorporado a las proteínas en forma de leucina y serina, que son dos aminoácidos abundantes, sin embargo, las figuras 1 y 7 muestran que el acetato se incorporó más eficientemente en los lípidos que en las proteínas. Los datos presentes en este trabajo apoyan la propuesta de que la utilización de PEP por las enzimas PEPC y PK es un determinante de la forma en que la sacarosa es particionada hacia lípidos y proteínas. Desafortunadamente, dado que desconocemos si existe alguna regulación en los transportadores de triosas fosfato/fosfato y PEP/fosfato (Flügge, 1999), por el momento no podemos hacer afirmaciones más categóricas. Algunos experimentos adicionales, como la utilización de piruvato y la caracterización del transporte en plástidos de embriones de maíz en desarrollo podrían ayudarnos a clarificar estos puntos.

Cabe recalcar que la incorporación diferencial de acetato y malato marcado no está determinada por barreras de permeabilidad de los tejidos, ya que los experimentos realizados en protoplastos muestran un comportamiento muy similar al observado en el tejido completo (figuras 6 y 7).

Por otro lado, algunas evidencias recientes sugieren que el transporte de glucos-6-fosfato hacia el interior de los plástidos podría también jugar un papel en la regulación de la síntesis de lípidos en las semillas inmaduras de colza (Kang and Rawsthorne, 1994; Harrison *et al.* 1998), de manera que una imagen completa de la regulación de estos procesos está aún lejos de nuestro alcance presente.

10. Conclusiones

- Los compuestos C4 durante la acumulación de reservas en los embriones de maíz tiene un mejor papel proveyendo esqueletos carbonados hacia la síntesis de proteínas, en contraste con los C3 que preferentemente se emplean en la síntesis de lípidos (principalmente en los TAG).
- El ABA y un bajo potencial osmótico no modifican el destino final del carbono durante su utilización en la biosíntesis de lípidos y proteínas en los embriones de maíz.
- Los resultados apoyan la propuesta de que la utilización del PEP por las enzimas PEPC y PK juega un papel central en el control de la partición de carbono hacia las diversas reservas en las semillas de maíz en desarrollo.

11. Bibliografia

- Ackerson, R.C. (1984). Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 35:403-413.
- Baselvich, J.J., Cutler, A.J., Lamb, N., Friesen, L.J., Kurz, E.U., Perras, M.R. and Abrams, S.R. (1994). Response of cultured maize cell a to (+)-Abscisic acid, (-)-Abscisic acid, and their metabolites. *Plant Physiol.* 100:184-190.
- Bapat V.A. and Schieder O. (1981) Protoplasts Culture Of Several Members of the Genus *Physalis*. *Plan Cell Reports* 1:69-70.
- Bernier, A.M. and Ballance, G. M. (1993). Induction and secretion de alpha-amylase, (1-3),(1-4)- β -glucanase, and (1-3)- β -glucanase activities in gibberellic acid and CaCl_2 -treated and aleurones of wheat *Cereal Chemistry* 70:127-132.
- Bewley D.J., and Black M. (1994). Seed. Physiology of development and germination. Plenum Press. New York. pp. 29-83
- Black, M. (1991). Involvement of ABA in the Physiology of developing and mature seeds. In: Abscisic acid, physiology and Biochemistry. W.J. Davis and H.G. Jones, eds. Bios Scientific Publisher. Oxford, U.K. pp. 30-80
- Buchanan, B.B., Grissem, W., and Jones, R.L. (2000). Biochemistry and Molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Courier Companies. USA. pp. 630-675
- Cao, Y. and Huang, C.A.H. (1986). Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species. *Plant Physiol.* 82:813-820.
- Daniel R. Gallie and Todd E. Young. The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm Protoplasts., *Plant Physiol.* (1994) 106: 929-939.
- Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lefebure, D.D. and Layzell, D.B.(1997). Plant Metabolism. Addison Wesley. Longman Limited. U.K. pp. 78-100
- Dhojwani S.S. and Razdan M. K. (1983) Developments in crop science. Plant tissue culture. Elsevier Amsterdam-Oxfor.
- Eastmond, P.J. Dennis, D.T. and Rawsthorne, S. (1997) Evidence that a malate/inorganic phosphate translocator imports carbon across the leucoplast envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm, *Plant Physiol.* 114:851-856.
- Finkelstein, R. And 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.
- Fitter, M.S. and Krikorian, A.D. (1982) Plant Protoplasts some guidelines for their preparation and manipulation in culture. Brand Biochemicals. Behring diagnostics.
- Flügge, U.I. (1999). Phosphate translocators in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:27-45.
- Garcia-Maya M., Chapman, J.M. and Black, M. (1990) Regulation de α -amilasa formation and gene expression in the developing wheat embryo. Role of abscisic acid, the osmotic enviroment and gibberelin. *Planta* 181:296-303.

- Garland, W.J. and Dennis, D.T. (1980). Plastid and cytosolic phosphofructokinases from the developing endosperm of *Ricinus communis* L. Separation, purification and initial characterization of isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 204:302-309
- Gallie D. R. and Young T. E. (1994) The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm Protoplasts., *Plant Physiol* 106: 929-939.
- Golombek, S., Heim, U., Horstmann, C., Wobus, U. and Weber, H. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Vicia faba* L.: gene expression and metabolic regulation. *Planta*. 208: 66-72
- Gottlob-McHugh S., Rajender, S.S., Blakeley, S.D., Vanlergerghe G.C., Ko, K., Turpin, HD., Plaxton, W.C., Miki, B.L., and Dennis, D.T. (1992). Normal growth of transgenic tobacco plants in the absence of cytosolic pyruvate kinase. *Plant Physiol.* 100:820-825.
- Griffiths, G. and Harwood, J.L. (1991). The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao*) *Planta*. 184:279-284
- Groot, S.P.C. and Krassen, C.M. (1992). Dormancy and germination of abscisic acid deficient tomato seeds. *Plant Physiol.* 99:952-958.
- Gurr, M.I. (1980) The biosynthesis of triacylglycerols In P.K. Stumpf and E.E. Conn (eds) The biochemistry of plants, Vol. 4 de Academic Press New York. pp 205-246
- Harwood J.L., (1989). Plant acyl lipids structure, distribution and analysis. In The biochemistry of plants, Vol. 4 de Academic Press New York. pp. 2-48
- Heldt, H. W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. Oxford, U.K. pp. 317-351
- Hein, M.B., benner, M.L. and Brun, W.A. (1984). Concentrations of indol-3-acetic acid and abscisic acid in soybean seeds during development. *Plant Physiol.* 76:951-954.
- Hu, Z. and Plaxton W.C. (1996). Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from leaves of the castor plant. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 333:298-307.
- Ichihara, K. (1984). Sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seed *Arch. Of Biochem. Biophys.* 232:685-698.
- Ichihara, K., Asalin, T. And Fujii, S. (1987) 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol. *Eur. J. of Biochem.* 167:339-347.
- Ireland, R. J., DeLuca, V. And Dennis, D.T. (1980). Characterization and kinetics of isozymes of pyruvate Kinase from developing castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 65.1188-93.
- Jones, R.J. and Benner, M.L. (1987). Distribution of abscisic acid in maize kernel during grain filling. *Plant Physiol.* 83:905-909.
- Joyard, J. Teyssier, E. Miegé, C. Berny-Seigneurin, D. Marechal, E. Block M.A. Dorne, A.-J. Rolland, N. Ajlani, G., and Douce, R. (1998). *The Biochemical Machinery of Plastid Envelope Membranes* *Plant Physiol.* 118: 715-723.
- Joyce J. D. (1998-2000) Introduction to Metabolism.
<http://www.rensselaer.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/sugar.htm>

- Kang, F. and Rowsthorne, S. (1996). Metabolism of glucose 6 phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 199:321-327
- Kermode, A.R. (1990). Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit. rev. Plant Sci.* 9:155-195.
- Kermode, A.R., Dumbroff, E.B. and Bewley, J.D. (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.
- King, R.W. (1976) Abscisic in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta.* 132:43-51.
- King, R.W. (1982) Abscisic and seed development. In: *The Physiology and Biochemistry of seed development, dormancy and germination* (ed. A.A. Khan) Elsevier, Amsterdam.
- Kovac, M., Horgan, R. And Meilan, R. (1993) Cytokinins in Scotch pine seedling root exudates and their influence on seed germinations. *Plant Cell Physiol.* 32:459-466.
- Lewak, S. (1985) Hormones in seed dormancy and germination. In *hormonal regulation of plant growth and development.* ed., Purohit, S.S., Martinus Nishoff, Dordrecht.
- Lepiniec, L., Keryer, E., Philipe, H., Gadai, P. and Crétin, C. (1993). Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. *Plant Mol. Biol.* 21:487-502.
- Leprince, O. Bonchart, R. and Deltour, R. (1990). Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ.* 13. 539-546.
- Library of 3-D Molecular Structures. New York University Scientific Visualization Center. <http://www.nyu.edu/pages/mathmol/library/Overview.html>
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1989) *The germination of Seeds* Fourth Edition, Pergamon Press, London.
- Mindy S.Fitter and Krikorian, A.D. (1982). *Plant Protoplasts some guidelines for their preparation and manipulation in culture.* Brand Biochemicals. Behring diagnostics.
- Nes, W.R., and Mckenan, M.L. (1977). *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids.* University Park Press. Baltimore, MD. USA.
- Newhaus, H.E. and Emes, M.J. (2000) Nonphotosynthetic metabolites in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:111-140.
- Neuhaus, H.E. and Wagner, R. (2000) Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids *Biochim. Biophys. Acta.* 1465 :307-323.
- O'Leary, M.E. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 33:297-315.
- Ohlrogge, J.B. and Jaworski, J.G. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:109-136.

-Pacheco-Moisés, F Valencia-Turcotte, L., Altuzar-Martinez, M., and Rodriguez-Sotres, R. (1997). Regulation of acyltransferase activity in immature maize embryos by abscisic acid and the osmotic environment *Plant Physiol.* 144: 1095-1101.

-Plaxton, W.C (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47:185-214

-Podestá, F.E and Plaxton, W.C. 1994^a Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure del pyrophosphate and ATP-dependent phosphofructokinases phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta.* 194:374-380.

-Podestá, F.E. and Plaxton, W.C. 1994^b 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.

-Quebedeaux, B., Sweetser, P.B. and Rowell, J.C. (1976) Abscisic acid leaves in soybean reproductive structure during development. *Plant Physiol.* 58:363-366.

-Rodríguez-Penagos, M. and Black M. (1994) Changes in the cell wall accompanying drying and maturation determine the ease of isolation of protoplasts from wheat aleurone layer. *Plant Cell Reports* 13:353-356.

-Rodríguez-Penagos, M. and R. A. Muñoz-Clares, (1999). Response of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Maize Leaves to Moderate Water Difícil. *J. Plant Physiol.* 155 (4-5) 631.

-Rodríguez-Sotres, R., Lara-Nuñez, A. and Rodríguez-Penagos, M. (1999). Seed Biology Advances and Applications (M. Black, K.J. Bradford and J. Vázquez-Ramos, eds). CABI pub. Cambridge, U K. pp. 141-148.

-Rodríguez-Sotres, R. and Black, M. (1993) Quantitative determination of triacylglycerols in plant tissues. *Phytochem Anal.* 4: 68-71.

-Rodríguez-Sotres, R. and Black, M. (1994). Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos. *Planta.* 192: 9-15.

-Shewry, R.P. (1995). Cereal seed storage proteins. In: seed development and germination. Kigel K. Y Galili, G. Eds. Marcel Dekker, Inc.

-Sivak, N.M. and Preiss, J. (1995). Starch synthesis in seed. In. seed development and germination. Kigel K. Y Galili, G. Eds. Marcel Dekker, Inc.

-Skriver, K. and Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell.* 2:503-512

-Smith, R.G. Gauthier, D.A. Dennis, D.T. and Turpin, D.H. (1992). Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm, *Plant Physiol.* 98:1233-1238.

-Stumft, P.K. (1990) Lipids Structure and function In P.K. Stumpf and E.E. Conn (eds) The biochemistry of plants, Vol. 9 de Academic Press New York.

-Turpin, D.H., Boyha, F.C., Smith, R.R., Feil, R., Horsey, A. K. And Vanlerberghe, C.G. (1990). Regulation of carbon partitioning to respiration during ammonium assimilation by the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 93:166-175.

- Tom Zanis. (1998) Chemistry Molecular Models. <http://chemdept.uwsp.edu/pdbs/>
- Voet, D and Voet, J.G. (1992). Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona España.
- Washio, K. And Ishikawa K. (1992) Structure and expression during the germination of rice seeds of *Acer saccharum*. *Plant Mol. Biol.* 19:631-640
- Walker-Simmons M. (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 120: -148.
- Weber, S., Wolter, P., Buck, F., Frentzen, M. And Heinz E. (1991) Purification and cDNA sequencing of an oleate-desaturase acyl-ACP-*sn* glycerol-3-phosphate acyltransferase from the pea chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 17:1067-1076.
- Whitehead, C.S. and Nelson, R.M. (1992). Ethylene sensitivity in germinating peanut seeds: the effects of short-chain saturated fatty acids. *Plant Physiol.* 139:479-483.
- Woo, K.C., Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1987) A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light, *Plant Physiol.* 84:624-632.