

00562.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

División de Estudios Superiores



REGULACION DE LA SINTESIS DE ENZIMAS
HIDROLITICAS INDUCIDAS POR ACIDO GIBE-
RELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO
VAR POTAM S - 70.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tesis de Maestría en Ciencias Químicas
(B I O Q U I M I C A)

ALBA ESTELA JOFRE Y GARFIAS

México, D. F.

1983



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

INDICE	1
INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	9
1.1 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TRIGO	10
1.2 COMPOSICION QUIMICA DE LAS SEMILLAS	12
1.2.1 SUBSTANCIAS DE RESERVA.	13
1.2.1.1 CARBOHIDRATOS	13
1.2.1.2 LIPIDOS	15
1.2.1.3 PROTEINAS	16
1.2.1.4 FITINA	17
1.3 GERMINACION	19
1.3.1 MOVILIZACION DE CARBOHIDRATOS	20
1.3.2 MOVILIZACION DE LIPIDOS	21
1.3.3 MOVILIZACION DE PROTEINAS	23
1.3.3.1 ENDOPEPTIDASAS	24
1.3.3.2 EXOPEPTIDASAS	29
1.3.4 CONTROL HORMONAL DE LA MOVILIZACION DE RESERVAS EN CEREALES.	29
1.3.4.1 MOVILIZACION DE CARBOHIDRATOS.	32
1.3.4.2 MOVILIZACION DE PROTEINAS	39
OBEJTIVOS.	44
2. MATERIALES Y METODOS	47
2.1 MATERIAL BIOLOGICO	47
2.2 SUBSTANCIAS	48

	2	
2.3	IMBIBICION DE LAS MEDIAS SEMILLAS	49
2.4	AISLAMIENTO DE LAS CAPAS DE ALEURONA	49
2.5	INCUBACION DE LAS CAPAS DE ALEURONA	50
2.6	INDUCCION DE LA α -AMILASA Y PROTEASA	52
2.7	TRATAMIENTO DE LAS CAPAS DE ALEURONA	52
2.7.1	INDUCCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA EN PRESENCIA DE CICLOHEXIMIDA	52
2.7.2	INDUCCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA EN PRESENCIA DE ACTINOMICIA D	53
2.7.3	INDUCCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA EN PRESENCIA DE ACIDO ABSCISICO	53
2.8	METODOS ANALITICOS	53
2.8.1	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA	53
2.8.1.1	OBTENCION DE EXTRACTO PARA DE TERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA	54
2.8.1.2	ENSAYO ENZIMATICO DE LA α -AMILASA	55
2.8.2	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA	57
2.8.2.1	OBTENCION DEL EXTRACTO	58
2.8.2.2	ENSAYO ENZIMATICO DE LA PROTEASA	58
2.8.2.3	DETERMINACION DE AMINOACIDOS	61
2.8.3	DETERMINACION DE LAS POZAS DE AMINOACIDOS	61
2.8.3.1	PREPARACION DEL EXTRACTO	61
2.8.4	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN FUNCION DEL pH	63
2.8.4.1	OBTENCION DE LOS EXTRACTOS	63
2.8.5	EFFECTO QUE TIENEN COMPUESTOS QUE ACTIVAN SULFHIDRILLO SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA	65

	3
2.8.5.1 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.	65
2.8.6 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY	65
2.8.6.1 METODO	66
2.8.7 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD	66
2.8.7.1 METODO	66
3. RESULTADOS.	70
3.1 INDUCCION DE α -AMILASA Y PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA AISLADAS POR ACIDO GIBERELICO	70
3.2 EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS EN PRESENCIA DE ACIDO GIBERELICO	71
3.3 EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LA INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA POR AG_3 EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO	77
3.4 EFECTO DEL ACIDO ABCISICO SOBRE LA INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA PROMOVIDA POR ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO	78
3.5 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ACTIVIDAD -- PROTEOLITICA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIEN AISLADAS E INDUCIDAS CON ACIDO GIBERELICO DURANTE 50 HORAS	83
3.6 EFECTO DE COMPUESTOS QUE ACTIVAN GRUPOS SH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA INDUCIDA POR ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO DURANTE 22 HORAS Y DE SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE ALEURONAS SIN INDUCIR.	84
3.7 DETERMINACION DE LAS POZAS DE ACIDO ABCISICO DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO EN PRESENCIA Y - AUSENCIA DE AG_3	88
4. DISCUSION	91
5. CONCLUSIONES	98
6. PERSPECTIVAS	100
BIBLIOGRAFIA	101

I N D I C E D E F I G U R A S

FIGURA	Pág.
1.1 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TRIGO	11
2.1 OBTENCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA	51
2.2 ESQUEMA DE LA INCUBACION DE LAS CAPAS DE ALEURONA Y PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE α -AMILASA	56
2.3 ESQUEMA DE LA INCUBACION DE LAS CAPAS DE ALEURONA Y PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.	59
2.4 DIAGRAMA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.	60
2.5 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS	62
2.6 CURVA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY Y COLS (1951)	67
2.7 CURVA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD (1976)	69
3.1 INDUCCION DE LAS ACTIVIDADES DE α -AMILASA Y PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS EN PRESENCIA DE ACIDO GIBERELICO	72
3.2 INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE AG_3	73
3.3 EFECTO DE LA ADICION DEL ACIDO ABSCISICO DURANTE LA INDUCCION DE PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS CON AG_3	82
3.4 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIENTES AISLADAS E INDUCIDAS DURANTE 50 HORAS CON ACIDO GIBERELICO.	85
3.5 DETERMINACION DE LAS POZAS DE AMINOACIDOS	86

INDICE DE TABLAS

TABLA	Pág.
1. I COMPOSICION QUIMICA DE LAS SEMILLAS	14
1. II COMPOSICION DE ALGUNAS PROTEINAS	18
1. III CARATERISTICAS DE ALGUNAS PROTEINAS ENCONTRADAS EN PLANTAS	30
3. I CINETICA DE APARICION DE PROTEASA INDUCIDA POR -- ACIDO GIBERELICO EN ALEURONAS DE TRIGO	74
3. II EFECTO DE LA CILCOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD -- PROTEOLITICA INDUCIDA POR ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO VAR. POTAM S-70	76
3. III EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LA INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA PROMOVIDA POR EL ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO VAR. POTAM S-70	79
3. IV EFECTO DE LA ADICION DEL ACIDO ABSCISICO DURANTE LA INDUCCION DE LA PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS CON ACIDO GIBERELICO	81
3. V DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIEN AISLADAS E INDUCIDAS DURANTE 50 HORAS CON ACIDO GIBERELICO	87
3. VI EFECTO DE COMPUESTOS ACTIVADORES DE GRUPOS SULFHI DRILOS SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIEN AISLADAS E INCUBADAS.	89

ABREVIATURAS:

ABA	ACIDO ABSCISICO.
Act-D	ACTINOMICINA D.
AG ₃	ACIDO GIBERELICO.
DIFP	DIISOPROPILFLUOROFOSFATO.
DTT	DIFIOFREITOL.
EDTA	ACIDO ETILENDIAMINOTETRAACETICO.
GS	GLUTATION REDUCIDO.
IA	IDOACETATO.
ME	2 - MERCAPTOETANOL.
NEM	N-ETILMALEIMIDA.
pCMB	p-CLOROMERCURIBENZOATO.
PMSF	FLUORURO DE FENILMETAN-SULFONILO.
SH	SULFHIDRILO.
t _i	TIEMPO DE INDUCCION.
TCA	ACIDO TRICLOROACETICO.
TLCK	N-TOSIL-L-LISINO-CLOROMETIL-CETONA.
TPCK	N-TOSIL-L-FENILALANIL-CLOROMETIL-CETONA.

RESUMEN.

Se conoce que el ácido giberélico y el ácido abscísico regulan la síntesis de la α -amilasa y la proteasa en la capa de aleurona de los cereales y se ha propuesto que el mecanismo por el cual se efectúa esta regulación es el mismo para ambas enzimas, sin embargo, no se ha estudiado con detalle el caso de la proteasa.

Esto da lugar a pensar que pudieran ser diferentes los mecanismos por los que se regula la síntesis de α -amilasa y la proteasa, y los resultados obtenidos ser solo coincidencias, por lo que es conveniente determinar si los mecanismos de regulación de la síntesis de las dos enzimas son el mismo o son diferentes.

Para comprobar que las actividades de la α -amilasa y la proteasa aparecen simultáneamente en variedad de trigo empleada, se siguió la cinética de inducción de ambas enzimas en función del tiempo de incubación.

Para determinar si los mecanismos por los que se regula la síntesis de las dos enzimas hidrolíticas son iguales ó no, se hicieron experimentos agregando inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN a diferentes tiempos durante la inducción con ácido giberélico y se determinó la actividad proteolítica a un tiempo fijo, y adicionando ácido abscísico a las 15 horas de incubación con ácido giberélico y determinando la actividad proteolítica a diferentes tiempos después de la adición del ácido abscísico.

Los resultados sugieren que son diferentes los mecanismos por los cuales los ácidos giberélico y abscísico regulan la síntesis de las dos enzimas ya que se encontraron diferencias en cuanto a los efectos del ácido abscísico y de la -- actinomicina D. En el primer caso no se presenta el período lag que se ha reportado para la α -amilasa y en el segundo, se determinó que se requiere de la síntesis de ARN durante todo el período de la incubación, que difiere con lo descrito para la amilasa, cuya síntesis se vuelve insensible a este tipo de inhibidores después de las 12 horas de incubación con ácido giberélico.

Por otro lado, se determinó el pH óptimo para la actividad proteolítica de capas de aleurona recién aisladas e - inducidas con ácido giberélico durante 50 horas, encontrando diferencias en los pH óptimos, lo que indica que se trata de más de una actividad proteolítica, una constitutiva presente en las capas de aleurona sin inducir y otra que aparece por acción del ácido giberélico, lo que se refuerza con lo encontrado al utilizar activadores de grupos sulfhidrilo.

1 INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Cuando una semilla viable se coloca en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, experimenta fenómenos tales como la captación de agua, incremento en la respiración, en la síntesis de macromoléculas como proteínas, ARN, ADN, etc., aumentando también otras actividades metabólicas. Como resultado de todo ésto, una nueva planta comienza a desarrollarse.

Una vez iniciado este proceso, la nueva plántula metabolizará las reservas de que dispone, hasta que sea capaz de sintetizar por ella misma, todo lo necesario para su crecimiento, esto es, que se convierta en un organismo autótrofo.

En los cereales, como se mostrará más adelante, las reservas se encuentran localizadas en el endospermo almidonoso y en la capa de aleurona, misma que jugará un papel preponderante durante la germinación y el crecimiento temprano, ya que en ella se sintetizan las enzimas hidrolíticas que están involucradas en la movilización de las reservas.

El ácido giberélico (AG_3) tiene una función muy importante en la movilización de las sustancias almacenadas, ya que de alguna forma participa en la síntesis *de novo* de algunas enzimas hidrolíticas como la α -amilasa y la proteasa

en la capa de aleurona y en la secreción de estas enzimas al endospermo almidonoso; en tanto que en otros casos, como el de la β -1,3-glucosidasa, aparentemente solo está involucrado en la secreción. Además el ácido giberélico también juega un papel en la activación de enzimas almacenadas en el endospermo.

1.1 *Estructura de la semilla de trigo*

Las semillas de las angiospermas están constituidas por un embrión y un tejido de reserva, rodeados por una envoltura, la testa. En algunas semillas el endospermo puede servir como órgano de reserva en el que se acumulan las sustancias que servirán al embrión para su germinación y primeras etapas de crecimiento, mientras que en otras, las reservas se localizan en los cotiledones; en éstas últimas, el endospermo degenera parcial o totalmente, quedando como tejido rudimentario. En la figura 1.1 se esquematizan la estructura y localización de estos componentes en la semilla de trigo.

El embrión de trigo está constituido por la radícula, la plúmula o epicotilo, el único cotiledón o escutelo y el hipocotilo que conecta la radícula con la plúmula. Además de estos tejidos existen otros, cuya función es proteger a

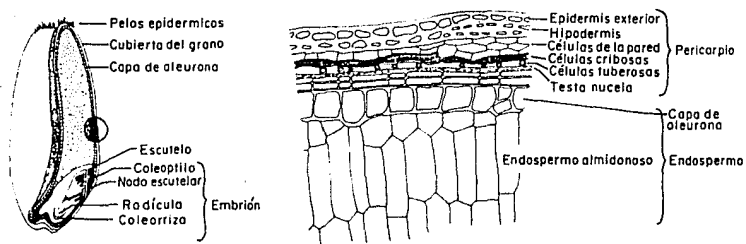


FIGURA 1.1 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TRIGO.

Izquierda corte longitudinal de la semilla completa (Esau, 1977)
 Derecha, corte de la semilla que muestra las partes del endospermo y del pericarpio (Fahn, 1977).

la plúmula y a la radícula durante la emergencia: el coleog_utilo y la coleorriza.

El endospermo de trigo está constituido por el endospermo almidonoso y la capa de aleurona. El primero está formado por células muertas, llenas de gránulos de almidón. La aleurona, que puede tener una o varias capas de células, que se caracterizan por estar vivas aunque no tienen capacidad para replicarse, desempeñan una función muy importante durante la germinación y en el desarrollo de la plántula, ya que en ella se sintetizan varias enzimas hidrolíticas que degradan las sustancias de reserva de la semilla (Chrispeels y Varner, 1967; Jacobsen y Varner, 1967; Taiz y Jones, 1970 y Taiz y Honigman, 1976).

La testa o cubierta de la semilla se localiza inmediatamente sobre la capa de aleurona y, en el trigo, se encuentra el pericarpio o cubierta del fruto, envolviendo a la testa, ya que en el caso de este cereal, no existe la pulpa del fruto, o sea, se trata de un fruto cariósido.

1.2 Composición química de las semillas

Las semillas pueden dividirse en dos grandes grupos en base al tipo de sustancias de reserva que contienen. El primero y más abundante, está formado por las semillas de

alto contenido de lípidos y el segundo está integrado por aquéllas semillas cuyo principal material de reserva lo constituyen los carbohidratos.

La composición cualitativa de las semillas está determinada genéticamente, pero las cantidades relativas pueden modificarse por factores ambientales como el clima, la nutrición mineral, etc.

En la tabla 1.1 se muestra la composición química de algunas semillas. En ella se observa que el trigo pertenece a las semillas cuya principal reserva la constituyen los carbohidratos, ya que del 60 al 75% de su peso seco está formado por almidón, mientras que de proteínas tiene 13.3% y de lípidos una cantidad mucho menor.

1.2.1 *Substancias de reserva*

1.2.1.1 *Carbohidratos*

Las reservas de carbohidratos están formadas principalmente por almidón y menos frecuentemente, por otros polisacáridos: hemicelulosa y galactomanas. Algunos azúcares se encuentran también como reservas menores en varias semillas. Estas reservas se encuentran localizadas principalmente en el endospermo almidonoso de los cereales.

TABLA 1.1 COMPOSICION QUIMICA DE LAS SEMILLAS.

	Porcentaje en la semilla seca			
	Carbohidratos			
	Almidón	Azúcares	Proteínas	Grasas
<i>Zea mays</i>	50-70	1-4	10.0	5.0
<i>Pisum sativum</i>	30-40	4-6	20.0	2.0
<i>Anachis hypogea</i>	8-21	4-12	20-30	40-50
<i>Helianthus annuus</i>	0	2	25	45-40
<i>Ricinus communis</i>	0	0	18	64
<i>Acer saccharinum</i>	42	20	27.5	4
<i>Triticum</i>	60-75		13.3	2.0
<i>Fagopyrum esculentum</i>		72.0	10.0	2.0
<i>Chenopodium quinoa</i>		48.0	19.0	5.0
<i>Aesculus hippocastanum</i>		68.0	7.0	5.0
<i>Castanea vesca</i>		42.0	4.0	3.0
<i>Quercus pedunculata</i>		47.0	3.0	3.0
<i>Linum usitalissimum</i>		23.0	23.0	34.0
<i>Brassica rapa</i>		25.0	20.0	34.0
<i>Papaver somniferum</i>		19.0	20.0	41.0
<i>Cannabis sativa</i>		21.0	18.0	33.0
<i>Amygdalus communis</i>		8.0	24.0	53.0
<i>Aleurites moluccana</i>		5.0	21.0	62.0

El polisacárido más abundante en las semillas de los cereales es el almidón. Está constituido por dos polímeros de D-(+)-glucosa, uno lineal, la amilosa, formado por unidades de glucosa con uniones α -1,4. El otro polímero es la amilopectina, que además de las uniones α -1,4 tiene uniones α -1,6. En el caso del trigo, estas ramificaciones se presentan cada 20 a 25 residuos de glucosa. Las proporciones de estos polímeros varía mucho entre las semillas de las diferentes especies y aún dentro de las variedades de una misma especie.

El almidón se localiza en cuerpos subcelulares llamados gránulos de almidón o amiloplastos que pueden ser esféricos, angulares o elípticos.

Los di y oligosacáridos son comunmente reservas menores en muchas semillas, en el caso de los cereales, se localizan principalmente en el embrión. En trigo, cerca del 20% del peso seco del embrión desgrasado lo constituyen la sacarosa (58.5%) y la rafinosa, que es un trisacárido compuesto por galactosa-glucosa-fructosa (41.5%) (Bewley y Black, 1978).

1.2.1.2 *Lípidos*

Los lípidos son un grupo de sustancias heterogéneo

cuya característica común es su solubilidad en disolventes orgánicos no polares. Entre ellos se pueden mencionar los glicéridos, los esteroides, los fosfolípidos, los glicolípidos y las ceras.

En las semillas, la mayor parte de las reservas de lípidos las constituyen las grasas neutras, en forma de triglicéridos de ácidos grasos monocarboxílicos de cadena larga, la mayoría de los cuales son insaturados.

Los lípidos se localizan en organelos llamados esferosomas, que pueden contener las enzimas para la biosíntesis y degradación de los ácidos grasos (Mayer y Marbach, 1981 y Bewley y Black, 1979).

1.2.1.3 *Proteínas*

Las proteínas de reserva se encuentran localizadas en organelos subcelulares esféricos u ovalados llamados cuerpos protéicos, que además de las proteínas contienen otras sustancias como iones inorgánicos, principalmente fosfatos, calcio, magnesio y potasio, en forma de fitina. Los cuerpos protéicos están limitados por una membrana simple y se encuentran en tejidos de almacenamiento haploide, diploide, triploide y en el eje embrionario de las monocotiledóneas. La mayoría de las dicotiledóneas no tienen un

tejido de reserva especial y los cuerpos protéicos se localizan en los cotiledones (Ashton, 1976).

En los cereales, del 40 al 60% de las proteínas totales de la semilla la constituyen las prolaminas y del 20 al 40%, las glutelinas. Estos dos tipos de proteínas se consideran la principal reserva de la semilla, el resto son albúminas, muchas de las cuales tienen actividad enzimática y las globulinas. En la tabla 1.11 se da la composición de aminoácidos de algunas proteínas de semillas.

Las glutelinas constituyen la fracción de proteínas más heterogéneas dentro de las proteínas de reserva, la gliadina del trigo, por ejemplo, puede separarse en cuatro fracciones: α , β , γ y ω y por electroforesis en geles de poliacrilamida y por isoelectroenfoque pueden encontrarse hasta 46 componentes (Wall, 1979).

1.2.1.4 *Fitina*

La fitina, que es una mezcla de sales del ácido hexafofosfoinosfítico (ácido fítico), es la principal forma en que se almacenan macroelementos, como se mencionó anteriormente. Se localizan en el endospermo en los globoides de la capa de aleurona. Se ha publicado que la actividad de la fitasa se incrementa en la semilla de los cereales durante los primeros días de germinación (Peers, 1953) y que si se eli

TABLA 1.11 COMPOSICION DE ALGUNAS PROTEINAS (g aa/100 g PROTEINA)

NITROGENO TOTAL	GLIADINA TRIGO	ZEINA MAIZ	GLOBULINA CEBADA
NITROGENO TOTAL	17.7	16.2	---
GLICINA	1.0	0.0	4.2
ALANINA	2.0	11.5	6.5
SERINA	4.8	7.8	4.3
TREONINA	2.1	3.0	5.9
VALINA	2.6	3.0	9.5
LEUCINA	6.7	24.0	11.0
ISOLEUCINA	(5.1)	7.4	3.2
METIONINA	1.6	2.3	3.2
CISTEINA ó CISTINA	2.5	1.0	9.4
PROLINA	13.2	10.5	13.3
FENILALANINA	6.3	6.5	4.7
TRIPTOFANO	0.0	0.0	3.8
TIROSINA	3.3	5.3	8.5
HISTIDINA	2.3	1.7	1.7
ARGININA	2.7	1.8	2.7
LISINA	1.2	0.0	2.1
ACIDO ASPARTICO	3.6	5.7	8.8
ACIDO GLUTAMICO	4.7	27.0	17.8
AMONIACO	6.2	3.0	2.5

BROUHLT, S. Y SANDERGEN, E. (1954) En The Proteins. Chemical biological Activity and Methods. Neurath, H. Y BAILEY, K. (eds) Vol. 11-A Academic Press. Inc. N.Y. pp. 511.

mina el embrión, este aumento de la actividad se pierde - (Eastwood y Laidman, 1971).

1.3 Germinación

Se puede definir la germinación de las semillas de las plantas superiores, como el conjunto de eventos consecutivos que llevan a una semilla quiescente, con un contenido de agua bajo, a un incremento en su actividad metabólica general y a la iniciación de la formación de una nueva planta a partir del embrión (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Al final de este proceso se consumirán las sustancias que se almacenaron durante la embriogénesis de la semilla y que se describieron en la sección anterior.

Estas sustancias de reserva se encuentran principalmente en el endospermo y en los cotiledones y servirán para sustentar el crecimiento de la nueva plántula hasta que ésta sea capaz de producir los compuestos que formarán parte de las macromoléculas estructurales y activas, así como la energía necesaria para su actividad metabólica.

Los procesos que se llevan a cabo durante la germinación han sido objeto de varias revisiones, Ching (1972), Mayer y Poljakoff-Mayber (1982), Mayer y Marbach (1980), Mayer y Shain (1974) y Tomos y Laidman (1979), por lo que

aquí se mencionará en forma resumida, el comportamiento - que muestra el endospermo almidonoso y la capa de aleurona de los cereales, principalmente durante la movilización de las reservas.

1.3.1 *Movilización de carbohidratos*

En los cereales la sustancia de reserva más abundante es el almidón, como se mencionó anteriormente, y es hidrolizado principalmente por las α - y β -amilasas. La α -amilasa hidroliza los enlaces α -1,4 de la amilosa y la amilopectina en cualquier punto de la cadena, mientras que la β -amilasa rompe las cadenas de tal manera que da como producto final unidades de maltosa, comenzando por el extremo no reductor. La α -glucosidasa o maltasa hidroliza la maltosa en dos moléculas de glucosa. Además existe la enzima desramificante, que rompe los enlaces α -1,6 de las ramificaciones, que no pueden ser atacadas por las otras enzimas.

La β -amilasa se sintetiza durante la embriogénesis de la semilla seca, en forma inactiva, unida a glutelinas por puentes disulfuro. Se ha propuesto que para su activación se requiere de una hidrólisis parcial o bien de una reducción con sustancias que disocian grupos sulfhidrilos (Hardie, 1975 y Tronier y Ory, 1970). Esta activación se realiza durante el proceso de germinación por acción del áci-

do giberélico, probablemente debido a la síntesis de proteasas (Roswell y Goad, 1964). En cuanto a la α -amilasa, se sabe que esta enzima se sintetiza *de novo* en la capa de aleurona, bajo el control del AG_3 (Varner, 1964 y Filner y Varner, 1967). Esto se tratará con mayor detalle más adelante.

Además de estas enzimas existen otras como la β -1,3-glucosidasa que degrada la hemicelulosa de la pared celular que requiere de AG_3 para ser liberada de la capa de aleurona, aunque su síntesis sea independiente de la hormona (Tomos y Laidman, 1979 y Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982). Por otro lado, en las capas de aleurona de cebada, se ha descrito que la arabinofuranosidasa, la endo- β -1,4-xilanasasa y la xilanopiranosidasa aumentan su actividad total y se liberan al medio de incubación como respuesta al AG_3 (Taiz y Honigman, 1976).

1.3.2 Movilización de lípidos

Los triglicéridos de los esferosomas de las semillas cuya principal reserva son los lípidos, se hidrolizan por la acción de las lipasas produciendo ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos se incorporan a las membranas como fosfolípidos o producirán acetil-coenzima A en la beta oxidación de estos compuestos. Por el ciclo del glioxilato

la acetil-coenzima A se convertirá en succinato, el cual se transferirá a la mitocondria, en donde, por el ciclo de Krebs, se transforma en oxaloacetato, el cual puede derivarse hacia la gluconeogénesis produciendo carbohidratos, o bien, compuestos oxidables para la cadena respiratoria (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Durante la germinación de las semillas de trigo se van consumiendo las reservas de triglicéridos. Esta degradación depende del embrión, ya que si éste se elimina, se produce una disminución rápida de los triglicéridos de la capa de aleurona durante las primeras 24 horas de imbibición (aproximadamente el 20%), después de las cuales no se observa mayor degradación. Por otro lado, si se elimina el endospermo almidonoso, no se produce la hidrólisis de los triglicéridos de la capa de aleurona, lo que sugiere que se requiere de algún compuesto proveniente del endospermo almidonoso para que se lleve a cabo la hidrólisis. Por estos hechos, en 1972 Tavener y Laidman propusieron que hay dos pozas de triglicéridos en la capa de aleurona, una que para ser degradada requiere de algún factor emanado del embrión y otra que depende de algún compuesto proveniente del endospermo almidonoso. Utilizando citocininas como la benziladenina o la cinetina, se observó que estos compuestos pueden sustituir al factor del endospermo y en el caso de la substancia proveniente del embrión se puede sustituir

por algunos compuestos nitrogenados como la glutamina o la hidroxilamina en presencia de una auxina, pero no por el AG_3 (Eastwood, Travener y Laidman, 1969).

1.3.3 *Mobilización de proteínas*

En las semillas de los cereales las proteínas de reserva se encuentran localizadas tanto en la capa de aleurona como en el endospermo almidonoso. Para su movilización requieren ser hidrolizadas por proteasas que se distribuyen en las células de la capa de aleurona, en el escutelo, en el endospermo almidonoso y en el eje embrionario (Mikolá y Kolehmainen, 1972).

Los términos que se han utilizado en la literatura para denominar a las enzimas proteolíticas, han sido muy variados e introducen confusiones, por ejemplo se habla de proteasas, proteinasas o endopeptidasas sin establecer si hay diferencias entre estos términos o si en realidad son sinónimos. Barret en 1980 hace incapié en este problema señalando que el término proteasa se usa para describir todas las enzimas que hidrolizan proteínas, propone que a las endopeptidasas se les denomine proteinasas y que a las exopeptidasas, se les denomine peptidasas.

En general, las enzimas proteolíticas se clasifican -

en dos grandes grupos, dependiendo del sitio en que cortan a las proteínas: A) las endopeptidasas, que rompen en sitios internos y B) las exopeptidasas, que lo hacen desde los extremos de la cadena polipeptídica y que pueden ser a su vez: a) carboxipeptidasas y b) aminopeptidasas.

En base a las características y requerimientos del mecanismo catalítico, se puede dividir a las enzimas proteolíticas en 4 grandes grupos, que son:

- a) Proteasas con serina: son las que contienen serina en el sitio activo como tripsina, quimotripsina y subtilisina,
- b) Proteasas tiol o sulfhidrilo: aquéllas que requieren un grupo SH libre en su sitio catalítico como papaína, bromelina, ficina y catepsina,
- c) Metaloproteasas: requieren iones metálicos como cofactores y son inhibidas por quelatos, por ejemplo termolisina y proteasas neutras, y
- d) Proteasas ácidas, las que son activas a pH ácido, como pepsina y catepsina B.

1.3.3.1 Endopeptidasas

La mayoría de las proteinasas encontradas en plantas

parecen ser del grupo de las sulfhidrido proteinasas, aunque en los últimos años se han descrito algunas enzimas de plantas que no involucran grupos SH para su actividad catalítica y que se clasifican dentro de dos grandes grupos: aquéllas que tienen un pH óptimo entre 3 y 4 y otras que se parecen a las serino proteinasas, con un pH óptimo de 8 ó mayor (Ryan y Walker-Simmons, 1981).

Se han purificado sulfhidriloproteinasas de semillas y de hojas de varias familias de plantas entre las que se incluyen *Caricaceae*, *Bromeliaceae*, *Moraceae*, *Graminae*, *Leguminosae* y *Dilleniaceae*. Todas estas enzimas altamente purificadas presentan un pH óptimo entre 5 y 7 y casi todas tienen un peso molecular entre 25,000 y 30,000 daltones. Algunos ejemplos son los siguientes:

La papaína obtenida del látex y del fruto de *Carica papaya*, tiene un peso molecular de 23,000 y su pH óptimo es de 5.5 a 7.0 (Glazer y Smith, 1971) y se ha utilizado como principal modelo para estudiar el mecanismo de acción de estas proteinasas (Drenth y cols. 1971 y Schechter y Berger, 1962). En la familia *Moraceae* está el género *Ficus*; en el látex de algunas especies se encuentra una considerable actividad proteolítica (*Ficus glabrata* y *F. carica*). A la principal enzima del látex se le llama ficina, su peso molecular es de 25,000 y su pH óptimo de 6 a 7, es

tá compuesta por varias isoenzimas (Jones y Glazer, 1970). De algunos géneros de la familia *Gramineae* se han obtenido enzimas altamente purificadas, como una enzima que se aisló de hojas en senescencia de avena, con un peso molecular de 76,000, que se activa con 2-mercapto etanol (ME) y se inhibe con Hg^{2+} , iodoacetato (IA) y fluoruro de fenilmetil sulfonilo pero no con p-cloromercuribenzoato (pCMB), se le determinó un pH óptimo de 6.6 utilizando hemoglobina desnaturada como sustrato (Drivdahl y Thimann, 1977 y 1978).

En semillas de cebada en germinación se han encontrado 4 endopeptidasas, 3 de las cuales son sulfhidriloproteinasas y la otra, que es una proteínasa activada por metales con pH óptimo de 5.5 y 8.5. De las sulfhidrilo proteinasas la principal tiene un peso molecular de 17,000 y un pH óptimo entre 3.8 y 6.0, se inhibe con pCMB y con EDTA (Ryan y Walker-Simmons, 1981). Durante la germinación la actividad proteolítica sufre un incremento notable. Jacobsen y Varner en 1967 demostraron que la síntesis de proteasa en la capa de aleurona de cebada es producida por la acción del Ag_3 y que esta síntesis es *de novo* (Jacobsen y Varner, 1967), aunque esta enzima no se ha purificado ni estudiado en detalle, un intento ha sido el de Varty y cols. (1982), que señalan que la enzima proteolítica inducida por el Ag_3 en la capa de aleurona de trigo tiene un peso molecular de

43,700 y un pH óptimo de 3.5.

Otra enzima que se ha purificado es de endospermo de maíz en germinación, tiene un peso molecular de 21,000, su punto isoeléctrico es igual o menor a 2.3, su pH óptimo es de 3.0, utilizando hemoglobina como sustrato; se activa con ME, ditiotreitól (DTT) y glutatión reducido (GS); se inhibe fuertemente con pCMB, IA, pero no se inhibe con diisopropilfluorofosfato (DIFP) ni pepstatina (Abe y cols., - 1977).

Ragster y Chrispeels describieron una enzima de hoja de soya que digiere hemoglobina a un pH óptimo de 4.0, requiere ME para su actividad y es inhibida por pCMB y N-etil maleimida (NEM) (Ragster y Chrispeels (1981a y b).

En frijol mungo, Baumgartner y Chrispeels describieron otra proteinasa de la clase de las sulfhidriloproteinasas con un peso molecular de 23,000, un punto isoeléctrico de 3.75 y un pH óptimo, utilizando vicilina como sustrato, de 5.1. Esta enzima es activada por ME e inhibida por pCMB y NEM, mientras que no se inhibe con fluoruro de fenil metansulfonilo (PMSF), N-tosil-L-lisino-clorometilcetona (TLCK), N-tosil-L-fenilalanil-clorometil-cetona (TPCK), inhibidor de tripsina y EDTA (Baumgartner y Chrispeels, 1977).

Del grupo de las proteasas con serina en el sitio ac-

tivo, se han encontrado muy pocas en plantas y no se han purificado lo suficiente. Recientemente se han estudiado algunas proteinasas que pueden ser de este tipo, tienen un pH óptimo mayor de 8 y no se ven afectadas por reactivos que bloquean o activan grupos sulfhidrilos, algunas se inhiben con DIFP y PMSF, que actúan sobre la serina del sitio activo, y otras se inhiben con TLCK y TPCK, que reaccionan con las histidinas del sitio catalítico (Drivdahl y Thimann, 1978, Du Toit, 1976, Takeda y Tominga, 1977, Shanon y Wallace, 1979).

Las proteinasas ácidas tienen un sitio catalítico con 3 residuos de aminoácidos activos; dos de ellos son ácidos aspárticos, que comparten un protón común y el otro es tirosina (James y cols., 1977). En animales y en hongos, estas proteinasas presentan un pH óptimo de 2 a 3 y rompen la cadena polipeptídica con cierta especificidad entre dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales largas e hidrofóbicas. Como en el caso de las proteinasas con serina, estas enzimas no se han caracterizado bien en plantas al grado de que, sin lugar a dudas caigan dentro de esta categoría, aunque recientemente se han encontrado algunas enzimas que parecen ser del tipo ácido, como la reportada en 1978 por Salmia y cols., que es una de las pocas enzimas de plantas que se inhiben fuertemente por pestatina (Ryan y Walker-Simmons, 1981).

1.3.3.2 Exopeptidasas

Las carboxipeptidasas se encuentran en muchas, posiblemente en todas las plantas y quizá en la mayoría de los tejidos vegetales. Las carboxipeptidasas de plantas hidrolizan la mayoría de los aminoácidos terminales de proteínas y polipéptidos, aunque en general, lo hacen a velocidades bajas cuando el aminoácido terminal es glicina o prolina.

Todas las carboxipeptidasas de plantas que se han estudiado en detalle son inhibidas por DIFP, no son metaloenzimas y mecanísticamente parecen ser similares a la catepsina A (Doi, 1974).

En la tabla 1.111 se resumen algunas características de enzimas proteolíticas encontradas en plantas.

1.3.4 Control hormonal de la movilización de reservas en cereales

En la movilización de las reservas localizadas principalmente en el endospermo de los cereales, están involucradas varias hormonas, entre ellas el ácido giberélico y el ácido abscísico (ABA). Estas dos hormonas desempeñan una función muy importante, controlando la degradación de las sustancias almacenadas, ya que regulan la producción

TABLA 1.111 CARACTERISTICAS DE ALGUNAS PROTEINASAS ENCONTRADAS EN PLANTAS.

Enzima	Tipo	Peso Molecu- lar	pH Optimo	Activador	Inhibidor	Fuente	Referencia
Papaína	SH	23,000	5.5 a 7.0	Reductores grupos SH	Bloqueadores grupos SH	Fruto y latex de papaya	Glazer y Smith (1971)
Ficina	SH	25,000	6.0 a 7.0	Reductores grupos SH	Bloqueadores grupos SH	Latex (F. <i>labrata</i>)	Jones y Glazer (1970)
Proteinasa	SH	76,000	6.6	ME	Hg ²⁺ , IA, PMSF	Hoja en senes cencia avena	Drivdahl y Thimann (1977 y 1978)
Proteinasa	SH	17,000	3.8 y 6.0		pCMB, EDTA	Cebada (germ)	Ryan y Walker Simmons (1981)
Proteinasa Metalo			5.5 y 8.5	Metales		Cebada (germ)	Ryan y Walker Simmons (1981)
Proteasa	ND	43,700	3.5	ND	ND	Aleurona de trigo	Varty y cols. (1982)
Proteinasa	SH	21,000	3.0	ME, DTT, GS	pCMB, IA	Maiz en germinación	Abe y cols. (1977)
Proteinasa	SH		4.0	ME	CMB, NEM	Hoja de soya	Ragster y Chrispeels (1981 a y b)
Proteinasa	SH	23,000	5.1	ME	CMB, NEM	Cotiledones de frijol mungo	Baumgartner y Chrispeels (1977)

Abreviaturas: pCMB, p-cloro-mercuri-benzoato; DTT, ditioneitol; EDTA, ácido etilén-diamino-tetraacético; PMSF. Fluoruro de fenil-metán-sulfonilo; GS, glutatión reducido; IA, yodo acetamida; ME, mercapto etanol; NEM, N-etil-maleimida; SH, sulfhidrilo.

ND, no determinado. germ, semilla en germinación.

de algunas enzimas hidrolíticas en la capa de aleurona de los cereales.

Existen dos grupos de enzimas que se ven afectadas por la presencia del AG_3 , uno que requiere que la hormona esté presente para ser secretado de la capa de aleurona al endospermo almidonoso, y otro grupo, que además requiere del AG_3 para ser sintetizado. Entre las enzimas que requieren del fitorregulador para ser liberadas, se pueden mencionar la β -1.3-glucosidasa (Bennet y Chrispeels, 1972; Pollard, 1969 y Taiz y Jones, 1970) y la fosfatasa ácida, las cuales se acumulan en grandes cantidades en la pared interna de las células de la capa de aleurona y que, al adicionar la hormona se liberan al exterior (Ashford y Jacobsen, - (1974).

Algo semejante ocurre con la ribonucleasa, aunque en este caso hay una cierta cantidad de la enzima que se produce debido a la presencia del AG_3 . En cuanto a la temporalidad, esta última se libera después de la α -amilasa de la capa de aleurona (Chrispeels y Varner, 1967).

En el grupo de enzimas que requieren de la fitohormona para ser sintetizadas y liberadas al medio están la α -amilasa y la proteasa (Varner y Ram Chandra, 1964; Chrispeels y Varner, 1967 y Jacobsen y Varner, 1967).

La α -amilasa está constituida por dos grupos de iso-

enzimas de igual peso molecular, pero con diferente pH isoeléctrico, el grupo I entre 6.0 y 6.5 y el grupo II entre 4.5 y 4.8, que se unen en forma diferencial a los gránulos de almidón intactos. Las isoenzimas del grupo I se adsorben y digieren los gránulos de almidón, mientras que las del grupo II no, pero estas últimas sí son capaces de hidrolizar los oligosacáridos producidos por las primeras (Sargent, 1969).

1.3.4.1 *Movilización de carbohidratos*

De las enzimas involucradas en la movilización de carbohidratos que se mencionaron con anterioridad, la α -amilasa es la que más se ha estudiado. A continuación se describen algunas características de la síntesis de la enzima en capas de aleurona de cebada y trigo:

Su síntesis está regulada por el AG_3 y el ABA. En el caso del ácido giberélico se sabe que se sintetiza en el embrión y que pasa a las células de la capa de aleurona en donde estimula la síntesis de la α -amilasa entre otras enzimas. Con respecto al ABA, del que no se conoce exactamente el sitio de síntesis, se sabe que es capaz de inhibir la síntesis de la α -amilasa cuando se adiciona a cualquier tiempo durante la incubación de aleuronas en presencia de AG_3 (Chrispeels y Varner, 1966 y 1967).

A continuación se presentan algunas características del sistema de las capas de aleurona aisladas que lo hacen muy atractivo para el estudio de la regulación de los genes involucrados en la producción de la α -amilasa bajo el control del AG_3 (que estimula) y el ABA (que la inhibe). Jones las enuncia como sigue:

- a) *In vivo* el disparador natural de la producción de la enzima son las giberelinas,
- b) esta respuesta es debida a sólo esta clase de hormonas,
- c) el tejido blanco está compuesto por un sólo tipo de células,
- d) estas células no se dividen,
- e) las capas de aleurona pueden aislarse libres de otros tejidos y aún conservan su capacidad para responder al AG_3 , y
- f) la respuesta de las capas de aleurona aisladas es independiente de la adición de substatos (Jones, 1973).

La inducción de la síntesis de α -amilasa por AG_3 presenta las siguientes características:

Un período lag de aproximadamente 8 horas (Yomo y Varner, 1971 y Bernal, 1978), seguido de un período de sín

tesis de la enzima de cuando menos 16 horas. La secreción de la α -amilasa al endospermo almidonoso también depende de la presencia de AG_3 (Jacobsen y Knox, 1974). Del total de enzimas que se sintetizan en la capa de aleurona, el 60% aproximadamente es α -amilasa cuando al fitohormona está presente. (Ho y Varner, 1964). El aumento en la actividad de la hidrolasa es debido a síntesis *de novo* de la cadena polipeptídica ya que si se le agrega cicloheximida al sistema, se inhibe el incremento de la actividad (Chrispeels y Varner, 1967). La demostración más contundente de este hecho la realizaron Filner y Varner en 1967, utilizando $H_2^{18}O$ en la incubación de las capas de aleurona de cebada en presencia de la hormona, encontrando que la α -amilasa migra a una zona de mayor densidad cuando se le somete a centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. Esto además demostró que los aminoácidos utilizados en la síntesis de la α -amilasa provenían de la degradación de las proteínas almacenadas, que al ser hidrolizadas incorporaron el ^{18}O . Ho en 1978 descartó la posibilidad de que se tratara de la activación de un precursor, utilizando aminoácidos ^{13}C en presencia de bromato de potasio.

Las primeras evidencias de que se requiere de la síntesis de ARN mensajero para la producción de la enzima en capa de aleurona fueron indirectas, empleando inhibidores

de la transcripción (Chrispeels y Varner, 1967b; Ho y Varner, 1974 y Yomo y Varner, 1971). En varios estudios posteriores, se aisló ARN poli A⁺ (Jacobsen y Zwar, 1974) y se tradujo *in vitro* en los sistemas libres de células de germen de trigo y de reticulocito de conejo (Higgins y cols., 1976; Okita y cols., 1979; Ho, 1980 y Mozer, 1980). En estos estudios se obtenía un producto de la traducción de peso molecular mayor al de al α -amilasa, que puede ser un precursor de la enzima ya que inmunoprecipita con anticuerpos contra α -amilasa. Boston y cols. introdujeron ARN poli A⁺ aislado de capas de aleurona de trigo en ovocitos de rana, produciendo una proteína de 41,500 de peso molecular que se identificó como α -amilasa por inmunoprecipitación (Boston y cols. 1982) y Higgins y cols. encontraron que cuando se agregan membranas de páncreas de perro al sistema de traducción de germen de trigo, el polipéptido sintetizado es hidrolizado parcialmente (de 46,000 a 44,000) identificándolo como α -amilasa por inmunocromatografía de afinidad. Se ha sugerido que el segmento extra de la α -amilasa puede estar involucrado en la secreción de la enzima como se verá más adelante.

Por los experimentos de traducción *in vitro*, se ha determinado que el ARN mensajero que codifica para la α -amilasa es aproximadamente el 20% del total, asumiendo que -

todos los ARN mensajeros se traducen con la misma eficiencia en los sistemas de traducción libres de células. Ho encuentra resultados semejantes cuando incuba capas de aleurona de cebada en presencia de cicloheximida a concentraciones que no inhiben completamente la traducción. La explicación de porqué en la capa de aleurona la síntesis de la α -amilasa representa del 40 al 60% del total de las proteínas sintetizadas en presencia de AG_3 si el ARN mensajero es de aproximadamente el 20% aún no es clara y se requiere que se hagan más estudios para poder dilucidarlo.

En los últimos años se han hecho estudios obteniendo el ADN complementario al ARN poli A⁺. Entre ellos el de Bernal y cols., en que encuentran que la secuencia de ARN mensajero de la α -amilasa hibridizable, se incrementa 40 veces en aleuronas tratadas durante 16 horas con AG_3 . Rogers y Milliman y Muthurishnan y cols., clonaron el ADN complementario del ARN obtenido de capas de aleurona de cebada incubadas en presencia de AG_3 , en el sitio Pst I del plásmido pBR322 de *E. coli*. Por el análisis de los patrones electroforéticos de los ARN obtenidos de las clonas, concluyeron que existen varios genes estructurales o grupos de genes que contienen la información para la α -amilasa (Bernal y cols., 1981; Rogers y Milliman, 1983 y Muthurishnan y cols., 1983).

Por otro lado, Callis y Ho (1983) y Jacobsen y cols. (1982), reportaron que las isoenzimas de la α -amilasa, que como se mencionó, son dos grupos de isoenzimas con diferentes puntos isoeléctricos, no aparecen simultáneamente, sino que hay una población de isoenzimas de α -amilasa que se sintetizan primero, diferentes de las que lo hacen posteriormente, lo que sugiere que se tienen dos poblaciones de ARN mensajeros maduros en las capas de aleurona tratadas con AG_3 .

Recientemente, Hamabata y Bernal (manuscrito en preparación), demostraron que el paso limitante en la producción de la α -amilasa inducida por ácido giberélico en capa de aleurona de trigo es la traducción.

En este momento se puede decir que hay cuando menos - dos genes estructurales o grupos de genes diferentes, cuya expresión está regulada por el ácido giberélico y que puede haber diferencias en los mecanismos por los que esta regulación se lleva a cabo.

En cuanto a la secreción de la α -amilasa de la capa de aleurona al endospermo almidonoso, se han propuesto dos mecanismos diferentes, uno en que la enzima es liberada en forma soluble y otra en la que intervienen vesículas que contienen a la enzima. Se tienen evidencias en ambos sentidos pero no son concluyentes, por un lado, apoyando la se-

creción en forma soluble, Jones (1972) y Chen y Jones, (1974), no pudieron encontrar partículas que contuvieran la enzima, mientras que Firm (1975), Colborne y cols., - (1976), Gibson y Paleg (1972 y 1975), sí la encuentran asociada a membranas.

Locy y Kende (1978) confirmaron que la α -amilasa, del 40 al 70%, se encuentra asociada a membranas del retículo endoplásmico y demostraron que esta asociación no es debida al procedimiento de extracción. Jones y Jacobsen (1982), localizaron la enzima en el "lúmen" del retículo endoplásmico, quedando todavía sin respuesta la pregunta de cómo - la enzima llega al exterior de las células de la capa de - aleurona.

Otra hormona involucrada en en la liberación de la - α -amilasa de las capas de aleurona al medio de incubación es el etileno. También en este caso se tienen resultados contradictorios, algunos autores sugieren que el etileno aumenta la secreción de la enzima y otros afirman que se - incrementan tanto la síntesis como la secreción de la α -amilasa.

Jones (1968), reporta una mayor secreción significativamente mayor de la α -amilasa en presencia de etileno. Ho y cols. (1977), no encuentran un incremento en la cantidad de enzima sintetizada, pero sí la mayor secreción de

ella. En contraste, Jacobsen (1973) y Eastwell y Spencer (1982 a y b), encuentran una mayor producción de la enzima en capas de aleurona de cebada tratadas con ácido giberélico, y una mayor secreción de la enzima, durante las primeras 24 horas de la inducción y proponen que la secreción aumenta debido al incremento de la actividad de xilanasas, que degrada las paredes celulares de las células de la capa de aleurona.

Ho y cols.(1982), sugieren que la secreción no es lo que se afecta con el etileno sino la liberación de la α -amilasa de las paredes celulares, que es independiente del paso a través de las membranas, que sería la secreción, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Eastwell y Spencer.

Por último, se ha sugerido que la razón por la que se encuentran productos de traducción de mayor peso molecular al esperado, en los experimentos de traducción *in vitro*, es que haya un precursor de α -amilasa que contenga un "peptido señal", que al ser secretada la enzima sufra una hidrólisis, quedando la α -amilasa con el peso molecular conocido (Boston y cols., 1982).

1.3.4.2 *Mobilización de proteínas*

Las proteínas de reserva del endospermo almidonoso

y de la capa de aleurona, para poder ser aprovechadas por el embrión en desarrollo y la capa de aleurona, necesitan ser hidrolizadas por enzimas proteolíticas.

Esta degradación de las proteínas de reserva es de suma importancia, ya que, la única fuente de nitrógeno de que dispone la planta durante la germinación de la semilla y - las primeras etapas del crecimiento, son los aminoácidos que provienen de las proteínas de reserva. Estos aminoácidos los emplea directamente en la síntesis de proteínas tanto del eje embrionario como de la capa de aleurona, o los transforma, produciendo todos los compuestos nitrogenados que su metabolismo demanda, como son bases nitrogenadas, fosfolípidos, coenzimas, etc.

Se tiene conocimiento de que en las semillas de los cereales en germinación existen actividades proteolíticas tanto en la capa de aleurona, en el endospermo almidonoso como en el escutelo (Mikola y Kolehmainen, 1972). La función de estas últimas podría ser terminar de hidrolizar - los péptidos provenientes del endospermo y translocar los aminoácidos al embrión en desarrollo.

Filner y Varner en 1967, demostraron que en el caso - de las capas de aleurona de cebada, la síntesis de proteínas depende de los aminoácidos provenientes de las proteínas de reserva, lo que indica que debe existir cuando me-

nos una proteasa, en la capa de aleurona, que sea la responsable de proporcionar los aminoácidos necesarios para la síntesis de otros polipéptidos.

Uno de los pocos estudios de enzimas proteolíticas que se han hecho es el de Melville y Scandalios (1972), en el que describen 2 variantes de una endopeptidasa de maíz. Utilizando técnicas de retrocruza de dos líneas de maíz que tienen enzimas con características diferentes, encontraron que su expresión está regulada a nivel genético.

Abe y cols. (1977), reportan una proteinasa que se localiza en el endospermo de maíz de 5 días de germinación, la caracterizan en cuanto a su punto isoeléctrico (2.3 o menor), determinan su pH óptimo (3.0 cuando usan hemoglobina como sustrato) y la clasifican como sulfhidrilo proteinasa por su respuesta a sustancias que inhiben ó activan grupos SH, mientras que no es afectada por pepstatina. Su peso molecular es de 21,000.

En el caso de cebada, podemos mencionar la enzima que se sintetiza en la capa de aleurona por acción del ácido giberélico, descrita por Jacobsen y Varner en 1967. Estos autores demuestran que la enzima es sintetizada *de novo*, que la actividad proteolítica se induce simultáneamente con la α -amilasa, que si las capas de aleurona se incuban en concentraciones diferentes del AG_3 , la cantidad de am-

bas enzimas guarda una cierta proporción y que es secretada al endospermo almidonoso, al igual que la α -amilasa. Por otra parte, si las capas de aleurona son incubadas - en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas o de la transcripción, o con ácido abscísico, además del ácido giberélico, no se detecta actividad ni de α -amilasa - ni de la proteasa (Jacobsen y Varner, 1967, Chrispeels y Varner, 1967).

Estos datos experimentales llevaron a proponer que la síntesis de α -amilasa y de proteasa en capa de aleurona de cebada, inducidas por ácido giberélico, está regulada por un mecanismo común, pero no se tienen las evidencias experimentales de que la inducción de la proteasa sea exactamente igual a la de la α -amilasa, ya que los estudios efectuados solamente se hicieron agregando los inhibidores desde el inicio de la inducción, quedando todavía la pregunta de que pasa en el curso de la inducción de la proteasa, ya que puede darse el caso de que sean solo coincidencias los resultados obtenidos previamente.

Un problema en el estudio de las enzimas proteolíticas en plantas, es que generalmente las actividades son - muy bajas, lo que dificulta mucho su medición y en consecuencia, se tiene muy poca información acerca de las proteasas involucradas en la movilización de las proteínas al

macenadas en las semillas y menos aún de la forma en que está regulada su síntesis y actividad.

OBJETIVOS

Se ha sugerido que el ácido giberélico y el ácido abs-císico controlan la producción de la α -amilasa y la protea-sa en las células de la capa de aleurona de los cereales. Esta sugerencia se basa en algunos datos experimentales co-mo son:

- 1) Ambas enzimas son sintetizadas *de novo* por la ac-ción del ácido giberélico.
- 2) La síntesis se lleva a cabo simultáneamente.
- 3) La respuesta en ambos casos depende de la concentra-ción de la hormona.
- 4) No se encuentra actividad de α -amilasa ni de protea-sa cuando se les agrega ABA al inicio de la incuba-ción.
- 5) Si se agregan inhibidores de la síntesis de proteí-nas o de ARN, tampoco se detecta actividad de las dos enzimas.

Sin embargo, estos datos pueden ser sólo coincidencias, ya que al desconocer el mecanismo de inducción de la protea-sa por AG_3 en la capa de aleurona, no se puede asegurar que los sistemas que controlan la síntesis de la α -amilasa sean idénticos a los que controlan los de la proteasa.

Es indudable el interés que presenta el estudio del con

tro] de la producción de ambas enzimas, ya sea que respondan a un mismo mecanismo regulado por la fitohormona o que dos mecanismos diferentes coincidan en el tiempo y la magnitud de la respuesta a la adición del AG_3 a las capas de aleurona.

De este modo se propuso el estudio de este fenómeno para dilucidar si se trata de un mismo mecanismo que regula el incremento de las dos enzimas hidrolíticas como respuesta al AG_3 , o bien, si la fitohormona hace funcionar varios mecanismos simultáneamente.

Se pueden citar ejemplos de ambas posibilidades: El operón de lactosa de *E. coli*, responde en forma coordinada a la adición del inductor, el isopropiltiogalactósido, dando lugar a la síntesis de tres enzimas, mientras que la hidrocortisona muestra efectos variados, desde el incremento de la gluconeogénesis hasta el bloqueo de la lipogénesis; efectos que por su diversidad han propiciado que se mencione en la literatura que la hidrocortisona posea acciones "multivectoriales".

Al igual que muchas investigaciones, ésta que se desea abordar, no tiene una respuesta simple y única, pero conducirá a futuros estudios que pretendan profundizar en la solución del problema.

rante todo el proceso de inducción por el ácido giberélico - ya que en el caso de cebada, que es el el que más se ha estudiado, la síntesis de la α -amilasa se vuelve insensible a este tipo de inhibidores después de las 12 horas.

3) Determinar si se requiere de la síntesis de proteínas durante todo el período de inducción.

4) Estudiar el efecto que tiene el ABA sobre la inducción de la proteasa. En el caso de la α -amilasa se sabe que el ABA inhibe la síntesis de la enzima a cualquier tiempo - que se adicione a las capas de aleurona, con un período - lag de aproximadamente 6 horas cuando se agrega a las 15 horas de inducción.

5) Determinar el o los pH óptimos para capas de aleurona recién aisladas e incubadas en presencia de ácido giberélico, lo que sugerirá si se trata de una o más enzimas.

6) Determinar el efecto que tengan sustancias que activen grupos sulfhidrilos en capas de aleurona de tiempo cero e incubadas en presencia de AG_3 , para tratar de caracterizar parcialmente la especificidad de la o las enzimas proteolíticas.

7) Medir las pozas de aminoácidos en capas de aleurona a diferentes tiempos de inducción para verificar si los niveles de aminoácidos libres se modifican durante la inducción.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 *Material biológico*

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum*) de la variedad Potam S-70, cosechadas en 1978 y 1982, amablemente proporcionadas por PRONASE.

Esta variedad está clasificada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas como trigo doble enano, blanco y blando.

Dentro de lo posible, se trató que las semillas se obtuvieran libres de agentes químicos e insectos. Para realizar el trabajo presente se seleccionaron lotes de semillas, eliminando aquéllas de color diferente, quebradas, muy pequeñas, sin embrión y en general, todas las que se sospechó pudieran estar infestadas por hongos.

El lote de semillas seleccionadas mostró una buena germinación, del 95 al 100% a las 48 horas, cuando se les imbibió en cajas de petri con una hoja de papel filtro, a 25°C y en la obscuridad.

No se tomaron precauciones especiales para su almacenamiento durante el periodo experimental.

2.2 *Substancias*

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico de las siguientes marcas:

J.T. BAKER: Acetato de potasio, acetato de sodio, ácido acético glacial, ácido fosfórico, ácido tricloroacético, alcohol etílico, alcohol isopropílico y yodo.

MERCK: Acido clorhídrico, ácido succínico, almidón soluble, cloruro de sodio, cloruro de calcio dihidratado, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, sulfato cúprico pentahidratado, tartrato de sodio y potasio y yoduro de potasio.

SIGMA DE MEXICO: Reactivo de Folín-Ciocalteau.

SIGMA: Acido abscísico grado IV, ácido giberélico grado III, actinomicina D, albúmina de suero de bovino, fracción V libre de ácidos grasos, aminoácidos, azul de Coomassie - G-250, caseína libre de vitaminas, cicloheximida, cloramfenicol, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol.

Para la desinfección de las medias semillas se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 0.3% de cloro activo. Para esto se hizo una dilución 1:20 del blanqueador comercial Cloralex con 6% de cloro activo.

Las soluciones utilizadas en las incubaciones de las

capas de aleurona fueron esterilizadas a través de membranas Millipore tipo HA de $0.45\mu\text{m}$ de poro.

El material de vidrio y el agua bidestilada se esterilizaron en autoclave a 120°C y $1.1\text{Kg}/\text{cm}^2$ durante 20 minutos.

2.3 *Imbibición de las medias semillas*

Las semillas de trigo seleccionadas se cortaron transversalmente con un bisturí y las mitades sin embrión se idesinfectaron con la solución de hipoclorito de sodio al 0.3% de cloro activo, aplicando vacío durante 15 minutos, para eliminar la contaminación por hongos y bacterias que pudieran tener las semillas en la superficie. Se enjuagaron cinco veces con agua bidestilada estéril, para lavar el exceso del desinfectante y se transfirieron a cajas petri de 9cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro Whatman 40 y 10ml de agua bidestilada estéril. Las cajas petri con las medias semillas se envolvieron en papel aluminio y se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.4 *Aislamiento de las capas de aleurona*

Se eliminó cuidadosamente el endospermo almidonoso de las medias semillas embebidas por 24 horas, con la ayuda de

dos espátulas. Las capas de aleurona con pericarpio y testa, que se denominarán capas de aleurona, se transfirieron a una caja petri con agua estéril, colocada sobre un baño de hielo. Esto último se hizo debido a que para obtener el ambiente estéril se utilizó un mechero en una campana de extracción de gases, lo que incrementa mucho la temperatura.

Cuando se tuvieron aisladas todas las capas de aleurona necesarias para el experimento, se enjuagaron varias veces con agua bidestilada estéril y se transfirieron a ma-traces erlenmeyer con tapón de rosca para efectuar los di-ferentes tratamientos.

Todas las manipulaciones, desde la desinfección de las medias semillas hasta el fin de las incubaciones, se hicieron en condiciones estériles y a temperatura ambiente.

El procedimiento para el aislamiento de las capas de aleurona se muestra en forma de diagrama en la figura 2.1.

2.5 *Incubación de las capas de aleurona*

Por cada 10 capas de aleurona se utilizaron 2ml de me-dio de incubación y se colocaron en matraces erlenmeyer - con tapón de rosca de 50ml. Estos se incubaron en un baño a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, con agitación moderada.

El medio de incubación contenía: succinato de sodio -

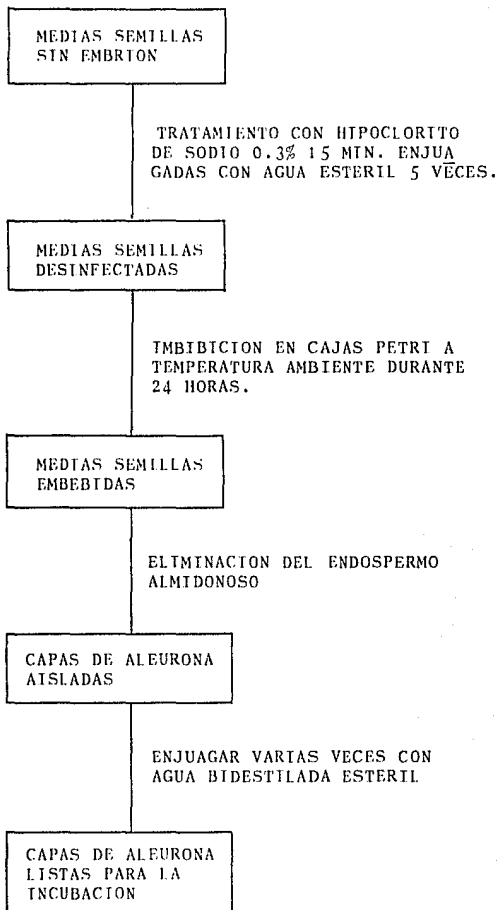


FIGURA 2.1 OBTENCION DE LAS CAPAS DE ALEURONA.

5mM, pH 5.8, cloruro de calcio 20mM, sulfato de estreptomina 50µg/ml y cloramfenicol 50µg/ml.

2.6 *Inducción de la α-amilasa y proteasa*

Para la inducción, las capas de aleurona se incubaron en el medio antes descrito, en presencia de ácido giberélico 10^{-6} M, a 25°C, y se obtuvieron muestras a diferentes tiempos de incubación, que se especificarán para cada experimento, de las capas de aleurona y medio de inducción y se determinaron las actividades enzimáticas utilizando los métodos que se describirán más adelante.

2.7. *Tratamientos de las capas de aleurona*

2.7.1 *Inducción de las capas de aleurona en presencia de cicloheximida*

Se incubaron 20 capas de aleurona con 4ml de medio de incubación en presencia de AG_3 10^{-6} M, a 25°C. A diferentes tiempos de la inducción, t_i , se les agregó cicloheximida a una concentración final de 5µg/ml y las incubaciones se continuaron hasta las 27 horas, tiempo en que se determinó la actividad proteolítica.

2.7.2 *Inducción de las capas de aleurona en presencia de actinomicina D*

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml de medio de incubación en presencia de AG_3 $10^{-6}M$, a $25^{\circ}C$; a diferentes tiempos, t_i , se les agregó actinomicina D (Act-D) a una concentración final de $20\mu g/ml$ y las incubaciones se prosiguieron hasta las 24 horas, tiempo en que se determinó la actividad proteolítica.

2.7.3 *Inducción de las capas de aleurona en presencia de ácido abscísico.*

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml de medio de incubación en presencia de AG_3 $10^{-6}M$. Transcurridas 15 horas de la inducción se les agregó ácido abscísico (ABA) a una concentración final de $10^{-5}M$ y se prosiguió la incubación durante diferentes tiempos. Se determinó la actividad proteolítica cada 2 horas a partir de la adición del ABA, hasta las 27 horas.

2.8 *Métodos analíticos*

2.8.1 *Determinación de la actividad de la α -amilasa*

Para esta determinación se siguió el método de Briggs

modificado (Bernal, 1978), que consiste en medir la disminución del complejo almidón-yodo debido a la degradación del almidón, en función de la actividad de la α -amilasa y del tiempo de incubación.

Reactivos:

a) Acetato de calcio 6.5mM pH 6.0,

b) sustrato: se suspendieron 0.125g de almidón soluble en 5ml de agua bidestilada; la suspensión se calentó a ebullición durante 1.5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente, luego se le agregaron 0.5ml de acetato de calcio - 0.65M pH6.0 y 0.5ml de cloruro de sodio 0.5M, y se aforó a 50ml con agua bidestilada. La solución de almidón se preparó el día del ensayo.

c) Solución de yodo-yoduro de potasio. Se disolvieron 40g de yoduro de potasio en agua bidestilada, se le agregaron 2.54g de yodo resublimado en el laboratorio y se aforaron a 100ml con agua bidestilada. El día del ensayo se hizo una dilución 1:200 con agua bidestilada.

2.8.1.1 *Obtención del extracto para determinar la actividad de la α -amilasa*

Las capas de aleurona se homogeneizaron a 4°C en un homogeneizador tipo Potter con émbolo de teflón por 4 períodos de 20 segundos de molido a 1.800rpm, con intervalos de 10

segundos de descanso, para evitar el calentamiento de las muestras, con 3ml de acetato de calcio 6.5mM pH 6.0. El homogenado se calentó a 70°C durante 20 minutos para inactivar a la β -amilasa y se centrifugó a 4°C a 17,000 g en un rotor Sorvall SS-34 durante 15 minutos. El sobrenadante se denominó extracto y se utilizó para hacer la determinación de la α -amilasa. En la figura 2.2 se esquematiza el procedimiento.

2.8.1.2 *Ensayo enzimático de la α -amilasa*

A 1.5ml de sustrato se le agregaron 0.5ml del extracto a la dilución apropiada, se incubó a temperatura ambiente y a diferentes tiempos (0,2,4,6,8 y 10 minutos), se tomaron alícuotas de 0.2ml, los cuales se transfirieron a tubos que contenían 10ml de la solución 1:200 de yodo-yoduro de potasio y se leyeron a 565nm. La solución de yodo al mismo tiempo que forma el complejo colorido con el almidón, detiene la actividad enzimática.

En general, los cambios de absorbencia no deben ser mayores de 0.0500/10 minutos, porque es el rango de absorbencia, determinado en el laboratorio, en el cual la linealidad de la reacción, con respecto al tiempo, se mantiene. Se definió la unidad de α -amilasa como la cantidad de enzima que cambia la absorbencia en 0.001 unidades de absorbencia/minuto mg de proteína.

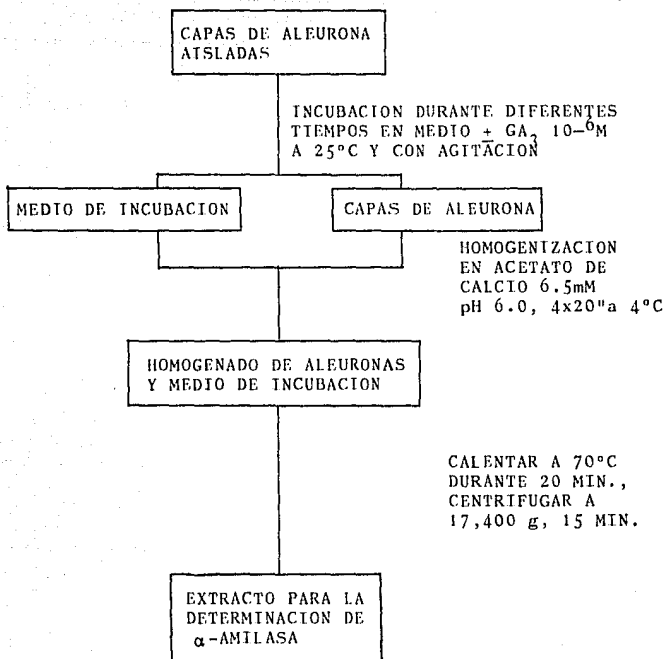


FIGURA 2.2 Incubación de las capas de aleurona y preparación de los extractos para la determinación de α-amilasa.

2.8.2 Determinación de la actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad proteolítica se utilizó el método reportado por Feller y cols. (1978) modificado, que consiste en medir la degradación de una proteína, en este caso la caseína, midiendo los grupos amino libres que aparecen en el sobrenadante de la precipitación de la mezcla de incubación con ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Los grupos amino se cuantificaron por el método de Rosen (1957).

Reactivos:

a) Medio de extracción. Acetato de potasio 50mM pH - 5.4, con 2-mercaptoetanol 10mM,

b) sustrato: caseína libre de vitaminas al 0.5% en acetato de potasio 50mM pH 5.4 con ME 10mM,

c) ácido tricloroacético al 50% p/v,

d) amortiguador para la determinación de aminoácidos:
acetato de sodio 3.5M pH 5.2 a 5.4,
cianuro de sodio 5mM,
amortiguador acetato-cianuro: 1ml de la solución de cianuro de sodio se lleva a 50ml con el amortiguador de acetato de sodio,

e) ninhidrina. Solución al 3% en metilcelosolve. Este reactivo debe prepararse el día de la determinación y el metil-celosolve debe estar libre de peróxidos.

f) diluyente, isopropanol-agua 1:1 v/v.

2.8.2.1 *Obtención del extracto*

Las aleuronas se homogeneizaron en acetato de potasio 50mM pH 5.4 con ME 10mM, en un homogeneizador tipo Potter de la misma forma que se describió para la obtención del extracto de la α -amilasa, se centrifugó a 17,400g durante 15 minutos a 4°C, en un rotor Sorvall SS-34. Al sobrenadante se le llamó extracto y se utilizó para la determinación de la actividad proteolítica. El procedimiento se esquematiza en la figura 2.3.

2.8.2.2 *Ensayo enzimático de la proteasa*

Se preincuba 1ml del sustrato a 30°C durante 10 minutos en un baño con agitación. Se agrega 0.5ml del extracto y se continúa la incubación a 30°C durante 60 minutos. Para detener la reacción se agrega TCA a una concentración final de 5% p/v. Inmediatamente se transfieren a un baño con hielo y se dejan ahí durante por lo menos 2 horas, después de ésto, se centrifugan a 3,000rpm durante 20 minutos en una centrífuga IEC modelo PR-2 a 4°C. El sobrenadante se utilizó para hacer la determinación de aminoácidos por el método de Rosen (1957).

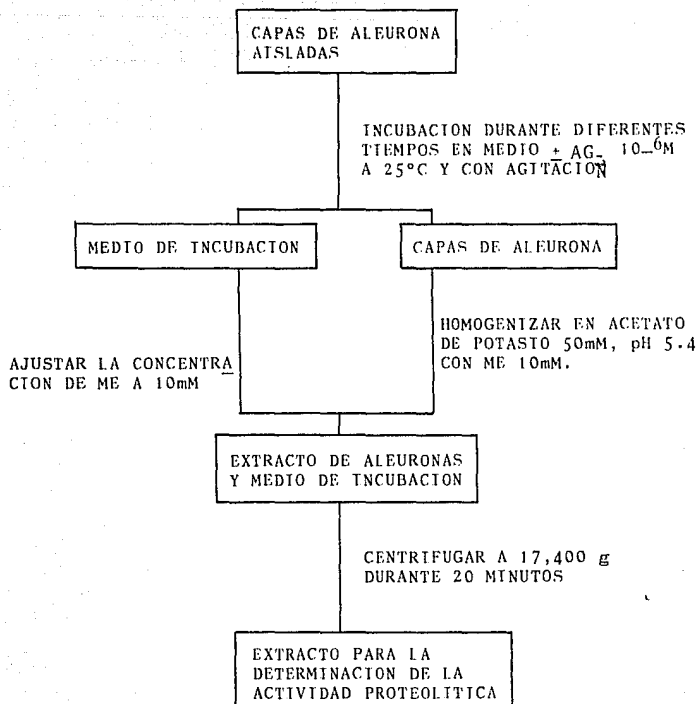


FIGURA 2.3 Incubación de las capas de aleurona y preparación del extracto para la determinación de la actividad proteolítica.

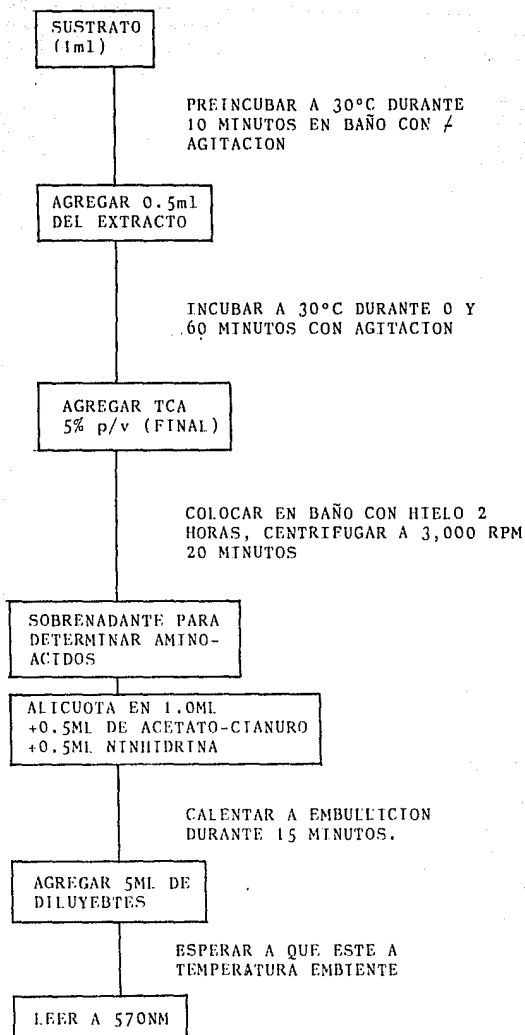


FIGURA 2.4 Diagrama para la determinación de la actividad proteolítica.

2.8.2.3 *Determinación de aminoácidos*

A 1ml de muestra se le agregaron 0.5ml del amortiguador acetatos-cianuro y 0.5ml de la solución de ninhidrina, se agitaron bien, se taparon con canicas y se pusieron en un baño con agua hirviendo durante 15 minutos, se sacaron del baño y se les agregaron 5ml del diluyente y cuando estuvieron a temperatura ambiente, se leyeron a 570nm contra un blanco preparado de la misma forma, pero con 1ml de agua en lugar de la muestra. Como estándares glicina o leucina a una concentración entre 0 y 100nmoles/ml. En la figura 2.4 se muestra el diagrama para la determinación de la actividad proteolítica y en la figura 2.5 la curva patrón de aminoácidos, en este caso glicina.

2.8.3 *Determinación de las pozas de aminoácidos.*

Reactivos

- a) ácido perclórico 12% p/v
- b) hidróxido de potasio 1N,
- c) soluciones para la determinación de aminoácidos.

2.8.3.1 *Preparación del extracto*

Lotes de 40 capas de aleurona se homogeneizaron con 2.5ml de agua bidestilada a 4°C en un homogeneizador tipo

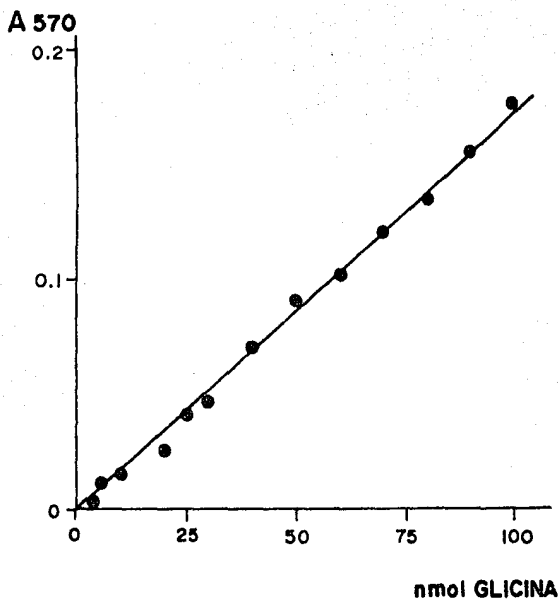


FIGURA 2.5 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS
La determinación se hizo utilizando el método de -
Rosen (1957), utilizando glicina como estándar.

Potter en la misma forma que se describió para la obtención del extracto para la α -amilasa; se centrifugó a 25,400g en un rotor Sorvall SS-34 durante 20 minutos. Al sobrenadante se le agregó un volúmen igual de ácido perclórico al 12% p/v y se dejó en un baño con hielo durante 2 horas, al cabo de las cuales se centrifugó a 25,400g a 4°C durante 20 minutos en el rotor Sorvall SS-34. Se ajustó el pH del sobrenadante a un valor entre 5 y 6 con hidróxido de potasio 1N, se dejó en un baño con hielo durante 1 hora y se centrifugó a 25,400 g durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar los aminoácidos por el método de Rosen (1957).

2.8.4 *Determinación de la actividad proteolítica en función del pH*

Reactivos:

- a) Medio de extracción, acetato de potasio 5mM pH 5.4
- b) acetato de potasio 50mM a los diferentes pH que se probaron en el rango de 3.6 a 5.6 con ME 10mM,
- c) fosfato de potasio 50mM, a los diferentes valores de pH que se probaron en el rango de 5.7 a 7.0, con ME 10mM.

2.8.4.1 *Obtención de los extractos*

Un lote de 400 capas de aleurona incubadas en 100ml - de medio de inducción con $Ag_3 10^{-6}$ M durante 50 horas a 25°C

se enjuagaron 3 veces con 25ml de acetato de potasio 5 mM con 10mM de ME; el primer lavado se agregó al medio de inducción y se le ajustó la concentración de ME a 10mM, se centrifugó a 17,400g durante 15 minutos y se utilizó para determinar la actividad proteolítica.

Las capas de aleurona se congelaron en nitrógeno líquido, se molieron en un mortero preenfriado hasta obtener un polvo fino, que se homogeneizó en un homogeneizador tipo Potter con acetato de potasio 5mM pH 5.4 con ME 10mM a 4°C y se centrifugó a 17,400g en un rotor Sorvall SS-34 durante 15 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad proteolítica y se denominó extracto de aleuronas de tiempo 50 horas.

400 capas de aleurona recién aisladas se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron de la misma forma que que describió para las aleuronas incubadas durante 50 horas con AG_3 . Al sobrenadante obtenido después de la centrifugación se le denominó extracto de aleuronas de 0 horas.

Se hicieron determinaciones de la actividad proteolítica a cada pH para:

- a) Extracto de aleuronas de tiempo 0,
- b) extracto de aleuronas de 50 horas de incubación y,
- c) medio de incubación de 50 horas.

2.8.5 Efecto que tienen compuestos que activan sulfhidrilos sobre la actividad proteolítica

Reactivos:

- a) acetato de potasio 5mM pH 5.4,
- b) sustrato caseína al 0.5% en acetato de potasio - 50mM al pH escogido \pm el compuesto a probar,
- c) acetato de potasio 50mM al pH escogido, con los siguientes compuestos: ME (0, 0.1, 1.0 y 10mM); ditiotreitól (DTT) (1.0 y 10mM). Los pH a los que se hicieron las determinaciones fueron: 3.5, 4.8 y 5.4.

2.8.5.1 Preparación de los extractos

Se utilizaron aleuronas inducidas durante 22 horas en presencia de $AG_3 \cdot 10^{-6}M$ y aleuronas recién aisladas (tiempo 0 horas). Los homogenados se prepararon en la forma descrita para el caso del efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

2.8.6 Determinación de proteínas por el método de Lowry (1951)

Reactivos:

- a) carbonato de sodio al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1M,
- b) sulfato cúprico pentahidratado al 0.5%,

c) mezclar 50ml de la solución a) con 1ml de la solución b),

d) reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 con agua.

2.8.6.1 Método

A 1ml de muestra se le agregan 5ml del reactivo c) y se deja reposar por aproximadamente 10 minutos. Transcurrido este tiempo se le agregan 0.5ml del reactivo d) y se espera durante 30 minutos. Se lee a 750nm contra un blanco preparado con 1ml de agua en lugar de la muestra. Como estándar se utilizó albúmina de suero de bovino fracción V libre de ácidos grasos, en un rango de concentración entre 0 y 100µg/ml. En la figura 2.6 se muestra la curva patrón de albúmina.

2.8.7 Determinación de proteínas por el método de Bradford (1976)

Reactivo:

0.1g de azul de Coomassie G-250 se disolvieron en 50ml de etanol, se le agregaron 100ml de ácido fosfórico al 85% y se aforó a 1l con agua bidestilada.

2.8.7.1 Método

A 0.1ml de muestra se le agregaron 5ml del reactivo de

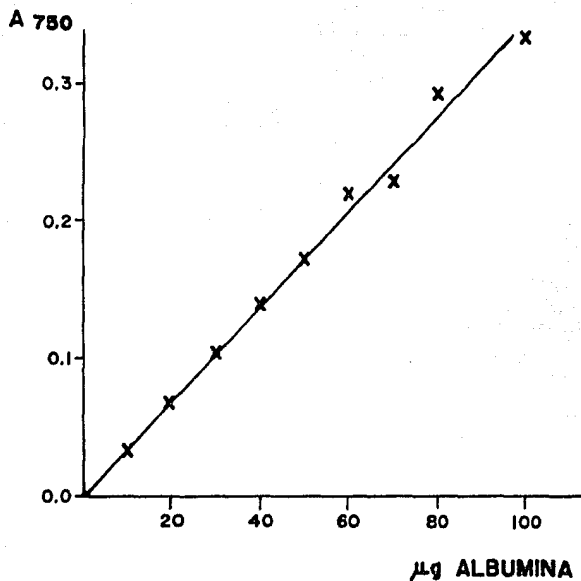


FIGURA 2.6 CURVA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY Y COLS. (1951).

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó albúmina de suero de bovino fracción V, libre de ácidos grasos.

Bradford, se agitó, evitando la formación de espuma y se leyó a 595nm contra un blanco preparado con 0.1ml de agua en lugar de la muestra. Como estándar se utilizó albúmina de suero de bovino fracción V libre de ácidos grasos, en un rango de concentración de 0 a 100µg/0.1ml. En la figura 2.7 se presenta la curva patrón de albúmina.

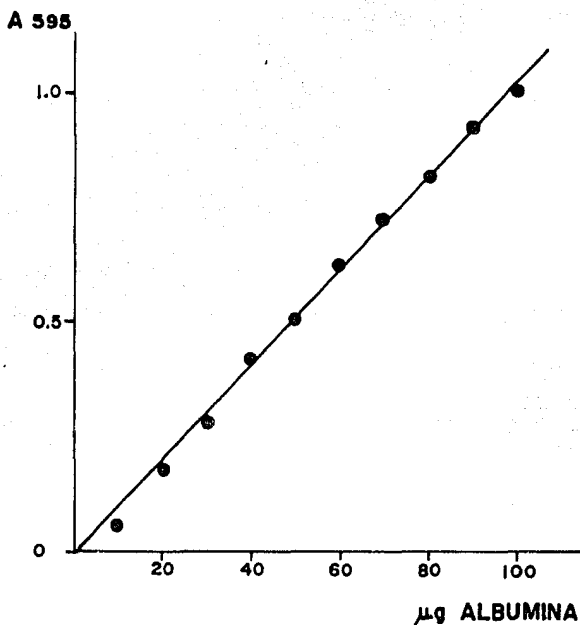


FIGURA 2.7 CURVA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD (1976).

Para la determinación de proteínas se utilizó albúmina de suero de bovino fracción V, libre de ácidos grasos como estándar.

3 RESULTADOS

3.1 *Inducción de α -amilasa y proteasa en capas de aleurona aisladas por ácido giberélico*

En la literatura existen reportes de que el ácido giberélico induce la síntesis de enzimas proteolíticas y de que la síntesis de α -amilasa y proteasa se lleva a cabo simultáneamente en capas de aleurona de cebada (Jacobsen y Varner, 1967).

Para comprobar si esto sucede en las capas de aleurona de la variedad de trigo utilizada en este trabajo, se hizo la incubación de capas de aleurona en presencia de AG_3 $10^{-6}M$, tomando muestras a diferentes tiempos durante la incubación.

Los resultados se muestran en la figura 3.1 en que se graficaron las actividades de la α -amilasa y la proteasa en el período comprendido entre las 0 y las 48 horas. Los resultados obtenidos en la determinación de la α -amilasa concuerdan con los reportados en la literatura, ya que se puede observar que la actividad de la enzima aparece después de las 6 horas de incubación.

En el caso de la proteasa, se encontró que existe una actividad en las capas de aleurona sin incubar (tiempo 0), que en presencia del AG_3 tiende a disminuir durante las primeras 6 horas de la incubación, incrementándose después de las 9 horas .

En la figura 3.2 se graficó la actividad proteolítica a diferentes tiempos de incubación en presencia y en ausencia de la hormona, hasta las 27 horas. En las capas de aleurona, como ya se mencionó, hay una disminución de la actividad proteolítica reproducible, durante las primeras 6 horas.

La actividad de la proteasa se reporta como equivalentes de grupos amino liberados por hora y por miligramo de proteína. Para cada muestra, la determinación de la actividad proteolítica se efectuó por triplicado.

En el caso de las capas de aleurona incubadas en ausencia de AG_3 , se observa que la actividad proteolítica prácticamente no varía, mientras que en las aleuronas incubadas en presencia de AG_3 al rededor de las 9 horas se inicia un incremento en aa actividad, que es lineal al menos hasta las 48 horas de inducción, que fué el tiempo máximo al que se siguió la cinética de inducción de la enzima.

En la tabla 3.1 se dan los resultados de la inducción de la proteasa en presencia del ácido giberélico.

3.2 *Efecto de la cicloheximida sobre la inducción de la actividad proteolítica en capas de aleurona de trigo incubadas en presencia de ácido giberélico.*

Para comprobar si se requiere de la síntesis de proteí-

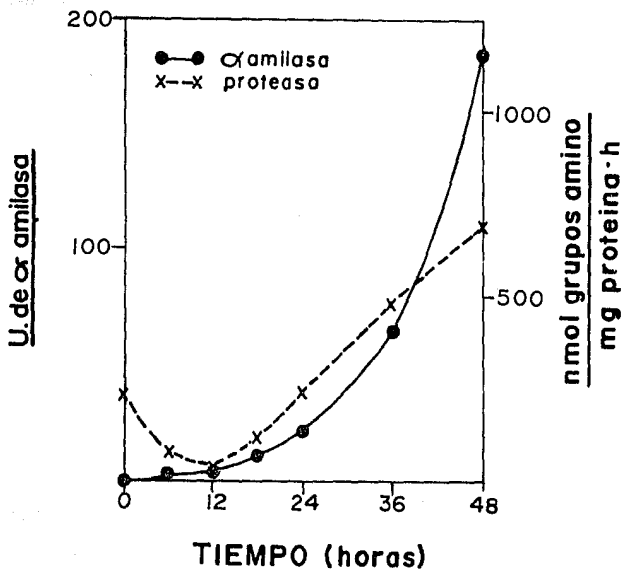


FIGURA 3.1 INDUCCION DE LAS ACTIVIDADES DE α -AMILASA Y PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS EN PRESENCIA DE ACIDO GIBERELICO.

Lotas de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml de medio de inducción que contenía succinato de sodio - 5mM pH 5.8, acetato de calcio, 20mM, estreptomina y cloramfenicol 50 μ g/ml en presencia de AG_3 10^{-6} M. Se determinó la actividad de α -amilasa y de proteasa a diferentes tiempos de inducción como se describió en materiales y métodos.

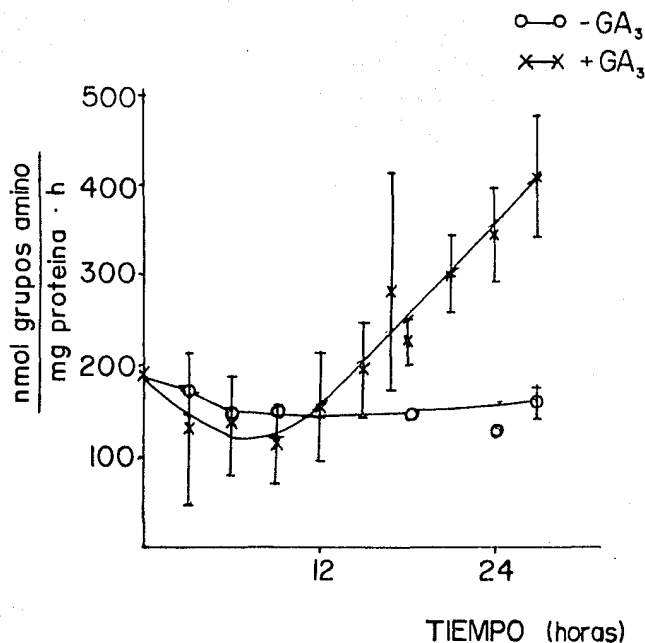


FIGURA 3.2 INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE AG₃.

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml del medio de inducción que contenía succinato de sodio 5mM, cloruro de calcio 20mM pH 5.8, estreptomina y cloramfenicol 50 μ g/ml en presencia y en ausencia de AG₃ 10⁻⁶M, por diferentes tiempos, 0; 3, 6, 9, 12, 15, 17, 18, 21, 24 y 27 horas. La actividad proteolítica se determinó por el método de Feller y cols. (1978).

TABLA 3.1 CINETICA DE APARICION DE PROTEASA INDUCIDA POR ACIDO GIBERELICO EN ALEURONAS DE TRIGO.

TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)	nMOLES DE GRUPOS AMINO/mg PROTEINA HORA
0	190.1 ± 85.0
3	131.6 ± 82.6
6	141.9 ± 54.8
9	109.8 ± 41.7
12	154.8 ± 58.7
15	196.3 ± 51.0
17	278.0 ± 128.8
18	255.2 ± 21.8
21	302.6 ± 43.0
24	347.1 ± 50.0
27	411.6 ± 64.8
-GA ₃ 27	161.3 ± 12.3

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml de medio de inducción que contenía succinato de sodio 5mM pH 5.8, con cloruro de calcio 20mM, sulfato - de estreptomicina y cloramfenicol 50µg/ml y ácido giberélico 10⁻⁶M a 25±0.5°C por diferentes tiempos (0,3,6,9,12,15,17,18,21,24 y 27 horas) a los que se de terminó la actividad proteolítica por el método de Feller y cols. (1978).

nas durante todo el proceso de inducción, como ocurre con la α -amilasa, se agregó cicloheximida a una concentración final de 5 μ g/ml, a diferentes tiempos de incubación, t_i , y se continuó la incubación hasta las 27 horas, tiempo en que se determinó la actividad proteolítica.

En la tabla 3.11 se muestra que hay una disminución en la actividad proteolítica por la adición de la cicloheximida, ya que las actividades encontradas a las 27 horas, son aún menores que las que se tenían antes de agregar el inhibidor. Este efecto se observó en forma independiente del tiempo de adición de la cicloheximida.

La actividad proteolítica se calculó de la siguiente manera: A la actividad proteolítica medida del tiempo t_i a las 27 horas en presencia de ácido giberélico se le consideró como el 100% de la actividad sintetizada de t_i a 24 horas.

Al incremento en la actividad proteolítica del tiempo t_i a las 27 horas, de capas de aleurona incubadas en presencia de AG_3 a las que se les agregó cicloheximida al tiempo t_i , se le consideró como la actividad proteolítica sintetizada de t_i a 27 horas en presencia del inhibidor.

El % de inhibición se calculo como sigue:

Se restó la actividad proteolítica sintetizada de t_i a 27 horas en presencia del inhibidor de la actividad proteolít-

TABLA 3.11 EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA INDUCIDA POR ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO VAR. POTAM S-70.

TIEMPO HORAS	ACTIVIDAD +AG ₃	TIEMPO DE ADICION DE CICLOHEXIMIDA	INCREMENTO ACTIVIDAD DE t _i a 27 HORAS +AG ₃	ACTIVIDAD MEDIDA A 27H EN PRESENCIA DE CICLOHEXIMIDA	INCREMENTO ACTIVIDAD t _i a 27 HORAS +CH DE t _i a 27 HORAS	% INHIBICION
0	242.0	0	169.6	208.3	-33.7	120.0
3	197.5	3	214.1	159.0	-38.0	117.7
6	219.9	6	191.7	285.7	+65.8	65.7
9	186.3	9	225.3	142.3	-44.0	119.5
12	192.4	12	219.2	166.9	-25.5	116.3
15	214.5	15	197.1	215.5	+ 1.0	99.5
18	279.4	18	132.2	221.9	-58.1	143.9
21	325.1	21	86.5	225.0	-70.1	181.0
24	367.5	24	44.1	289.0	-78.5	278.0

-AG₃ DE 0 A 27 HORAS 242.0

+AG₃ DE 0 A 27 HORAS 411.6

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron con 4ml de medio de inducción que contenía succinato de sodio 5mM pH 5.8, cloruro de calcio 20mM, cloramfenicol y sulfato de estreptomycin 50µg/ml, ácido giberélico 10⁻⁶M y a diferentes tiempos de incubación se les agregó cicloheximida a una concentración final de 5µg/ml. Se determinó la actividad a las 27 horas. La inhibición se calculó de la siguiente manera: A la actividad proteolítica encontrada del tiempo t_i a 27 horas en presencia de ácido giberélico que se consideró como el 100% de actividad, se le restó la actividad determinada del tiempo t_i a las 27 horas en presencia del inhibidor, se dividió entre la primera y se multiplicó por 100.

tica sintetizada de t_1 a 27 horas en presencia de AG_3 y se dividió entre la actividad proteolítica sintetizada de t_1 a 27 horas en presencia de AG_3 y se multiplicó por 100.

3.3 Efecto de la actinomicina D sobre la inducción de la actividad proteolítica por AG_3 en capas de aleurona de trigo

Una vez que se demostró el requerimiento de la síntesis de proteínas durante todo el período de incubación para la producción de la actividad proteolítica, se investigó si se trataba de una inducción que procedía desde la transcripción de ARN mensajeros.

Para este estudio se incubaron capas de aleurona en presencia de AG_3 $10^{-6}M$ y a diferentes tiempos se les agregó actinomicina D (Act-D), a una concentración final de 20 $\mu g/ml$; esta concentración de Act-D inhibe el 80% de la síntesis de la α -amilasa en capas de aleurona del trigo de la variedad Potam S-70, que es el utilizado en este trabajo (Bernal, 1978) y se determinó la actividad proteolítica a las 24 horas de iniciada la inducción con AG_3 .

Los resultados se muestran en la tabla 1.111. Se observa que hay una inhibición de la actividad proteolítica a cualquier tiempo de adición de la Act-D, lo que indica que se requiere de la síntesis de ARN durante todo el pro-

ceso de inducción. Otra vez, como en el tratamiento anterior, la actividad proteolítica no solo no aumentó desde el momento de la adición del inhibidor hasta las 24 horas de incubación total, sino que en algunos puntos experimentales, se encontró una disminución en la actividad proteolítica. - Esto sugiere una inactivación o recambio en la proteasa inducida, sin embargo, no se exploró más allá este hecho.

Los cálculos para la inhibición que produce la actinomicina D sobre la inducción de la proteasa por ácido giberélico, se hicieron en forma análoga a lo que se describió en el caso de la cicloheximida.

La inhibición se determinó restando la actividad sintetizada en presencia del inhibidor de la actividad sintetizada en ausencia del mismo, se dividió entre la actividad sintetizada en ausencia del inhibidor y se multiplicó por 100, dando como resultado el % de inhibición.

3.4 *Efecto del ácido abscísico sobre la inducción de la actividad proteolítica promovida por ácido giberélico en capas de aleurona de trigo.*

Para tratar de dilucidar si el mecanismo del control de la producción de la α -amilasa y la proteasa es el mismo, el cual, por los datos del experimento anterior con Act-D, aparentemente es distinto, se incubaron capas de aleurona

TABLA 3.111 EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LA INDUCCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA PROMOVIDA POR EL ACIDO GIBERELICO EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO VAR. POTAM S-70.

TIEMPO HORAS	ACTIVIDAD + AG ₃	TIEMPO DE ADICION DE ACTINOMICINA D	INCREMENTO ACTIVIDAD DE t _i A 24 HORAS + GA ₃	ACTIVIDAD MEDIDA A 24H EN PRESENCIA DE ACTINOMICINA-D	INCREMENTO ACTIVIDAD DE t _i A 24 HORAS + ACT-D DE t _i A 24 HORAS	% INHIBICION
0	153.1	0	260.8	56.9	-96.1	136.8
3	87.2	3	326.7	66.9	-20.3	106.2
6	79.9	6	334.0	57.9	-22.0	106.6
9	101.6	9	312.3	117.9	16.3	94.8
12	123.3	12	290.6	119.4	- 3.9	101.3
15	235.7	15	178.2	188.4	-47.3	126.5
17	277.0	17	136.0	259.8	-18.1	113.3
21	368.4	21	45.5	305.0	-63.4	239.3
<hr/>						
-AG ₃ DE 0 A 24 HORAS	161.0					
+AG ₃ DE 0 A 24 HORAS	413.9					

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron en 4ml de medio de incubación que contenía succinato de sodio 5mM pH 5.8, cloruro de calcio 20mM, sulfato de estreptomycina y cloramfenicol 50µg/ml y ácido giberélico 10⁻⁶M. A diferentes tiempos durante la incubación (0,3,6,9,12,15,17 y 21 horas) se les agregó actinomicina-D a una concentración final de 20µg/ml y se prosiguió la incubación hasta las 24 horas, tiempo en que se determinó la actividad proteolítica. La inhibición se calculó de la siguiente manera: A la actividad proteolítica encontrada del tiempo t_i a 24 horas en presencia de AG₃, que se consideró como 100% de actividad, se le restó la determinada del tiempo t_i a 24 horas en presencia del inhibidor, se dividió entre el incremento de actividad en ausencia del inhibidor y se multiplicó por 100.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

en presencia de ácido giberélico $10^{-6}M$ a $25^{\circ}C$ durante 15 horas, tiempo al que se les agregó ácido abscísico (ABA) a una concentración final de $10^{-5}M$ y se determinó la actividad proteolítica cada 2 horas a partir de la adición y hasta las 27 horas.

En el caso de la α -amilasa, se ha reportado que el efecto inhibitorio se presenta después de un período lag de 6 horas, cuando se agrega el ABA a las 15 horas de inducción con AG_3 (García-Maya, 1982)

Los resultados se muestran en la tabla 3.IV y en la figura 3.3. Se observa que sí hay una inhibición de la actividad proteolítica, y es de mencionarse, que no se presenta el período lag, como sucede con la α -amilasa.

Los cálculos para determinar la inhibición de la actividad proteolítica se hicieron como a continuación se describe:

El incremento en la actividad proteolítica desde las 15 horas hasta el tiempo t_1 , en presencia de ácido giberélico se consideraron como el 100% de actividad inducida en las capas de aleurona por la acción del ácido giberélico.

Al incremento en la actividad determinado de 15 horas al tiempo t_1 , cuando se agregó ABA a las 15 horas, fué el incremento de actividad en presencia del inhibidor.

TABLA 3.IV EFECTO DE LA ADICION DEL ACIDO ABCISICO DURANTE LA INDUCCION DE LA PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS CON ACIDO GIBERELICO.

TIEMPO HORAS t_i	ACTIVIDAD + AG ₃ AL TIEMPO t_i	TIEMPO DE MEDICION DE ACTIVIDAD ABA 15 A	INCREMENTO DE ACTIVIDAD DE 15 A t_i + AG ₃	ACTIVIDAD MEDIDA AL TIEMPO t_i AG ₃ O A t_i ABA 15 A t_i	INCREMENTO DE ACTIVIDAD DE 15 A t_i ABA 15 A t_i	% INHIBICION
15	165.0	--	-----	-----	-----	-----
17	133.8	17	-31.2	238.5	73.5	-335.6
19	117.7	19	-47.3	114.0	-51.0	7.8
21	291.3	21	126.3	236.6	71.3	43.5
23	488.8	23	323.8	238.9	73.9	76.5
25	631.8	25	466.8	310.6	145.6	68.8
27	821.0	27	656.0	241.6	76.6	88.3

-AG₃ DE 0 A 27 HORAS 136.4

+ABA DE 0 A 27 HORAS 194.5

+AG₃ +ABA DE 0 A 27 HORAS 260.9

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron en 4 ml de medio de inducción que contenía succinato de sodio 5mM, pH5.8, cloruro de calcio 20mM, sulfato de estreptomina y cloramfenicol 50µg/ml y ácido giberélico 10⁻⁶ M a las 15 horas de incubación se les agregó ácido abscisico a una concentración de 10⁻⁶ M y se determinó la actividad proteolítica a diferentes tiempos (15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27 horas. La inhibición se calculó de la siguiente manera: al incremento en la actividad proteolítica de 15 horas al tiempo t_i , se -- consideró como el 100% de actividad. A este incremento se le restó el correspondiente de 15 horas a t_i - en presencia del ABA y se divide entre el incremento de actividad en ausencia de ABA y se multiplica por 100.

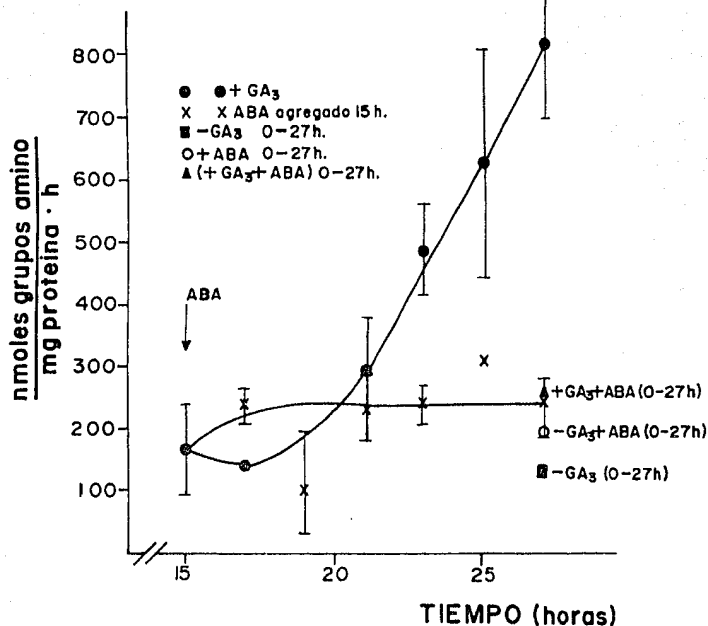


FIGURA 3.3 EFECTO DE LA ADICION DEL ACIDO ABCISICO DURANTE LA INDUCCION DE LA PROTEASA EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO INCUBADAS CON AG₃.

Lotes de 20 capas de aleurona de trigo se incubaron con 4ml de medio de incubación que contenía succinato de sodio 5mM pH 5.8, cloruro de calcio 20mM, estreptomicina y cloramfenicol 50µg/ml y AG₃ 10⁻⁶M. A las 15 horas de incubación se les agregó ³ABA a una concentración final de 10⁻⁵M y se determinó la actividad cada 2 horas hasta las 27horas.

Se restó la actividad proteolítica en presencia del ABA de la actividad proteolítica en ausencia del inhibidor, se dividió entre esta última y se multiplicó por 100, para obtener el % de inhibición.

3.5 *Determinación del pH óptimo de la actividad proteolítica en capas de aleurona de trigo recién aisladas e inducidas con ácido giberélico durante 50 horas*

Se hizo notar que existía una actividad proteolítica inicial en las capas de aleurona recién aisladas, figura 3.2 y tabla 3.1, la que se mantuvo en ausencia del AG_3 hasta las 27 horas de incubación. Esto indujo a pensar que fueran varias las enzimas proteolíticas presentes en el sistema experimental, una que se puede denominar "constitutiva", presente en las capas de aleurona y otra, que por acción del ácido giberélico, es inducida.

Se intentó demostrar si eran varias las enzimas que se tenían en las capas de aleurona, determinando el pH óptimo de la actividad proteolítica presente en aleuronas recién aisladas y en capas de aleurona inducidas durante 50 horas en presencia de ácido giberélico, así como también en el medio de incubación de éstas últimas.

En la figura 3.4 y en la tabla 3.V se muestran los resultados de la actividad proteolítica de los extractos de las ca-

pas de aleurona de tiempo cero, se encontró que hay un máximo de actividad a pH de 4.8. En el caso de las aleuronas de 50 horas de inducción con ácido giberélico, la máxima actividad se localizó a 5.4, con un "hombro" a 4.8, y por último, en el medio de inducción de las aleuronas incubadas durante 50 horas, que es la actividad proteolítica que se secreta, se encontró un pH óptimo a 5.4, con un incremento hacia la zona ácida, a pH de 3.6 o aún menor.

3.6 *Efecto de compuestos que activan grupos SH sobre la actividad proteolítica inducida por ácido giberélico en capas de aleurona de trigo durante 22 horas y de sobre la actividad proteolítica de aleuronas sin inducir.*

Para tratar de caracterizar parcialmente las actividades proteolíticas presentes en capas de aleurona, se utilizaron dos compuestos que activan grupos SH, el 2-mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT).

Las determinaciones se hicieron en acetato de potasio - 50mM a tres diferentes pH. 3.5, 4.8 y 5.4, que fueron los pH a los que se encontraron actividades más altas en el experimento anterior, en presencia y en ausencia de los reactivos con sulfhidrilos libres.

En la tabla 3.VI se puede observar lo siguiente:

- a) En el caso de las aleuronas no inducidas, a pH de - 3.5 se incrementa la actividad aproximadamente 5 veces con -

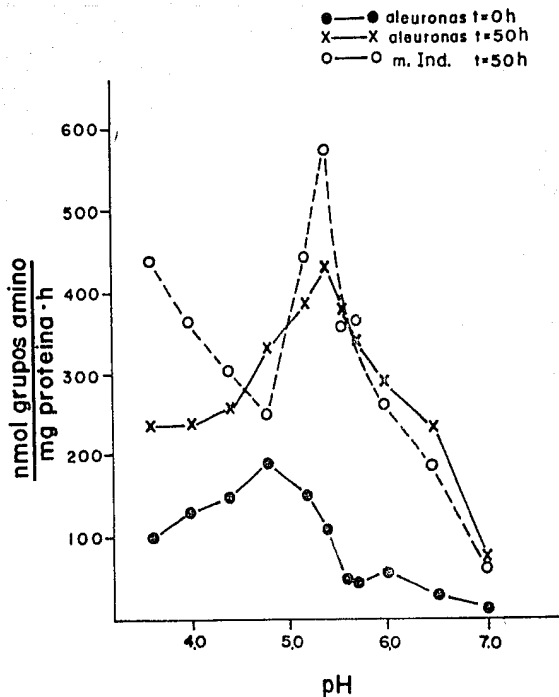


FIGURA 3.4 Aleuronas de 0 ó 50 horas de inducción con ácido giberélico 10^{-6} M. se homogeneizaron en acetato de potasio 5mM -- pH 5.4 con 2 mercapto etanol 10mM. Para la incubaciones se ajustaron utilizando acK 50mM. -- al pH requerido y el sustrato también se ajustó al mismo pH. Las incubaciones se hicieron a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en un baño con -- agitación. Se tomaron muestras a tiempos 0 y 60', se -- precipitaron con TCA (5% x/v conc. final.) Se dejaron -- en frío por un mínimo de dos horas, se centrifugaron y -- al SN se le determinaron aminoácidos por el método de Ro sen.

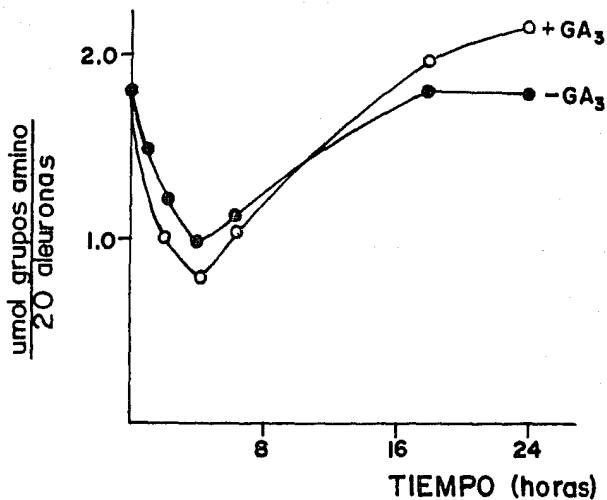


FIGURA 3.5 DETERMINACION DE LA POZA DE AMINOACIDOS

Lotes de 20 capas de aleurona se incubaron en succinato de sodio 5mM pH 5.8, cloruro de calcio 20mM, - estreptomicina y cloramfenicol 50µg/ml en presencia o en ausencia de ácido giberélico. A diferentes tiempos se determinó la poza de aminoácidos.

TABLA 3.V DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIEN AISLADAS E INDUCIDAS DURANTE 50 HORAS CON ACIDO GIBERELICO.

pH	CAPAS DE ALEURONA DE 0 HORAS	CAPAS DE ALEURONA DE 50 HORAS DE INDUCCION	MEDIO DE INCUBACION DE 50 HORAS DE INDUCCION
3.6	100	238	441
4.0	130	238	367
4.4	146	257	305
4.8	192	334	251
5.2	151	388	446
5.4	108	433	575
5.6	49	380	309
5.7	46	340	314
6.0	56	289	262
6.5	27	235	187
7.0	11	76	62

Lotes de 400 capas de aleurona se homogeneizaron en acetato de potasio 5mM pH 5.4 con ME 10mM, se centrifugaron a 17,400g, el sobrenadante se utilizó para hacer la determinación de actividad a los diferentes pH. Las aleuronas fueron a) recién aisladas (tiempo cero) y b) incubadas con AG₃ durante 50 horas. El medio de inducción de estas últimas también se centrifugó a 17,400g, habiendo adicionado previamente ME a una concentración final de 10mM. Se utilizaron amortiguadores acetatos para los pH 3,6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.4 y 5.6 y fosfatos para los pH 5.7, 6.0, 6.5 y 7.0 todos a una concentración de 50mM y con ME 10mM. y la determinación se realizó a 30°C como se describió en materiales y métodos.

ME 1.0 y 10mM; en el caso del pH 5.4, también ocurre una activación, de entre 5 y 6 veces con ME 10mM y DTT 10mM, mientras que para el pH de 4.8, prácticamente no se modifica.

En cuanto a las actividades encontradas en las aleuronas de 22 horas de inducción con AG_3 , se ven menos afectadas por los activadores de grupos SH, ya que se presentan incrementos de 1.5 a 2 veces la actividad del control.

Estos datos sugieren que se trata de diferentes actividades proteolíticas, una localizada en las capas de aleurona - sin inducir y que posiblemente tenga una función importante en la degradación de las proteínas de reserva; y otra que, se encuentra en las capas de aleurona inducidas con AG_3 , que posiblemente ejerza su acción en el endospermo almidonoso.

3.7 *Determinación de las pozas de aminoácidos de capas de aleurona de trigo en presencia y ausencia de AG_3*

Para la determinación de las pozas de aminoácidos se utilizaron lotes de 20 capas de aleurona que se incubaron en presencia y ausencia de AG_3 durante diferentes tiempos, se extrajeron los aminoácidos como se describió en materiales y métodos y se determinó la cantidad de aminoácidos en ellos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.5. de ella podemos decir que el comportamiento de las capas de

TABLA 3.VI EFECTO DE COMPUESTOS ACTIVADORES DE GRUPOS SULFHIDRILOS SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO RECIEN AISLADAS E INCUBADAS EN PRESENCIA DE AG_3

TRATAMIENTO	ALEURONAS RECIEN AISLADAS						ALEURONAS INCUBADAS 22 HORAS CON AG_3					
	pH 3.5	VECES ESTIMULACION	pH 4.8	VECES ESTIMULACION	pH 5.4	VECES ESTIMULACION	pH 3.5	VECES ESTIMULACION	pH 4.8	VECES ESTIMULACION	pH 5.4	VECES ESTIMULACION
CONTROL	93.3	1.00	269.6	1.00	99.7	1.00	659.3	1.00	362.8	1.00	532.0	1.00
ME 0.1mM	231.6	2.48	297.3	1.10	245.4	2.46	774.5	1:11	228.9	0.63	557.1	1.05
ME 1.0mM	445.9	3.78	300.7	1.12	304.2	3.05	824.9	1.25	457.8	1.26	650.1	1.17
ME 10 mM	449.8	4.82	321.5	1.19	553.1	5.55	963.0	1.46	816.2	2.25	1098.4	1.97
DTT 1.0 mM	-----	----	-----	----	396.4	3.98	-----	----	-----	----	1117.1	2.00
DTT 10 mM	-----	----	-----	----	619.9	6.22	-----	----	-----	----	1142.7	2.05

Lotes de 400 capas de aleuronas recién aisladas o incubadas en presencia de AG_3 $10^{-6}M$ durante 22 horas, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero pre enfriado hasta obtener un polvo fino que se homogeneizó en un homogeneizador tipo Potter con acetato de potasio 5mM pH 5.4 con ME 10 mM a 4°C. Se centrifugó a 17,400g en un rotor Sorvall SS-34 durante 15 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad proteolítica y se denominó extracto de aleuronas de tiempo 0 ó de 22 horas. Las determinaciones se hicieron en acetato de potasio 50mM al pH requerido en presencia o ausencia de los compuestos activadores de grupos sulfhidrilos a las concentraciones indicadas. Las veces de estimulación se obtuvieron dividiendo los valores de actividad proteolítica a las diferentes concentraciones de los compuestos entre el valor obtenido en ausencia de los mismos.

aleurona en presencia y ausencia del AG_3 , son prácticamente iguales hasta las 6 horas, tiempo en que comienza a haber diferencias en la cantidad de aminoácidos libres, lo que podría ser un reflejo de la actividad proteolítica en las capas de aleurona, que en presencia de AG_3 , sigue un comportamiento semejante como se mostró en la figura 3.2.

4 DISCUSION

En trabajos realizados desde fines de la década de los 60's a la fecha, se ha ido acumulando información acerca de los eventos que tienen lugar en la capa de aleurona de los cereales, debido a los que se consumen las sustancias de reserva acumuladas en el endospermo y que dan como resultado el crecimiento de una nueva planta.

El ácido giberélico tiene una función muy importante en la movilización de las reservas, ya que se requiere de su presencia para que algunas enzimas hidrolíticas, cuya síntesis no depende de AG_3 , sean secretadas al exterior y en otros casos, es necesaria tanto para la síntesis como para la secreción.

Entre estas últimas se pueden mencionar: la α -amilasa (Varner y Ram Chandra, 1964; Chrispeels y Varner, 1967), la proteasa, (Jacobsen y Varner, 1967) y la ribonucleasa (Chrispeels y Varner, 1967), que se sintetizan *de novo*. El otro grupo de enzimas que requiere de AG_3 solo para ser liberadas de la capa de aleurona, está representado por la β -1,3-glucosidasa, cuya secreción se efectúa antes de que comience la de la α -amilasa (Taiz y Jones, 1970).

Estudios hechos en la capa de aleurona de cebada, sugieren que la síntesis de la α -amilasa se lleva a cabo regu

lada por un mecanismo común. Las evidencias que sostienen esto son:

- 1) Ambas enzimas aparecen simultáneamente cuando capas de aleurona son incubadas en presencia de AG_3 (Jacobsen y Varner, 1967).
- 2) La síntesis de ambas enzimas es *de novo* (Filner y Varner, 1967 y Jacobsen y Varner, 1967)
- 3) El ácido abscísico las inhibe cuando es agregado al inicio de la incubación con AG_3 (Chrispeels y Varner, y Jacobsen y Varner, 1967)
- 4) Inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN, también bloquean la síntesis de ambas enzimas, (Jacobsen y Varner, 1967).

Esto no es sorprendente, puesto que existen en la literatura muchos ejemplos donde varias enzimas se sintetizan simultáneamente bajo el control de un mismo mecanismo, como por ejemplo, en el caso de las bacterias se conoce muy bien la existencia de operones que controlan de manera coordinada la expresión fenotípica de varias enzimas. El ejemplo clásico es el operón *lac*, que regula la síntesis de β -glucosidasa, su permeasa y la transacetilasa en presencia del inductor, el isopropiltiogalactósido (IPTG), sin embargo, estos ejemplos son raros en células eucariontes. Resulta pues, muy interesante dilucidar si el sistema de inducción de α -a

amilasa y proteasa responden a la adición de AG_3 de una manera coordinada y por el mismo mecanismo o se trata de una coincidencia fortuita.

Los resultados obtenidos, figuras 3.1, 3.2 y tabla 3.1, muestran que la proteasa y la α -amilasa se producen simultáneamente por acción del ácido giberélico, sin embargo, como se puede observar en la tabla 3.III, cuando se agrega actinomicina D a diferentes tiempos durante la inducción, se inhibe la síntesis de la proteasa a cualquier tiempo de adición. Esto no concuerda con lo que sucede con la α -amilasa, ya que cuando el inhibidor se agrega después de 12 ó 13 horas de inducción, la síntesis de la enzima amilolítica continúa (Bernal, 1978 y Yomo y Varner, 1971). Este dato, más el hecho de que si las capas de aleurona inducidas con AG_3 durante 15 horas son lavadas para eliminar el AG_3 , vuelven a sintetizar α -amilasa cuando éste se adiciona nuevamente al medio de inducción, en condiciones tales que la síntesis de ARN está inhibida, lo que indica que el ARN mensajero para la α -amilasa es estable y funcional por lo menos durante 48 horas de inducción.

En este trabajo la actinomicina D inhibió la síntesis de la proteasa tanto en las primeras 12 horas como después de este periodo, lo que sugiere que en este caso el ARN men

sajero es de vida media corta, lo que se puede interpretar como que el control de la proteasa puede ser fundamentalmente a nivel de la transcripción y de la regulación de la velocidad de recambio de ARN mensajero específico.

Otros resultados obtenidos que apoyan esta sugestión, se puede ver en la tabla 3.2. Se observa que al inhibir la síntesis de proteínas con cicloheximida, no sólo no hay un incremento en la actividad proteolítica al agregar el inhibidor, sino que los valores encontrados al final de la incubación son aún menores a los medidos al tiempo de adición del inhibidor, lo que indica que hay una degradación o inactivación de la enzima, en cambio, en el caso de α -amilasa, se observa que la actividad se conserva. Aunque no se investigó la causa de la pérdida de la actividad, sí sugiere también que a este nivel pueden operar otro tipo de controles, ya que la α -amilasa es una enzima muy estable.

Se puede concluir, que aún cuando la síntesis de estas dos enzimas se lleva a cabo al mismo tiempo al inducir capas de aleurona con AG_3 , es probable que la regulación de las actividades enzimáticas sea diferente. La síntesis de la α -amilasa dependería de un control discreto, es decir, primero se sintetiza el ARN mensajero y después se regula la síntesis de la enzima, mientras que en el caso de la proteasa, se requiere de la síntesis continua del ARN mensajero y

de la enzima en relación con su inactivación y/o degradación.

En la figura 3.3 se observa que el ácido abscísico - inhibe la síntesis de la proteasa cuando es agregado a las 15 horas de incubación con AG_3 . En este caso, no se presenta el período lag que se encuentra en la síntesis de α -amilasa, lo que nuevamente nos sugiere, que el mecanismo por el cual se regula la síntesis de ambas enzimas es diferente.

Por otro lado, es interesante hacer notar que en las capas de aleurona sin inducir, en las condiciones que se hicieron las determinaciones, aparece una actividad proteolítica inicial, que durante las primeras 6 horas tiende a disminuir y que en ausencia del AG_3 se conserva prácticamente constante hasta las 27 horas, figura 3.2, y otra que se induce por la hormona, aparece desde las 9 horas de tratamiento.

Ante la posibilidad de que se tratara de más de una actividad proteolítica, se determinó el pH óptimo en los extractos de capas de aleurona de 0 horas y de 50 horas de inducción.

Los resultados se muestran en la figura 3.4 y se puede apreciar que, efectivamente se trata de varias actividades proteolíticas, una con pH óptimo de 4.8 que aparece en los extractos de 50 horas de inducción, otra con un pH óptimo -

de 5.4 que sólo aparece en los sistemas inducidos y que, aparentemente se secretan al medio de incubación, en el que se identificó otra actividad enzimática con un pH óptimo igual o menor a 3.6.

Esta última enzima puede ser la misma que estudiaron, en capa de aleurona de trigo de la misma variedad, Varty y cols. (1983).

La posibilidad de que se trate de más de una enzima - proteolítica, se ve reforzada por la estimulación que protectores de grupos sulfhídrico, el 2-mercapto etanol y el ditiotreitól, tabla 3.VI, tienen sobre la actividad proteolítica de cero horas, principalmente a pH de 3.5 en que se incrementa la actividad 4.8 veces, y de 5.4 en que lo hace 5.5 veces la actividad encontrada en ausencia de estos grupos.

En el caso de las aleuronas de 22 horas de inducción, se observa una activación menor, de aproximadamente dos veces, cuando la concentración de ME fué de 10mM. Esta activación puede deberse a la presencia de proteasa de cero horas, por lo que serán necesarios más trabajos de caracterización más dirigidos, para poder esclarecer este hecho..

De los resultados se puede sugerir que se tienen por lo menos dos proteasas, a) una constitutiva, no inducida,

que en ausencia de ácido giberélico se mantiene constante durante la incubación, y en presencia de la hormona tiende a disminuir y b) una inducible por AG_3 , que comienza a aparecer al rededor de las 9 horas de inducción y que se sigue sintetizando por lo menos hasta las 48 horas.

5 CONCLUSIONES

Estudios de otros investigadores han sugerido que la inducción de la α -amilasa y la proteasa por el ácido giberélico en la capa de aleurona de cereales, se regula a través de un mecanismo común. Esta afirmación se basó en que la cinética de inducción y la respuesta a diferentes concentraciones de fitorregulador eran muy semejantes para ambas enzimas. Además la inhibición presentada por las dos enzimas a la adición de ácido abscísico, inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas junto con el AG_3 , era también muy semejante (Jacobsen y Varner, 1967 y Chrispeels y Varner, 1967).

Sin embargo, en el presente trabajo se encontraron datos que sugieren que aunque la inducción de ambas enzimas sea semejante el control de la cantidad y de la actividad de la proteasa puede ser diferente al de la α -amilasa.

Los datos que sugieren esto son los siguientes:

- 1) La acción inhibitoria de los inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas se manifiesta en cualquier tiempo de la inducción con AG_3 . Mientras que varios trabajos han mostrado que después de las 12 horas de inducción con AG_3 - la síntesis de la α -amilasa ya no depende de la síntesis de ARN, ya que, aparentemente, la síntesis de ARN mensajero de la α -amilasa se lleva a cabo durante las primeras 12 horas

de inducción con AG_3 solamente. Esto permite concluir que si se considera que el ARN mensajero de α -amilasa es una molécula muy estable, la correspondiente molécula para la proteasa debe mostrar recambio mucho más rápido. Esto se ve apoyado por el dato de que si la adición de ABA a cualquier tiempo muestra un efecto inhibitorio, aún después de las 12 horas de inducción, sin un período lag, a diferencia del efecto que se puede ver en la α -amilasa, en la cual sí se presenta este retraso (Ho y Varner, 1976 y García-Maya, 1982).

2) Además, mientras que la α -amilasa es una enzima muy estable en presencia de calcio, se puede sugerir que la proteasa inducida por AG_3 es una molécula que está sujeta a degradación metabólica rápida. Este podría ser otro punto de control de la actividad proteolítica, es decir, la regulación de la actividad también podría ser a nivel del control de la cantidad de enzima activa. Esta sugerencia se basa en que tanto en la presencia de ABA como de los inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN, la actividad proteolítica va disminuyendo en función del tiempo de incubación, incluso llega por debajo de la actividad presente al tiempo de adición de los inhibidores. Este comportamiento contrasta con el de la α -amilasa, cuya actividad se mantiene constante después de la adición de los inhibidores.

Por otro lado, los experimentos de la determinación de la actividad proteolítica en función del tiempo de inducción, la medición de la actividad a diferentes pH y del efecto que tienen los grupos sulfhidrilos, se puede decir que el sistema de la capa de aleurona posee cuando menos dos actividades proteolíticas diferentes, una que se induce por acción del ácido giberélico y otra que está presente en las capas de aleurona antes de ser inducidas con la hormona.

Las características que se encontraron son las siguientes: La actividad proteolítica presente en las capas de aleurona sin inducir presenta un pH óptimo a 4.8, que casi no se afecta por la adición de grupos reductores, mientras que a pH de 3.5 y 5.4, la actividad proteolítica se ve fuertemente afectada, ya que se estimula entre 5 y 6 veces. Por lo que respecta a las aleuronas inducidas con ácido giberélico, estas presentan un pH óptimo a 5.4 y son mucho menos afectadas por los compuestos que activan sulfhidrilos.

Por último, que en las pozas de aminoácidos se observa una diferencia entre el tejido tratado con la hormona y el no tratado con ella, después de las 6 horas de incubación, lo que coincide con el inicio del incremento de la actividad proteolítica.

6 PERSPECTIVAS.

Para continuar con esta línea de investigación se sugiere que es necesario purificar tanto la proteasa constitutiva como la que se induce por la acción del ácido giberélico, con lo que podría determinarse cuándo aparece la enzima inducida, utilizando anticuerpos contra dichas proteasas, lo que permitiría hacer estudios mas finos de la regulación de la expresión genética de la proteasa inducida por el ácido giberélico.

También se mencionó que Varty y Cols. purificaron una actividad proteolítica de capas de aleurona de trigo con pH óptimo de 3.5, cuya actividad disminuye después de las 36 horas de inducción con ácido giberélico, lo que es diferente de lo encontrado para la actividad proteolítica de 5.4 medida en este trabajo, cuya actividad sigue aumentando a las 48 horas de inducción, lo que podría indicar que se tratara como sucede para α -amilasa, de diferentes enzimas proteolíticas que tuvieran una inducción diferencial en capa de aleurona de trigo por acción del ácido giberélico.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Arai, S. y Fumaki, M. (1977) Purification - and characterization of a protease occurring in endosperm of germinating corn. *Agric. - Biol. Chem.* 41: 893-899.
- Ashford, A.E. y Jacobsen, J.V. (1976) Cytochemical - localization of phosphatase in barley aleurone cells. The pathway of gibberellic acid - induced enzyme release. *Planta* 120: 81-105.
- Ashton, F.M. (1976) Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117.
- Barrett, A.J. (1980) The many forms and functions of cellular proteinases. *Fed. Proc.* 39: 9-14.
- Baumgartner, B. y Chrispeels, M.J. (1977) Purification and characterization of vicilin peptidohydrolase the major endopeptidase in the cotyledons of - mung bean seedlings. *Eur. J. Biochem.* 77: 223-233.
- Beloserskii, M.A., Emstseva, I.B. y Kursanova, T.A. (1973) Isolation and properties of the proteolytic - enzyme from buckwheat seeds. *Proc. Acad. Sci. USSR (Biochem.)* 209: 445-447. Traducción al inglés de Dokl. Akad. Nauk. SSSR uzb
- Bennett, P.A. y Chrispeels, M.J. (1972) *De novo* synthesis of ribonuclease and β -1,3-glucanase by - barley aleurone cells. *Plant Physiol.* 49: 445-447.
- Bernal-Lugo, I. (1980) Efecto post-transcripcional del ácido giberélico en capa de aleurona de trigo. Tesis de Doctorado (Bioquímica) Facultad de - Química, U.N.A.M.
- Bernal-Lugo, I., Beachy, R.N. y Varner, J.E. (1981) The response of barley-aleurone layers to gibberellic acid includes the transcription of new sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 617-623.

- Bewley, I.D., y Black, H. (1978) Physiology and Biochemistry of Plant Seeds in relation to Germination. Vol. I Development, germination and growth. Springer-Verlag. Berlin 306pp.
- Boston, R., Miller, R.J., Mertz, J.E. y Burgess, R.R. - (1982) *In vitro* synthesis and processing of wheat α -amylase. Translation of gibberellic acid-induced wheat aleurone layer RNA by wheat germ and *Xenopus laevis* oocyte systems. Plant Physiol. 69: 150-154.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Brouhult, S. y Sandergen, E. (1954) En Proteins Chemical Biological Activity and Methods. Neurath, H. y Bayley, K. (Eds.) vol. II-A. Academic Press Inc. N.Y. pp551.
- Callis, J. y Ho, T.H.D. (1983) Multiple molecular forms of the gibberellin- induced α -amylase from the aleurone cells of barley seeds. Arch. Biochem. Biophys. 224: 224-234.
- Colborne, A.J., Morris, G. y Laidman, D.L. (1976) The formation of reticulum endoplasmic in the aleurone cells of germinating wheat: an ultra structural study. J. Exp. Bot. 27: 759-768.
- Chen, E.F. y Jones, R.L. (1974) Studies on the release of barley aleurone cell proteins: autoradiography Planta: 119: 207-220.
- Ching, T.M. (1972) Metabolism of germinating seed. En Seed Biology Vol. II Koslowsky, T.T. (Ed.) - Academic Press. London pp 103-218.
- Chittenden, C.G., Laidman, D.L., Ahmad, N. y Wyn Jones, R.G. (1978) Aminoacid and quaternary nitrogen compounds in the germinating wheat grain. Phytochem. 17: 1209-1216.
- Chrispeels, M.J. Y Varner, J.E. (1966) Inhibition of gibberellic acid controlled metabolism of RNA in aleurone cells of barley. Biochim. Biophys. Acta. 180: 583-592.

- Chrispeels, M.J. y Varner, J.E. (1967a) Gibberellic acid enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42: 398-406.
- Chrispeels, M.J. y Varner, J.E. (1967b) Hormonal control of enzyme synthesis: On the mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42: 1008-1016.
- Doi, E. (1974) Stabilization of Pig kidney chatepsin A by sucrose and chloride ion, and inhibition of the enzyme activity by diisopropyl-fluoro-phosphate and sulfhydryl reagents. *J. Biochem.* 75: 881-887.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. y Yonezawa, D. (1980) - Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting seeds. *Agr. Biol. Chem.* 44: 741.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Loeboek, R. y Wolthers, B.G. (1971) Papain, X-ray structure. En The Enzymes Boyer, P.D. (ed.) Vol. III Academic Press, N.Y. pp 485-499.
- Drivdahl, R.H. y Thimann, K.V. (1977) Proteases of senescing oat leaves. I Purification and general properties. *Plant Physiol.* 59: 1059-1063.
- Drivdahl, R.H. y Thimann, K.V. (1978) Proteases of senescing oat leaves. II Reaction to substrates and inhibitors. *Plant Physiol.* 61: 501-505.
- Dure III, L.S. (1975) Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 259-278.
- Du Toit, P.J. (1976) Isolation and partial characterization of a protease from *Agave americana* variegata. *Biochim. Biophys. Acta.* 429: 895-911.
- Eastwell, K.C. y Spencer, M.S. (1982a) Effect of ethylene on the gibberellic acid-enhanced synthesis and release of amylase by isolated aleurone layers. *Plant Physiol.* 69: 557-562.

- Eastwell, K.C. y Spencer, M.A. (1982b) Modes of ethyl-ene action in the release of amylase from -barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 69: 563-567.
- Eastwood, D., Tavener, R.J.A. y Laidman, D.L. (1969) - Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. *Nature (London)* 221: 1267.
- Eastwood, D. y Laidman, D.L. (1971) The mobilization of macronutrient elements in the germinating wheat grain. *Phytochem.* 10: 1275-1284.
- Esau, K. (1977) *Anatomy of seed plants.* Segunda edición. John Wiley and Sons. pp 436.
- Fahn, A. (1977) *Plant Anatomy.* Segunda edición. Pergamon Press. N.Y. pp 547.
- Feller, U., Song, T.T. y Hageman, R.R. (1978) Patterns of proteolytic enzyme activities in different tissues of germinating corn (*Zea mays* L.) *Planta* 140: 155-162.
- Filner, P. y Varner, J.E. (1967) A test for *de novo* synthesis of enzymes. Density labelling with $H_2^{18}O$ of barley α -amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 58: 1520-1526.
- Firn, R.D. (1975) On the secretion of α -amylase by barley aleurone layers after incubation in gibberellic acid. *Planta* 125: 227-233.
- García-Maya, M. (1982) Control post-transcripcional del ácido abscísico sobre la síntesis de α -amilasa en aleurona de trigo. Tesis de Maestría (Bió-química) CINVESTAV, I.P.N.
- Glazer, A.N. y Smith, E.L. (1971) Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. En *The Enzymes.* Boyer, P.D. (Ed.) Vol. III Academic Press. pp 501-546.
- Groat, J.I. y Briggs, D.E. (1969) Gibberellin and α -amylase formation in germinating barley. *Phytochem.* 8: 1615-1627.

- Hamabata, A. y Bernal-Lugo, I. (1983) Translation the limiting step in the gibberellic acid-induced α -amylase synthesis in aleurone tissue. *Manus crito en preparaci3n*.
- Hardie, D.F. (1975) Control of carbohydraze formation by gibberellic acid in barley endosperm. - *Phytochem.* 14: 1719-1722.
- Higgins, T.J.V., Jacobsen, J.V. y Zwar, J.A. (1982) - Gibberellic acid and Abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. *Plant Molec. Biol.* 1: 191-215.
- Higgins, T.J.V., Zwar, J.A. y Jacobsen, J.V. (1976) - Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. *Nature (London)* 260: 166-168.
- Ho, T.H.D. (1980) Hormonal and genetic regulation of α -amylase synthesis in barley aleurone cells. En *Genome organization and expression in plants*. Leaver, D.J. (Ed.) NATO Advanced Study Series. Serie A. Life Sciences Vol. 29. Plenum Publishing Co. pp 147-157.
- Ho, T.H.D. y Varner, J.E. (1974) Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 71: 4783-4786.
- Ho, T.H.D. y Varner, J.E. (1976) Response of barley aleurone layers to abscisic acid. *Plant Physiol.* 57: 175-178.
- Ho, T.H.D. y Varner, J.E. (1978) Density labeling of proteins with ^{13}C -labeled amino acids. No accumulation of an inactive α -amylase precursor in barley aleurone cells. *Arch. Biochem. and Biophys.* 187: 441-446.
- Ho, T.H.D., Abrams, J. y Varner, J.E. (1982) Effect of ethylene on the release of α -amylase through cell walls of barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 69: 1128-1131.

- Jacobsen, J.V. y Higgins, T.J.V. (1982) Characterization of the α -amylase synthesis by aleurone cells of Himalaya barley in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 70: 1647-1653.
- Jacobsen, J.V. y Knox, R.B. (1974) The proteins released by isolated barley aleurone before and after gibberellic treatment. *Planta* 115: 193-206.
- Jacobsen, J.V. y Varner, J.E. (1967) Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42: 1596-1600.
- Jacobsen, J.V. y Zwar, J.A. (1974) Gibberellic acid - causes increased synthesis of RNA which contains Poly(A) in barley aleurone tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 71: 3290-3293.
- Jacobsen, J.V., Chandler, P.M., Higgins, T.J.V. y Zwar, J.A. (1982) Control of protein synthesis in barley aleurone layers by gibberellin. *Plant Growth Substances* (1982) Wareing, P.F. (Ed.) Academic Press. pp 111-120.
- Jones, I.K. y Glazer, A.N. (1970) Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases (ficins) of *Ficus glabrata* latex. *J. Biol. Chem.* 245: - 2765-2772.
- Jones, R.L. (1972) Fractionation of enzymes of the barley aleurone layer: evidence for a soluble mode of enzyme release. *Planta* 103: 95-109.
- Jones, R.L. (1973) Gibberellins: Their physiological role. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 571-598.
- Jones, R.L. y Jacobsen, J.V. (1982) The role of endoplasmic reticulum in the synthesis and transport of α -amylase in barley aleurone layers. *Planta* 156: 421-432.
- Kaneda, M. y Tominga, N. (1975) Isolation and characterization of a proteinase from sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem.* 78: 1287-1296.
- Kaneda, M. y Tominga, N. (1977) Isolation and characterization of a proteinase from white gourd. *Phytochem.* 16: 345-346.

- Kasarda, D., Bernardin, J.E. y Nimmo, C.C. (1976) Wheat proteins. En *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 1 Pomeranz Y. (Ed.) St. Paul Minn. Am. Assoc. Cereal chem. Inc. pp 158-236.
- Locy, R. y Kende, H. (1978) The mode of secretion of α -amylase in barley aleurone layers. *Plant* 143: 89-99.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin - phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mayer, A.M. y Marbach, I. (1980) Biochemistry of the - transition from resting to germinating state in seeds. *Progress in Phytochem.* 7: 95.
- Mayer, A.M. y Poljakoff-Mayber, A. (1982) The germination of seeds. Tercera edición. Pergamon - Press, N.Y.
- Mayer, A.M. y Shain, Y. (1974) Control of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 167-193.
- Melville, J.C. y Scandalios, J.G. (1972) Maize endopeptidase: genetic control, chemical characterization, and relationship to an endogenous - trypsin inhibitor. *Biochem. Genet.* 7: 15-31.
- Mikola, J. y Kolehmainen, L. (1972) Localization activity of various peptidases in germinating barley. - *Planta* 104: 167-177.
- Mozer, T.J. (1980) Partial purification and characterization of the mRNA for α -amylase from barley - aleurone layers. *Plant Physiol.* 65: 834-837.
- Muthukrishnan, S., Chandra, G.R. y Maxwell, E.S. (1983) - Hormonal control of α -amylase gene expression in barley. *J. Biol. Chem.* 258: 2370-2375.
- Okita, T.W., DeCaleys, R. y Rappaport, L. (1979) Synthesis of a possible precursor of α -amylase in wheat aleurone cells. *Plant Physiol.* 63: - 195-200.

- Peers, F.G. (1953) Phytase of wheat. *Biochem. J.* 53: 102-110.
- Pollard, C.J. (1969) A survey of the sequence of some effects of gibberellic acid in the metabolism of cereal grains. *Plant Physiol.* 44: 1227-1232.
- Ragster, L.E. y Chrispeels, M.J. (1981a) Hemoglobin-digesting acid proteinases in soybean leaves. Characteristics and changes during leaf maturation and senescence. *Plant Physiol.* 67: 110-114.
- Ragster, L.E. y Chrispeels, M.J. (1981b) Autodigestion in crude extracts of soybean leaves and isolated chloroplasts as a measure of proteolytic activity. *Plant Physiol.* 67: 104-109.
- Ram Chandra, G. y Varner, J.E. (1965) Gibberellic acid-controlled metabolism of RNA in aleurone cells of barley. *Biochem. Biophys. Acta.* 108: 583-592.
- Rogers, I.C. y Milliman, C. (1983) Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 258: 8169-8174.
- Rosen, H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for aminoacids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67: 10-15.
- Roswell, E.V. y Goad, L.J. (1964) The release of hydrolytic enzymes from isolated wheat aleurone layers activated by gibberellic acid. *Biochem. J.* 90: 12P.
- Ryan, C. y Walker-Simmons, M. (1981) Plant proteinases. En *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise.* Vol. 6 Marcus (Ed.) Academic Press N.Y. 321-350.
- Sargent, J.G. (1979) The α -amylase isoenzymes of developing and germinating wheat grain. En *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals.* - Laidman, D.L. y Wyn Jones, R.G. (Eds.) Academic Press, N.Y. pp 339-343.

- Shanon, J.D. y Wallace, W. (1979) Isolation and Characterization of peptide hydrolases from the maize root. *Eur. J. Biochem.* 102: 399.
- Schechter, I. y Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 157-162.
- St Angelo, A.J., Ory, R.L. y Hansen, H.J. (1970) Properties of a purified protease from hempseed. *Phytochem.* 9: 1933-1938.
- Taiz, L. y Honigman, W.A. (1976) Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 58: 380-386.
- Taiz, L. y Jones, R.L. (1970) Gibberellic acid, β -1,3-gluconase and the cell walls of barley aleurone layers. *Planta* 92: 73-84.
- Tomos, A.D. y Laidman, D.L. (1979) Control of mobilization and metabolism in the aleurone tissue during germination. En *Recent Advances in Biochemistry of Cereals*. Laidman, D.L. y Wyn Jones, R.G. (Eds.) Academic Press. N.Y. pp 119-146.
- Varner, J.E. (1964) Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm. *Plant Physiol.* 39: 412-415.
- Varner, J.E. y Ram Chandra, G. (1964) Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 52: 100-106.
- Varty, K., Arreguin, B., Muggenburg, R., Mijangos, J.L. y Trejo, B. (1983) Effect of ethylene on gibberellic acid-induced protease activity in wheat aleurone layers. *New Phytol.* 94: 211-216.
- Wall, J.S. (1979) The role of wheat proteins in determining baking quality En *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*. Laidman, D.L. y Wyn Jones, R.D. (Eds.) pp 275-311.
- Yomo, H. y Varner, J.E. (1971) Hormonal control of a secretory tissue. En *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 6. Moscona, A.A. y Monroy, A. (Eds.) Academic Press. N.Y. pp 111-144.