



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

EFFECTO DE LA ACIDIFICACION CAUSADA POR LA ALEURONA DE TRIGO

Triticum aestivum var. Tonichi

SOBRE LOS EFECTOS DEL ACIDO ABSCISICO

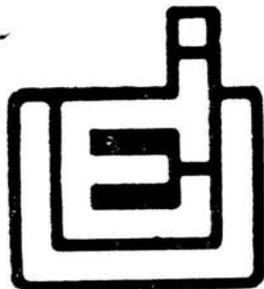
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :

JUANA PARADA DOMINGUEZ

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1994





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIATION

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 30 de Agosto de 1994

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología: Juana Parada Domínguez

titulado: "Efecto de la acidificación causada por la aleurona de trigo (*Triticum aestivum* v. Tonichi) sobre los efectos del ácido abscísico".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

BIOL. ANTONIA TRUJILLO HERNANDEZ

BIOL. MANUEL MANDUJANO PIÑA

DR. ALBERTO HAMABATA N.

M.en C. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

BIOL. ALBERTO ARRIAGA FRIAS

(Nombre completo)

[Firmas manuscritas]
FRANCISCO RIVERA
(Firma)

A MIS PADRES, HERMANOS Y SOBRINOS.

A MI ESPOSO.

A MI HIJO
MIGUEL ANGEL

AGRADEZCO SINCERAMENTE AL DR. ALBERTO HAMABATA N.
SU AYUDA, ORIENTACION Y TIEMPO PARA LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO

A LA DRA. GILDA FLORES R.

A LOS COMPANEROS DEL LABORATORIO.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
BIOQUIMICA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y
ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN.

I N D I C E

	Pag.
GLOSARIO	i
RELACION DE TABLAS	ii
RELACION DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	3
1 El trigo	3
1.1 Estructura del grano	3
1.2 Composición química de las distintas partes del grano	7
1.3 Estructura de la capa de aleurona	8
1.4 Composición química de la capa de aleurona	11
2 La germinación	11
3 Los fitorreguladores	12
3.1 Auxinas	12
3.2 Giberelinas	14
3.3 Citoquininas	16
3.4 Etileno	16
4 Acido Abscisico (ABA)	16
4.1 Biosíntesis de ABA	18
4.2 ABA durante el desarrollo del grano	18
4.3 Efectos fisiológicos de ABA	21
4.4 Papel de ABA en la inhibición de α -amilasa inducida por GA_3	21
4.5 Papel de ABA en la acidificación de la capa de aleurona de trigo	23
5 Movilización de reservas	25
6 α -amilasa	27
6.1 Isoenzimas de α -amilasa	27
III HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29

IV	MATERIAL Y METODOS	30
1	Reactivos y Material	30
1.1	Material biológico	30
1.2	Imbibición de medias semillas	30
1.3	Aislamiento de capas de aleurona	31
1.4	Métodos	31
1.5	Acidificación del medio por capas de aleurona aisladas de trigo	31
1.6	Medición del pH al medio de incubación	32
1.7	Obtención de a-amilasa	34
1.8	Determinación de la actividad de a-amilasa	34
1.9	Ensayo de a-amilasa	36
1.10	Determinación de a-amilasa en capas de aleurona de trigo en presencia o ausencia de GA ₃	36
1.11	Determinación de a-amilasa en capas de aleurona de trigo inducidas por GA ₃ en presencia o ausencia de ABA a pH de 4.0 y 6.0	37
1.12	Procedimiento general para la elaboración de feles de isoelectroenfoque	39
1.13	Cuantificación de proteínas por Lowry	40
V	RESULTADOS	42
1.1	Acidificación del medio de incubación por capas de aleurona de trigo	42
1.2	Inducción de a-amilasa por el ácido giberélico (GA ₃) en capas de aleurona de trigo	44
1.3	Efecto del ácido absclísico (ABA), sobre la inducción de a-amilasa por ácido giberélico (GA ₃) en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0	46
1.4	Medición del pH de los medios de inducción antes y después de los tratamientos con GA ₃ y/o ABA	49
1.5	Efecto de ABA y GA ₃ en la expresión de las isoenzimas de a-amilasa en capas de aleurona de trigo, en medios con pH 4.0 y 6.0	51

VI	DISCUSION	55
VII	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
VIII	BIBLIOGRAFIA	62

GLOSARIO

ABAGE:	ABA β -D-glucosil ester
a :	alfa
β :	beta
Da :	Dalton
DPA :	Acido dihidrofaseico
GA :	Giberelina
GA ₃ :	Acido giberélico
IAA :	Acido indolacético
M :	Molar
PA :	Acido faseico
P. I.:	punto isoeléctrico
RNAm :	Acido ribonucleico mensajero
r. p. m.:	revoluciones por minuto
TEMED:	N-N-N tetra metil etilen diamino
ug :	microgramo
ul :	microlitro
U a-a :	unidades de alfa-amilasa

RELACION DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAGINA
1	Contenido de ácido abscísico en algunas semillas	17
2	Acidificación del medio de incubación	31
3 y 4	Medición del pH de los medios de inducción antes y después de los tratamientos con GA ₃ y/o ABA.	50

RELACION DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Estructura del grano de trigo	5
2	Corte longitudinal del grano de trigo	6
3	Distribución de la proteína, tiamina y niacina en el grano de trigo	9
4	Estructura de la célula de aleurona	10
5	Estructuras químicas de las principales fitohormonas	13
6	Estructuras químicas de algunas giberelinas importantes	15
7	Biosíntesis y metabolismo de ABA	19
8	Papel que desempeña ABA en el grano de trigo.	20
9	La acción inhibitoria de ABA	24
10	Estructura de la semilla de cebada y las funciones de sus tejidos durante la germinación	26
11	Diagrama de la secuencia de procesos para la obtención de capas de aleurona	33
12	Diagrama de procesos para la acidificación del medio y obtención de sobrenadantes para la determinación de α -amilasa y realización de geles de isoelectroenfoque	35
13	Diseño experimental para la determinación de α -amilasa en capas de aleurona de trigo inducidas por GA_3 en presencia o ausencia de ABA a pH 4.0 y 6.0	38
14	Acidificación del medio de incubación por capas de aleurona de trigo	43
15	Inducción de α -amilasa por el ácido giberélico (GA_3) en capas de aleurona de trigo	45
16	Efecto de ABA sobre la inducción de α -amilasa por GA_3 en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0	48
17	Gel de isoelectroenfoque de α -amilasa de trigo, con igual cantidad de tejido	53
18	Gel de isoelectroenfoque de α -amilasa de trigo, con igual cantidad de proteína	54

RESUMEN

Los cereales son utilizados para consumo humano debido a su alto porcentaje de nutrimentos, así como para la elaboración de bebidas alcohólicas y como forraje para consumo animal. Entre la variedad de estos granos el trigo ocupa un lugar importante por el uso que se le da para la elaboración de panes y pastas (Aykroyd, 1970).

La importancia de los cereales en la nutrición humana se refleja en las investigaciones realizadas sobre la germinación de las semillas y las enzimas responsables de regular la movilización de las reservas del endospermo hacia el embrión.

Las semillas de los cereales presentan una capa de células llamadas de aleurona, que rodean al endospermo amiláceo, teniendo éstas la capacidad de acidificarlo, dicho evento puede permitir la movilización de reservas hacia el embrión durante la germinación (Hamabata, y col. 1988).

La capa de aleurona además es el sitio de síntesis de enzimas hidrolíticas, las cuales degradan las reservas del endospermo, produciendo azúcares y aminoácidos que utiliza el embrión para crecer, el GA_3 es el encargado de inducir la síntesis de dichas enzimas, siendo la más abundante la α -amilasa.

El ABA por el contrario tiene una acción inhibitoria sobre la inducción de esta enzima (Chrispeels y Varner, 1967).

La acidificación que presenta la capa de aleurona es independiente a la presencia del ácido giberélico (Hamabata, y col 1988). Encontrando en este trabajo que también lo es a la presencia del ácido abscísico.

Cuando se agregan exógenamente las dos fitohormonas juntas a capas de aleurona aisladas de trigo, previamente inducidas durante 21 h con GA_3 $10^{-6}M$, encontramos una acción inhibitoria de ABA al disminuir la síntesis de α -amilasa, con respecto a la α -amilasa sintetizada por capas de aleurona inducidas en presencia únicamente de GA_3 , siendo mayor su efecto cuando el pH del medio es de 4.0.

Al realizar geles de isoelectroenfoque se observó la acción de ABA al inhibir la síntesis de el grupo de isoenzimas de α -amilasa de punto isoelectrico bajo (P.I.) en el medio con pH ácido.

I INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los cereales son plantas pertenecientes a la familia de las gramíneas, de fruto seco o grano, que se emplea en la alimentación del hombre y los animales. Los cereales han tenido gran importancia desde épocas muy remotas y poseen un elevado contenido en almidones y azúcares, proteínas, grasas y vitaminas. El cultivo de algunos es tan antiguo que las variedades silvestres, de las que proceden, son en la actualidad totalmente desconocidas.

La mayor parte de los cereales están difundidos en la actualidad por todo el mundo. Su uso es muy variado ya que se utilizan como pienso, para hacer malta y cerveza, aguardiente, almidón, dextrina, etc. De sus semillas se extraen aceites y la paja se emplea para fabricar papel y objetos trenzados. Entre los cereales se encuentran el maíz, la cebada, la avena, el centeno, el arroz y el trigo.

El trigo es una gramínea de origen desconocido, es una planta herbácea, anual, cuyos granos o semillas son empleados para obtener harina de trigo refinada que es utilizada para elaborar panes y pastas. La paja de la planta de trigo sirve para elaborar diversos objetos como sombreros y como relleno de embalajes (Aykroyd, 1970).

La importancia de los cereales en la nutrición humana se refleja en las investigaciones realizadas sobre la germinación de las semillas y las enzimas responsables de regular la movilización de las reservas del endospermo hacia el embrión.

Las semillas de los cereales presentan una capa de células llamadas de aleurona, que rodean al endospermo amiláceo, estas células tienen la capacidad de acidificarlo, este evento puede permitir la movilización de reservas hacia el embrión durante la germinación y crecimiento heterotrófico del mismo. Sin embargo esta movilización de reservas requiere de una serie de eventos coordinados, como son la inducción de enzimas hidrolíticas en la capa de aleurona por el ácido giberélico (GA_3), la activación de estas enzimas encargadas de hidrolizar los materiales de reserva en el endospermo amiláceo, así como el transporte de los productos de hidrólisis al embrión.

La capa de aleurona tiene un papel muy importante en estos eventos, ya que es la encargada de proveer dichas enzimas hidrolíticas como son entre otras la α -amilasa y algunas proteasas. Pero esta no es la única función de la capa de aleurona, ya que este tejido acidifica al endospermo amiláceo y

cuando ocurre esto hay una mayor solubilización de proteínas, almidón y iones Ca^{2+} , produciendo sustratos solubles para la actividad enzimática, además de que activa varios sistemas de transporte en el epitelio escutelar (Hamabata y col, 1988).

La acción inhibitoria de ABA en la inducción de enzimas por GA_3 es bien conocida. (Ho y Varner, 1976). Cuando se agrega ABA a capas de aleurona al mismo tiempo que GA_3 , impide la síntesis y secreción de estas enzimas hidrolíticas.

El modo de acción de dichas hormonas vegetales en la estimulación e inhibición de la síntesis de las enzimas hidrolíticas no es aún completamente entendido, ya que se ha mostrado que ABA no actúa simplemente por competición al inhibir la acción de GA_3 en la inducción de la actividad de α -amilasa (Nolan y col, 1987).

La α -amilasa es la más abundante y mejor caracterizada de estas enzimas hidrolíticas.

La acidificación causada por la capa de aleurona y que favorece todos los procesos ya descritos en el endospermo amiláceo, se ha estudiado y se conoce que es independiente a la presencia del GA_3 , sin embargo ante la presencia de ABA se desconoce cual es la respuesta de la acidificación; así como el efecto que causaría la presencia de ambas fitohormonas en capas de aleurona de trigo previamente inducidas por GA_3 en medios con pH de 4.0 y 6.0 ya que los antecedentes muestran que sólo han sido utilizados medios de inducción con un pH de 5.0 por lo que se decidió emplear medios de inducción con un pH más ácido, con valor de 4.0, es decir un pH muy cercano al que es capaz de llegar la capa de aleurona por sí sola.

El modelo experimental que se utilizó en este trabajo fué la capa de aleurona aislada de trigo, debido a que este tejido a pesar de ser separado del resto de la semilla conserva su capacidad de acidificar el medio de inducción, así como de responder a la adición exógena de GA_3 y ABA *in vitro* tal como se conoce *in vivo*, por lo que se considera un modelo ideal para estudiar un fenómeno de regulación hormonal. En cebada la capa de aleurona ha sido ampliamente investigada, pero en trigo estos estudios son recientes y este trabajo forma parte de dicha investigación.

II ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

1 El trigo

El trigo es la planta alimenticia de más extenso cultivo en el mundo. Millones de seres humanos lo consumen en diversas formas y contribuye en mayor proporción que ningún otro alimento a suministrar calorías y proteínas al hombre. Las cantidades de trigo que pasan al mercado mundial son mayores que las de todos los demás cereales juntos. Estos hechos demuestran la gran importancia del trigo en la agricultura, el comercio y la nutrición.

La planta de trigo es un miembro de la familia de las gramíneas, la cual comprende unos 600 géneros y más de 5000 especies. Aunque las gramíneas tiene aspectos diversos, presentan gran número de similitudes en la estructura de las raíces, los tallos y las hojas. Los principales cereales consumidos por el hombre son: trigo, arroz, maíz, cebada, avena, centeno, sorgo y mijo todos ellos son semillas de plantas que forman parte de la familia de las gramíneas.

La palabra "trigo" designa tanto la planta como sus semillas comestibles. Todos los trigos, sean silvestres o cultivados, se hallan incluidos en el género *Triticum*, del cual se conocen comunmente 14 especies (Aykroyd, 1970).

1.1 Estructura del grano

El grano de trigo es un fruto seco indehiscente, llamado botánicamente cariopse, estando la semilla adherida al fruto, este constituye una delgada capa exterior debajo de la cual está la semilla, compuesta por el embrión que se transforma en la nueva planta y el endospermo que es un depósito de alimentos para el embrión.

En el grano, desde la periferia al centro, encontramos lo siguiente: (Figura 1)

Fruto o pericarpio: es una zona delgada formada a su vez por tres partes, el pericarpio, el mesocarpio y el endocarpio.

Cubierta de la semilla o testa: es el sitio en que está el pigmento que da la coloración al grano.

Capa de aleurona: es una sola capa de células que morfológicamente constituye la parte más externa del endospermo.

Endospermo: representa alrededor del 82% del peso del grano. Está formado de células muy apretadas y gránulos de almidón incrustados en una matriz que en gran parte es proteína. Su estructura no es completamente homogénea. Las células subvacantes a la capa de aleurona son pequeñas y de forma cúbica, las que se hallan más adentro son prismáticas y algo mayores y, en el centro, las células son grandes y poligonales.

Escutelo: forma alrededor del 1.75% del peso total del grano. El escutelo une el embrión al endospermo y lo recubre a manera de funda. Contiene alimento para el embrión y llegada la germinación, se convierte en un órgano que absorbe y digiere el alimento recibido del endospermo y lo transfiere a la espiga naciente. El embrión y el escutelo están soldados por una capa de células, pero esta unión se debilita con la humedad (Aykroyd, 1970).

Embrión: como en todos los vegetales, está formado por la plántula. Esta consta del talluelo y la radícula. (Figura 2) El talluelo posee la plúmula y está envuelta por una hoja protectora llamada coleoptilo. El coleoptilo envuelve la plúmula pero no totalmente, pues en el extremo superior tiene un orificio por donde emergen las tres primeras hojas durante la germinación. La plúmula está constituida por dos o tres hojas rudimentarias que rodean el tejido meristemático de crecimiento. La radícula, es la futura raíz, es decir, la primer raíz seminal o embrionaria que aparece. La radícula está envuelta por la vaina llamada coleorriza y en su extremidad se encuentra la zona de protección o pilorriza.

Además en el embrión se encuentra el cotiledón único por ser planta monocotiledónea (Soldano, 1978).

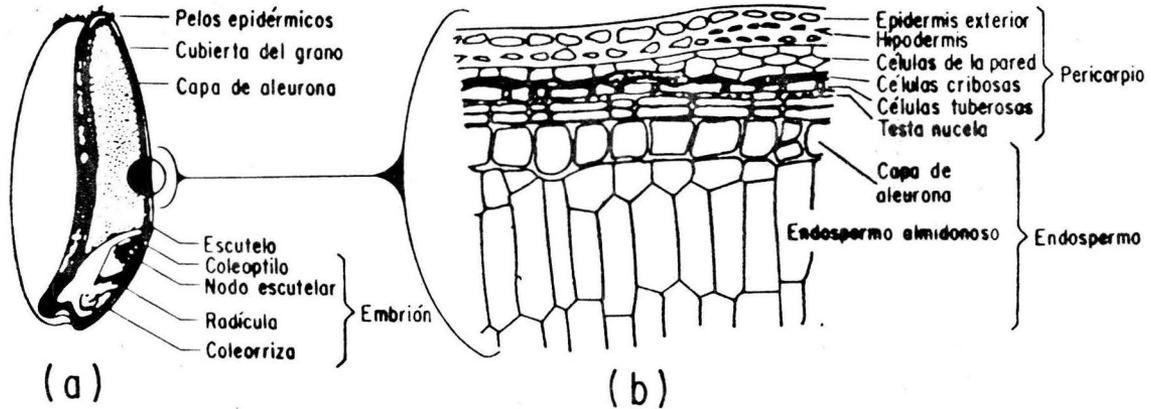


FIGURA 1. Estructura del grano de trigo.

a) Corte longitudinal del grano completo. (Esau, 1977)

b) Corte que muestra las partes del pericarpio y endospermo (Fahn, 1977).

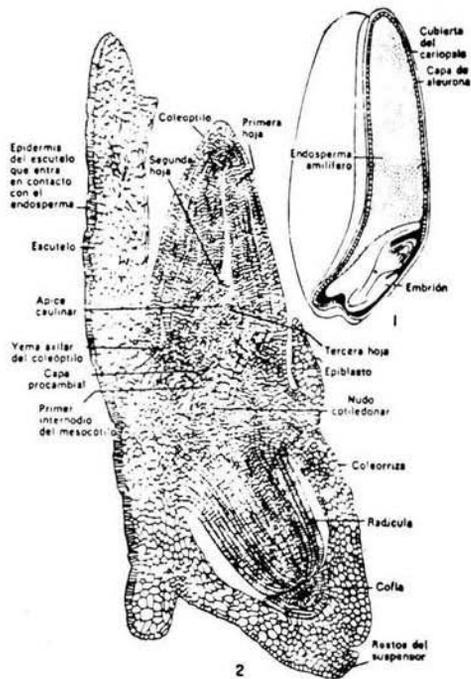


FIGURA 2. 1 Grano de trigo cortado longitudinalmente a nivel del surco.
 2 Sección longitudinal del embrión de *Triticum* (Núm. 1 Esau, 1953; núm. 2 Hayward, 1938.)

1.2 Composición química de las distintas partes del grano

El pericarpio y la testa

Se componen en gran parte de celulosa, hemicelulosa y lignina. De fuera a adentro disminuyen las cantidades de materia fibrosa en estas capas y aumentan las de proteínas y sales minerales. Estas capas sólo contienen una pequeña proporción de las distintas vitaminas existentes en el grano, pero sí un elevado contenido de ácido fólico.

El embrión

Este contiene aproximadamente un 30% de proteínas solubles, no tiene almidón, pero sí lleva incorporados carbohidratos hidrosolubles, principalmente sacarosa y rafinosa, los cuales representan alrededor del 20% del embrión. Es elevado el contenido graso u oleoso del embrión, que supone alrededor del 30% del peso. El aceite del germen de trigo tiene también una gran proporción de ácidos grasos no saturados y es una de las fuentes naturales más ricas de vitamina E o tocoferol. Se ha estimado que aproximadamente la mitad del tocoferol que hay en el trigo entero se encuentra en el embrión. Tiamina y otras vitaminas del grupo B se hallan presentes en grandes cantidades.

El escutelo

La composición del escutelo es semejante a la del embrión, a excepción de que el escutelo es rico en tiamina. Aunque representa menos del 2% del peso del grano, contiene alrededor del 60% de la tiamina. El escutelo es también rico en fósforo, que en un 69% es fitato (Aykroyd, 1970).

El endospermo

El principal constituyente de esta parte del grano es el almidón, presente en forma de gránulos, cada uno encerrado en una fina envoltura de celulosa. El almidón se combina en diversas porciones con proteínas, aceites y grasas. Los gránulos de almidón se originan en plastidios (unos o muchos) (Buttrose, 1960). Los cereales tienen frecuentemente gránulos de almidón pequeños y grandes, localizados en el centro de las células del endospermo amiláceo, rodeados de una sustancia proteica llamada gluten, de estructura amorfa. El gluten se compone de gliadina y glutenina que difieren por su solubilidad en alcohol, ácidos y

álcalis diluidos; ambas constituyen aproximadamente el 45 y 40% respectivamente de la totalidad de las proteínas del trigo.

En la mayor parte de las gramíneas, las células del endospermo que contienen almidón no están vivas (Esau, 1985).

El contenido de nutrientes del endospermo varía de la parte situada inmediatamente debajo de la capa de aleurona al centro. El contenido de proteínas, minerales y vitaminas disminuye hacia el centro y esta disminución es más pronunciada en unas variedades de trigo que en otras.

La distribución de la proteína, tiamina y niacina en el grano de trigo se observa en la figura 3. El porcentaje se refiere al contenido de proteína, tiamina y niacina en cada parte del grano de trigo

1.3 Estructura de la capa de aleurona

La capa de aleurona de las gramíneas monocotiledóneas (cebada, trigo, arroz, centeno y avena) es un tejido altamente especializado, terminal, diferenciado, y secretor cuya única función parece ser la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas. Al completar su función, las células de la capa de aleurona reducen su contenido y mueren (Talz, 1991). Dicha capa rodea al endospermo amiláceo y es citológica y bioquímicamente distinta a este. En la cebada está formada por tres o cuatro capas de células de aleurona, mientras que en el trigo, maíz, sorgo y arroz tiene una sola capa de células. Las células de aleurona están encerradas en una pared celular gruesa y contienen un gran número de organelos que almacenan proteína llamados granos de aleurona o cuerpos proteicos, además de esferosomas que almacenan lípidos. Las estructuras de una célula de aleurona se observan en la figura 4.

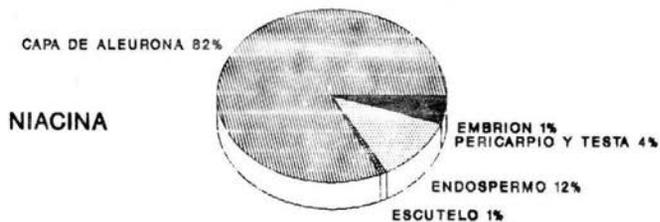
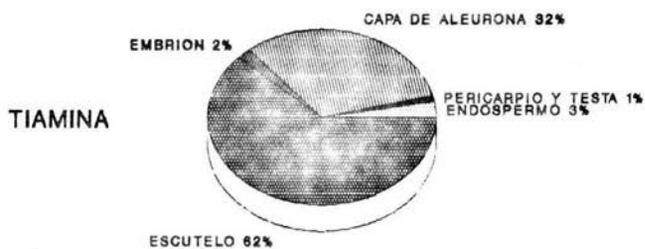
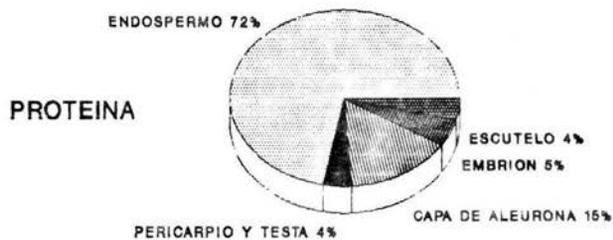


FIGURA 3. Distribución del contenido de proteína, tiamina y niacina en cada parte del grano de trigo (Adaptada de Aykroyd, 1970).

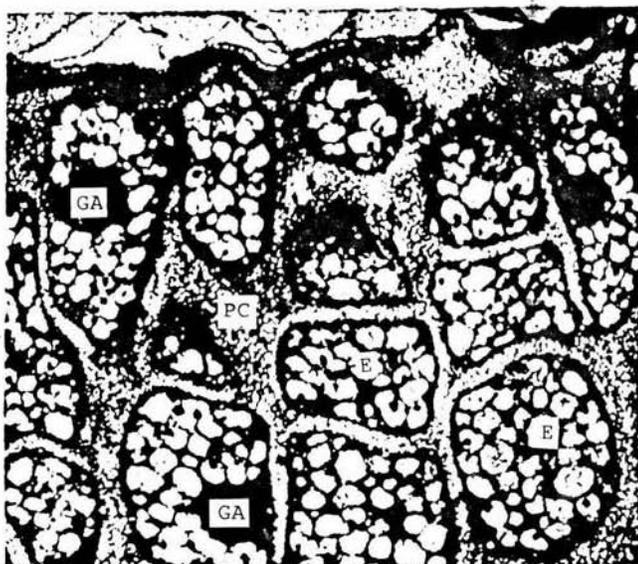


FIGURA 4. Microfotografía de células de aleurona. Se nota la presencia de paredes celulares gruesas (PC) y numerosos cuerpos proteicos llamados granos de aleurona (GA), además de esferosomas o cuerpos lipídicos en el interior de las células (E) (Talz, 1991).

1.4 Composición química de la capa de aleurona

Esta parte del grano es rica en nutrientes. Contiene el 80% de toda la niacina del grano y grandes cantidades de otras vitaminas del grupo B. Su contenido proteico es elevado de 18 a 24%, tratándose de proteínas de gran valor biológico, que se encuentran como granos de aleurona, que están compuestos de proteína con un cuerpo cristalino (cristal de proteína) y un cuerpo globoide (fosfato doble de calcio y magnesio con un radical orgánico). También abundan los minerales en esta capa, que carece de almidón. (Aykroyd, 1970). Los esferosomas que presenta son lugares de almacenamiento de lípidos como aceites y grasas o ceras, suberina y cutina, estos son material de reserva común en semillas, embriones y células meristemáticas (Fahn, 1974).

2 La germinación

De manera general se considera que una semilla ha germinado cuando la radícula se ha abierto paso a través de la cubierta seminal; sin embargo debe considerarse que antes y después de este efecto morfológico visible ocurren otros procesos poco visibles, que pertenecen también a la germinación.

En muchos casos la semilla es capaz de germinar inmediatamente después de liberarse de la planta madre. En otros sin embargo la semilla puede germinar sólo después de un periodo de pausa o latencia.

La latencia puede deberse a muy diferentes causas como son: la liberación de semillas con embriones que no están completamente desarrollados, ó en algunas especies la capacidad de germinación completa sólo se alcanza cuando las semillas han pasado por un proceso de sequedad o bien la presencia de inhibidores que impiden la germinación.

Cuando la semilla ha sido capaz de vencer todos los mecanismos de obstaculización, el embrión es capaz de germinar. Sin embargo, sólo lo hace cuando se dan determinadas condiciones exteriores como son: agua, oxígeno, temperatura y luz. Pero una vez que la germinación ha ocurrido, el crecimiento de la plántula joven continúa, soportado por la movilización de reservas alimenticias; eventualmente la plúmula es transportada hacia arriba y en su naturaleza es levantada hacia afuera de la tierra a la luz donde su vida autotrófica puede comenzar (Hess, 1980).

3 Los fitorreguladores

Actualmente se conoce que en las plantas la regulación y coordinación del metabolismo, crecimiento y morfogénesis depende de señales que van de una parte de la planta a otra.

La comunicación intercelular en las plantas es mediada por la acción de mensajeros químicos llamados hormonas vegetales, fitohormonas o fitorreguladores. En las células, las fitohormonas interactúan con proteínas específicas llamadas receptores. El complejo hormona-receptor es la forma activa de la hormona. Las fitohormonas se agrupan en cinco clases: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico. Todas estas fitohormonas son relativamente moléculas pequeñas, su tamaño va del etileno (28 Da) a la giberelina (346 Da) (Taiz, 1991). Las estructuras químicas de las principales fitohormonas pueden observarse en la figura 5.

3.1 AUXINAS

Es la primera fitohormona descubierta y probablemente la mejor conocida de todas las hormonas vegetales.

Actualmente se conocen diversas sustancias con actividad auxínica aisladas de tejidos vegetales y también otras sintéticas. La más común de estas auxinas naturales es el ácido indolacético (IAA) (Raven, 1975).

El crecimiento parece ser un requisito para la síntesis de IAA y se produce principalmente en los ápices en desarrollo, hojas en expansión y tejidos con igual actividad meristemática; en la raíz la cantidad de auxina es mínima y es probable que no se produzca en este órgano y se transporte del tallo.

El transporte de las auxinas es polar es decir va de los ápices de los tallos hacia la base de la planta y se producen casi continuamente por algunos tejidos de la planta sin llegar a acumularse en grandes cantidades, lo que significa que debe de ocurrir algún proceso de inactivación o de destrucción (Bidwell, 1979).

Efectos fisiológicos de la auxina

La auxina tiene una gran variedad de efectos en el crecimiento y morfogénesis de las plantas; promueve el alargamiento de tallos y coleótilos, pero puede inhibir el alargamiento de la raíz; promueve la división celular en tallos pero la inhibe en yemas laterales. Para el desarrollo de los frutos debe estar presente la auxina. Estos efectos dependen de varios factores, como: el estado de desarrollo del tejido u órgano, la concentración de auxina, el tipo de auxina (natural ó sintética), y la participación de otras fitohormonas (Taiz, 1991).

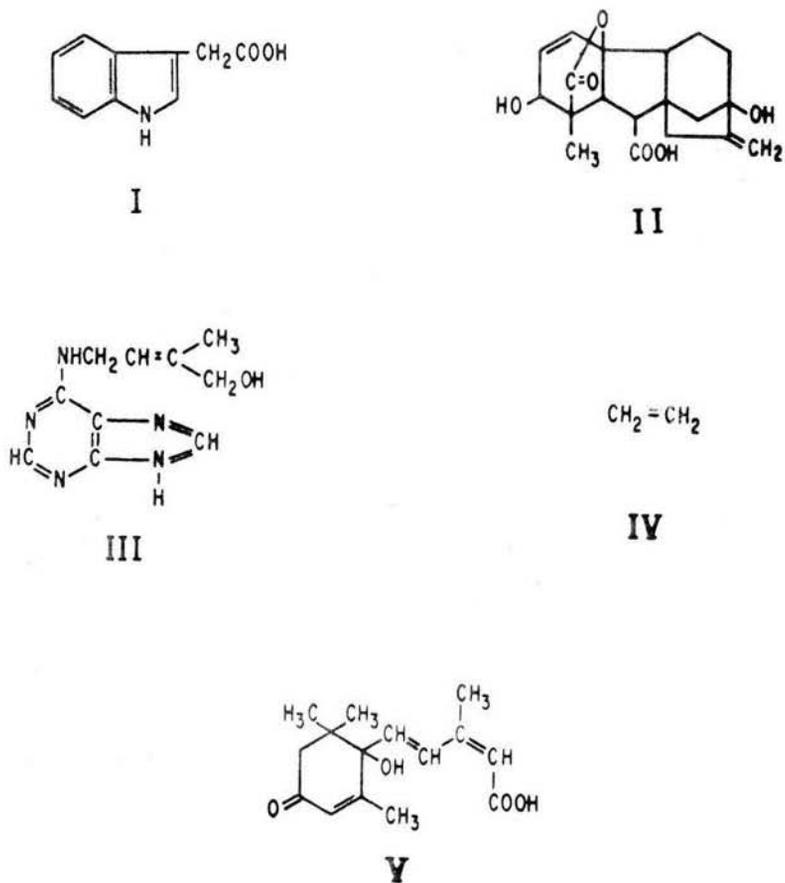


FIGURA 5. Estructuras químicas de las principales fitohormonas (Talz, 1991).

- | | |
|--|-------------------------|
| I. AUXINA [Acido Indolacético (IAA)] | IV. ETILENO |
| II. GIBERELINA [Acido Giberélico (GA ₃)] | V. ACIDO ABCISICO [ABA] |
| III. ZEATINA [Citoquinina] | |

3.2 GIBERELINAS

La giberelina fué aislada e identificada químicamente por bioquímicos japoneses en la década de los 30' a partir de un hongo parásito de las plántulas de arroz llamado *Gibberella fujikuroi*, pero fué hasta 1956 que se logró por primera vez el aislamiento de giberelina a partir de una planta superior, la semilla de la judía, *Phaseolus vulgaris*. Desde aquel entonces se han aislado giberelinas de muchas especies de plantas superiores y es posible que esten presentes en todas (Raven, 1975).

Hay más de 80 giberelinas conocidas, su distribución es bastante específica, aunque muchos tejidos contienen dos, tres o varias de las conocidas. Algunas giberelinas son biológicamente activas, mientras que otras no, parecen sintetizarse en muchas partes de la planta, pero especialmente en las áreas en crecimiento activo como los embriones o los tejidos meristemáticos o en desarrollo (Taiz, 1991).

Las giberelinas son compuestos terpenoides, hechos de unidades isoprenoides derivados del ácido mevalónico. La mayoría de ellas tienen 20 carbonos, las estructuras de algunas giberelinas importantes se muestran en la figura 6.

Efectos fisiológicos de las giberelinas

Debido a la amplia distribución de las giberelinas en las plantas y a las distintas respuestas específicas de cada tipo de planta a la aplicación externa de giberelinas, deben ser consideradas como fitohormonas del crecimiento de tipo natural. Por su actividad biológica se les ha comparado con el ácido indolacético (IAA), aunque en algunos casos actúan de modo distinto, y en otros de una manera parecida.

Las giberelinas actúan sobre el enanismo genético, espigamiento y floración, plantas fotoinhibidas, partenocarpia y movilización de las sustancias de reserva durante la germinación (Devlin, 1982).

En la germinación de las semillas, deben ser movilizadas las sustancias de reserva que estan almacenadas en el endospermo, las señales para esta movilización parten del embrión y el ácido giberélico (GA_3) puede ser una señal de este tipo (Yomo y Paleg 1960). Varner (1964) demostró que el ácido giberélico puede activar el material genético. Durante la movilización del material de reserva, el embrión deja GA_3 a disposición de la capa de aleurona. Allí se activan genes para la síntesis de distintas enzimas de acción hidrolítica, las cuales pasan al endospermo hidrolizando el almidón, proteínas y ácidos nucleicos a azúcares simples y aminoácidos, estos son absorbidos por el escutelo y transportados al embrión para su crecimiento (Hess, 1980).

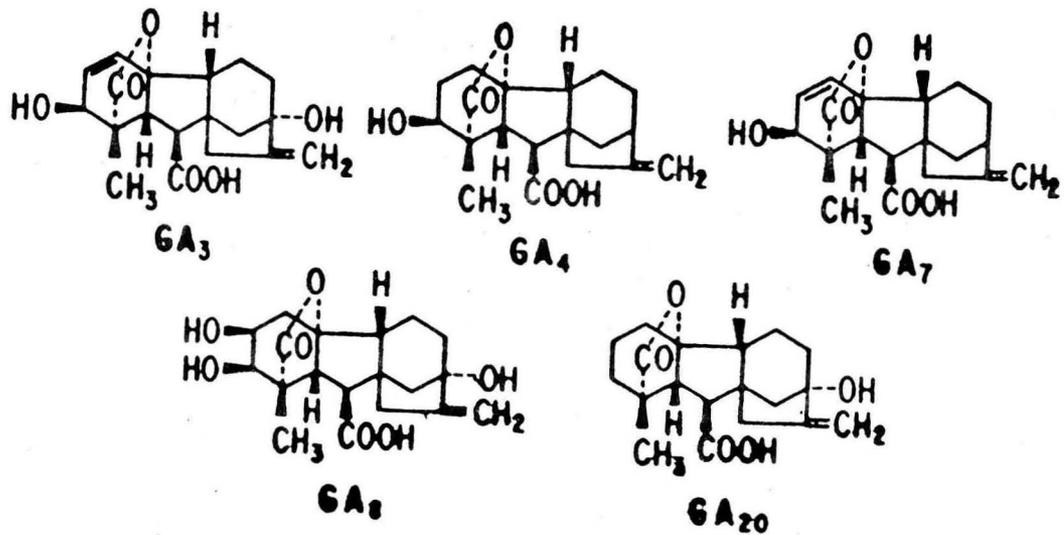


FIGURA 6. Estructuras químicas de algunas giberelinas importantes (Taiz, 1991).

3.3 CITOQUININAS

Existen compuestos que inducen a las células a multiplicarse como la cinetina (6-furfuril-aminopurina), la cual procede de la desoxiadenosina, un producto de la degradación del DNA, sin embargo se ha encontrado cinetina en células vegetales naturales, en especial en las células del tejido de las heridas.

A todas las sustancias análogas a la cinetina con actividad estimulante sobre la división celular se les dió el nombre de citoquininas.

Efectos fisiológicos de las citoquininas

La cinetina tiene sus efectos sobre diferentes sistemas de crecimiento de las plantas, como la estimulación de la división y el alargamiento celular, la iniciación y el crecimiento radicular y de la parte aérea de la planta y la terminación del reposo (Devlin, 1982).

3.4 ETILENO

En contraste con las hormonas que promueven el crecimiento, el etileno es una fitohormona que actúa inhibiendo los procesos de crecimiento y metabolismo en las plantas.

El etileno se forma en la mayoría de los órganos de las plantas, los tejidos en senescencia o frutos maduros produciendo más etileno que los tejidos jóvenes. El precursor del etileno es el aminoácido metionina.

La biosíntesis del etileno es desencadenada por varios procesos de desarrollo, por auxinas y por estrés medio ambiental. Los efectos fisiológicos del etileno pueden ser bloqueados por inhibidores biosintéticos o por antagonistas.

El etileno regula la maduración de los frutos y otros procesos asociados con la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y el crecimiento de la plántula (Taiz, 1991).

4 Acido Abscisico (ABA)

El ABA es un inhibidor del crecimiento, que en 1965 un grupo de científicos de la Universidad de California aislaron de los frutos de la planta del algodón *Gossyphium hirsutum* (Ohkuma y col, 1965).

Químicamente ABA es un terpenoide con 15 átomos de carbono los cuales configuran un anillo alifático con un doble enlace, dos grupos metil y una cadena insaturada con un grupo carboxilo terminal. La posición de los protones en los carbonos 2 y 4 y la orientación resultante del grupo carboxilo del carbono 2 determina los isómeros cis y trans de ABA.

Dentro de la planta, ABA ha sido detectado en cada órgano principal o tejido vivo de la raíz a la yema apical, ABA es sintetizado en casi todas las células que contienen cloroplastos o amiloplastos (Taiz, 1991).

En la semilla se localiza en varias partes según la especie, como se puede ver en la tabla 1. El origen de ABA de semillas no es claro aún. Una parte o la totalidad del ácido en ciertas semillas puede derivarse de la planta madre, pero al menos en un caso (*P. sativum*) ha sido demostrado que el embrión y el endospermo pueden sintetizar esta sustancia a partir del ácido mevalónico (Milborrow, 1974).

TABLA 1. Contenido de ácido abscísico en algunas semillas (Bewleg, 1978).

ESPECIES	CONCENTRACION (mg/Kg peso fresco)
<i>Pisum sativum</i> (semilla inmadura)	1.0
<i>Lactuca sativa</i>	0.70
<i>Triticum aestivum</i> (grano inmaduro)	0.12
<i>Rosa arvensis</i>	0.16
<i>Rosa canina</i>	0.53
<i>Cocos nucifera</i> (semilla madura)	-----
<i>Persea gratissima</i> (semilla madura)	0.11
<i>Pyrus malus</i> (semilla madura)	0.04
<i>Corylus avellana</i> (semilla madura)	
pericarpio	0.37
testa	5.03
embrión	0.02
<i>Fraxinus americana</i> (semilla madura)	0.45
pericarpio	0.73
<i>Fraxinus ornus</i> (semilla madura)	0.11
pericarpio	0.22
<i>Taxus baccata</i> (semilla madura)	0.71

4.1 Biosíntesis de ABA

Para conocer la vía de síntesis de ABA, dos rutas metabólicas han sido investigadas (Zeevaart y Creelman, 1988). (Figura 7) Una vía involucra al ácido mevalónico, el cual es un precursor de todos los terpenoides en plantas, en esta ruta que es llamada directa, la molécula de ABA de 15 carbonos está formada a partir del ácido mevalónico y un precursor de 15 carbonos llamado pirofosfato farnesil. Y la vía alterna o indirecta, en donde ABA es formado a partir de un carotenoide (violaxantina) de 40 carbonos por degradación.

La concentración de ABA en los tejidos está determinada por el balance entre la biosíntesis y el catabolismo. El ABA libre es inactivado por oxidación, dando como resultado la formación de un intermediario inestable llamado 6'-hidroximetil ABA, el cual es convertido a ácido faseico (PA) y ácido dihidrofaseico (DPA). El ABA libre también es inactivado por conjugación, en la cual la hormona forma un enlace covalente con otra molécula, como un monosacárido. Un ejemplo común de un conjugado de ABA es ABA β -D-glucosil ester (ABAGE) (Taiz, 1991).

4.2 ABA durante el desarrollo del grano

Durante el desarrollo del grano, el ABA acumulado en el embrión y en el endospermo juega un papel principal en el control de la maduración del embrión y en la prevención de la germinación prematura del grano morfológicamente maduro pero fisiológicamente aún inmaduro. En un grano seco, los niveles de ABA disminuyen y se lleva a cabo la germinación.

El efecto que tiene ABA en el grano inmaduro es doble; primero suprime la expresión hormonal de los genes específicos para la germinación, es decir, aquellos que se expresan en presencia de GA_3 ; esto puede ayudar a prevenir la germinación precoz; segundo, el ABA induce la expresión de genes "embriogénicos", algunos de los cuales pueden ser necesarios para la maduración del embrión. (Figura 8)

Entre las proteínas identificadas que se acumulan en el embrión en respuesta al ABA están la aglutinina del germen de trigo, la lectina de arroz y la proteína de reserva globulina 7S. Ninguna de estas proteínas tiene una localización precisa en el embrión, ni el sitio de acción del ABA ha sido definido.

El efecto doble de ABA puede observarse en capas de aleurona aisladas de granos maduros, donde no solamente se suprime la expresión de genes que codifican las proteínas que induce el GA_3 , incluyendo (1-3, 1-4) β -glucanasa y α -amilasa, sino también eleva los niveles de las proteínas específicas de ABA, como sucede con el inhibidor de α -amilasa, esta proteína puede inhibir alguna α -amilasa que se sintetiza durante la germinación prematura, por lo que la actividad de α -amilasa puede ser suprimida por ABA tanto a nivel transcripcional como en el de la enzima misma (Fincher, 1989).

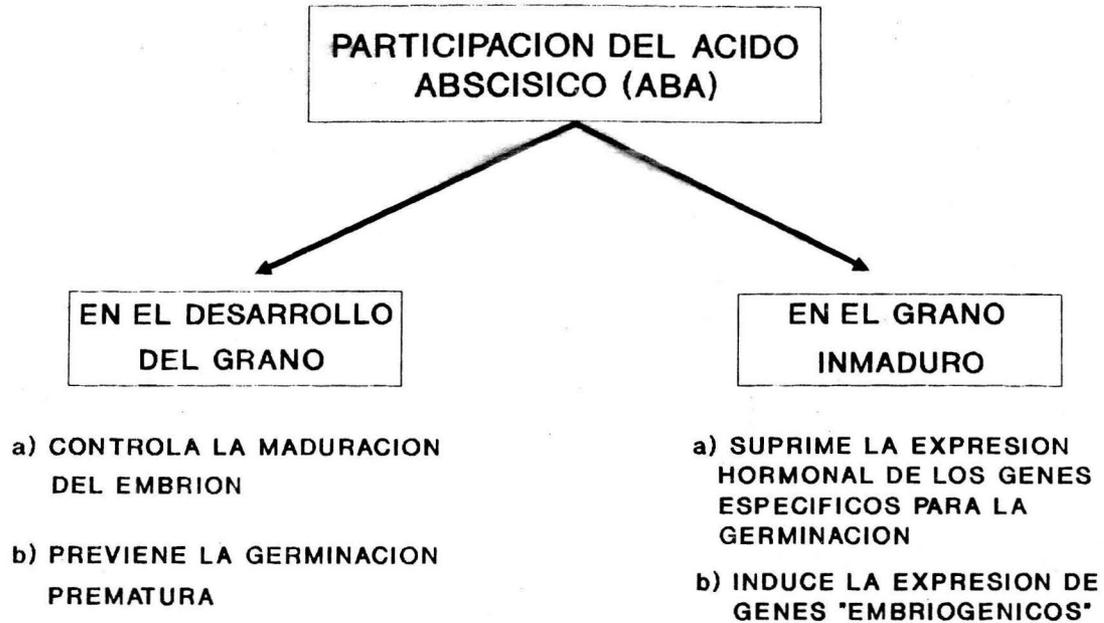


FIGURA 8. Papel que desempeña el ácido abscísico (ABA), en el grano de trigo (Fincher, 1989).

4.3 Efectos fisiológicos de ABA

La acción primaria de ABA parece ser la de inhibir la acción de la giberelina y estimular el letargo. Se ha advertido un efecto estimulante como el GA_3 , el ABA causa un aumento en la producción de invertasa en la caña de azúcar. Este efecto parece operar a nivel de la traducción del RNAm en el punto de síntesis. Otros efectos estimulantes del GA_3 son opuestos por el ABA.

El ABA inhibe la estimulación de la síntesis de retículo endoplásmico y de α -amilasa en las semillas de cebada que es causada por el GA_3 . El efecto del ABA parece ser bastante específico para inhibir α -amilasa, tanto que la síntesis de otras hidrolasas continúa; esto sugiere que inhibe específicamente la traducción del RNAm para esta enzima pero no para otras.

Los efectos de ABA sobre el letargo y la senescencia son paralelos a su influencia sobre la síntesis de proteínas y de RNA en general; por lo tanto, parece probable que gran parte de su acción inductora de letargo se deba a ellos.

El ABA también tiene efecto sobre las respuestas de floración, causando floración en plantas de días cortos. El ABA es también el agente que media el cierre de los estomas bajo el efecto de sequía (Bidwell, 1979).

4.4. Papel de ABA en la inhibición de α -amilasa inducida por GA_3

Durante la germinación de las semillas de los cereales, el GA_3 induce la síntesis de α -amilasa en la capa de aleurona, la cual cataliza la degradación de las reservas de almidón almacenadas en el endospermo de la semilla; ABA inhibe la síntesis de esta enzima hidrolítica dependiente de GA_3 ; esta inhibición no es debida a una simple competencia entre estas dos hormonas, porque altas concentraciones de GA_3 no pueden revertir totalmente los efectos de ABA. El efecto de ABA tampoco es sobre el metabolismo celular ya que no tiene efecto sobre el consumo de O_2 (Ho y Varner, 1976).

ABA a una concentración de 5 μM inhibe la formación de α -amilasa cuando es agregado al mismo tiempo que GA_3 en medios con capas de aleurona de cebada; sin embargo son necesarias altas concentraciones de ABA (10-25 μM) para reducir la síntesis de α -amilasa cuando ABA es agregado 12 h. después de GA_3 . (Figura 9) Y a concentraciones mayores de 50 μM ABA ya no tiene un efecto significativo sobre la actividad de α -amilasa (Ho y Varner, 1976).

Varner y Ho (1976), han sugerido que ABA inhibe la síntesis de α -amilasa inducida por GA_3 afectando la traducción de su RNAm,

sitio que ha sido sugerido también por Dure (1976), en embriones de algodón. Ho y Varner (1976), trabajando con capas de aleurona de cebada han encontrado que ABA inhibe la síntesis de a-amilasa si la hormona se añade 12 h después de iniciado el tratamiento con GA_3 . Pero la producción de esta enzima se previene si se adicionan, al mismo tiempo que GA_3 , inhibidores de síntesis de RNA tales como actinomicina-D y la cordicepina (Yomo y Varner, 1971). Sin embargo la síntesis de a-amilasa no es susceptible a estos inhibidores, si se añaden 12 h después de la adición de GA_3 (Ho y Varner, 1974). Lo que permite establecer que la síntesis de a-amilasa después de las 12 h de tratamiento con GA_3 , está bajo control post-transcripcional, que el RNAm de la a-amilasa debe sintetizarse antes o durante las primeras 12 h de tratamiento con GA_3 y que ABA actúa inhibiendo la síntesis de a-amilasa durante esta etapa.

Cuando ABA se agrega 12 h después de GA_3 y la cordicepina es adicionada al mismo tiempo o más tarde, la síntesis de a-amilasa no para o bien continúa rápidamente, lo que hace parecer que los efectos de ABA dependen de una síntesis continua de RNAm o proteína de vida corta, los cuales son bloqueados por cordicepina y cicloheximida (Nolan y Ho, 1988).

La capacidad continua de ABA para disminuir los niveles de RNAm de a-amilasa sugiere que el GA_3 puede ser constantemente requerido para una expresión máxima de a-amilasa y que ABA y el ácido faseico (PA), su primer metabolito estable actúan reduciendo los niveles del RNAm de la enzima al interferir con la acción continua de GA_3 .

Nolan y Ho (1988) sugieren que los inhibidores de síntesis de RNA y proteínas, previenen la degradación del RNAm de a-amilasa en la capa de aleurona. Favoreciendo el modelo en el que el GA_3 suprime la síntesis de la proteína o proteínas que afectan la estabilidad del RNAm de a-amilasa y que ABA y PA impiden esta acción de GA_3 . La expresión de la a-amilasa puede en este caso ser regulada post-transcripcionalmente por GA_3 , ABA y PA, ya que se ha demostrado su regulación transcripcional (Jacobsen y Beach, 1985). La cicloheximida y la cordicepina participan bloqueando la síntesis de las proteínas involucradas en la desestabilización del RNAm de a-amilasa y así aumentar la estabilidad del RNAm de a-amilasa. Deduciendo con esto que el RNAm y la proteína que están involucradas en la desestabilización de este RNAm tengan una vida media muy corta.

Otro papel que pueden desempeñar los inhibidores de traducción y transcripción es que causen un aumento en la estabilidad del RNAm de a-amilasa (Nolan y Ho, 1988).

4.5 Papel de ABA en la acidificación de la capa de aleurona de trigo.

Los experimentos realizados han mostrado que la capa de aleurona aislada de trigo tiene un papel de gran importancia durante la germinación y crecimiento de la semilla, ya que aparte de proveer de enzimas hidrolíticas como α -amilasa y proteasas, tiene la capacidad de acidificar el endospermo amiláceo, teniendo esta acidificación un papel regulatorio en la movilización de reservas, ya que cuando el pH del endospermo se acidifica hay una mayor solubilización de proteínas, almidón y iones Ca^{2+} , produciendo sustratos solubles para la actividad enzimática, además de que activa varios sistemas de transporte en el epitelio escutelar (Hamabata y col 1988).

Además se ha encontrado que la capa de aleurona es capaz de acidificar al medio de manera independiente a la presencia de el GA_3 (Hamabata y col 1988).

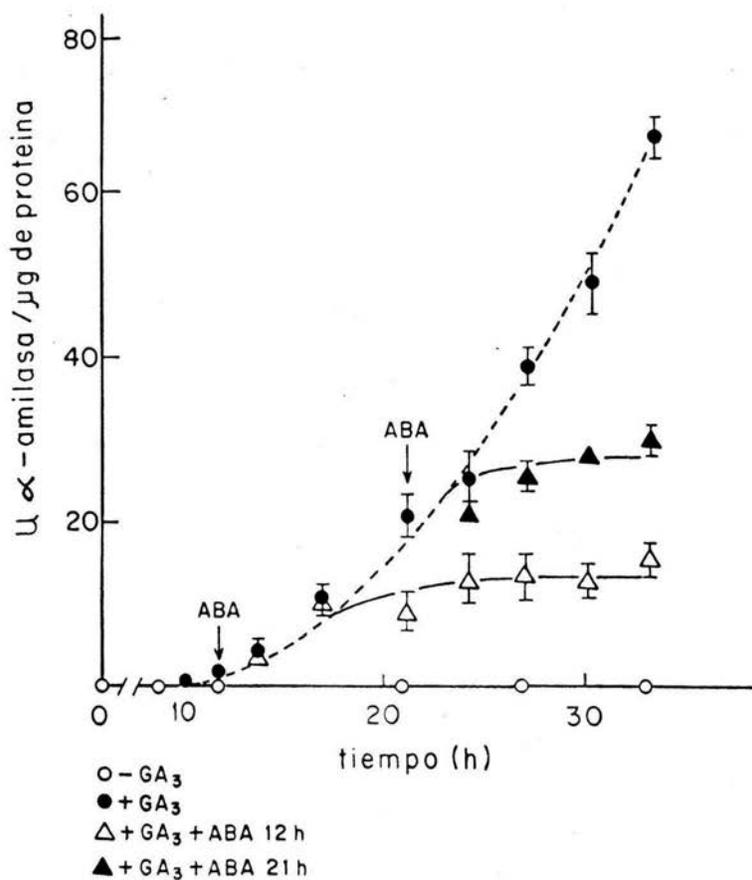


FIGURA 9. La acción inhibitoria de ABA sobre la inducción de alfa-amilasa por GA₃ en capas de aleurona de trigo (García, 1982).

5 Movilización de las reservas

Durante la germinación, las reservas alimenticias almacenadas en el endospermo amiláceo, principalmente almidón son degradadas por enzimas hidrolíticas, y los azúcares solubles, aminoácidos y otros productos son transportados para el crecimiento del embrión. Las dos enzimas responsables de la degradación del almidón son la α y β -amilasas. La α -amilasa hidroliza las cadenas interiores del almidón produciendo oligosacáridos o dextrinas límite, compuestas de residuos $\alpha(1,4)$ glucosídicos. La β -amilasa degrada los extremos del almidón para producir maltosa, un disacárido.

La amilasa es secretada al endospermo amiláceo de las semillas de los cereales por dos tejidos: el escutelo y la capa de aleurona (Figura 10). Sin embargo la primera función del escutelo es la de absorber los azúcares producidos durante la degradación del almidón, también puede liberar α -amilasa y así participar en la degradación del almidón; a diferencia de éste, la capa de aleurona es un tejido altamente especializado y secretor.

La secreción de las enzimas que degradan al almidón en las capas de aleurona de cebada dependen de la presencia del embrión. Cuando el embrión es eliminado de la semillas, la degradación del almidón no ocurre, ni siquiera después de una prolongada hidratación de las medias semillas; ya que es el embrión el que produce una sustancia difusible que dispara la producción de α -amilasa por la capa de aleurona, esta sustancia es el ácido giberélico (GA_3). Quedando claro que el embrión sintetiza y libera giberelinas al endospermo amiláceo durante la germinación. Así el embrión de los cereales regula eficientemente la movilización de sus propias reservas alimenticias a través de la secreción de giberelinas, las cuales estimulan la función digestiva de la capa de aleurona (Taiz, 1991).

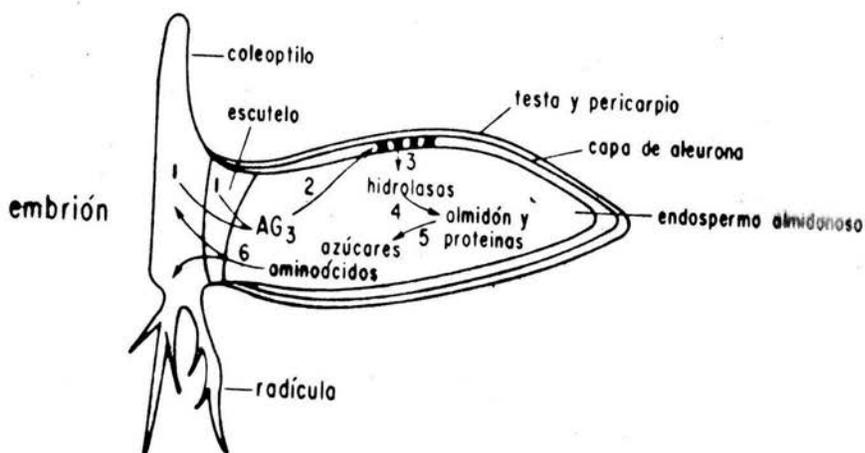


FIGURA 10. Estructura de la semilla de cebada y las funciones de sus tejidos durante la germinación.

- (1) El GA_3 es sintetizado por el coleoptilo y el escutelo del embrión y liberado al endospermo amiláceo.
- (2) El GA_3 difunde hacia la capa de aleurona.
- (3) La capa de aleurona es inducida a sintetizar y secretar α -amilasa y otras hidrolasas al endospermo.
- (4)y(5) El almidón y otras macromoléculas son hidrolizadas.
- (6) Los solutos del endospermo son absorbidos por el escutelo y transportados para el crecimiento del embrión. (Taiz, 1991).

6 a-amilasa

La enzima más estudiada en los granos de los cereales y que es producida por la capa de aleurona es la a-amilasa. tiene un papel definido en el endospermo amiláceo durante la germinación; la cual es producida en grandes cantidades por la aleurona, es fácilmente purificada y detectada en geles de isoelectroenfoque; es muy estable y consiste de una cadena simple de polipéptidos.

La actividad de la a-amilasa aumenta durante la germinación de los cereales, en algunas especies (cebada y trigo) la enzima proviene principalmente de las células de aleurona, mientras que en otras (arroz, sorgo, maíz) del escutelo (Russell y Jacobsen, 1991).

Es conocido que el GA_3 causa un aumento en la actividad de la a-amilasa y otras enzimas en las células de aleurona de trigo (Baulcombe y Buffard, 1983) y de cebada (Paleg y Yomo, 1960) y juega un papel importante en el control de la a-amilasa *in vivo*; este GA_3 proviene del embrión y controla la producción de la a-amilasa de la aleurona y el escutelo durante la germinación (Chandler y Mosleth, 1990).

La manera en que actúa el GA_3 para inducir la síntesis de la enzima es a nivel genético, ya que se ha encontrado que esta hormona aumenta el nivel del RNAm traducible para a-amilasa en la capa de aleurona (Higgins, et al. 1976) ó mas específicamente que los niveles de RNAm de a-amilasa son fuertemente aumentados por el GA_3 (Chandler y col. 1984 en Talz, 1991).

Usando capas de aleurona de cebada se ha encontrado que la producción de a-amilasa depende de la presencia de GA_3 y Ca^{2+} ; y que la mayoría de la enzima es liberada por las células de aleurona, que a-amilasa se sintetiza por síntesis *de novo*; la abundancia de RNAm para a-amilasa aumenta con la síntesis de a-amilasa y que el aumento de RNAm es debido en parte al incremento de la velocidad de transcripción de los genes de a-amilasa (Russell y Jacobsen, 1991).

6.1 Isoenzimas de a-amilasa

La a-amilasa de los granos de los cereales consiste en realidad en un número de isoenzimas que pueden ser separadas por varias técnicas: isoelectroenfoque (IEF); electroforesis de geles de poliacrilamida y por cromatografía de intercambio iónico (MacGregor, 1982; MacGregor y MacGregor, 1987; Hill y MacGregor, 1988).

El número de isoenzimas de α -amilasa que se encuentran en el endospermo de la cebada (sintetizadas y secretadas por la capa de aleurona) dependen de varios factores como son la técnica de separación, la variedad de la cebada, si se utilizan semillas enteras, aleuronas aisladas o endospermos tratados con GA_3 . Dependiendo de como se han producido y separado las isoenzimas, será el número de ellas que se encuentren (Russell y Jacobsen, 1991).

Jacobsen y Higgins (1982) utilizaron capas de aleurona de cebada (*Hordeum vulgare*) L. cv Himalaya tratadas con GA_3 y fraccionaron la α -amilasa sintetizada, encontrando 2 grupos de isoenzimas; las diferencias entre ambos grupos se dieron particularmente en las características serológicas y mapeo de péptidos indicando que estos dos grupos contienen polipéptidos con diferencias considerables en la secuencia de aminoácidos, siendo probable que fueran producto de genes diferentes o grupos de genes.

Los grupos de isoenzimas se designaron como A (con dos α -amilasas) y B (con dos α -amilasas), cada grupo se ha diferenciado también por su punto isoeléctrico (P.I.), el grupo A presenta un P.I. que va de un pH de 4.5 a 5.2 y el grupo B de un pH de 5.9 a 6.6, además el gen o genes del grupo A se localiza en el cromosoma 1 y en el grupo B el gen o genes está en el cromosoma 6.

En el caso del trigo Lazarus y col. (1985) reportan dos grupos de isoenzimas llamados α -Amy 1 y α -Amy 2.

El grupo 1 de isoenzimas está codificado en el cromosoma 6 y tiene un P.I. alto de aproximadamente 6.3 a 7.5, estas isoenzimas no están presentes durante el desarrollo del endospermo de la semilla de trigo, pero sí aparecen tempranamente durante la germinación y se acumulan hasta llegar a altos niveles.

El grupo 2 de isoenzimas presentan un P.I. bajo de 4.9 a 6.0 y se localizan en el cromosoma 7 del genoma de trigo, son activas durante el desarrollo del endospermo y la germinación del grano, estas aparecen más tarde y se acumulan a niveles más bajos que las isoenzimas del grupo 1.

III HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El GA_3 induce la síntesis de α -amilasa en capas de aleurona de trigo (Ho y Varner, 1976), siendo necesaria su presencia durante toda la inducción (Nolan y Ho, 1988), para poder obtener la máxima respuesta de la enzima, dicha inducción se lleva a cabo cuando el pH del medio es ácido (Chrispeels y Varner, 1967).

ABA inhibe la respuesta de la enzima ya que actúa sobre la síntesis de su RNAm (Nolan y Ho, 1988), el porcentaje de inhibición varía con respecto al tiempo de adición de la fitohormona (García, 1982).

Hipótesis:

Si ambas fitohormonas son agregadas al mismo tiempo a capas de aleurona de trigo previamente inducidas, después de un periodo de 21 h., en medios con un pH de 4.0 cuando ya se llevó a cabo la síntesis del RNAm de la α -amilasa, entonces la inhibición que presente la enzima no se deberá solamente a la presencia de ABA, sino también al valor de pH del medio 4.0 ó 6.0

Los objetivos que se plantean son los siguientes:

Objetivo General:

Conocer el efecto que causa el pH del medio 4.0 y 6.0 en la inducción de α -amilasa por GA_3 , cuando se agregan dos fitohormonas antagónicas (GA_3 y ABA) a capas de aleurona de trigo previamente inducidas.

Objetivos particulares:

Conocer si la acidificación del medio causada por la capa de aleurona de trigo, es independiente de la presencia del ácido absclísico (ABA).

Conocer el efecto de ABA sobre la inducción de α -amilasa por GA_3 previamente sintetizada en capas de aleurona de trigo a pH 4.0 y 6.0

Observar por medio de isoelectroenfoque que isoenzimas de α -amilasa de *Triticum aestivum* var. Tonichi son afectadas por el pH del medio 4.0 y 6.0 y la presencia de las dos fitohormonas juntas (GA_3 y ABA).

IV MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1 Reactivos y material.

Los reactivos que se utilizaron en cada uno de los experimentos fueron de grado analítico como: ácido clorhídrico (HCl), cloruro de calcio (CaCl_2) yodo (I_2), yoduro de potasio (KI), cloruro de sodio (NaCl).

El ácido giberélico y ácido abscísico que se emplearon, así como el sulfato de estreptomycin y cloranfenicol fueron de marca Sigma, el almidón soluble de la casa Merck, el hipoclorito de sodio de marca Cloralex.

El agua bidestilada, material de vidrio y filtros millipore (tipo HA 0.45 μm) se utilizaron estériles, por lo que se empleó para su esterilización un autoclave a 1.5 Kg/cm^2 a 120°C durante 20 min.

1.1 Material Biológico.

Se emplearon semillas de trigo (*Triticum aestivum* var Tonichi) cosecha 1985-1986 donada por PRONASE.

Se seleccionaron para cada experimento semillas enteras, sin manchas ni hongos, del mismo tamaño y color.

1.2 Imbibición de medias semillas.

A las semillas escogidas se les eliminó la porción del embrión, así como la parte opuesta con ayuda de un bisturí y pinzas.

Estas medias semillas se pasaron a un matraz Kitazato de 125 ml y se les agregó una solución de hipoclorito de sodio a una concentración final de 0.5% para esterilizarlas, colocando el matraz al vacío por 15 min. Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar, se decantó la solución del matraz y las medias semillas se lavaron 6 veces con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos de cloro y se distribuyeron en cajas Petri estériles que contenían un disco de papel filtro Whatman No. 40 y 10 ml de agua bidestilada estéril.

Las cajas se sellaron con parafilm, se envolvieron en papel aluminio y colocaron en reposo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. para la imbibición de las medias semillas desembrionadas.

1.3 Aislamiento de capas de aleurona

Pasando el periodo de imbibición se obtuvieron las capas de aleurona de las medias semillas, en condiciones de esterilidad. Esto se llevo a cabo con ayuda de una espátula, con la cual se presionó la media semilla logrando que el endospermo amiláceo saliera por un extremo, abriendo la media semilla para quitar los restos de endospermo.

Ya aisladas las capas de aleurona se lavaron 4 veces con aproximadamente 15 ml. de agua estéril para eliminar los residuos de almidón. En la figura 11 se muestra el diagrama de este proceso.

1.4 Métodos

1.5 Acidificación del medio por capas de aleurona aisladas de trigo.

Las capas de aleurona previamente aisladas y lavadas se separaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml., colocándose 10 capas por lote. La acidificación del medio se realizó en presencia ó ausencia de ácido absclisico (ABA) a una concentración de $10^{-5}M$ y de ácido succínico a una concentración de 5mM que actuaba como buffer, el medio de incubación contenía además cloramfenicol y estreptomycin 50 ug/ml de c/u para prevenir la contaminación microbiana, el pH que tenía el medio al iniciar el tratamiento era de 6.0.

La acidificación se llevó a cabo de la siguiente manera: A cada uno de los lotes con 10 capas de aleurona se les agregó 4 ml. del medio de incubación para un nuevo lavado, este se repitió una vez mas para finalmente incubar el tejido con 2 ml. de medio a $25 \pm 0.5^{\circ}C$ en agitación constante por 24 h. de acuerdo a a la tabla 2.

TABLA 2. Acidificación del medio de incubación

Lote 1	10 capas de aleurona + ac. succínico + antibióticos + ABA
Lote 2	10 capas de aleurona + ac. succínico + antibióticos ---
Lote 3	10 capas de aleurona + agua + antibióticos + ABA
Lote 4	10 capas de aleurona + agua + antibióticos ---

Cada lote se trabajó con su respectivo duplicado.

1.6 Medición del pH del medio de incubación

La medición del pH de los medios se llevó a cabo con un potenciómetro marca Corning Scientific Instruments Model 12, introduciendo el electrodo en el matraz que contenía el medio procurando separar los medios de las aleuronas, dicha medición se realizó cada 2 h. a cada uno de los medios, el registro de la acidificación se hizo de forma continua hasta las 8 h., y finalmente dos mediciones más a las 22 y 24 h.

Después de las mediciones los matraces se regresaron al baño de agitación para continuar la incubación.

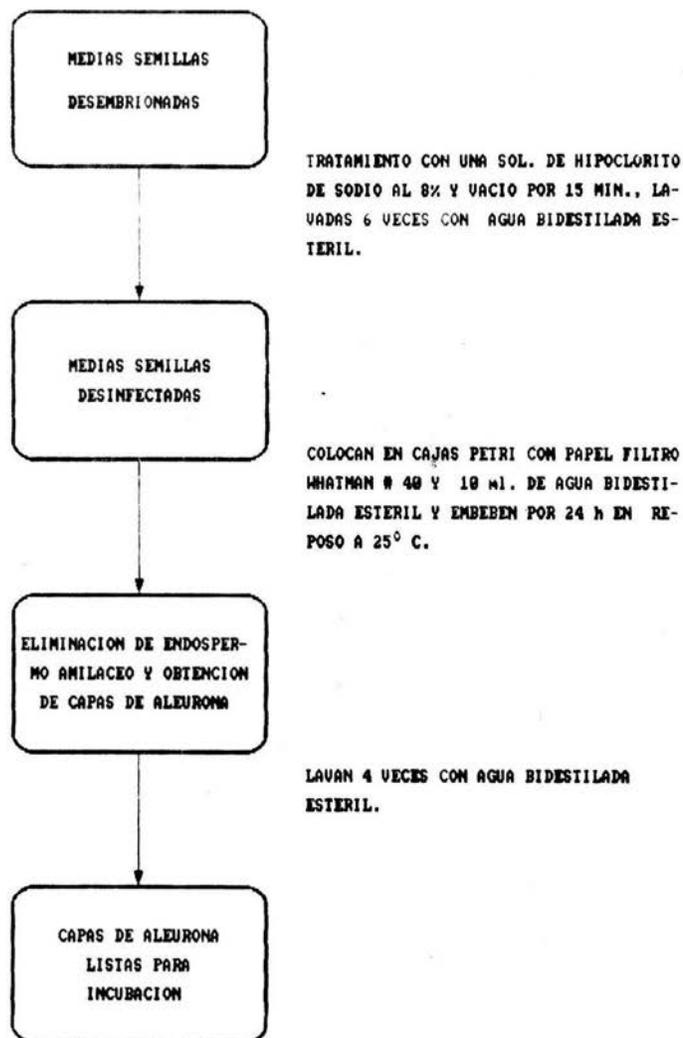


FIGURA 11. Diagrama de la secuencia de procesos para la obtención de capas de aleurona.

1.7 Obtención de α -amilasa

Una vez terminado el registro de acidificación, el medio de incubación contenido en los matraces se separó del tejido, se tomó exactamente 1.5 ml, se ajustó el pH a 6.0 y se aforó a 2 ml con una solución de acetato de calcio 6.5 mM.

Por su parte las capas de aleurona se secaron con papel filtro y colocaron en un mortero de porcelana al cual se le agregó nitrógeno líquido y se procedió a molerlas hasta obtener una harina muy fina. Dicha harina se pasó a un homogenizador Potter de vidrio de 10 ml y se agregaron 2 ml de acetato de calcio 6.5 mM el homogenizador se colocó en hielo y para llevar a cabo la homogenización se utilizó un taladro en dos periodos de 20 segundos cada uno, alternando con un descanso de 10 seg. Cuando se obtuvo el homogenado se pasó a un vaso de precipitados de 10 ml, enjuagando el homogenizador con 0.5 ml de acetato de calcio 6.5 mM, adicionando este lavado al vaso, se ajustó el pH a 6.0 y se aforó a 3 ml con la solución de acetato.

Tanto los medios como los extractos de aleuronas se colocaron a 70°C por 20 min. para inactivar las β -amilasas presentes, posteriormente se pasaron a tubos de polipropileno y se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 20 min. a 4°C en un rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall RC-5B. Terminado el tiempo de centrifugación se separaron los sobrenadantes y en ellos se midió la actividad de α -amilasa. El diagrama de estos procesos se observa en la figura 12.

1.8 Determinación de la actividad de α -amilasa.

La actividad de la enzima se determinó utilizando un ensayo basado en el método de Briggs (1967), el cual consiste en seguir la degradación del almidón por la disminución de color del complejo almidón-yodo.

Para este ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

-Sustrato (almidón): Se pesó 0.0625 g. de almidón soluble y disolvió en aproximadamente 10 ml de agua bidestilada, se dejó hervir por 1.5 min. se enfrió a temperatura ambiente, se agregó 0.5 ml. de una solución de cloruro de sodio 250 mM y 0.2 ml de acetato de calcio 325 mM, se aforó la solución a 25 ml. con agua bidestilada. Siempre se utilizó recién preparada.

-Yodo: La solución estándar se preparó disolviendo 40 g. de yoduro de potasio en aprox. 50 ml de agua bidestilada, posteriormente se agregaron 2.54 g. de yodo, hecha la solución se aforó a 100 ml y guardó en frasco ambar.

-Solución de trabajo de Yodo: Se tomó una parte de la solución estándar de yodo y se diluyó 200 veces con agua bidestilada.

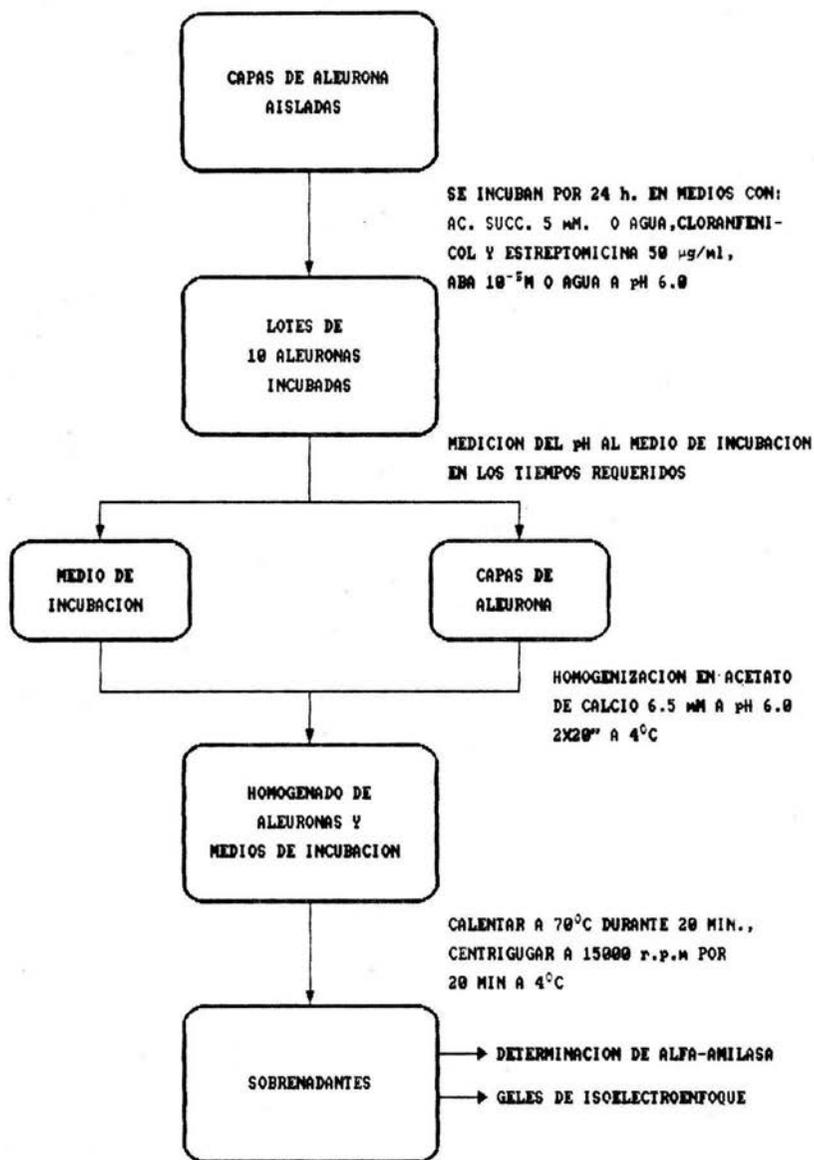


FIGURA 12. Diagrama de procesos para la acidificación del medio y obtención de sobrenadantes para la determinación de alfa-amilasa y realización de geles de isoelectroenfoque.

1.9 Ensayo de α -amilasa.

Se mezclaron 300 ul. del sustrato (almidón) con 100 ul de la muestra (medio o extracto del tejido), se tomó inmediatamente una alícuota de 100 ul. de la mezcla que se consideró como tiempo cero (t_0) y se agitó perfectamente con 5 ml de la solución de trabajo de yodo, a los 10 min. se tomó otra alícuota de 100 ul. de la mezcla que se agregó y agitó a otros 5 ml de solución de trabajo de yodo, considerándose como tiempo diez (t_{10}). Se realizó la lectura en un espectrofotómetro Carl Zeiss mod. M4 QIII a 565 nm., utilizándose como blanco agua bidestilada.

Se calculó el cambio de absorbancia por min. (A/min.) si este estaba entre 0.05-0.01 unidades se continuaba con la cinética por 10 min. pero si no era así, la muestra original se diluía cuantas veces fuera necesario con una solución de acetato de calcio 6.5 mM.

Obtenida la dilución adecuada para registrar la diferencia ya indicada se procedió a realizar la cinética para la cual se mezclaron 600 ul de sustrato con 200 ul de la muestra diluida, la mezcla se agitó y se tomaron alícuotas de 100 ul cada 2 min. que se agregaron y agitaron en sus respectivos tubos con solución de trabajo de yodo y se procedió a la lectura en las condiciones ya mencionadas.

Con los datos de absorbancia y tiempo se construyó una gráfica a partir de la cual se calculó la pendiente (m) de la recta y con esta las unidades de α -amilasa/ml y unidades de α -amilasa/10 aleuronas.

1.10 Determinación de α -amilasa en capas de aleurona de trigo en presencia o ausencia de GA_3

Para confirmar que las capas de aleurona de las semillas empleadas respondían a la presencia de GA_3 se embebieron medias semillas y se obtuvieron las capas de aleurona las cuales se incubaron utilizando 10 por lote en presencia y ausencia de GA_3 $10^{-6}M$ en matraces Erlenmeyer de 50 ml. con 2 ml. de medio de inducción a pH 6.0 que contenía: ácido succínico 5 mM, cloruro de calcio 20 mM, estreptomycin y cloramfenicol 50 $\mu g/ml$ de c/u en agitación constante a $25 \pm 0.5^\circ C$ por 28 h.

Pasado el periodo de incubación se obtuvieron los medios y las aleuronas, a ambos se les determinó por separado la α -amilasa sintetizada de la manera ya descrita.

1.11 Determinación de a-amilasa en capas de aleurona de trigo inducidas por GA₃ en presencia o ausencia de ABA a pH 4.0 y 6.0

Para cada uno de los 4 tratamientos se utilizaron 10 capas de aleurona por tratamiento que se obtuvieron siguiendo la metodología ya descrita. El diseño experimental se observa en la figura 13. Las 10 capas de aleurona aisladas se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml con tapón de rosca, con 2 ml de medio de inducción a pH 4.0 con GA₃ 10⁻⁸ M durante 21 h. en agitación constante a 25± 0.5°C, pasado este periodo los medios se extrajeron y guardaron en tubos eppendor, las capas de aleurona se lavaron 2 veces con 2 ml de una solución de lavado que contenía ac. succínico 5 mM, cloruro de calcio 20 mM, estreptomina y cloramfenicol 50 ug/ml de c/u y se dejaron incubando con 2 ml. de medio por 15 min. en las condiciones iniciales, este lavado se realizó 3 veces más cada 15 min. después de cada incubación los medios se recolectaban para cada uno de los tratamientos.

Después del último periodo de 15 min. las capas de aleurona se lavaron 2 veces con 4 ml del medio correspondiente al tratamiento indicado de fitohormona y pH y se incubaron con 2 ml de su medio respectivo durante 6 h. El tiempo total de incubación en este experimento fué de 28 h. al término del cual se midió el pH a los medios y posteriormente tanto medios como tejido fueron sometidos a la técnica de obtención de sobrenadantes para la determinación de a-amilasa, utilizándose también para la realización de geles de isoelectroenfoque.

1.12 Procedimiento general para la elaboración de geles de isoelectroenfoque

Se limpiaron las placas de vidrio y la placa de soporte perfectamente con alcohol. Se prendió el enfriador de agua y se graduó a 4°C.

Una jeringa de 10 ml se ensambló con un filtro millipore que contenía una membrana de 45 μ m, en un matraz kitazato de 50 ml. y directamente sobre la jeringa se agregaron los siguientes reactivos:

anfolinas: rango de pH	ml
3 - 10	0.1
4 - 6	0.2
6 - 8	0.2
glicerol al 50%	3.0
agua tridestilada	4.5

El contenido de la jeringa se filtró y se agregó además 4.0 ml de una mezcla de acrilamida 30% y bis-acrilamida 0.8%, lo cual también se filtró.

El matraz se sometió al vacío por 10 min. y se adicionó directamente sobre su contenido 5 μ l de N-N-N' tetra metil etilen diamino (TEMED) y 15 μ l de persulfato de amonio al 10%, se mezcló perfectamente y se adicionó a la placa de vidrio previamente instalada en el preparador de geles con ayuda de una pipeta, inyectando la mezcla por uno de los extremos de la placa, dejando que saliera un exceso por el extremo contrario.

Se dió un tiempo de 20 min. para que polimerizara la mezcla, al transcurrir este, con ayuda de una espátula delgada se despegó la placa de vidrio con el gel ya adherido y se colocó en la cámara de electroforesis.

Se cortaron 2 tiras de papel filtro de 12 cm. y una de ellas se embebió con una solución de hidróxido de sodio 1 M y se colocó sobre el gel en el extremo del polo negativo. La otra tira se embebió con una solución de ácido fosfórico 1 M colocándose en el extremo del gel correspondiente al polo positivo.

La fuente de poder se encendió y se fijó en las siguientes condiciones: voltaje 2000 volts como máximo, de 7-10 watts y con poder constante.

Para establecer el gradiente de pH en el gel se hizo una recorrida de 25 min., al terminar esta se apagó la fuente de poder y se colocó una guala sobre el gel para depositar en cada uno de los pozos la cantidad de muestra necesaria, para el primer gel se utilizaron 30 μ l de tejido por pozo y para el segundo gel se

emplearon 15 μg de proteína por pozo, se esperó unos minutos a que se absorbieran las muestras y se continuó la corrida por 1.5 h más

Transcurrida la separación, se pasó la placa con el gel a una charola y se agregaron 100 ml de acetato de calcio 40 mM para despegar el gel, hecho esto se decantó la solución y se agregaron 100 ml de una solución de almidón al 2% dejándose en ella por 20 min. en agitación suave.

Posteriormente se deshechó el almidón y se agregaron 100 ml de una solución de yodo al 2% y ácido acético glacial al 5% por 5 min., enseguida se eliminó el reactivo y se lavó el gel varias veces con agua bidestilada, dejándose en esta por 24 h.

Finalmente se pasó a fotografía y se preservó en papel celofán.

1.13 Cuantificación de proteínas por Lowry

La determinación se hizo de acuerdo a la modificación del método colorimétrico de Lowry, (1951).

Para llevar a cabo la prueba se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A

Carbonato de sodio al 2%
Hidróxido de sodio al 0.4%
Tartrato de sodio-potasio al 0.02%

Solución B

Sulfato de cobre 5 veces hidratado al 0.5%

Solución C

Se prepara el día de su uso, a una parte de la solución B, se agregan 50 partes de la solución A.

Solución D

Reactivo de Folin-Cicalteau diluido
1 ml. de reactivo + 1 ml. de agua bidestilada

Solución estándar de albúmina de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Para realizar la curva patrón de cuantificación de proteína se hizo una serie de tubos con el siguiente esquema:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Sol. Alb. (ml)	----	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Agua (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	----
Sol. C (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
----- AGITAR Y REPOSAR 10 MIN. -----						
Sol. D (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
--- MEZCLAR DE INMEDIATO Y REPOSAR 60 MIN. ---						
----- LEER A 750 NM CONTRA AGUA -----						

V RESULTADOS

RESULTADOS

1.1 Acidificación del medio de incubación por capas de aleurona de trigo

En la figura 14 se observa que en las dos curvas superiores la acidificación parte de 6.0 y llega hasta un valor de 4.3, notándose que es muy similar el comportamiento de ambos lotes de aleuronas, aunque en uno de los tratamientos se utilizó ácido abscísico $10^{-5}M$, mostrándose una total independencia de la acidificación a la presencia de la hormona inhibidora.

En las dos curvas inferiores de la gráfica se observa una situación semejante a la anterior, aunque en uno de los tratamientos también estaba presente el ácido abscísico $10^{-5}M$ sólo se nota como diferencia una mayor acidificación del medio ya que el pH parte de 6.0 y llega a 3.3.

En aquellos medios que estaba presente el ácido succínico 5mM como buffer, (curvas superiores) el pH llegó a un valor de 4.3, (22 y 24 h.) mientras que los medios que no contenían al amortiguador (curvas inferiores) su pH bajo hasta un valor de 3.3 (8 h.)

La curva muestra que el medio se acidifica rápidamente en las primeras 8 h. y hay muy poco cambio en las horas posteriores, y que la acidificación es independiente de la adición de ABA.

Cada punto representa el resultado de tres experimentos por duplicado y las barras la desviación estandar.

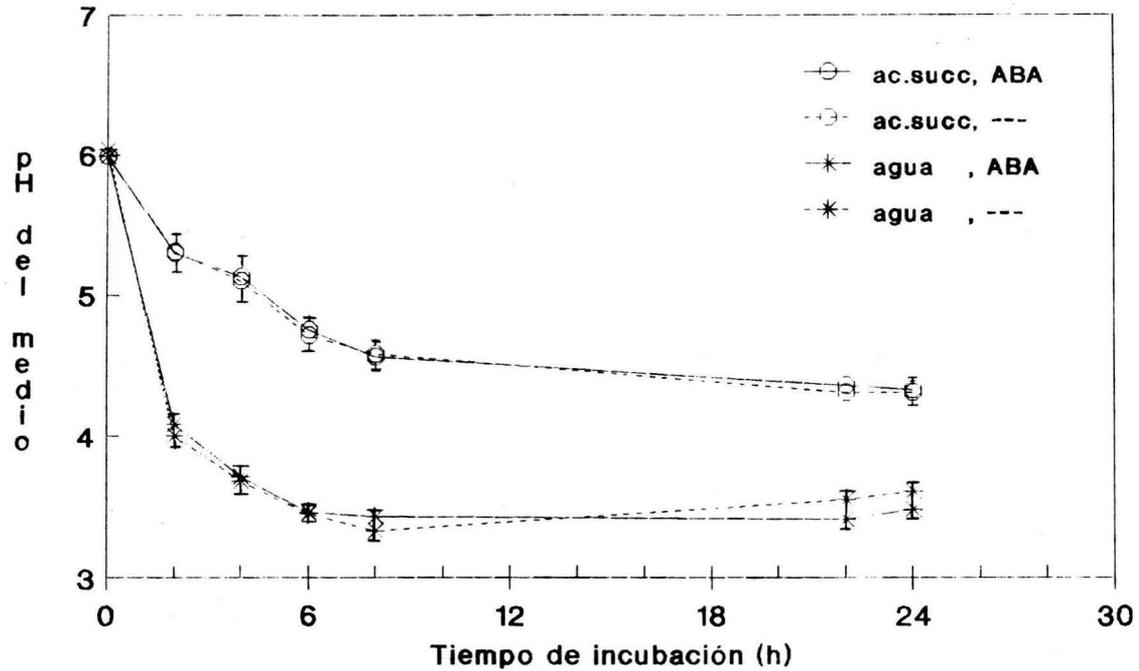


FIGURA 14. ACIDIFICACION DEL MEDIO DE INCUBACION POR CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO

1.2 Inducción de α -amilasa por el ácido giberélico (GA_3) en capas de aleurona de trigo

Para confirmar que el material biológico utilizado respondía a la acción del GA_3 empleado, se utilizaron lotes de capas de aleurona de trigo incubadas con y sin GA_3 .

Los lotes que se incubaron en presencia o ausencia de GA_3 , al término de 28 h de incubación en agitación constante a 25 ± 0.5 °C se les determinó la cantidad de α -amilasa sintetizada de la manera que se describe en la sección 1.8, encontrándose como se observa en la figura 15 en la columna del lado izquierdo (1) la respuesta de las capas de aleurona ante la presencia de la fitohormona inductora, mostrando una gran actividad de α -amilasa, llegándose a cuantificar 3.7386 Ua-amilasa total/ml.

Mientras que la columna del lado derecho (2) muestra la respuesta de los lotes de capas de aleurona que fueron incubados sin GA_3 a los cuales también se les determinó la actividad de α -amilasa, y solo mostraron una actividad de la enzima mínima, de menos de 1 Ua-amilasa/ml.

Por lo que se mostró que el tejido empleado respondía en forma normal a la acción de la fitohormona, induciendo una gran actividad de α -amilasa.

Cada columna de la gráfica es el promedio de 5 lotes de capas de aleurona con sus duplicados y las barras indican la desviación estándar.

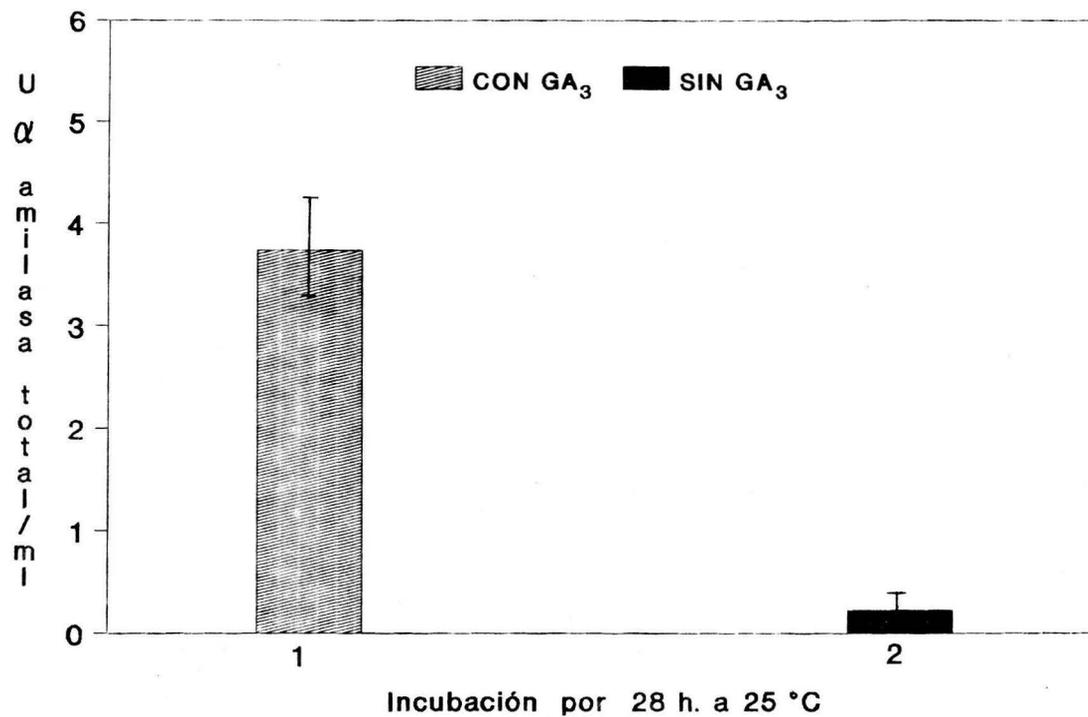


FIGURA 15. INDUCCION DE α -AMILASA POR GA_3 EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO

1.3 Efecto del ácido abscísico (ABA), sobre la inducción de a-amilasa por ácido giberélico (GA_3) en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0

Para conocer la respuesta de las capas de aleurona de trigo ante la presencia de ABA, cuando este tejido ya ha sido inducido a sintetizar a-amilasa por la acción del GA_3 se utilizó el diseño experimental mostrado en la figura 13 y explicado en la sección 1.11

La figura 16 como se puede ver (columnas 1a y 1b) muestran que la ausencia de GA_3 después de la inducción y los lavados proporciona una baja actividad de la a-amilasa. Se puede considerar que los valores de 1.7 Ua-amilasa total/ml (columna 1a) y 2.5 Ua-amilasa total/ml (columna 1b), para las incubaciones post-lavados, en ausencia de GA_3 , a pH 4.0 y 6.0 corresponden a la actividad de a-amilasa inducida en las primeras 21 h de inducción en presencia de GA_3 y a pH de 4.0. Sin embargo los dos pH de los medios posteriores a los lavados (4.0 y 6.0) si tuvieron un pequeño efecto sobre la actividad de la a-amilasa ya sintetizada, como lo muestran los diferentes valores reportados, encontrando una mayor actividad en el medio con pH de 6.0, pero no siendo significativa la diferencia.

Las columnas 2a y 2b reportan la actividad de a-amilasa de las capas de aleurona que estuvieron inducidas por GA_3 durante las 28 h. del experimento a excepción del periodo de lavados, la actividad fué mayor con respecto a los tratamientos anteriores (1a y 1b) los cuales solo tuvieron GA_3 en sus medios durante 21h., observándose que la a-amilasa sintetizada a pH de 4.0 durante el periodo de inducción, continuó haciéndolo aún cuando el pH del medio fué cambiado a 6.0 ó mantenido en 4.0., sin embargo si es notorio un aumento de actividad de la enzima en el medio con pH de 6.0 ya que ahí se encontraron 5.4 U a-amilasa total/ml. con respecto a las 4.2 U a-amilasa total/ml de los medios con pH de 4.0 mostrando un efecto positivo del pH básico sobre el pH ácido en la síntesis de a-amilasa. La diferencia que se observa entre ambos valores si es significativa.

Para los lotes marcados como 3a y 3b en las últimas 6 h del experimento los medios solo contenían ABA 10^{-5} M, habiéndose lavado el GA_3 a las 21 h de inducción y la actividad de a-amilasa reportada es el resultado del periodo de inducción a un pH de 4.0, ya que los medios de incubación después de los lavados carecían de GA_3 , mostrando los resultados que no hay un efecto inhibitor de ABA sobre la a-amilasa ya sintetizada en el periodo de inducción. Además de que el pH del medio 4.0 ó 6.0, no tiene un efecto que favorezca o no la acción inhibitor de ABA,

reportándose una actividad de 2.0 U a-amilasa/ml para la columna 3a y de 1.6 U a-amilasa/ml para la 3b, no encontrando una diferencia significativa en ambos valores. También se muestra que ABA no tiene efecto inductor tanto a pH de 4.0 como de 6.0., ya que la actividad de la a-amilasa es muy semejante a la de las columnas 1a y 1b

En los tratamientos marcados como 4a y 4b se emplearon ambas fitohormonas juntas, después de la inducción por GA₃ a pH de 4.0 y el lavado de la fitohormona inductora ; ya que uno de los objetivos del trabajo era conocer que efecto causaría el pH del medio (4.0 y 6.0) sobre la acción inhibitoria de ABA y la inductora de GA₃ en la actividad de a-amilasa por GA₃ ya sintetizada en el periodo de inducción y la producción de a-amilasa que aún se podría dar en las capas de aleurona aisladas de trigo.

Debido a que inicialmente las capas de aleurona se incubaron en un medio con pH de 4.0 y en presencia de GA₃ 10⁻⁶M, la posterior adición de ABA 10⁻⁵M acompañada de nuevo GA₃ 10⁻⁶M a un pH de 4.0 como el de la inducción y a un pH de 6.0 era necesaria, para lograr nuestro objetivo.

La columna 4a muestra las U a-amilasa total/ml determinadas a un pH de 4.0 siendo de 1.9 U a-a/ml, mientras que la columna 4b reporta 3.9 U a-a/ml para un pH de 6.0, es decir más del doble de la columna 4a. Esto se puede interpretar en el sentido de que el ABA inhibió completamente la inducción ejercida normalmente por el GA₃ a pH de 4.0, mientras que a pH de 6.0 la actividad de a-amilasa es semejante a la del experimento en donde está presente todo el tiempo el GA₃, o sea, que a pH de 6.0 no ocurrió la inhibición producida por ABA.

El efecto inhibitorio de ABA a pH de 4.0, con respecto a un nulo efecto a pH de 6.0 es significativo como se observa en la gráfica.

Cada columna de la gráfica es el promedio de dos experimentos, con sus respectivos duplicados, las barras indican la desviación estándar.

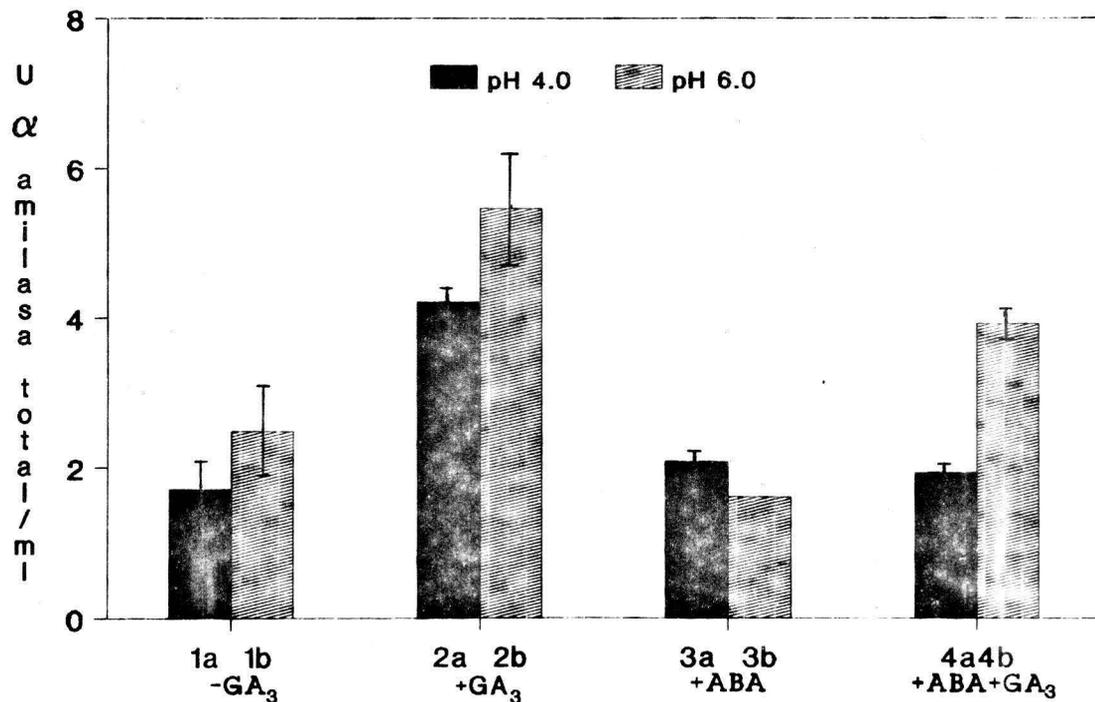


FIGURA 16. EFECTO DE ABA SOBRE LA INDUCION DE α -AMILASA POR GA₃ EN CAPAS DE ALEURONA DE TRIGO EN MEDIOS A PH 4.0,6.0

1.4 Medición del pH de los medios de inducción antes y después de los tratamientos con GA₃ y/o ABA

Cuando las capas de aleurona de trigo son incubadas a un pH inicial de 6.0, estas acidifican su medio amortiguado hasta llegar a valores de 4.3, (figura 14) pero cuando estas son incubadas a un pH de 4.0 y en presencia de GA₃ que valores de pH alcanzará el medio después de 21 h de inducción, para conocer estos resultados se utilizaron los lotes de aleuronas del experimento reportado en el punto 1.3, por lo que fué necesario medir el pH de los medios al término del periodo de inducción.

Después de 21 h de inducción, los 8 lotes mostraron valores entre 4.05 ± 0.21 a 4.15 ± 0.21 como se observa en la tabla 3. Los valores reportados son el resultado de 3 experimentos por duplicado. El medio en el que estuvieron inducidas las capas de aleurona contenía ácido succínico 5mM como buffer, por lo que el pH se mantuvo, impidiendo que las capas de aleurona pudieran acidificarlo hasta un valor de 3.5, como se reporta en la curva de acidificación de medios que carecen de buffer. (figura 14)

Tomando en cuenta la desviación estándar en cada uno de los valores, podemos considerar que el valor de pH se mantuvo en 4.0

Ya conocidos estos resultados faltaba saber a que valores de pH llegarían los medios si las capas de aleurona eran lavadas e incubaron en nuevos medios que contenían ácido succínico 5 mM, estreptomycin y cloramfenicol 50ug/ml, de c/u y ahora con cada uno de los tratamientos de fitohormona y dos valores de pH: 4.0 y 6.0

Observamos en la tabla de resultados 4 que aquellos lotes incubados en un valor de pH de 4.0, las capas de aleurona no acidificaron mas por la presencia del buffer en el medio, mientras que los lotes cuyo valor de pH fué de 6.0 y en donde pensamos que el pH tendría valores cercanos a 4.0 encontramos valores entre 5.50 ± 0.14 a 5.95 ± 0.21 , es decir las capas de aleurona no fueron capaces ya de acidificar el medio.

TABLA 3y4. MEDICION DEL pH DE LOS MEDIOS DE INDUCCION ANTES Y DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS CON GA_3 Y/O ABA.

TABLA 3

TRATAMIENTOS	MEDIOS	
	21 h	
ANTES DE LAVADOS	pH inicial	pH final
+ GA_3	4.0	4.05 ± 0.21
	4.0	4.15 ± 0.21
	4.0	4.05 ± 0.21
	4.0	4.15 ± 0.21
	4.0	4.10 ± 0.14
	4.0	4.05 ± 0.07
	4.0	4.10 ± 0.14
	4.0	4.10 ± 0.14

TABLA 4

TRATAMIENTOS	MEDIOS	
	6 h	
DESPUES DE LAVADOS	pH inicial	pH final
- GA_3	4.0	4.15 ± 0.07
- GA_3	6.0	5.50 ± 0.14
+ GA_3	4.0	4.15 ± 0.07
+ GA_3	6.0	5.50 ± 0.14
+ABA	4.0	4.25 ± 0.07
+ABA	6.0	5.95 ± 0.21
+ABA+ GA_3	4.0	4.20 ± 0.14
+ABA+ GA_3	6.0	5.90 ± 0.28

Capas de aleurona de trigo fueron incubadas en medios que contenían $GA_3 10^{-6}$ M, ácido succínico 5 mM, estreptomicina y cloranfenicol 50 µg/ml durante 21 h., al término de la inducción se les midió el pH, posteriormente fueron lavadas e incubadas en los tratamientos hormonales y de pH indicados, por 6 h. más, para finalmente medir el pH. ABA se utilizó a una concentración de 10^{-5} M.

1.5 Efecto de ABA y GA₃ en la expresión de las isoenzimas de a-amilasa en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0

Las capas de aleurona que fueron inducidas por GA₃ y posteriormente sometidas a los tratamientos hormonales y de pH descritos en la sección 1.11 e ilustrados en la figura 13 fueron el material utilizado para la realización de geles de isoelectroenfoque, los cuales se hicieron para conocer que grupo de isoenzimas de a-amilasa podrían estar siendo afectadas por los condiciones de los tratamientos empleados.

Se realizaron dos geles. Los resultados obtenidos para el primer gel se observan en la figura 17.

En este caso se utilizó igual cantidad de tejido por pozo, siendo de 30 ul para cada una de las muestras, con la finalidad de observar lo que la determinación de la actividad de a-amilasa graficada en la figura 16 ya nos habla dicho.

En los dos primeros grupos de bandas que corresponden a los lotes de aleuronas que tuvieron un periodo de inducción con GA₃ solo por 21 h y posteriormente carecieron sus medios de esta hormona, teniendo como variable entre ellos que los marcados como 1a se incubaron las últimas 6 h en un medio con pH de 4.0 y los 1b en un medio con pH de 6.0., en el gel se nota más claramente la expresión de las isoenzimas tanto de punto isoeléctrico alto (P.I.), como de punto isoeléctrico bajo, para el segundo lote (1b) es decir para las capas de aleurona incubadas en un pH de 6.0 en el periodo de 6 h. Se puede notar que en ambos tratamientos (1a y 1b) existen igual cantidad de isoenzimas de a-amilasa.

Para los lotes de capas de aleurona que presentaron en sus medios GA₃ durante 28 h, y en las últimas 6 h sólo se varió el pH utilizándose de 4.0 para 2a y de 6.0 para 2b las bandas que mostró el isoelectroenfoque parecen tener una expresión similar de ambos grupos de isoenzimas, ya que ambos lotes estuvieron ante la presencia de GA₃ durante todo el experimento., sin embargo si es notoria una mayor expresión de las 2 primeras bandas de isoenzimas de P.I. bajo, del lote marcado como 2b, lo que concuerda con la determinación de mayor actividad de a-amilasa reportada y graficada en la figura 16. Lo que si es claro es su mayor expresión de bandas de isoenzimas, de ambos grupos de P.I. de este lote (2b) con respecto al resto de los tratamientos hormonales.

Los grupos de bandas que aparecen en el gel identificados como 3a y 3b, corresponden a los tratamientos en los cuales durante las últimas 6h. las capas de aleurona estuvieron en pre-

sencia solo de la enzima inhibidora (ABA) , teniendo en el medio un valor de pH de 4.0 para 3a y de 6.0 para 3b, observándose en el gel que hay una menor expresión de las isoenzimas de P.I. bajo para ambos grupos de bandas., a diferencia de la clara expresión de las bandas marcadas como 2a y 2b en cuyos medios siempre estuvo GA₃. Entre los lotes 3a y 3b no se observa una diferencia significativa en el gel.

Los últimos tratamientos hormonales marcados como 4a y 4b son los más importantes para nuestro trabajo por la presencia de las dos fitohormonas juntas. Los resultados muestran la acción de ambas fitohormonas, ya que en ambos tratamientos no se expresan las últimas bandas de p.I. bajo como se observa en la figura 17 en la parte superior, que sí se notan en los lotes 2a y 2b ó control, indicando la acción inhibidora de ABA; mientras que comparando entre si los tratamientos 4a y 4b notamos que para 4a hay una menor notoriedad de las bandas de ambos grupos de isoenzimas, observándose más claramente en las 4 primeras bandas del grupo de isoenzimas de P.I. bajo, estos resultados son semejantes a los graficados en la figura 16, en donde se observa la acción inhibidora de ABA en mayor grado cuando el pH del medio es ácido.

Las isoenzimas de P.I. alto también se ven afectadas por la acción de ABA en el tratamiento 4a ya que se observa una menor expresión de estas en el medio ácido.

Para el segundo gel de isoelectroenfoque, que se presenta en la figura 18, se utilizaron muestras de los mismos tratamientos empleados en el gel anterior, con la modificación de que en este fué necesario determinar la cantidad de proteína existente, para utilizar 15 ug de proteína por cada muestra de homogenado de tejido.

Al utilizar igual cantidad de proteína de cada uno de los tratamientos se observan en el gel resultados similares a los obtenidos en el gel con igual cantidad de tejido descrito anteriormente.

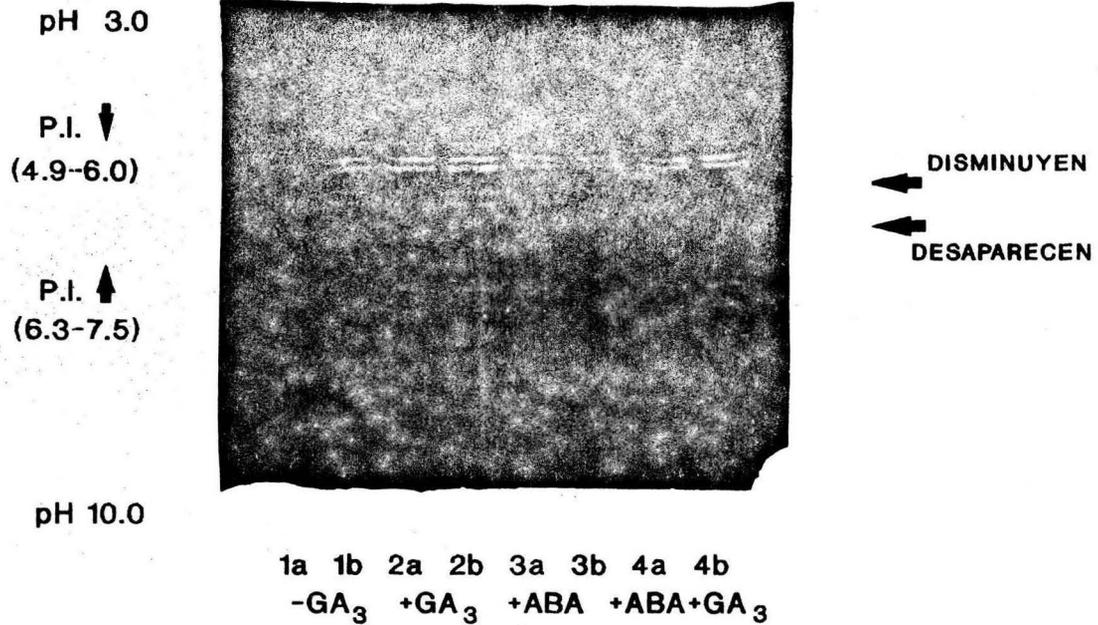


FIGURA 17. GEL DE ISOELECTROENFOQUE DE α -AMILASA DE TRIGO CON IGUAL CANTIDAD DE TEJIDO

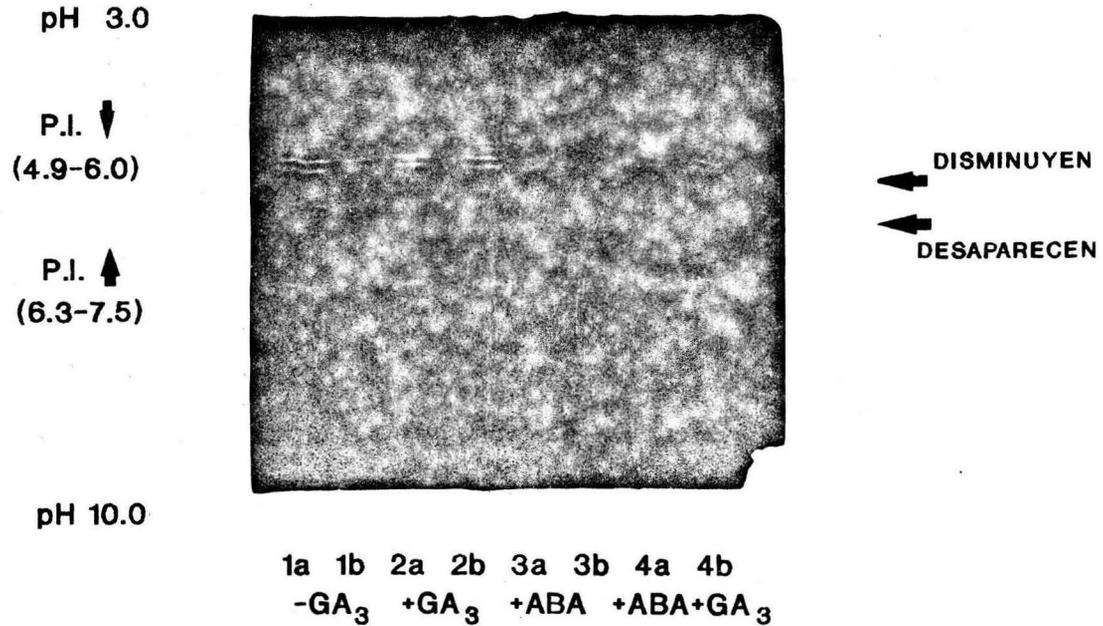


FIGURA 18. GEL DE ISOELECTROENFOQUE DE α -AMILASA DE TRIGO CON IGUAL CANTIDAD DE PROTEINA

VI DISCUSION

DISCUSION

Acidificación del medio de incubación por capas de aleurona de trigo

Las capas de aleurona de cebada tienen la capacidad de acidificar el endospermo amiláceo (Mikola, y Mikola 1980), esta acidificación también se observa en las capas de aleurona de cebada aisladas (Mikola y Virtanen, 1981), así como de trigo (Hamabata, y col 1988), y este fenómeno es independiente al ácido giberélico.

En la figura 14 se observa la curva de acidificación, mostrando que la incubación se inició a partir de un pH de 8.0 para todos los lotes, utilizándose dos clases de medios, unos que contenían ac. succínico 5 mM como buffer, y otros que carecían de él. Ambas condiciones se llevaron a cabo en la presencia y en la ausencia de ABA

Es evidente la capacidad de las capas de aleurona de trigo de acidificar el medio en el que están incubadas, siendo más ácido el valor final en las curvas inferiores (3.3), por la ausencia del ac. succínico en el medio, que fué sustituido por agua. La presencia o ausencia de la fitohormona (ABA) en nada cambió la tendencia ácida de la curva.

Esta acidificación independiente a la presencia de fitohormonas ya estaba reportada para GA_3 , encontrando en este trabajo que también lo es para ABA. Hamabata. (1988) sugiere que este proceso depende de las células de aleurona *per se* y es independiente del embrión.

Inducción de α -amilasa por el ácido giberélico (GA_3) en capas de aleurona de trigo

Chrispeels y Varner en 1967, reportaron la existencia de un control hormonal en la síntesis de enzimas en capas de aleurona de cebada, este proceso incluía la presencia de dos tipos de hormonas, una inductora y una inhibidora, desde entonces se ha establecido que el GA_3 aumenta la síntesis de α -amilasa y ABA la inhibe.

En la figura 15 los lotes de capas de aleurona graficados en la columna 1 cuyos medios contenían GA_3 $10^{-6}M$ muestran la actividad de la α -amilasa total sintetizada, por la presencia de la hormona inductora, indicando que el material biológico (capas de aleurona de trigo) utilizado respondía al ácido giberélico empleado.

Las capas de aleurona de trigo que fueron incubadas en medios que no contenían GA_3 y que están graficadas en la columna 2 no mostraron una actividad significativa de la enzima al no estar presente la hormona inductora. Sin embargo se ha observado una cierta actividad basal que corresponde a la α -amilasa que no requiere inducción.

Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la inducción de α -amilasa por el ácido giberélico (GA_3), en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0

Durante la síntesis de α -amilasa existe un periodo lag de 7 a 9 h. en el cual la presencia de GA_3 es necesaria, así como durante todo el periodo de síntesis de α -amilasa si se quiere obtener la máxima síntesis y secreción de la enzima (Chrispels, 1967). En la figura 16 observamos en las columnas marcadas como 1a y 1b lotes de capas de aleurona de trigo incubadas durante 21 h en presencia de GA_3 , posteriormente fueron lavadas e incubadas sin GA_3 por 6 h. más, mostrando que la actividad de α -amilasa determinada corresponde a la primera inducción.

Cuando el GA_3 es nuevamente agregado a los medios de incubación después de los lavados, la síntesis de α -amilasa inmediatamente se reanuda ya que en los lotes marcados como 2a y 2b observamos más actividad de la enzima con respecto a los anteriores. debido a que en estos segundos lotes se agregó a los medios GA_3 $10^{-6}M$ por 6h. más.

La presencia de 2 diferentes pH para los medios se debió a la interrogante de saber si un pH ácido o básico daría un efecto positivo ó negativo a la síntesis de α -amilasa, entendiéndose por positivo a una mayor síntesis de la enzima y negativo a lo contrario.

Teniendo como antecedentes la utilización de medios con un pH de 5.0 (Chrispels y Varner, 1967) se decidió utilizar un pH más ácido, de 4.0 y otro menos ácido de 6.0 encontrándose que en el pH de 6.0 (columna 2b) hubo mayor síntesis de α -amilasa.

O bien es posible que exista cierta inactivación de la α -amilasa secretada y que se encuentra a pH de 4.0

En los lotes marcados como 3a y 3b las capas de aleurona que fueron sometidas a la inducción por GA_3 durante 21 h. con 1 h. de lavados y posteriormente incubadas en presencia solo de ABA mostraron una menor actividad de la enzima, lo cual es comprensible ya que durante las últimas 6 h. del tratamiento no hubo GA_3 en el medio, y como ya mencionamos anteriormente la presencia de esta hormona inductora es indispensable durante toda la incubación si se quiere una máxima síntesis de a-amilasa.

Ante la ausencia del GA_3 durante las últimas 6 h de incubación y la presencia de ABA los niveles de a-amilasa en estos dos lotes de capas de aleurona (3a y 3b) son semejantes a los graficados en los lotes en cuyos medios no hubo ninguna hormona en las últimas 6 h de incubación (1a y 1b) sin embargo la presencia de la hormona inhibidora ABA nos haría pensar en una disminución de la respuesta de a-amilasa, pero no sucede esto, ya que ABA no actúa sobre la a-amilasa ya sintetizada, teniendo su sitio de acción sobre los niveles de RNAm de a-amilasa que se está sintetizando en el momento, interfiriendo con la acción continua de GA_3 (Nolan, 1988).

El pH de 4.0 ó 6.0 del medio parece no favorecer o impedir la acción de ABA ante la ausencia de GA_3 .

Cuando están presentes las 2 fitohormonas en el medio de inducción, actuando sobre capas de aleurona previamente inducidas se encontró una mayor respuesta de la enzima en el lote 4b que fué incubado a un pH de 6.0 o dicho de otra manera un menor efecto de la hormona inhibidora (ABA).

Sabemos que la acción de las 2 fitohormonas no es debida a una simple competencia entre ambas, ya que altas concentraciones de GA_3 no revierten completamente los efectos de ABA, debido a que la mayoría de los efectos de GA_3 en las células de aleurona dependen de un metabolismo celular como la transcripción y la traducción. Varner y Ho (1976) sugirieron que el ABA inhibe la síntesis de a-amilasa inducida por GA_3 afectando la traducción de su RNAm.

Esta inhibición varía de acuerdo al momento en que es agregado ABA, ya que García (1982) reporta que si se agregan ambas fitohormonas simultáneamente al inicio de la inducción se causa una inhibición del 96%, mientras que si ABA es agregado a las 12 h. de iniciada la inducción en la etapa en la cual la síntesis de RNAm de a-amilasa se ha completado (y la síntesis de a-amilasa continúa) se produce una inhibición del 75% de la síntesis subsecuente de la enzima. (figura 9)

En nuestros tratamientos ABA fué agregado después de 21 h de inducción con GA_3 y 1 h. de lavados observando que si hay una menor expresión de la enzima en ambos tratamientos de pH (4a y 4b) con respecto a las columnas 2a y 2b en las cuales GA_3 estuvo

presente durante todo el tratamiento a excepción de la hora de lavados.

Entre los tratamientos 4a y 4b se observa claramente una mayor cantidad de unidades de a-amilasa total/ml. en el tratamiento 4b que en el 4a, esta diferencia de unidades no es solo debida a la acción de la hormona inhibidora, ya que suponemos que el pH del medio participó en la respuesta obtenida de la a-amilasa.

En la columna marcada como 4a se obtuvieron solo 1.9 Ua-amilasa total/ml contra 3.9 Ua-amilasa total/ml. de la columna 4b, es decir casi la mitad de la actividad de la enzima, por lo que consideramos que el pH ácido (4.0) del medio tuvo un mayor efecto para que actuara ABA inhibiendo la síntesis de a-amilasa con respecto al pH menos ácido (6.0) del medio que se empleó en el lote 4b.

Medición del pH de los medios de inducción antes y después de los tratamientos con GA₃ y/o ABA

Como se observa en la tabla 3 en todos los tratamientos se empezó con un pH de 4.0 y después de 21 h. de incubación los valores fueron muy cercanos al pH inicial, y al incubar las capas de aleurona en nuevos medios con diferentes tratamientos hormonales tabla 4 se observa algo similar a lo anterior, los valores de pH final se mantiene muy cercanos a los valores iniciales, notándose además que aquellos medios que inician con un valor de 4.0 terminan con valores mayores, como en el tratamiento con +ABA el pH inicial en el periodo de 6 h. es de 4.0 y el final de 4.25±0.07

Para aquellos tratamientos que inician con pH de 6.0 y que se esperaba encontrar valores cercanos a 4.0 sí muestran una acidificación pero es mínima, disminuyendo solo 0.5 unidades.

Lo que se considera que pasó es que hubo un agotamiento de las capas de aleurona después de 28 h. de incubación total y lavados, debido al metabolismo que llevó a cabo el tejido, pero se ha observado que si se agrega al medio una fuente de carbono como la glucosa, las capas de aleurona son capaces de acidificar su medio nuevamente (Flores, 1994).

Efecto de ABA y GA₃ en la expresión de las isoenzimas de a-amilasa en capas de aleurona de trigo en medios con pH 4.0 y 6.0

Los genes a-Amy 1 y a-Amy 2 de trigo producen distintas subseries de isoenzimas de a-amilasa las cuales muestran diferentes patrones de expresión en las células de aleurona de trigo y en los granos en desarrollo. (Lazarus, 1985)

El número de isoenzimas detectadas depende de la técnica empleada, del tejido utilizado, así como de la especie de trigo que se emplee, para este caso se reportan isoenzimas de *Triticum aestivum* var. Tonichi, con la técnica de isoelectroenfoque la cual separa a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico., este se define como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico (Lehninger, 1988).

Como se mencionó en los resultados la presencia de las fitohormonas en cada uno de los tratamientos tuvo su efecto en la expresión en uno o en los dos grupos de isoenzimas. Ya que la acción inductora de GA_3 se nota claramente sobre las isoenzimas de P.I. bajo, en los tratamientos de $+GA_3$ a pH de 6.0 (columna 2b) ya que como se observa en el gel son las más visibles del resto de los tratamientos.

Mientras que ABA tiene una mayor acción inhibitoria en las isoenzimas de P.I. bajo que se expresan cuando el pH del medio es ácido.

VII CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La capa de aleurona acidifica el medio de incubación, independientemente de la presencia del ácido abscísico (ABA).
- 2.- Se comprobó la síntesis de a-amilasa después de 28 h. de inducción por GA_3 en capas de aleurona de *Triticum aestivum* var. Tonichi.
- 3.- El ácido abscísico adicionado en ausencia de GA_3 a capas de aleurona previamente inducidas por 21 h. no actúa sobre la a-amilasa ya sintetizada, aunque inhibe la síntesis posterior.
- 4.- Al agregar las dos fitohormonas juntas a capas de aleurona previamente inducidas durante 21 h. el ABA disminuye la síntesis de a-amilasa, con mayor efecto en un medio ácido.
- 5.- La acidificación provocada por la capa de aleurona favorece la acción de ABA, al igual que sucede con los efectos de GA_3 .
- 6.- Las isoenzimas de a-amilasa de P.I. bajo se ven más afectadas por el pH ácido del medio y la presencia de ambas fitohormonas.

PERSPECTIVAS

Los dos valores de pH trabajados sí tuvieron un efecto en la respuesta de las fitohormonas utilizadas, sin embargo desconocemos cómo actúa este pH, en el interior de la célula de aleurona por lo que se puede sugerir en continuar trabajando este mismo modelo de capa de aleurona de trigo, pero ahora utilizando pruebas fisicoquímicas y dejando un poco la actividad de a-amilasa.

Se ha sugerido la presencia de receptores a las fitohormonas empleadas en la membrana de la célula de aleurona que que se activan o prenden ante la presencia de éstas o bien que son inducidos a activarse por otros factores, que pueden ser en este caso el pH que hay en el medio. Estos trabajos sobre receptores en la membrana son posibles investigarlos utilizando los protoplastos de la célula de aleurona, lo cual podría continuar este trabajo.

La acidificación causada por la capa de aleurona de trigo es un fenómeno que desencadena una serie de eventos de gran importancia para la semilla, sin embargo el por que y como sucede esto no es aún muy claro, pero ya se han llevado a cabo investigaciones que muestran que posiblemente la acidificación se deba a la salida de malato, ó por un simporte de malato/ H⁺.

VIII BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AYKROYD, W.R. y DOUGHTY, J. (1970). "El trigo en la alimentación humana". Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. pp. 1-7, 23-30.
- 2.- BAULCOMBE, D.C. y BUFFARD, D. (1983). Gibberellic acid-regulated expression of α -amylase and six other genes in wheat aleurone layer. *Planta* 157:493-501
- 3.- BEWLEY, D.J. y BLACK, M. (1978). "Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination". Springer-Verlag, Berlin.
- 4.- BIDWELL, R.G.S. (1980). "Fisiología Vegetal". A.G.T. Editor, S.A. México. pp. 569-571, 599-625.
- 5.- BRIGGS, D.E. (1967). Modified assay for α -amylase in germinating barley. *J. Inst. Brew.* 73:361-369
- 6.- CHRISPEELS, M.J. y VARNER, J.E. (1967). Hormonal Control of Enzyme Synthesis: On the Mode of Action of Gibberellic Acid and Abscisin in Aleurone Layers of Barley. *Plant Physiol* 42:1008-1016
- 7.- DASHEK, W.V., SINGH, B.N. y WALTON, D.G. (1979). Abscisic Acid Localization and Metabolism in Barley Aleurone layers. *Plant Physiol.* 64:43-48
- 8.- DEVLIN, M.R. (1980). "Fisiología Vegetal". Tercera Edición. Ediciones Omega. Barcelona España. pp. 353-383, 409-432.
- 9.- ESAU, K. (1985). "Anatomía Vegetal". Tercera Edición. Ediciones Omega. Barcelona España. pp. 641-657.
- 10.- FAHN, A. (1978). "Anatomía Vegetal". Ediciones Blume. España. pp. 583-599.
- 11.- FINCHER, G.B. (1989). Molecular and Cellular Biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grain. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 40:305-346
- 12.- FLORES, G. (1994). Importancia metabólica del malato en la capa de aleurona del trigo. Tesis de Doctorado. Departamento de Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N.

- 13.- GARCIA, M.M. (1982). "Control Post-transcripcional del ácido abscísico sobre la síntesis de α -amilasa en aleurona de trigo" Tesis de maestría. Centro de Investigación y estudios Avanzados (IPN).
- 14.- HAMABATA, A. y GARCIA, M.M. (1988). Kinetics of the Acidification Capacity of Aleurone Layer and Its Effect upon Solubilization of Reserve Substances from Starchy Endosperm of Wheat. *Plant Physiol.* 86:643-644
- 15.- HESS, D. (1980). "Fisiología Vegetal". Ediciones Omega. Barcelona. Barcelona España. pp. 235-257, 301-313.
- 16.- HO, T.H.D. y VARNER, J.E. (1974). Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc. Nat. Acad.Sci.* 71:4783-4786
- 17.- HO, T.H.D. y VARNER, J.E. (1976). Response of Barley Aleurone Layers to Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 57: 175-178
- 18.- JACOBSEN, J.V. y HIGGINS, T.J.V. (1982). Characterization of the α -amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 70:1647-1653
- 19.- JONES, R.L. y VARNER, J.E. (1967). The bioassay of gibberellins. *Planta (Berl.)* 72:53-59
- 20.- JONES, R.L. y JACOBSEN, J.V. (1991). Regulation of synthesis and transport of Secreted Proteins in Cereal Aleurone. *International Review of Cytology.* 126:49-87
- 21.- LAZARUS, C.M., BAULCOMBE, D.C. y MARTIENSSEN, R. (1985). Alpha-amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. *Plant Mol Biol* 5:13-24
- 22.- LEHNINGER, L. A. (1988). *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.* Segunda Edición. Décima segunda reimpresión. Ediciones Omega. Impreso en España. pp 166.
- 23.- LIN, L.S. y HO, T.H.D. (1986). Mode of Action of Abscisic Acid in Barley aleurone Layers. Induction of New proteins by Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 82:289-297
- 24.- LOWRY. (1951). "Modificación del método colorimétrico de Lowry". *J. Biol Chem.* 193:265
- 25.- MIKOLA, L. y MIKOLA, J. (1980). Mobilization of proline in the starchy endosperm of germinating barley grain. *Planta* 149:144-154.

- 26.- MIKOLA, J. y VIRTANEM, M. (1981). Regulation of pH in the starchy endosperm of barley grain during reserve protein. Abhdlg. Akad. Wiss. Ddr. Abt. Math. Naturwiss.,Tech. 5N:257-258
- 27.- NOLAN, R.C., LIN, L.S. y HO, T.H.D. (1987). The effect of abscisic acid on the differential expression of α -amylase isozymes in barley aleurone layers. Plant Mol Biol. 8: 13-22
- 28.- NOLAN, R.C. y HO, T.H.D. (1988). Hormonal Regulation of α -Amylase Expression in Barley Aleurone Layers. The effects of gibberellic acid removal and abscisic acid and phaseic acid treatments. Plant Physiol. 00:588-593
- 29.- OKITA, T.W. y DeCALEYA, R., RAPPAPORT, L. (1979). Synthesis of a Possible Precursor of α -Amylase in Wheat Aleurone Cells. Plant Physiol. 63:195-200
- 30.- SOLDANO, O.R. (1978). "El trigo". Editorial Albatros. Buenos Aires. pp. 5-9, 33-43.
- 31.- TAIZ, L. y ZEIGER, E. (1991). "Plant Physiology". The Benjamin/ Cummings, Publishing Company, Inc. Redwood City, California. pp. 398-488.
- 32.- UKNES, S.J. y HO, T.H.D. (1984). Mode of Action of Abscisic Acid in Barley Aleurone Layers. Abscisic acid induces its own conversion to phaseic acid. Plant Physiol. 75:1126-1132
- 33.- ZEEVAART, J.A.D. y CREELMAN, R.A. (1988). Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 39:439-473