

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

"EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS INVERTASAS ÁCIDAS
EN LA GERMINACIÓN DE TEJIDO EMBRIONARIO DE MAÍZ
EN CARBOHIDRATOS METABOLIZABLES Y SU RELACIÓN
CON EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

VICTOR HUGO MARTÍNEZ MARCELO



MÉXICO D.F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Marina Gavilanes Ruíz
Vocal	Raquel Ortega Muñoz
Secretario	Sobeida Sánchez Nieto
1er suplente	José Ignacio Páramo Ramírez
2do suplente	Nora Andrea Gutiérrez Nájera

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114, del departamento de bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Asesor

QFB Ma. Consuelo Enríquez Arredondo
Supervisor técnico

Víctor Hugo Martínez Marcelo
Alumno

A LA MEMORIA DE:

† Mi abuela materna Josefina Martínez.

Por las bases tan firmes que heredo a mi padre, y sobre todo por su coraje e inteligencia que demostró en esta vida.

DEDICATORIA:

Durante estos años he conocido y compartido momentos con muchas personas que me han apoyado, no solo en lo académico y en lo científico, si no también en lo personal. A todos ellos y sin dejar a nadie en el olvido quiero agradecerles su tiempo, palabras y apoyo. Gracias.

A Dios:

Por darme la vida, por haberme iluminado todo este tiempo de esfuerzo, por darme la oportunidad de conocer a alguien que ha sido como un pilar muy importante para mi, y sobre todo por los padres tan maravillosos que me dio, los Amó.

A mi Directora de tesis:

Por compartir conmigo su interés y sus valiosos conocimientos, por la formación que me proporciono, por su orientación, siempre impecable, su dedicación, por su apoyo anímico en todo momento y especialmente por su calidad humana. Gracias por todo lo que hizo por mi, no olvidare nunca la riqueza de sus enseñanzas.

A mi Padre:

Mi guía, por su inteligencia, por su apoyo por sus valores, por su ejemplo y sobre todo por confiar en mí.

A mi Madre:

Por su ternura, por su atención, por su dedicación y que me ha conducido por la vida educándome, y enseñándome, desde las cosas más sencillas a las más complicadas.

A Aída:

Mi novia y futura esposa, eres o mas valioso que tengo ahora en la vida y la persona más maravillosa que jamás he conocido, tendremos que pasar la vida juntos para poderte agradecer cada día por todo lo que haces por mi. Te Amó.

A mis Hermanos:

May, Bey y Perla, por su apoyo y por haber caminado conmigo una buena niñez llena de aventuras y aprendizaje pues todo se junto para formarnos como somos, con nuestras virtudes y defectos, pero siempre hombres y mujeres de bien como nuestros padres nos enseñaron.

A mis Sobrinos:

Eynar, Monse, Gaby, Diego, Amanda, y Mari por la alegría que los caracteriza y que todo lo que se propongan en esta vida se puede realizar si uno quiere.

A mis Abuelos:

Por sus ganas de vivir y ver en mí satisfacción al realizar mis estudios, pues saben que contribuyeron mucho para mi formación desde que ellos dieron verdaderos valores a mi madre.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo técnico de la QFB Julieta Sandoval Guillén en la determinación de sacarosa por HPLC en algunas de las muestras.

Se agradece a la estudiante de la carrera de QA Gabriela Contreras Castañón, quien durante la Estancia Corta que llevo a cabo en el laboratorio, realizó la determinación de lípidos de los tejidos embrionarios de maíz.

Este trabajo se realizó con apoyos de:

- PAPIIT IN218505, DGAPA, UNAM.
- PAIP 6290-12 de la Facultad de Química.
- Beca para realización de Tesis de Licenciatura, otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 de la Asociación Autónoma del Personal Académico de la UNAM (AAPAUNAM), Cátedra Javier Urbina del Raso.

Índice

	Página
Índice de figuras y tablas.....	5
Resumen.....	6
1. Antecedentes.....	7
1.1 La semilla.....	7
1.2 Composición química de la semilla.....	8
1.3 Germinación.....	8
1.4 Metabolismo durante la germinación: Movilización de sustancias de reserva.....	12
1.5 Las invertasas.....	14
1.5.1 Regulación de la actividad de las invertasas.....	19
2. Hipótesis.....	22
3. Objetivos.....	23
4. Materiales y Métodos.....	24
5. Resultados.....	34
6. Discusión.....	54
7. Conclusiones.....	66
8. Perspectivas.....	67
9. Referencias.....	68

Índice de Figuras y Tablas

	Página
Figura 1. Estructura de la semilla de maíz mostrando sus tejidos principales.	7
Figura 2. Fases de la germinación de la semilla.	11
Figura 3. Localización de las isoenzimas de invertasas y las vías de descarga del floema.	15
Figura 4. Diagrama de flujo que muestra el proceso general que se siguió en este trabajo.	24
Figura 5. Curva temporal de actividad de invertasa vacuolar en embriones de maíz a dos diferentes concentraciones de proteína.	30
Figura 6. Curvas temporales de la actividad de la invertasa de pared celular de embrión de maíz embebidos 24 horas a diferentes concentraciones de proteína.	31
Figura 7. Curva de acumulación de agua de tejido embrionario de maíz.	34
Figura 8. Contenido de glucosa y fructosa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.	35
Figura 9. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.	36
Figura 10. Contenido de carbohidratos solubles en embriones de maíz durante la germinación.	37
Figura 11. Contenido de carbohidratos solubles en embriones de maíz durante la germinación.	38
Figura 12. Contenido de sacarosa y lípidos totales en escutelo y eje embrionario de maíz durante la germinación.	39
Figura 13. Perfil de la actividad de la invertasa de vacuola de los tejidos embrionarios de maíz durante la germinación.	41
Figura 14. Patrón de la actividad de la invertasa de pared celular de tejido embrionario de maíz durante la germinación.	42
Figura 15. Contenido de carbohidratos en embriones y ejes embrionarios de maíz embebidos en diferentes tipos de carbohidratos.	43
Figura 16. Actividad de la Inv-V de tejido embrionario de maíz embebido en diferentes carbohidratos.	45
Figura 17. Curvas de saturación con sacarosa de la actividad de Inv-V de ejes embrionarios de maíz.	47
Figura 18. Curvas de saturación con sacarosa de la actividad de Inv-V de embriones de maíz.	49
Figura 19. Actividad de In-CW de tejido embrionario de maíz embebido en diferentes carbohidratos.	51
Figura 20. Curvas de saturación de las invertasas de pared celular de tejido embrionario de maíz.	52
Figura 21. Modelo sobre el reparto de carbohidratos en los embriones de maíz a las 24 h de germinación.	65
Tabla 1. Propiedades y características de las isoformas de Invertasas.	17
Tabla 2. Rendimiento proteico para la obtención de Invertasas ácidas.	32
Tabla 3. Efecto de la incubación de los ejes embrionarios en los parámetros cinéticos de la Inv-V.	48
Tabla 4. Efecto de la incubación de los embriones de maíz en los parámetros cinéticos de las Inv-V.	50

RESUMEN

La germinación es un proceso que se inicia con la toma de agua por la semilla y culmina con la salida de la radícula, durante este periodo debe ocurrir una primera movilización de reservas tanto en el tejido que dará lugar a la nueva planta como en los tejidos más próximos, que en el maíz son el eje embrionario y el escutelo respectivamente. Posteriormente a que la radícula emerja, comenzará la hidrólisis de las reservas almacenadas en el endospermo, segunda etapa de movilización.

Pocos estudios se han realizado respecto a la movilización temprana de carbohidratos, por lo que con la finalidad de contribuir al conocimiento en este proceso, decidimos medir a lo largo de la germinación los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa y la actividad de las invertasas ácidas, enzimas que al hidrolizar sacarosa ya sea en la pared celular o en la vacuola, ayudan a establecer gradientes de carbohidratos, los cuales favorecen la atracción de carbono a las células para su crecimiento. Adicionalmente, se conoce que la expresión de la enzima es modulada por carbohidratos, por lo que en el presente trabajo se determinó el efecto que producía la imbibición de tejido embrionario en carbohidratos tanto en su actividad como en el contenido de carbohidratos solubles.

Se encontró que durante las primeras 8 h de la germinación, la sacarosa tanto del eje embrionario como del embrión se reduce alrededor del 60%. Lo que coincide con la activación de la invertasas ácidas a ese tiempo. Conforme procede la germinación el eje sigue degradando sacarosa hasta llegar a un contenido residual del 5%, mientras que el embrión a partir de las 24 h comienza a sintetizar sacarosa a partir de la movilización de sus reservas de lípidos. Durante el periodo post-germinativo (24 h en adelante) ambas invertasas ácidas aumentan, lo cual indica que el tejido está demandando nutrimentos. Por su parte, el embrión sí presenta un aumento gradual de sus invertasas ácidas durante el periodo post-germinativo, pero siempre se encuentra en actividades menores que las encontradas en el eje, lo que correlaciona con que es un tejido que se encuentra sintetizando de manera activa la sacarosa y que la exportará al tejido demandante.

Se obtuvieron las Km de las invertasas y encontramos que se encuentran en valores similares a los reportados en la literatura, de 0.7 mM para la de pared celular e identificamos dos formas de enzima vacuolar en el embrión, con Kms de 0.4 mM y 3.5 mM de sacarosa; en el eje sólo encontramos la de baja afinidad, por lo que sugerimos que la segunda enzima corresponde a una forma específica del escutelo. La capacidad de ambas invertasas ácidas, la de pared celular y la de la vacuola, pese a que se ha documentado ampliamente que se modifica por la adición de carbohidratos, no cambió, excepto para la actividad de la Inv-V de baja afinidad. Se redujo la actividad de la enzima y proponemos que podría corresponder al producto del gene *lvr2*, que se ha documentado se reprime por carbohidratos en maíz.

Encontramos en este trabajo que las invertasas son importantes para degradar las reservas en las primeras horas de la germinación y para demandar nutrientes en el

periodo post-germinativo, y que la invertasa vacuolar del eje es una enzima que responde a la concentración de glucosa y sacarosa, al menos a las 24 h.

1. ANTECEDENTES

1.1 La semilla

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen.

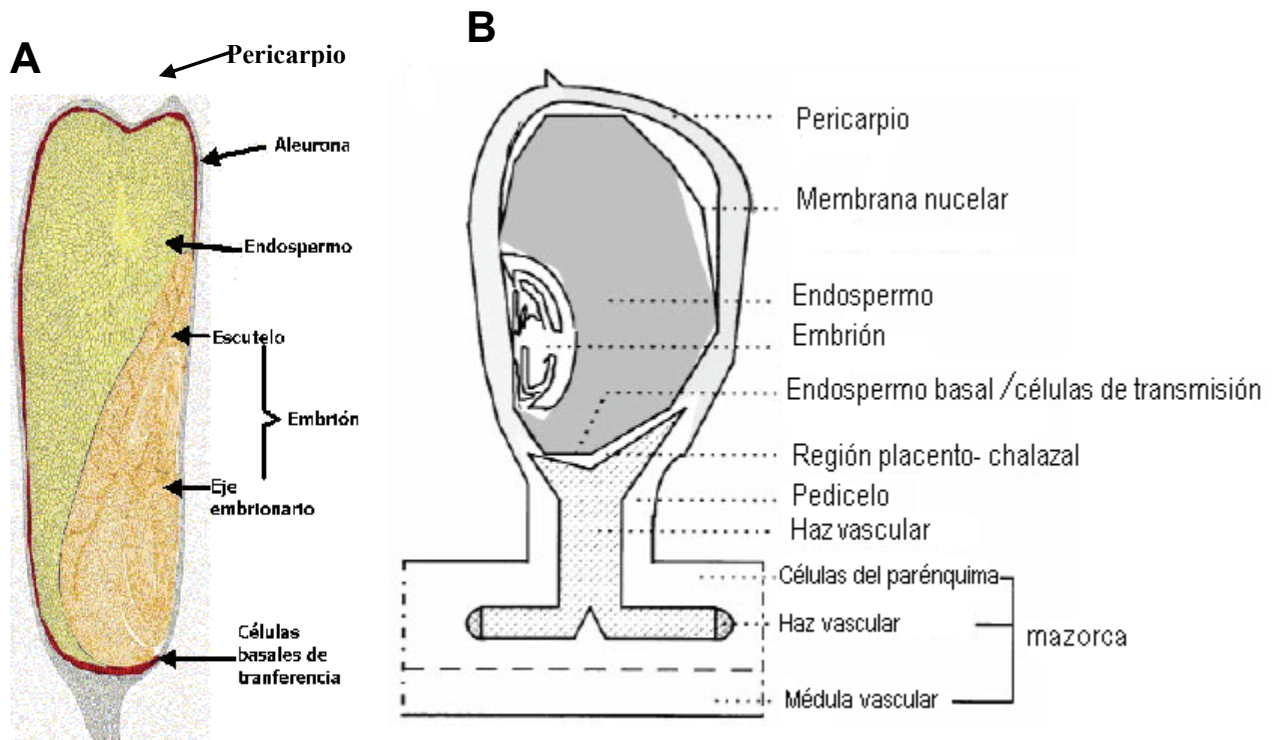


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz mostrando sus tejidos principales. A) Semilla de maíz seca; B) dibujo de la semilla de maíz unida a la mazorca (Tomado de Cheng y Chourney, 1999).

Los elementos básicos de la estructura de una semilla son: un embrión formado por un eje embrionario que está integrado a su vez por la plúmula y la radícula, uno, dos o varios cotiledones; una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado (albumen o endospermo) o en el propio embrión; una cubierta externa del endospermo de células especializadas llamada capa de aleurona y por último una capa exterior dura que recubre a toda la semilla llamado pericarpio (Figura 1).

Cada una de estas partes tiene una función específica: el pericarpio protege a la semilla de los cambios ambientales o del ataque por microorganismos; el endospermo es la reserva de la que se alimenta la nueva planta hasta que sea autótrofa; el escutelo o cotiledón es una estructura que generalmente se encuentra entre el endospermo y el eje embrionario y absorbe los nutrimentos ya digeridos en el endospermo y los transporta a las partes del embrión que están creciendo durante el proceso de la germinación (Black, 2001).

Para que la semilla cumpla con su objetivo de perpetuar la especie es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de sintetizar sus propios nutrimentos y finalmente convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogenéticos cuyo resultado dinámico es el crecimiento de la planta.

1.2 Composición química de las semillas.

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que permitirán el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta sea capaz de alimentarse por sí misma. Estas reservas se encuentran en su mayor parte, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, hidratos de carbono y compuestos inorgánicos.

La composición química de las semillas es variable y éstas se pueden clasificar en función del tipo de material que almacena de reserva. Pudiendo existir grandes diferencias entre las semillas. Así, en los cereales predominan los carbohidratos, especialmente almidón, en muchas semillas de importancia agrícola como avellana, almendro, ricino, girasol, soja entre otras se almacenan mayoritariamente, lípidos (triglicéridos) y por último un tercer grupo de semillas, entre las que se encuentran las leguminosas, almacenan proteínas junto con cantidades considerables de almidón, siendo en éstas los lípidos muy escasos (Bewley, 2001).

Por ejemplo, entre las especies en que los carbohidratos alcanzan valores altos están el maíz (*Zea mays*, con 50-70% en la semilla seca, contra 5% de lípidos), el chícharo (*Pisum sativum*), con 30-40 de carbohidratos, el castaño (*Castanea vesca*) con 42% de carbohidratos contra 3% de lípidos, por mencionar algunas.

Por otro lado, entre las especies con un mayor porcentaje de lípidos en materia seca está el cacahuate (*Arachis hypogaea*), con cantidades entre 8-21% de carbohidratos del 40-50% de lípidos, mientras que el girasol (*Helianthus annuus*) y el ricino (*Ricinus communis*) no contienen carbohidratos, pero tienen entre 40 a 50% de lípidos el primero y 64% el segundo.

Son pocos los casos en que las proteínas funcionan como reservas. Esto sucede en el frijol de soya, por ejemplo, el cual tiene 40% de proteínas, 18% de lípidos y 7% de hidratos de carbono. Cabe mencionar que muchas de estas proteínas están inactivas metabólicamente y que funcionan como reservas, las cuales varían según la especie. Por ejemplo en el arroz (*Oryza sativa*) contiene las siguientes proteínas de reserva: glutelina en un 80%, globulina 10% y albúmina y prolamina 5% cada una. En el maíz los valores de estas mismas proteínas son 31, 0, 14 y 48% respectivamente.

En cuanto a la localización de las reservas, como ya se ha mencionado, se pueden almacenar en el embrión o en tejidos extraembrionarios, como el endospermo. En muchas especies, como algunas leguminosas, las proteínas y carbohidratos se encuentran en los cotiledones. Sólo ocasionalmente el propio eje embrionario funciona como región de almacenamiento, como sucede con la nuez del Brasil. La mayor parte del almidón y las proteínas de los cereales y otras gramíneas se almacenan en el endospermo.

1.3. Germinación

El proceso posterior a la formación de la semilla o embriogénesis es la germinación y su establecimiento provee el medio de preservación y propagación de la especie, sin embargo, el concepto de germinación es amplio y no hay una definición sin

ambigüedades de este fenómeno, aunque existen varias definiciones que dependen de la disciplina científica que lo estudie, por ejemplo:

La definición agronómica define a la germinación como el surgimiento y desarrollo, a partir del embrión de la semilla, de las estructuras esenciales como son la raíz, el tallo y las hojas, lo que indica la capacidad de la semilla para producir una planta normal en condiciones favorables.

En la definición botánica, la germinación incorpora esos acontecimientos que comienzan con la recepción de agua por la semilla y termina con la salida de la radícula o raíz primitiva (Bewley y Black, 1994; Srivastava 2002).

Nosotros tomaremos esta última, en la cual germinación comienza con la toma de agua por la semilla, proceso denominado imbibición, fenómeno que sólo tendrá lugar cuando las condiciones ambientales sean favorables y son básicamente las siguientes:

- 1.- Humedad suficiente en el ambiente.
- 2.- Temperatura favorable.
- 3.- Posibilidad de intercambio de gases.
- 4.- Presencia de luz, aunque este factor no es imprescindible para algunas semillas.

La germinación termina con la emergencia del eje embrionario en dicotiledóneas o de la radícula en monocotiledóneas y gimnospermas.

Podemos reconocer tres fases características en el proceso de la germinación (Figura 2; Bradford, 2004):

- **Fase I o de hidratación:** La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua debida a la gran diferencia de potencial hídrico entre el medio externo y la semilla, proceso que altera la

estructura de las membranas celulares. Dicho incremento en peso húmedo va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria a los pocos instantes de comenzarse la imbibición, siendo anaerobia en las primeras horas debido a la limitación de oxígeno y posteriormente aerobia, cuando las cubiertas seminales se rompen y aumenta la disponibilidad de oxígeno.

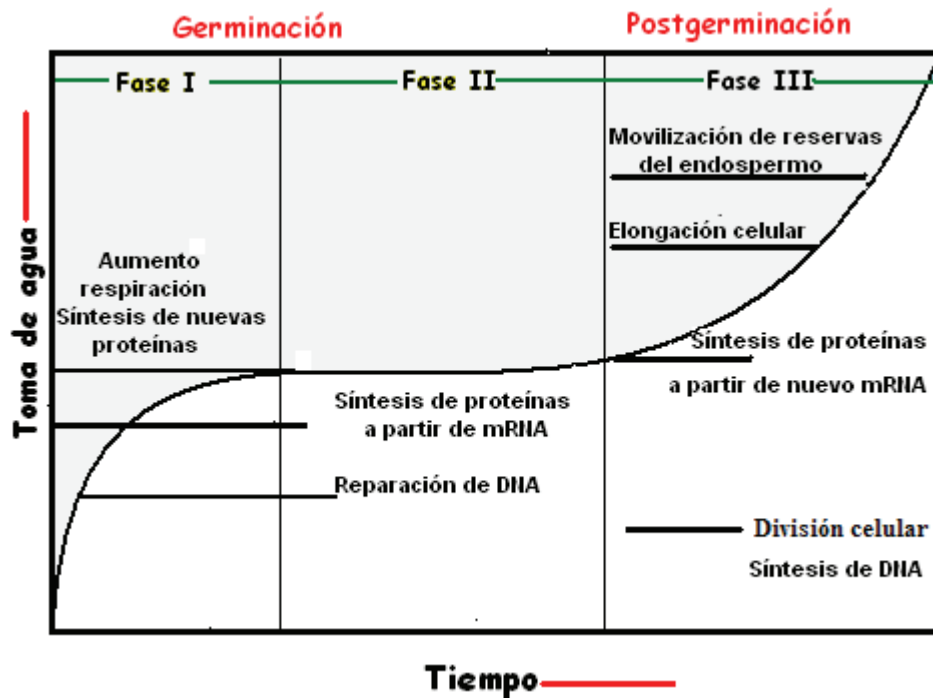


Figura 2. Fases de la germinación de la semilla. Se indican los cambios más importantes que ocurren durante cada una de las fases de la germinación (modificado de Bradford, 2004).

- **Fase II:** En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para llevar a cabo la duplicación celular y comenzar el desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente y prácticamente no se observa un cambio en la toma de agua por la semilla.
- **Fase III o de crecimiento:** Es la última fase de la germinación, aunque en realidad es la fase post-germinativa temprana y se inicia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria.

Adicionalmente, un cambio importante es el inicio de la movilización de las reservas contenidas en el endospermo (Bewley 1997).

La duración de cada una de las fases de la germinación depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también se afectan por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc.

1.4 Metabolismo durante la germinación: Movilización de sustancias de reserva.

La semilla está protegida por el pericarpio en su capa externa y debajo de éste se encuentra la capa de aleurona, constituida por unas pocas capas de células o sólo una y ella tiene la capacidad de sintetizar un número importante de proteínas, la mayoría de ellas con actividad hidrolítica.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluyen un aumento en la respiración, la síntesis proteínica y la movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan el rompimiento de las cubiertas seminales que generalmente se produce por la emergencia de la radícula (Bradford, 2004).

Se pueden reconocer dos periodos de movilización de reservas, no sólo por el tiempo en el cual ocurren, sino por la localización de las reservas utilizadas. Al comenzar la germinación de la semilla, el embrión utiliza en gran parte las reservas nutricias que se encuentran cercanas a él, como la sacarosa y los lípidos, en un primer periodo de movilización. La segunda etapa, ocurre cuando las primeras reservas se reducen y el embrión lo percibe y responde liberando hormonas, principalmente giberelinas, que se difunden hacia el endospermo a través del escutelo y al llegar a las células de la capa de aleurona, inducen la producción de enzimas hidrolíticas como las α -amilasas. La secreción de varias isoenzimas de α -amilasas (productos de los genes Amy1, Amy2 y Amy3) al endospermo provoca un

aumento considerable de glucosa libre (Bradford, 2004; Hwang *et al.*, 1998; Lovegrove y Hooley, 2000).

Las moléculas de glucosa liberadas son utilizadas por el embrión como fuente de energía, las cuales llegan hasta el mismo por difusión. Adicionalmente, se liberan proteasas y otras enzimas hidrolíticas que favorecerán la hidrólisis de las reservas produciendo moléculas más sencillas como aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, y nucleótidos. Además, las células de la aleurona almacenan fitina, mioinositol y minerales como K^+ y Mg^{2+} . Ahora, el embrión ya dispone de las moléculas estructurales y de la energía necesarias para continuar la síntesis de sus propias moléculas, la semilla entonces se convertirá en una joven plántula (Lovegrove y Hooley, 2000).

Se conocen muchos de los pasos de la movilización de reservas después de la salida de la radícula (segunda etapa de movilización), como la temporalidad de la inducción por giberelinas, la reducción del ácido abscísico en el endospermo, la síntesis de las diferentes formas de amilasas y su capacidad de degradar al almidón y su regulación por carbohidratos (Bewley y Black, 1994; Srivastava 2002), sin embargo, hay pocos estudios en los cuales se hayan estudiado los eventos que median el flujo de carbono inicial de carbono hacia el tejido que propiamente crecerá y se transformará en la joven planta. Entre los estudios sobre la movilización de carbono durante la germinación en *Arabidopsis thaliana*, semilla que contiene como principal reserva a los lípidos (Pritchard *et al.*, 2002; Pinfield-Wells *et al.*, 2005), se ha encontrado que la degradación de los lípidos comienza pocos minutos después de hidratarse la semilla y es alta antes de que la germinación concluya. La degradación inicial coincide con un aumento en la tasa respiratoria, mientras que la posterior concuerda con la síntesis de la isocitrato liasa y la malato sintetasa, enzimas clave y únicas del ciclo del glioxilato y que comienzan a sintetizarse cuando las reservas de carbono fácilmente asimilable, como sacarosa comienzan a decrecer (Eastmond y Graham, 2001).

En maíz, se ha detectado a la actividad de la ATPasa de protones en las primeras horas de la germinación, aumentando su actividad conforme avanza ésta (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998). La enzima acidifica el apoplasto y establece un gradiente electroquímico de protones, facilitando así el alargamiento celular y la toma de solutos a través de transportadores secundarios. Un hallazgo interesante es que la enzima se localiza preferentemente en los escutelos de maíz, tejido que proporcionará los nutrimentos al eje embrionario en crecimiento, tanto antes como después de que la germinación ocurra (Enríquez-Arredondo *et al.*, 2005). En el laboratorio se ha encontrado que un transportador de sacarosa es activamente sintetizado en la germinación del maíz, los niveles de transcrito en el escutelo son incluso más altos que los que hay en una hoja madura (alrededor de 2 veces), así como también la expresión de su actividad, lo que indica la fuerte necesidad de mover sacarosa hacia el eje embrionario (Greaves-Fernández, 2001; Zavala-Zendejas, 2001). De manera interesante, se ha encontrado que el transportador de sacarosa no se encuentra en los ejes embrionarios de maíz, por lo que la sacarosa que es vertida a los apoplastos desde el escutelo, debe ser degradada por las invertasas de pared celular del propio escutelo, o del eje embrionario para poder ser utilizados por éste último. Además el patrón de expresión del transportador cambia cuando se coloca a embeber el eje embrionario en glucosa o fructosa, propiciándose la inducción del transportador en ciertas zonas del eje como la coleorriza y el tejido vascular.

1.5 Las invertasas.

En gran variedad de plantas el principal carbohidrato exportado es la sacarosa, la cual se sintetiza en el tejido fuente (hoja) y es transportada hacia el floema y de allí a los diferentes tejidos demandantes o que necesitan aporte de nutrientes como los tallos, raíces, semillas u órganos reproductivos. La toma de sacarosa por el tejido demandante puede ser por dos vías, simplástica y apoplástica.

Durante su paso por la vía apoplástica, la sacarosa puede ser hidrolizada en glucosa y fructosa por la invertasa de la pared celular. O bien, puede entrar de manera intacta

a la célula por vía simplástica y es entonces hidrolizada en el citosol, ya sea por la invertasa citosólica o en la vacuola por la invertasa vacuolar (Sturm, 1999).

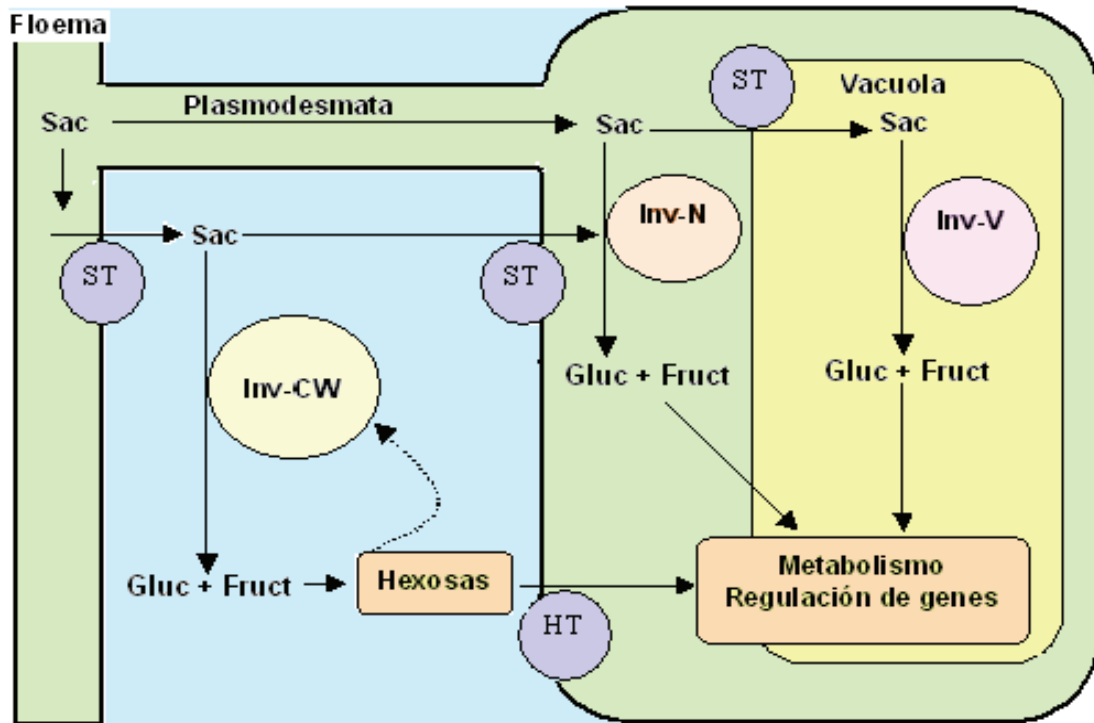


Figura 3. Localización de las isoenzimas de invertasas y las vías de descarga del floema. La invertasa de pared celular (Inv-CW) es capaz de hidrolizar la sacarosa previo a su entrada a la célula y sus productos serán transportados mediante el transportador de hexosas (HT). Si la Inv-CW no actúa sobre la sacarosa entonces el transportador de sacarosa (ST) la introduce a la célula. Otro medio por el que la sacarosa llega a la célula es vía los plasmodesmata y en el citosol puede ser sustrato de la invertasa citosólica (Inv-N) o bien en la vacuola, por la invertasa de la vacuola (Inv-V). Adaptado de Roitsch y González 2004.

Las invertasas (EC 3.2.1.26, β -fructosidasa, β -fructofuranosidasa) catalizan de manera irreversible la reacción de hidrólisis de la sacarosa en sus dos monosacáridos estructurales: glucosa y fructosa. Las plantas poseen tres variedades de esta enzima, la invertasa de pared celular o extracelular (Inv-CW), la invertasa vacuolar (Inv-V) y la invertasa citosólica (Inv-N) y presentan diferencias en su localización subcelular, pH óptimo de actividad y solubilidad. (Figura 3; Roitsch y González, 2004).

Las propiedades de éstas tres formas de invertasa son diferentes, sin embargo, las invertasas denominadas ácidas que son las de pared celular y la de vacuola, tienen algunas propiedades enzimáticas y bioquímicas semejantes. Ambas son β -fructofuranosidasas y son capaces de aceptar otros fructofuranosidos como estaquiosa y rafinosa como sustratos, pero con una disminuída eficiencia en su uso. Comparten un alto grado de homología, en uno de los motivos conservados, la secuencia **WECP/V**, le proporciona la característica de su pH óptimo ácido y su especificidad por el sustrato, encontrándose en las invertasas vacuolares el residuo de valina, mientras que el aminoácido prolina está presente en las invertasas extracelulares. Este sólo aminoácido produce una diferencia entre el pH de las invertasas ácidas, ya que el pH óptimo de actividad de la Inv-V es ligeramente mayor al de la Inv-CW (Tabla 1; Roitsch y González, 2004).

Ambas invertasas ácidas son glicoproteínas y su actividad se inhibe por iones metálicos como el Hg^{2+} y la Ag^+ (Sturm 1999).

En cuanto a la invertasa citoplásmica, ésta tiene propiedades muy distintas (Tabla 1), es una enzima con pH neutro, y de la cual la información es muy limitada, ya que es una enzima lábil con una actividad baja. Su actividad se inhibe fuertemente por los productos de su hidrólisis y no es afectada por metales pesados, lo que sugiere una marcada diferencia en el sitio catalítico, respecto a las invertasas ácidas (Kingston-Smith *et al.*, 1999; Roitsch y González 2004).

Tabla 1. Propiedades y características de las isoformas de Invertasas (modificado de Sturm y Tang, 1999).

Tipo de invertasa	pH óptimo de actividad	Temperatura Óptima (°C)	Pi	Función
Invertasa de pared celular ó insoluble	3.5-5.0	30	Básico	<ul style="list-style-type: none"> • Participa en la respuesta a heridas e infecciones. • Regulación de la hidrólisis de la Sacarosa. • Control en la diferenciación celular y desarrollo de la planta.
Invertasa vacuolar	5.0-5.5	37	Neutral	<ul style="list-style-type: none"> • Osmoregulación y crecimiento celular. • Aumenta en respuesta a estrés, hipoxia y gravitropismo. • Balance del contenido de azúcares en frutos y tubérculos maduros
Invertasa citoplásmica	6.8-8.0	37	Neutral	<ul style="list-style-type: none"> • Probablemente involucrada en canalizar el catabolismo de la sacarosa.

Si bien las plantas prefieren usar a la sacarosa como forma de transporte de carbono y energía a distancia, las hexosas son las que en realidad serán utilizadas para el crecimiento celular, por lo que las invertasas son enzimas importantes a las que se les han sugerido diferentes papeles (Tabla I).

La Inv-V se ha sugerido que controla el nivel de sacarosa que es almacenada en la vacuola, siendo responsable de la re-movilización de la sacarosa, es decir se ha planteado que al hidrolizar a la sacarosa, se promueve la salida de las hexosas al citoplasma, sin embargo la velocidad de salida de hexosas es menor que la de la entrada de sacarosa, lo que propicia un aumento de esta última en la vacuola. Por su parte, la actividad de la invertasa de pared celular se ha sugerido que es importante en tejidos de rápido crecimiento, relacionándole con la regulación de la demanda de carbohidratos. La Inv-CW hidroliza a la sacarosa que es vertida o transportada por un transportador en eflujo a los apoplastos de la célula demanda y a través de su actividad establece un gradiente de sacarosa que favorece su entrada a la célula demandante (Kingston-Smith *et al.*, 1999; Roitch y González, 2004).

Mucho del papel que se les ha asignado a las invertasas ácidas proviene de evidencia circunstancial, el contar con mutantes ha ayudado a vislumbrar su relevancia en la fisiología de la planta. Experimentos en papa en donde se sobreexpresa una invertasa en el citosol o en el apoplasto, lleva a una disminución en el contenido de sacarosa y un incremento en el de hexosas, pero lo más importante es que la mayor actividad de las invertasas en el citosol o en el apoplasto llevan a un cambio en la respuesta fenotípica de la planta. Por ejemplo el incremento en la actividad de la Inv-CW llevó a un incremento en el tamaño del tubérculo de la papa, pero redujo el número de tubérculos que se formaba, mientras que el aumento en la Inv-V llevó a un fenotipo opuesto al anterior.

Cuando se ha realizado la supresión de la actividad de la invertasa, se ha encontrado una alteración significativa en la morfología de la semilla y mucho más en el índice de peso hoja a raíz. En zanahoria por ejemplo, el crecimiento de las plantas se alteró: cuando se suprimió la producción de Inv-CW, las plantas produjeron más hojas y en ellas se acumularon sacarosa y almidón, mientras que en las raíces se redujo el desarrollo y el contenido de carbohidratos disminuyó, lo que llevó a que de una relación de 3 a 1 en el peso de hojas a raíces, cambiara de 17 a 1. Por su parte las plantas que expresaban en anti-sentido al RNAm de la invertasa vacuolar, también tuvieron más hojas que las plantas silvestres, pero las raíces se desarrollaron de manera normal. Cuando las plántulas transgénicas se crecieron en un medio que contenía una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa, éstas recuperaron el fenotipo silvestre, lo que pone de manifiesto la relevancia de controlar la concentración interna y externa de carbohidratos (Tang *et al.* 1999).

Evidencia sobre la temporalidad de la expresión y del papel de la invertasa en el desarrollo de tejidos en plantas se ha obtenido en diferentes especies, por ejemplo en maíz se ha estudiado la ruta del transporte de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla, se ha establecido que la semilla en formación recibe la sacarosa de las terminales del floema de la planta madre, en las células del pedicelo, células que no expresan al RNAm para la invertasa. Posteriormente, la sacarosa llega a los

apoplastos de la parte basal del endospermo y es hidrolizada por el producto del gen *Incw2*, el cual se expresa exclusivamente en esta zona, entonces la fructosa y glucosa producidas son tomadas por transportadores de hexosas de las membranas plasmáticas de las células del endospermo. Se ha corroborado que la actividad de la invertasa de pared celular es necesaria para proporcionar las hexosas para la actividad mitótica del endospermo y las que funcionan como señal para el desarrollo apropiado del embrión (Cheng y Chourey, 1999). Lo anterior fue demostrado en una mutante denominada miniatura 1 (*mn1*), en la que se redujo el peso del grano en alrededor del 30% y contiene sólo trazas de actividad de invertasa en el endospermo basal. Los autores proveen evidencia de que el locus *Incw2*, que codifica a la invertasa de la pared celular se encuentra mutado y que es responsable de la reducción en la actividad de la invertasa de la pared celular, además de que la temporalidad de la expresión debe ser importante para el llenado del grano, ya que la adición exógena de glucosa no produce fenotipos silvestres.

1.5.1 Regulación de la actividad de las invertasas.

A pesar del papel central de la actividad de las invertasas en la vida de las plantas, poco se sabe acerca de su regulación. La sacarosa se ha reconocido como una molécula señal para la expresión de genes de plantas (Rolland *et al.*, 2002) y ya que la invertasa provee el punto de entrada de la sacarosa hacia el metabolismo celular, no es de sorprenderse que la invertasa pertenezca al grupo de enzimas reguladas por carbohidratos.

En un cultivo fotoautótrofo de *Chenopodium rubrum*, la actividad de la Inv-CW es regulada positivamente por la adición de sacarosa o glucosa (Roitsch *et al.*, 1995). En maíz se ha encontrado que las dos invertasas vacuolares presentes, *Ivr1* e *Ivr2* no son moduladas por azúcares de manera similar. *Ivr2* aumenta su transcripción cuando aumenta la concentración de glucosa del medio desde 0.2% hasta 4%. Mientras que *Ivr1* aumenta sólo entre 0.2 a 0.5% de glucosa y disminuye a 2-4%. Además *Ivr2* se expresa en la mayoría de los órganos que importan carbohidratos,

mientras *Ivr1* aumenta su expresión durante el desarrollo reproductivo, en las anteras, y cuando el cultivo de células se ha sujeto a una dieta pobre en carbohidratos, se mantiene el nivel del RNAm para *Ivr1* y la adición de carbohidratos al medio produce un incremento en el nivel de su mensajero más rápidamente que para el de *Ivr2* (Xu *et al.*, 1996).

Otra forma de regulación de la invertasa es a través del inhibidor para la enzima. Se han encontrado proteínas que co-purifican con la enzima y que reducen la actividad de la invertasa *in vitro*. El inhibidor de la invertasa fue encontrado inicialmente en los tubérculos de papa y años después se encontró en otros tejidos, demostrando que el inhibidor era estable al calor y al ácido, que presentaba un mecanismo de inhibición no competitiva y con un peso molecular de alrededor de 15 a 23 kDa. Debido a que las preparaciones en donde se encontraba la proteína inhibidora de la invertasa contenían a otras proteínas, se hizo difícil su caracterización y su clonación. En 1994, se reportó una posible secuencia de su porción N-terminal obtenida del fruto de tomate y de células de suspensión de tabaco, ambas secuencias polipeptídicas eran similares. Sin embargo, cuando se obtuvieron las proteínas de ambas plantas, se encontró que una inhibía a la invertasa de pared celular y otra a la invertasa de la vacuola. El significado fisiológico de la presencia de la proteína inhibidora es todavía controversial, pero en el caso del maíz se ha encontrado que la sobreexpresión de la proteína en el grano del maíz, produce fenotipos similares al de la mutación de la invertasa, mutante *mn1*, lo que sugiere que la presencia de la proteína en el endospermo de la semilla silvestre, pudiera estar regulando la actividad de la enzima *in vivo* (Rausch y Greiner, 2004).

Se tienen evidencias también de que los RNAm para la proteína inhibidora aumentan por la adición exógena de ABA o concentraciones cambiantes de PEG, sin un cambio aparente en la cantidad de invertasa de pared celular presente, por lo que la respuesta al cambio osmótico del medio o a la sequía es la que produciría una actividad disminuída de la invertasa. Por lo anterior, es probable que la abundancia

de la proteína se da en procesos muy específicos del desarrollo de la planta o cuando ha sido sujeta a condiciones de estrés (Rausch y Greiner, 2004).

También se ha observado un incremento en la actividad de invertasa en respuesta a auxinas o citocininas, sin embargo no está claro si está ocurriendo una inducción específica de la enzima o a que las hormonas indujeron la proliferación de las células demanda (Ehneb y Rotisch, 1997; Sturm, 1999). Señales de estrés o de evocadores fúngicos también se han relacionado con la estimulación de la transcripción del mensajero enzima, sin embargo aún se desconoce si es un efecto específico.

Adicionalmente, a la invertasa se le ha involucrado en una respuesta paralela a la de la expresión del transportador de hexosas en diversas plantas, tal vez por la canalización de las hexosas producidas, hacia los tejidos demanda. Sin embargo, aún se desconoce si tiene una relación directa con la percepción de las concentraciones de azúcares que modifican el patrón de expresión de otras proteínas que están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (Ehneb y Rotisch, 1997; Sturm, 1999).

Siendo relevante para la vida de una planta la regulación de la actividad de sus invertasas ácidas, es factible que durante la germinación del maíz, su actividad se vea modulada y por tanto modifique o participe en la regulación del flujo de carbono que se dirige hacia un tejido fuertemente demandante como lo es el eje embrionario.

2. HIPÓTESIS.

Si las invertasas son enzimas importantes en mediar el flujo de carbono hacia los tejidos demandantes, entonces su actividad se verá modificada al embeber tejido embrionario en carbohidratos fácilmente asimilables y esto tendrá repercusiones en el contenido acumulado de los azúcares solubles en los tejidos embrionarios y por tanto en su crecimiento.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto de la imbibición en carbohidratos en los niveles de actividad de las invertasas ácidas y en el contenido de carbohidratos en los tejidos embrionarios del maíz durante su germinación.

Objetivos particulares:

1. Medir los cambios en los contenidos de sacarosa, fructosa y glucosa en los ejes y embriones de maíz durante la germinación.
2. Determinar los niveles de actividad de las invertasas ácidas en la germinación de ejes embrionarios y embriones de maíz.
3. Evaluar el efecto que la adición exógena de carbohidratos tiene en los perfiles de los diferentes carbohidratos en los escutelos y ejes embrionarios de maíz germinado.
4. Determinar el efecto de la imbibición en carbohidratos en la actividad de las invertasas ácidas de los tejidos embrionarios del maíz.
5. Comparar los contenidos de carbohidratos y los niveles de invertasas en la germinación del maíz.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Esquema general de trabajo.

El trabajo experimental que se llevó a cabo en esta tesis involucró la obtención del tejido embrionario de maíz, su germinación en diferentes concentraciones de carbohidratos y la cuantificación en este tejido, tanto de algunos carbohidratos solubles como de la actividad de las invertasas ácidas: la de pared celular y la vacuolar (Figura 4). A continuación se desglosa el protocolo de cada uno de los métodos empleados.

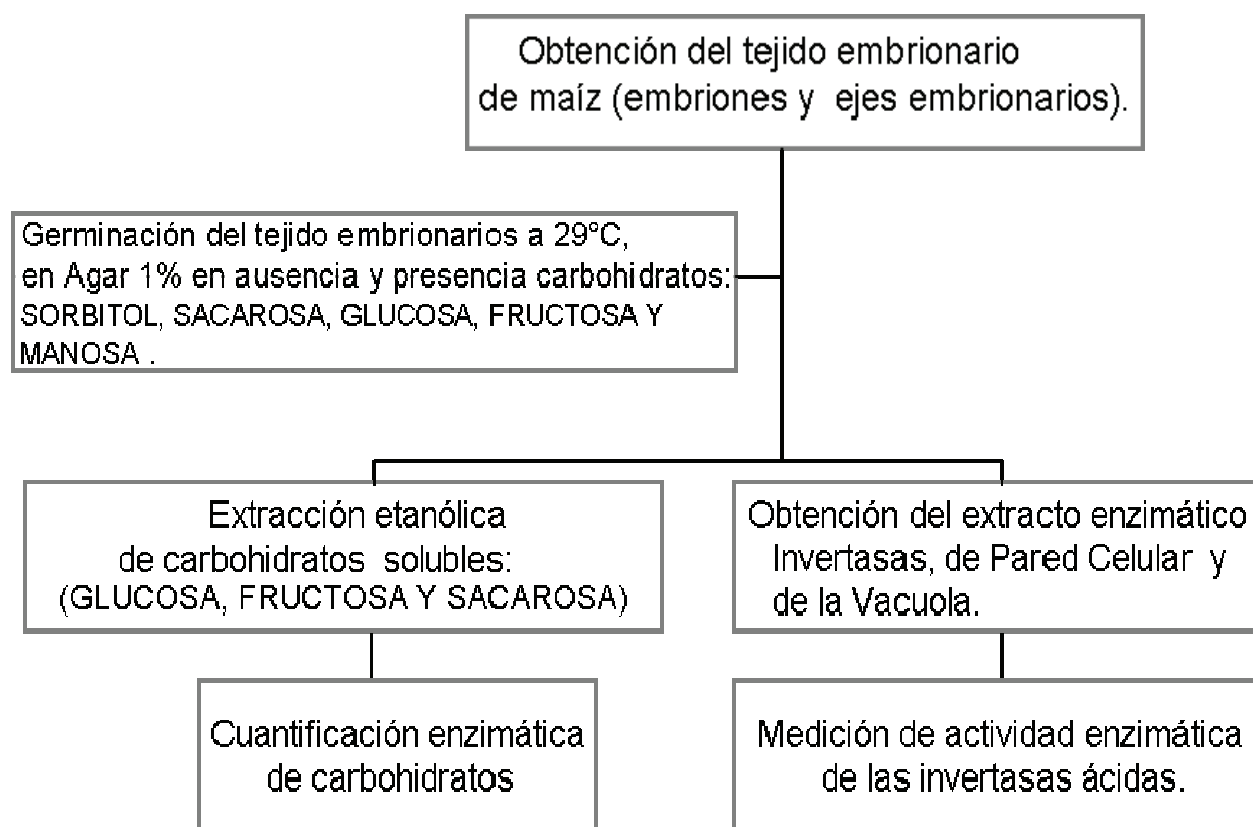


Figura 4. Diagrama de flujo que muestra el proceso general que se siguió en este trabajo.

4.2. Germinación de ejes y embriones de maíz.

4.2.1. Germinación del tejido a diferentes tiempos.

Embriones y ejes embrionarios que fueron extraídos manualmente con navaja, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% y se enjuagaron dos

veces con agua estéril. La imbibición ó germinación de los embriones y ejes embrionarios de maíz a los diferentes tiempos (8,12, 24, 30, 48, 60, y 72 h), se llevó a cabo en cajas Petri que contuvieron Agar al 1%, por duplicado. Se incubaron a 29°C y en ausencia de luz. Al terminó de la germinación se colocaron los tejidos en congelación a -80°C hasta su utilización.

4.2.2. Germinación de embriones y ejes embrionarios en diferentes hidratos de carbono.

La germinación de los embriones y ejes embrionarios se llevó a cabo en los siguientes carbohidratos: sorbitol, sacarosa, glucosa y fructosa a una concentración de 50 mM en agar al 1%, manosa se utilizó a una concentración de 5 mM en agar 1%. Se incubó el tejido por 24 h a 29°C.

4.2.3. Determinación del contenido de humedad.

Se realizó una curva de germinación como se describió anteriormente y al concluir se tomaron 10 ejes o embriones de cada tiempo, el tejido se secó a 65°C en vacío por 3 días. El contenido de humedad en el tejido se determinó por diferencia de pesos entre el húmedo y el seco, expresándose en porcentaje.

4.3. Extracción de lípidos

Se colocaron embriones a germinar por diferentes tiempos y al concluir el tiempo de incubación se separaron en dos lotes, a un lote de embriones se le extrajeron los escutelos y se congelaron tanto escutelos como ejes embrionarios. Al otro lote de embriones sólo se congelaron en nitrógeno líquido. Los escutelos, embriones y ejes embrionarios se molieron por separado con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se tomaron 0.15 g del polvo de cada uno, el cual se homogeneizó con 5 ml de una mezcla de cloroformo- metanol (2:1) a 4°C.

Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min en la Centrífuga Universal 320R, marca Hettich. El sobrenadante fue separado y vertido en un tubo. El precipitado se lavó con 2.5 ml de una mezcla de Cloroformo- metanol (relación 2:1); se volvió a

centrifugar durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido se mezcló con el sobrenadante del paso anterior. Se evaporó el disolvente en un bloque de calentamiento a 60°C, una vez que los tubos se encontraban sin residuos del disolvente se pesaron y por diferencia de pesos se obtuvo la cantidad de lípidos presentes en las muestras.

4.4 Cuantificación de carbohidratos solubles

4.4.1 Extracción de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

El extracto se obtuvo de 100 mg de tejido de embriones y ejes embrionarios, que fueron previamente molidos en N₂ líquido. El polvo del tejido se colocó en mortero con 1 ml de etanol (80% v/v) a temperatura de ebullición, moliendo perfectamente, la mezcla alcohólica se traspasó a un tubo de ensaye. Al remanente del mortero se le agregó 1 ml de agua a temperatura de ebullición y se volvió a moler; este extracto se mezcló con el del extracto alcohólico.

Posteriormente, la mezcla alcohólica se centrifugó en una microfuga por 10 min a 2,500 rpm. El botón se desechó y el sobrenadante se colocó en un tubo de ensaye y en un bloque de calentamiento a 70°C por tres días, el residuo se resuspendió en 100 µl de agua. El extracto se guardó a -20°C hasta su utilización.

4.4.2 Cuantificación de los carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

La cuantificación de glucosa y fructosa, se hizo a través de un método enzimático, utilizando el protocolo del kit de fructosa de SIGMA (catálogo FA-20) pero modificado por Ramírez-Palma (2007). Brevemente, para la determinación de glucosa y/o fructosa, la muestra problema (no mayor de 10 µl) se puso en contacto con 200 µl de una mezcla enzimática que contuvo 1.0 U/ml de hexocinasa y 1.0 U/ml de glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH), se incubó 20 min a temperatura ambiente.

En la muestra, tanto la glucosa como la fructosa se fosforilaron y sólo la Glucosa-6P continuó reaccionando ya que la mezcla enzimática contiene G6PDH; los productos finales son 6-fosfogluconato y el NADPH. Se leyó la absorbancia a 340nm, la cuál es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Después de la primera lectura, al mismo pozo en donde se midió glucosa, se le añadió 1.2 U/ml glucosa-6P isomerasa, la cual cataliza la conversión de la fructosa-6P en glucosa-6P (que no reaccionó en el paso anterior) y entonces la G6PDH ya puede usar este sustrato, se hizo una segunda lectura y ahora el incremento en absorbancia a 340 nm corresponde a la sumatoria de la glucosa de la primera determinación más la concentración de fructosa.

Para la determinación de sacarosa se realizó una hidrólisis en medio ácido (100 mM de buffer de acetatos pH 4.5) de la sacarosa de la muestra (12 µL máximo) usando invertasa de levadura de SIGMA (número de catálogo I-9253, 4µL de una solución de 80 mg/ml de invertasa disuelta en 100 mM de acetato de magnesio, pH 4.5) se incubó por 2 h a 37°C y posteriormente se determinaron la glucosa y fructosa con el método descrito en el párrafo anterior.

El cálculo se realizó según la siguiente fórmula:

$$Glucosa = \frac{(Abs_m - Abs_b) * 0.00614F * Vol.}{Vol_{susp} * g_{tejido}} = mg / g_{tejido}$$

Abs : absorbancia_{λ340nm}

F : factor de dilución

Vol : volumen de alícuota

Vol_{susp} : volumen de resuspensión

4.5. Medición de la actividad de las invertasas ácidas

4.5.1 Obtención del extracto.

Los extractos se obtuvieron según se describe en Pelleschi *et al.*, 1997. Brevemente, 200 mg de tejido se molieron en mortero y con N₂ líquido. Después se añadieron 350

μl de amortiguador de extracción (HEPES/KOH pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM Na_2EDTA , 2.6 mM Ditiotreitól, 0.02% Tritón X-100) y se homogeneizó. Posteriormente se centrifugó a 12,000 Xg por 3 min a 4°C, el botón contenía a la invertasa de pared celular, mientras que en el sobrenadante se encontraban las invertasas solubles. El sobrenadante se desaló y concentró usando tubos Amicon Ultra-4 marca Millipore.

Para obtener la invertasa de la pared celular, el botón obtenido se resuspendió en 1000 μl de agua, posteriormente se centrifugó a 12,000 Xg por 3 min, el botón se volvió a lavar tres veces más con agua. Al concluir el último lavado, al botón se le añadió amortiguador de extracción adicionado con 1 M de NaCl, se homogeneizó y se dejó incubando a 4°C en agitación rotatoria durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó nuevamente según se describió antes y ahora el sobrenadante contenía a la invertasa de la pared celular y se desaló y concentró usando tubos Amicon Ultra-4 marca Millipore.

4.5.2 Determinación de proteína.

El contenido de proteína en la muestra se determinó por el método de Ghosh *et al.* 1988, usando suero de albúmina bovino como estandar.

4.5.3 Actividad de invertasa.

La actividad de invertasa ácida se determinó según Bergmeyer y Bernt (1974). En un tubo eppendorf se acidifican 25 μl del extracto desalado con 25 μl de 200 mM de acetato de sodio (pH 4.8). La reacción enzimática se realizó añadiendo 10 μl de 600 mM de sacarosa (para una concentración final de 100 mM) e incubando a 30°C por 15 min. Para determinar los productos de la reacción, primero se ajusta el pH a 7.0 añadiendo 50 μl de 0.5 mM de NaH_2PO_4 y las muestras son inmediatamente calentadas a ebullición por 5 min para desnaturalizar a la enzima. La glucosa y la fructosa se determinaron enzimáticamente adicionando a la mezcla anterior 750 μl del medio de reacción que contuvo 50 mM de HEPES/KOH pH 7.0, 2 mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 1mM ATP, 3.5 U de fosfoglucosa-isomerasa, 2 U de glucosa-6 fosfato-

deshidrogenasa y 4.2 U de hexocinasa y 0.5 mM NADP⁺. Se incubó por 20 min a 30°C y por último se centrifugó a 12,000Xg por 2 min; el NADPH formado se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 530.

El cálculo de actividad de las invertasa se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$Actividad = \left(\frac{Abs_{\lambda 340nm}}{6220 * t_{min} * mg_{proteína}} \right) * 1X10^6 = \frac{nmolGlu}{min mg}$$

4.5.3.1 Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad de las invertasas ácidas.

Se realizó el ensayo de actividad de la invertasa ácida vacuolar de embriones incubando a dos diferentes concentraciones de proteína por diferentes tiempos (Figura 5). Al analizar las absorbancias obtenidas se observa que la actividad es lineal desde 10 hasta los 60 minutos. Al usar 100 µg de proteína, la máxima absorbancia alcanzada fue de sólo 0.3, por lo que decidimos usar 200 µg de proteína para realizar las determinaciones de actividad de invertasa vacuolar de embriones.

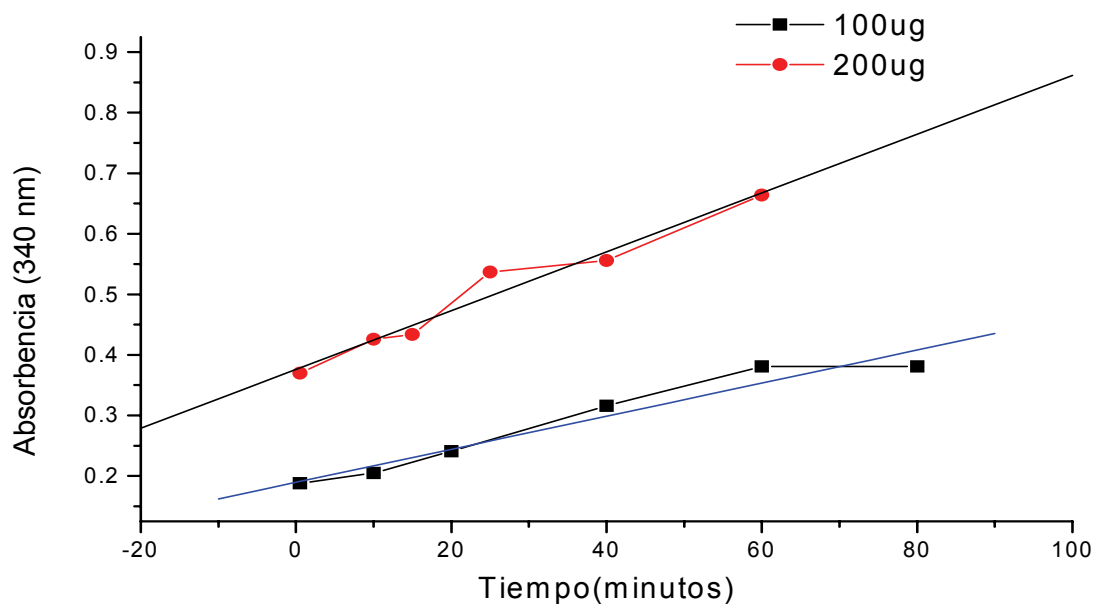


Figura 5. Curso temporal de actividad de invertasa vacuolar en embriones de maíz a dos diferentes concentraciones de proteína. Se muestran las absorbancias obtenidas de la lectura a 340 nm, ya que para la determinación se usó un método enzimático acoplado en el que la glucosa y fructosa producida es usada por la hexocinasa, la fosfoglucoasa isomerasa y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ para producir NADPH.

Para la invertasa ácida de pared celular de los embriones de maíz se utilizaron tres diferentes concentraciones de proteína: 50, 100 y 200 μg . En la Figura 6 se muestra que usando 200 μg de proteína nos permite obtener lecturas entre 0.2 y 0.8 de absorbancia y que la curva que se describe usando esta concentración de proteína es lineal entre los 10 y lo 80 min.

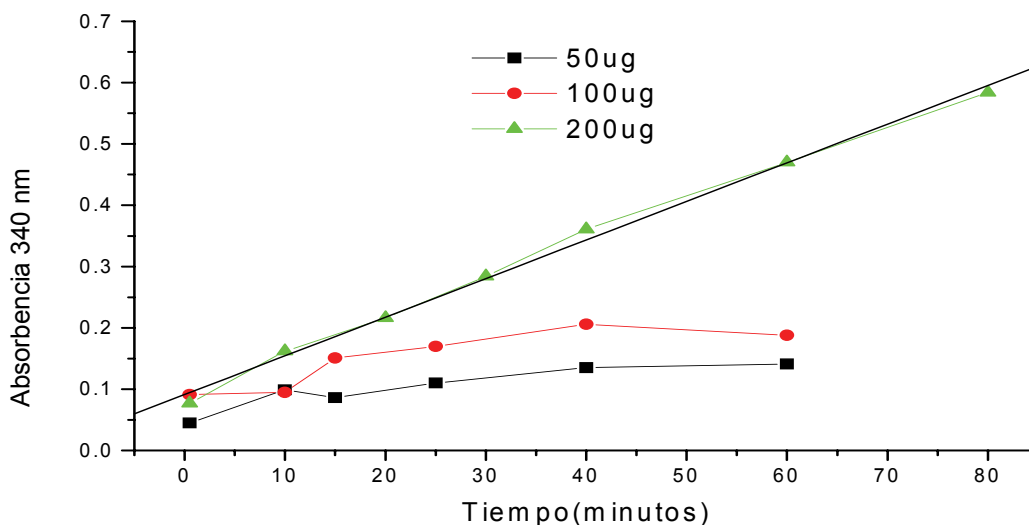


Figura 6. Curvas temporales de la actividad de la invertasa de pared celular de embrión de maíz embebidos 24 h a diferentes concentraciones de proteína.

Usamos como condiciones de trabajo para medir a las invertasas en el tejido embrionario, 200 µg de proteína y 45 min de incubación.

4.5.3.2. Rendimiento proteico de las fracciones de invertasas ácidas de vacuola y pared celular de embriones y ejes embrionarios de maíz.

Como se aprecia en la Tabla 2, el contenido de proteína que se obtuvo tanto de la invertasa vacuolar como de la de pared celular es suficiente para determinar la actividad de ambas enzimas, partiendo de 3 g o 1.5 g de tejido embrionario de maíz. Cabe destacar que a pesar de que el peso de ejes embrionarios era sólo la mitad del que se usó en embriones, es suficiente para obtener una cantidad comparable o aún mayor de proteína que la que se obtiene de los embriones completos. Lo anterior se puede explicar debido a que el embrión contiene una gran cantidad de lípidos de reserva, 80% de su peso, y el eje no, por lo que el rendimiento en proteína en el primero es menor.

Tabla 2. Rendimiento proteico para la obtención de invertasas ácidas. Se utilizaron 3 g de embriones y 1.47 g de ejes embrionarios de maíz germinados 24 h.

Fracción de embriones	µg/µl	Volumen (ml)	Proteína (mg)	% Rendimiento
Extracto crudo	16	6	96	100
Invertasa de Vacuola	8	2	16	16.66
Invertasa de Pared Celular	2	1.4	2.8	6.94
Fracción de ejes embrionarios				
Extracto crudo	ND	5	ND	ND
Invertasa de Vacuola	42	0.6	25.2	ND
Invertasa de Pared Celular	12	0.5	6	ND

ND= No determinado

Obtención de los parámetros cinéticos de las invertasas ácidas.

Se midió la actividad de invertasa según se describió, pero a 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14 y 30 mM de sacarosa. Para obtener los parámetros cinéticos de una enzima hay varias estrategias, nosotros seguimos dos, en la primera, el programa MicroCal Origin versión 3.0 realiza el cálculo literando varias posibilidades, hasta que los valores más cercanos a la K_m y V_{max} son los que mejor describen la curva de los datos experimentales. Otra forma es regraficar los datos experimentales, convirtiendo la ecuación de Michaelis-Menten a una forma lineal, de la cual se pueden obtener la K_m y la V_{max} directamente de la gráfica o después del cálculo obtenido de datos de la gráfica. Para obtener la forma lineal existen varias opciones, elegimos la gráfica de Hanes, en la que se grafica en el eje de las ordenadas al índice $[s]/\text{velocidad}$ y en el de las x la $[s]$. Este es un gráfico que se usa en el manejo de datos de enzimas, aunque no es tan popular como el de dobles recíprocos o Lineaweaver-Burk, es una representación que es más confiable y en la que el error es constante a lo largo de la curva, contrario al de Lineaweaver-Burk en donde a concentraciones de sustrato bajas el error aumenta grandemente, generando una curva que se desvía con mucho de los valores reales de V_{max} y K_m (Eisenthal y Cornish-Bowden, 1973).

La ecuación linealizada de Michaelis, según Hanes es:

$$\frac{[s]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [s]$$

De donde la pendiente de la curva es $1/V_{max}$ y el intercepto en X es la K_m .

Se compararon los valores de ambos tratamientos matemáticos y observamos que las V_{max} obtenidas con el programa de MicroCalOrigin generalmente son mayores que las obtenidas de la gráfica de Hanes y al comparar con los datos de actividad de la enzima medida a concentración alta de sacarosa (100 mM), encontramos que generalmente se parecían más a los datos obtenidos en la gráfica de Hanes, por lo anterior, los valores que se reportan fueron los obtenidos por este último método.

5. RESULTADOS.

5.1 Contenido de humedad de tejido embrionario de maíz

Para establecer los tiempos en los que se medirían los contenidos de carbohidratos y la actividad de las invertasas ácidas en los tejidos embrionarios de maíz, se realizó una curva de contenido de humedad de ejes y embriones de maíz durante la germinación y el período temprano post-germinativo. La tendencia de las curvas es similar para ejes y embriones de maíz (Figura 7). Durante las primeras 8 h de la germinación el contenido de humedad aumenta entre el 60 al 70%, posteriormente se mantiene en este valor hasta las 24 h, comportamiento denominado fase II. Por último hay un ligero aumento en el contenido de agua que nos indica el inicio de la fase III o estado post-germinativo. Con estos datos, se decidió tomar muestras a los 0, 8 (fase I), 12, 24 (fase II), 30, 40, 48 y 60 horas de germinación (fase III), para cubrir las tres fases de la germinación del tejido embrionario del maíz

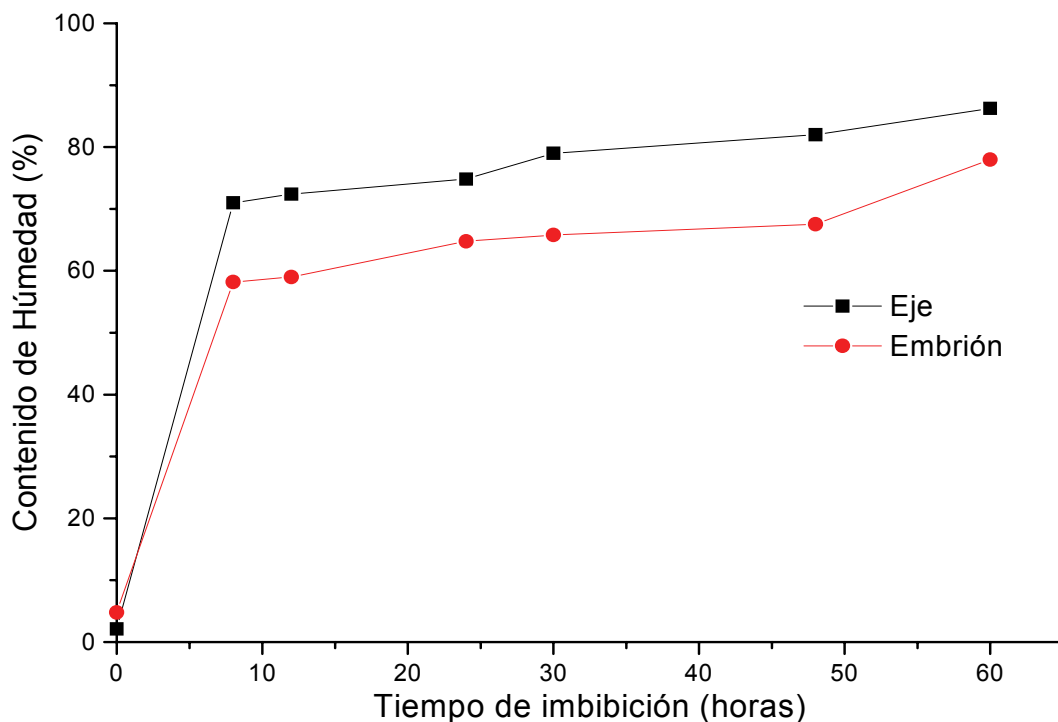


Figura 7. Curso temporal de acumulación de agua de tejidos embrionario de maíz.

5.2 Contenido de carbohidratos solubles en tejidos embrionarios de maíz durante la germinación.

La movilización de carbohidratos solubles es uno de los eventos tempranos durante la germinación, ya que éstos son la fuente de carbono fácilmente asimilable por los tejidos embrionarios. Al determinar los contenidos de glucosa en el eje embrionario encontramos que entre 0 y 8 h hay una disminución de aproximadamente el 60%, posterior a este tiempo el eje embrionario mantuvo el contenido de glucosa en aproximadamente 0.4 mg/g de eje hasta las 60 h de la germinación (Figura 8).

Conjuntamente la fructosa va aumentando conforme avanza el tiempo de germinación, pero siempre en valores menores a los la concentración de glucosa. La acumulación de fructosa nos sugiere que podría estar ocurriendo la hidrólisis de la sacarosa.

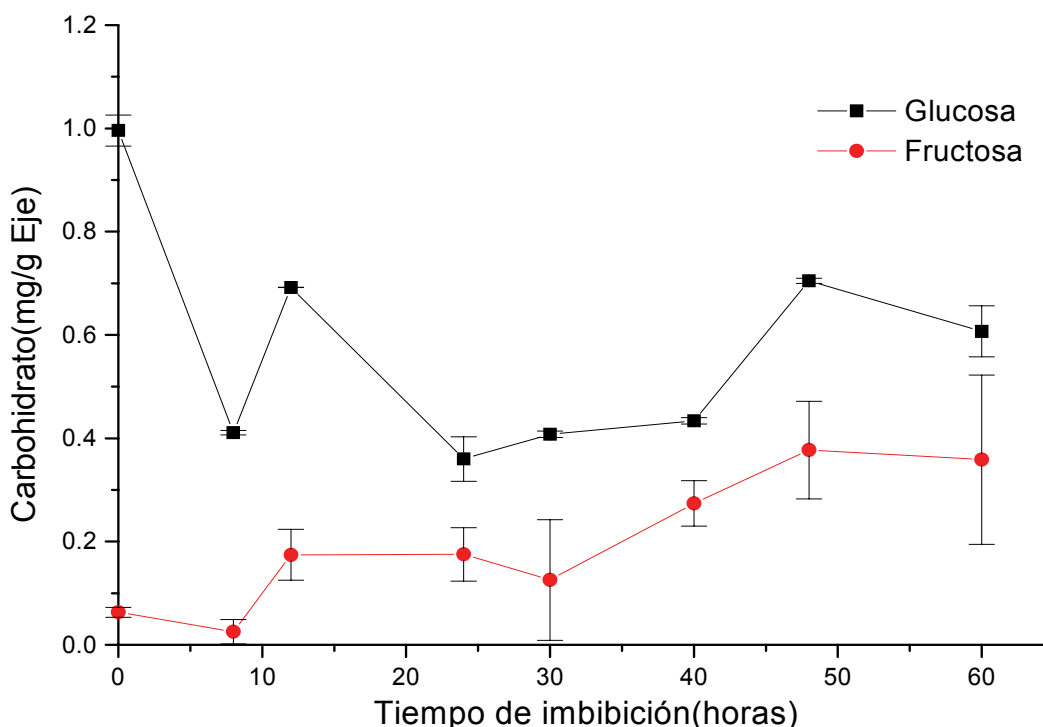


Figura 8. Contenido de glucosa y fructosa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. La determinación de carbohidratos se realizó mediante un método enzimáticamente según se describió en Materiales y Métodos.

Analizando el perfil de concentración de sacarosa en el eje embrionario (Figura 9), encontramos que inicia con 9.7 mg Sacarosa/g de tejido, alrededor de 9 veces más que el máximo de glucosa encontrado en el eje embrionario, posterior a este tiempo y hasta las 24 h su concentración disminuye más de un 75%, sin embargo tiende a disminuir gradualmente para mantenerse a una concentración similar a la que se encuentra de glucosa, alrededor de 0.6 mg/g de tejido. Si comparamos los contenidos de los tres carbohidratos durante la germinación del eje embrionario podemos observar que a las 40 h las concentraciones de glucosa, sacarosa y fructosa se encuentran a niveles similares y se mantienen así hasta las 60 h (Figura 9), lo que hace suponer que se requiere un contenido basal de los tres carbohidratos, probablemente para regular la osmolaridad del medio celular.

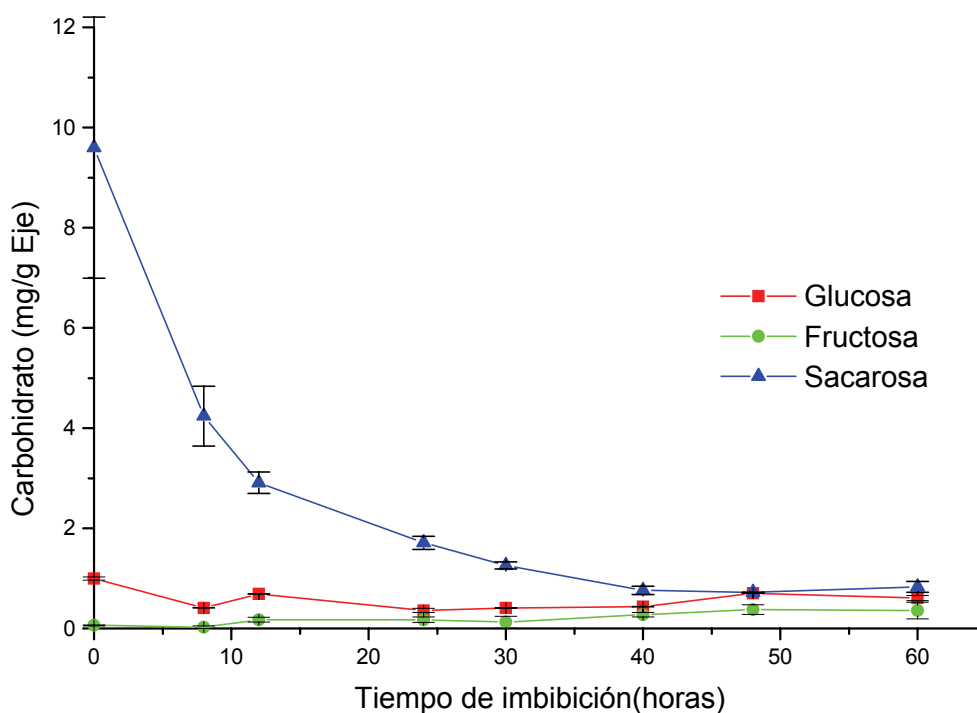


Figura 9. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

Por otra parte, en el embrión completo, el contenido de glucosa comienza en 0.8 mg/g de tejido y durante las primeras 12 h de la germinación no cambia (Figura 10), y comienza a disminuir a las 24 h (57%), posteriormente aumenta hasta alcanzar una concentración ligeramente mayor a la del tiempo cero. En cuanto al contenido

de fructosa durante el proceso de germinación, el embrión presenta un sostenido aumento llegando al doble de su concentración inicial a las 60 h, tendencia que también presentó el eje embrionario.

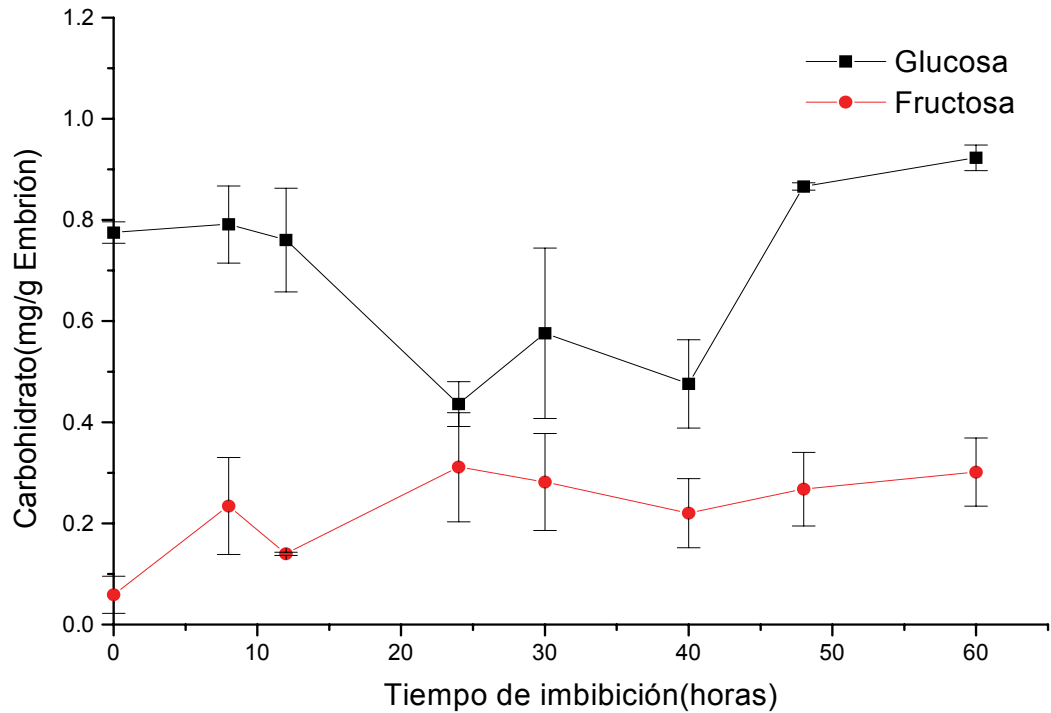


Figura 10. Contenido de carbohidratos solubles en embriones de maíz durante la germinación.

Este comportamiento puede indicarnos que durante la germinación del embrión, la glucosa y la fructosa son la fuente para el metabolismo de carbono, sin embargo, el incremento en ambos carbohidratos también puede ser un indicativo de la actividad de enzimas hidrolíticas sobre la sacarosa.

Al medir los contenidos de sacarosa en el embrión podemos claramente encontrar dos fases: de las 0 a las 24 horas, los contenidos de sacarosa disminuyen 80%, mientras que de las 24 a las 60 horas hay un aumento en el contenido de sacarosa, y aún cuando no se llega a contenidos de sacarosa similares a los del tiempo 0, el incremento es importante, 160%, si comparamos los valores de las 24 h con los de las 48 h (Figura 11).

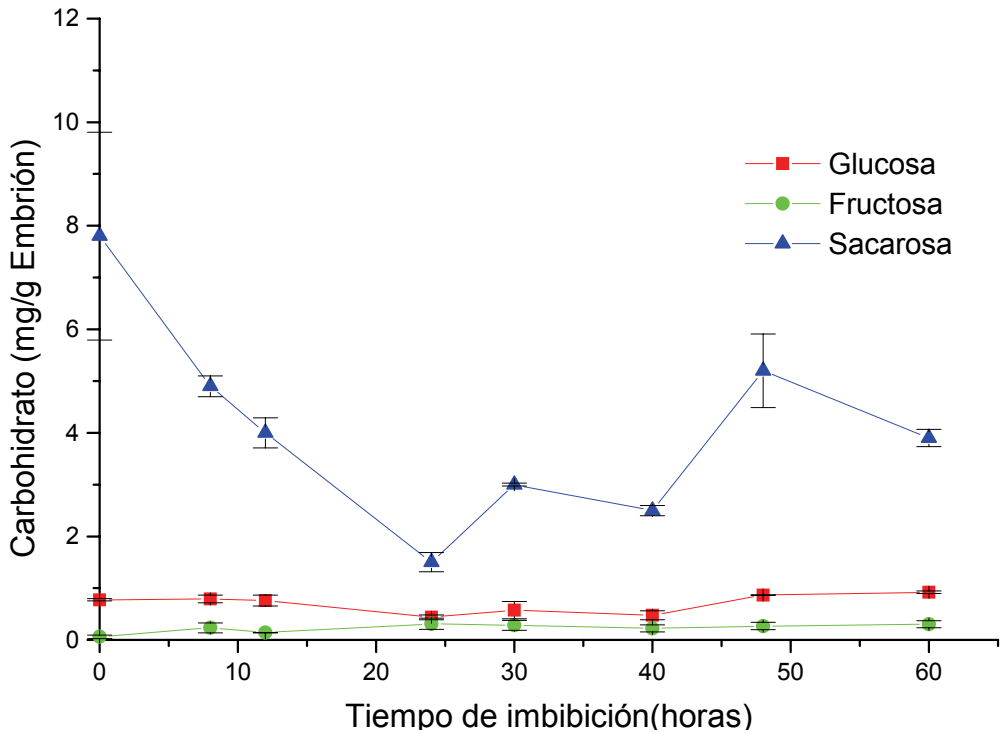


Figura 11. Contenido de carbohidratos solubles en embriones de maíz durante la germinación.

La disminución de sacarosa en el embrión en la fase germinativa puede deberse a la utilización de este carbohidrato por los dos tejidos embrionarios del maíz, el escutelo y el eje embrionario. Mientras que el aumento del carbohidrato que se observa posterior a las 24 h solo podría darse en los escutelos, ya que como se observó en la Figura 10, en el eje embrionario los contenidos de sacarosa disminuyen de manera continua.

Para evaluar lo anterior se embebieron embriones por 8, 12, 24, 36 y 48 h en agar y pasado el tiempo de incubación se les extrajeron los escutelos y el eje embrionario, y en ellos se determinó el contenido de sacarosa (Figura 12). El escutelo a las 0 horas contiene 3.2 mg de sacarosa/g tejido, posteriormente se reduce el contenido de sacarosa 2.6 veces a las 8 h y 9 veces a las 12 h, pero a las 24 h encontramos que la sacarosa aumentó y continúa en aumento para llegar a un valor similar al inicial a las 36 h de imbibición. Por su parte el eje presenta una curva de disminución en el

contenido de sacarosa hasta las 24 h de germinación, para permanecer constante hasta las 60h.

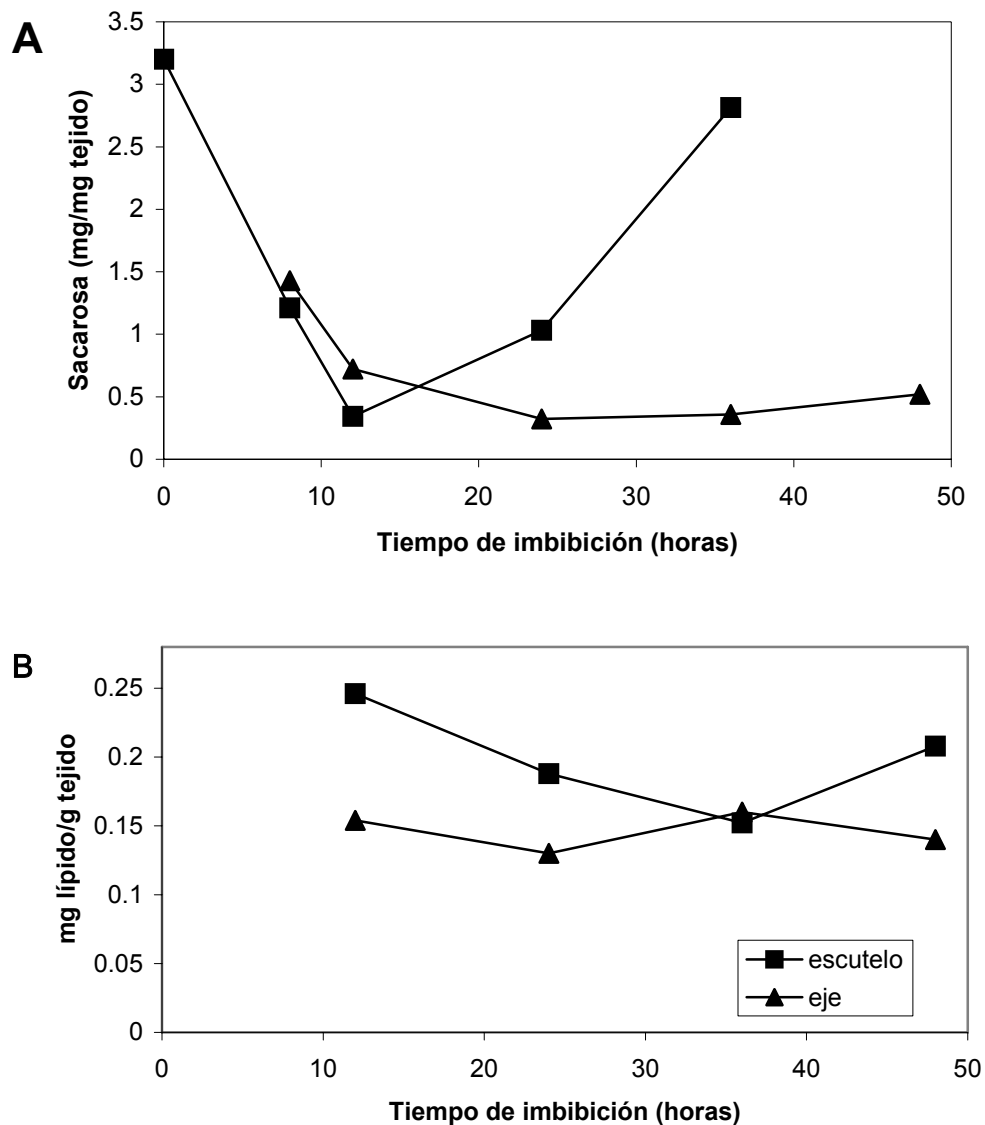


Figura 12. Contenido de sacarosa y lípidos totales en escutelo y eje embrionario de maíz durante la germinación. **A.** Contenido de sacarosa y **B.** Contenido de lípidos totales (Datos obtenidos por Castañón-Contreras, 2007). El experimento se realizó por triplicado, las desviaciones estándar no se aprecian debido a que representan menos del 1% del valor.

El escutelo cuenta con una reserva de lípidos importante que puede ser canalizada al ciclo del glioxilato para producir carbohidratos, fuente de carbono que sustentaría el crecimiento de la plántula hasta que se convierta en un organismo fotosintéticamente

activo y que antes de que la germinación ocurra se utiliza para la producción de sacarosa. Cuantificamos el contenido total de lípidos y encontramos que efectivamente hay una disminución en el contenido de éstos en el escutelo conforme avanza la germinación y hasta las 36 h (Figura 12B). A las 48 h se incrementa, probablemente debido a la nueva formación de tejido en la joven plántula. El tiempo en el que encontramos la máxima reducción en el contenido de lípidos coincide con el tiempo en el que existe la mayor cantidad de sacarosa en el escutelo, las 36 h (Figura 12).

5.3 Perfil de la actividad de las invertasas ácidas a lo largo de la germinación.

La movilización de la sacarosa en los tejidos embrionarios podría ocurrir a expensas de las invertasas ácidas localizadas en la vacuola y en la pared celular, por lo que nos propusimos determinar los niveles de actividad de ambas enzimas durante la germinación y el posterior período temprano post-germinativo.

En la Figura 13 se muestran los resultados de actividad de la Inv-V a lo largo de la germinación en tejido embrionario de maíz. Conforme aumenta el tiempo de imbibición, aumenta la actividad de esta enzima tanto en eje y embrión de maíz, sin embargo, después de las 24 h cuando ya la radícula emergió es cuando se observa el mayor incremento en la actividad para ambos tejidos. La Inv-V del eje presenta mayor actividad respecto a la del embrión completo tanto en la fase germinativa como en la postgerminativa, en la primera es 2.5 a 2.8 veces mayor y en la segunda llega a ser en el punto máximo (30 h) de 5.6 veces más. También los perfiles son diferentes, en el embrión el aumento es gradual durante todo el tiempo del experimento, mientras que en el eje se alcanza un máximo de actividad a las 30 h para después disminuir. Es probable que el incremento en la actividad de la invertasa vacuolar del eje embrionario sea necesaria para demandar la entrada de más carbono para continuar su crecimiento.

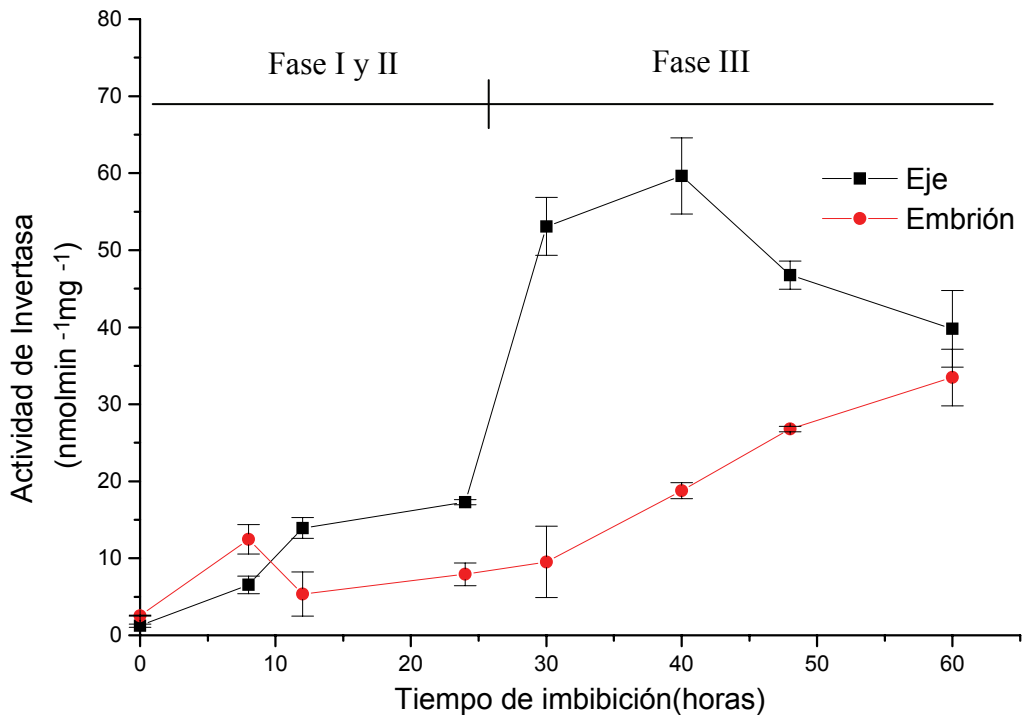


Figura 13. Perfil de la actividad de la Inv-V durante la germinación de los tejidos embrionarios de maíz.

Por su parte, la actividad de la Inv-CW también es baja en las dos primeras fases de la germinación tanto en ejes como embriones, aunque a las 24 horas comienza a aumentar la actividad en el eje embrionario, siendo 4.8 veces mayor que la actividad encontrada en el embrión (Figura 14). La curva de actividad del eje presenta su máximo a las 40 h, 30 veces más actividad que a las 24 h, aún con la disminución posterior en la actividad, estos son mayores que los del embrión. En cuanto a la actividad de la Inv-CW en el embrión a diferentes tiempos de imbibición, encontramos que aumenta gradualmente, al comparar la máxima actividad que hay en el embrión (60 h) con la actividad encontrada entre las 8 y 24 h, resulta que se alcanza 6 veces más actividad. El perfil de actividad de la Inv-CW en ejes embrionarios sugiere que éste es el tejido que está fuertemente demandando nutrientes a partir de las 24 h de la germinación.

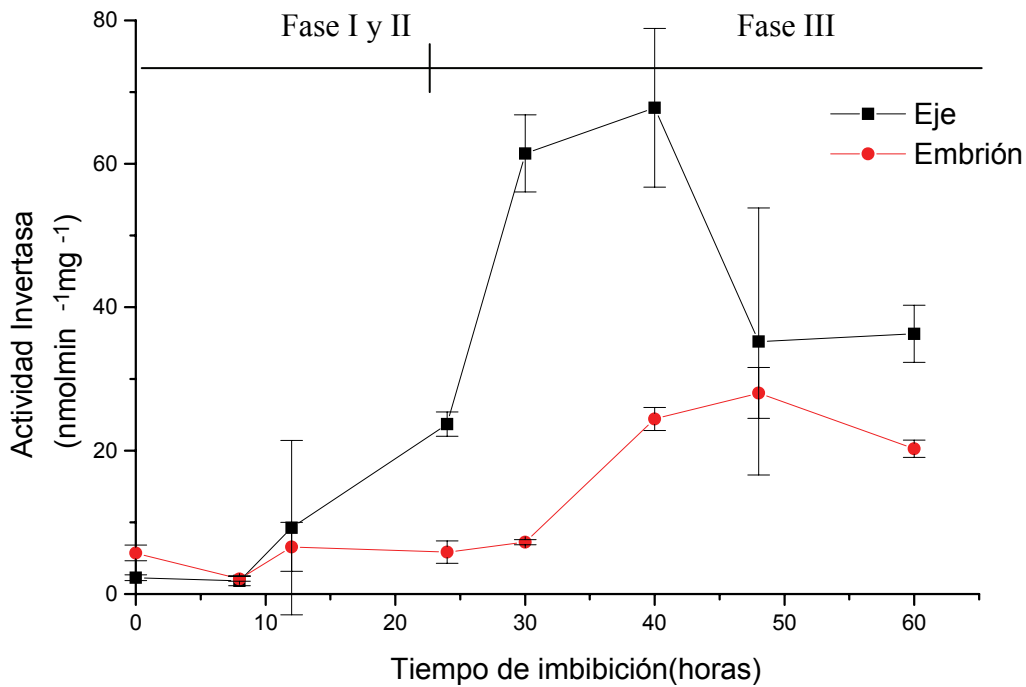


Figura 14. Patrón de la actividad de la Inv-CW durante la germinación de tejido embrionario de maíz.

5.4. Imbibición del tejido embrionario de maíz en diferentes carbohidratos y su efecto en el contenido de carbohidratos solubles.

Para medir el efecto que los carbohidratos tienen en la regulación del flujo de carbono en los tejidos embrionarios, se incubaron los ejes y embriones en diferentes carbohidratos y se analizaron primero los contenidos de carbohidratos solubles en ellos, para después analizar el efecto que se produjo en la actividad de las invertasas ácidas. Debido a que a partir de las 24 h la actividad de la enzima es alta respecto al tiempo cero, realizamos los experimentos en tejido embrionario embebido 24 h.

Los tejidos fueron embebidos en diferentes carbohidratos, en agar sólo o en presencia de sorbitol, estos dos últimos los usamos como controles y la descripción de los efectos de los carbohidratos siempre están referidos a los valores que se encontraron en los controles.

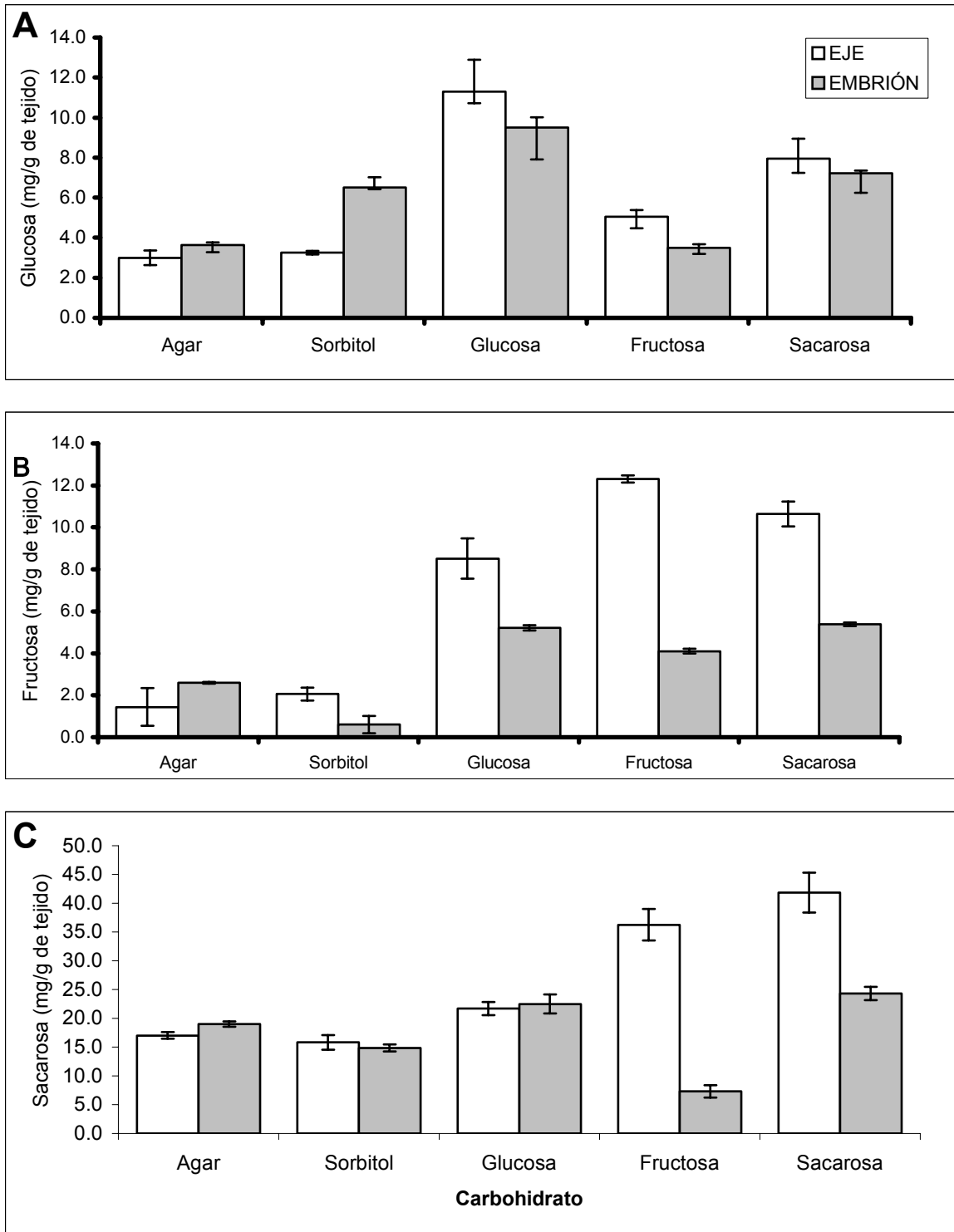


Figura 15. Contenido de carbohidratos en embriones y ejes embrionarios de maíz embebidos en diferentes tipos de carbohidratos. A) Contenido de glucosa, B) contenido de fructosa y C) contenido de sacarosa.

Se encontró que la imbibición del tejido embrionario en glucosa produce una acumulación de ésta tanto en el eje como en el embrión (Figura 15A), 3.6 veces en ejes y 2.4 veces en embriones comparado con la concentración que se obtuvo en Agar. Probablemente 50 mM Glucosa es una cantidad en exceso para las necesidades del tejido embrionario, esto produce que el eje prefiera usar glucosa y la fructosa se llegue a acumular (4.5 veces más fructosa, Figura 15B), aunque ésta elevación en el contenido de fructosa no altera el contenido de sacarosa en el eje (Figura 15C). Contrario a los ejes, los embriones no llegan a producir un aumento alto en el contenido de fructosa cuando el tejido es embebido en glucosa (Figura 15B), probablemente se use como sustrato para la síntesis de sacarosa, aunque no observamos que éste último carbohidrato se acumule (Figura 15C) en el embrión.

La imbibición del eje embrionario en fructosa produce una acumulación en éste carbohidrato (Figura 15B) y también promueve la acumulación de sacarosa, es poco probable que a este tiempo el eje embrionario sea capaz de sintetizar sacarosa con la fructosa disponible, por lo que el efecto que observamos de la incubación con fructosa podría ser una alteración en la utilización de la sacarosa, posiblemente alguna de las invertasas disminuyó su actividad, por lo que observamos un aumento en el contenido de sacarosa (Figura 15C).

Al embeber el eje embrionario en sacarosa, encontramos una acumulación de la sacarosa (5.5 veces) en el eje embrionario pero no en el embrión (Figura 15C), es posible que el eje embrionario tenga un abasto suficiente de carbohidratos, por lo que no utiliza toda la sacarosa que se le añadió. El eje degradó la sacarosa y esto produjo un aumento de 4 y 3.6 veces en el contenido de fructosa (Figura 15B) y glucosa (Figura 15A) respectivamente. El comportamiento del embrión embebido en sacarosa es diferente al del eje, pues el embrión sí fue capaz de usar la sacarosa añadida sin acumularla (Figura 15C), no acumuló fructosa (Figura 15B), aunque sí aumentó en 2 veces su contenido de glucosa (Figura 15A).

En resumen, comparado con el embrión completo, el eje embrionario responde de manera diferente en cuanto a la acumulación de glucosa, fructosa y sacarosa. Al parecer, el primero es capaz de modular su actividad metabólica de una manera diferente a la del eje, lo que le permite mantener sus concentraciones de carbohidratos solubles, en cierto intervalo, independientemente, de si es expuesto o no a carbohidratos.

5.5 Niveles de actividad de la invertasa vacuolar de tejido embrionario embebido en diferentes carbohidratos.

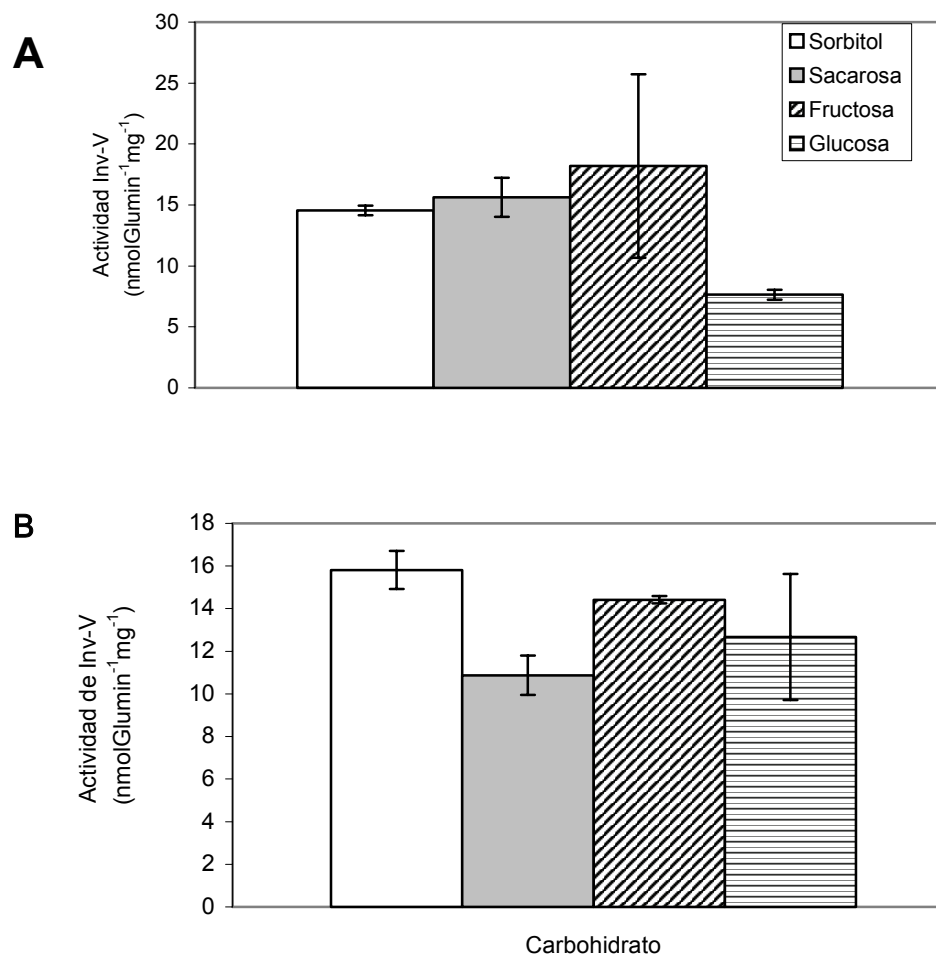


Figura 16. Actividad de la Inv-V de tejido embrionario de maíz embebido en diferentes carbohidratos. A) Ejes embrionarios y B) embriones. Ambos tejidos se embebieron por 24 h en 50 mM de los diferentes carbohidratos.

La incubación de los ejes embrionarios en carbohidratos sólo modificó la actividad de la Inv-V cuando el carbohidrato añadido fue glucosa y produjo un decremento del 50% en la actividad de la Inv-V al compararla con la actividad que se encontró al embeber el tejido en sorbitol (Figura 16A). Mientras que en los embriones, la reducción en la actividad sólo ocurrió cuando se embebió el tejido en sacarosa, observándose 32% menos actividad que en el control (Figura 16B).

Para obtener mayor información sobre cual era el efecto de la incubación con glucosa en la actividad de las invertasas ácidas, se realizaron cinéticas de saturación de la enzima con su sustrato, la sacarosa: tanto en ejes embrionarios como en embrión fueron incubados con glucosa, sacarosa y agar. En la Figura 17A se muestra que la actividad de la enzima obtenida de cualquiera de las condiciones en las que se incubaron los ejes embrionarios, presenta una cinética de actividad de tipo Michaeliano, es decir las curvas describen una hipérbola cuadrática. Las curvas descritas mediante la versión linearizada de Michaelis hecha por Hanes, nos proporcionaron líneas rectas que presentan un valor de regresión lineal cercano a 1, lo que nos sugiere nuevamente que tenemos una invertasa ácida con cinética de tipo Michaeliano (Figura 17B).

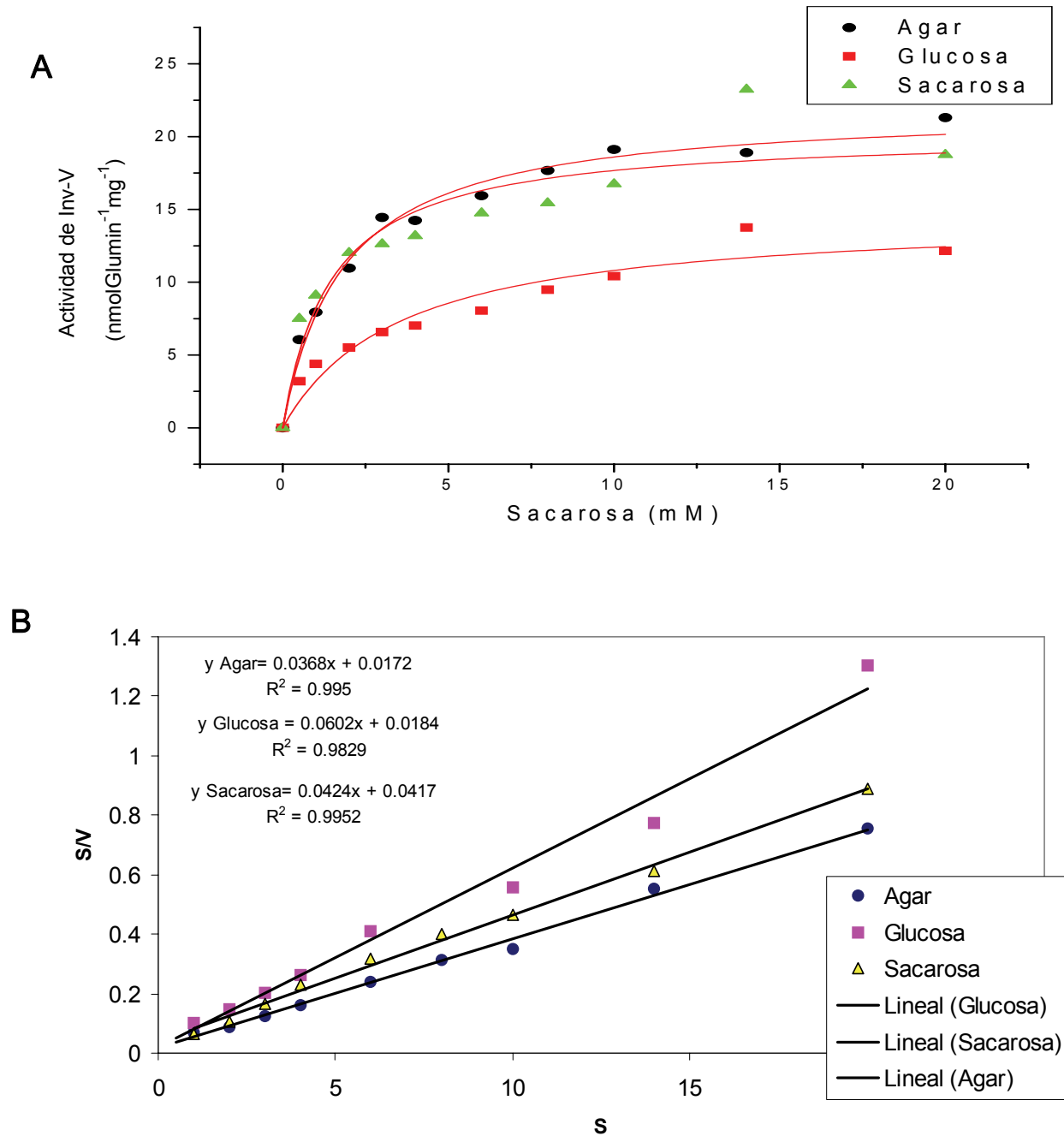


Figura 17. Curvas de saturación con sacarosa de la actividad de Inv-V de ejes embrionarios de maíz. A) Cinética de la actividad de Inv-V a diferentes concentraciones de sustrato. B) Regráfico de Hanes de los datos en A. Las rectas que pasan por los puntos experimentales fueron obtenidas mediante regresión lineal, misma que se muestra para cada tratamiento. Cuando en el gráfico de Hanes los datos se ajustan a una línea recta, se sugiere que la enzima presenta un comportamiento Michaeliano. El recíproco de la pendiente de la curva es la Vmax y la intersección en el eje de las abcisas es la Km.

Tabla 3. Efecto de la glucosa y sacarosa en los parámetros cinéticos de la Inv-V de los ejes embrionarios de maíz. Los valores de Km y Vmax fueron obtenidos de los datos que arrojó la regresión lineal de la gráfica de Hanes (Figura 17B).

Incubación en:	Km (mM)	Vmax (nmolGlumin⁻¹mg⁻¹)
Agar	0.47	27.17
Glucosa	0.31	16.61
Sacarosa	0.98	23.59

Los valores de Km y Vmax se presentan en la Tabla 3, se observó que la Vmax de la enzima es menor (39% menos que el control) cuando se embeben los ejes embrionarios en glucosa, como ya habíamos notado cuando se media la actividad a 100 mM de sacarosa, pero la Km de la enzima no cambia, esto sugiere que hay una reducción en la cantidad de proteína o bien a que pudiera haber ocurrido una mayor síntesis de la proteína inhibidora de la invertasa vacuolar y entonces ésta se está uniendo a la enzima, disminuyendo así la cantidad de enzima disponible para la catálisis. Mientras que, aún cuando no detectamos cambios en la actividad de la Inv-V al embeber el tejido en sacarosa, sí observamos que la Km para la enzima aumenta.

Se analizó también el efecto de la incubación de los embriones en carbohidratos en los parámetros cinéticos de la Inv-V. Se midió la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato y los datos experimentales fueron ajustados a una hipérbola cuadrática utilizando el programa MicroCal Origin 3.0 (Figura 18A). Como se observa los datos no se ajustan bien a esta curva. Al realizar el regráfico de Hanes, se observa, que no describen con claridad una sola recta, sino dos, lo que sugiere que hay más de una enzima en la preparación o que la enzima no presenta un comportamiento Michaeliano. Se sabe que la enzima no presenta cooperatividad ni respuesta a ningún efector alostérico natural, pero en maíz se ha reportado que existen dos genes para las invertasas vacuolares (Xu et al., 1996), por lo que es probable que ésto es lo que estamos observando en los datos cinéticos de la enzima.

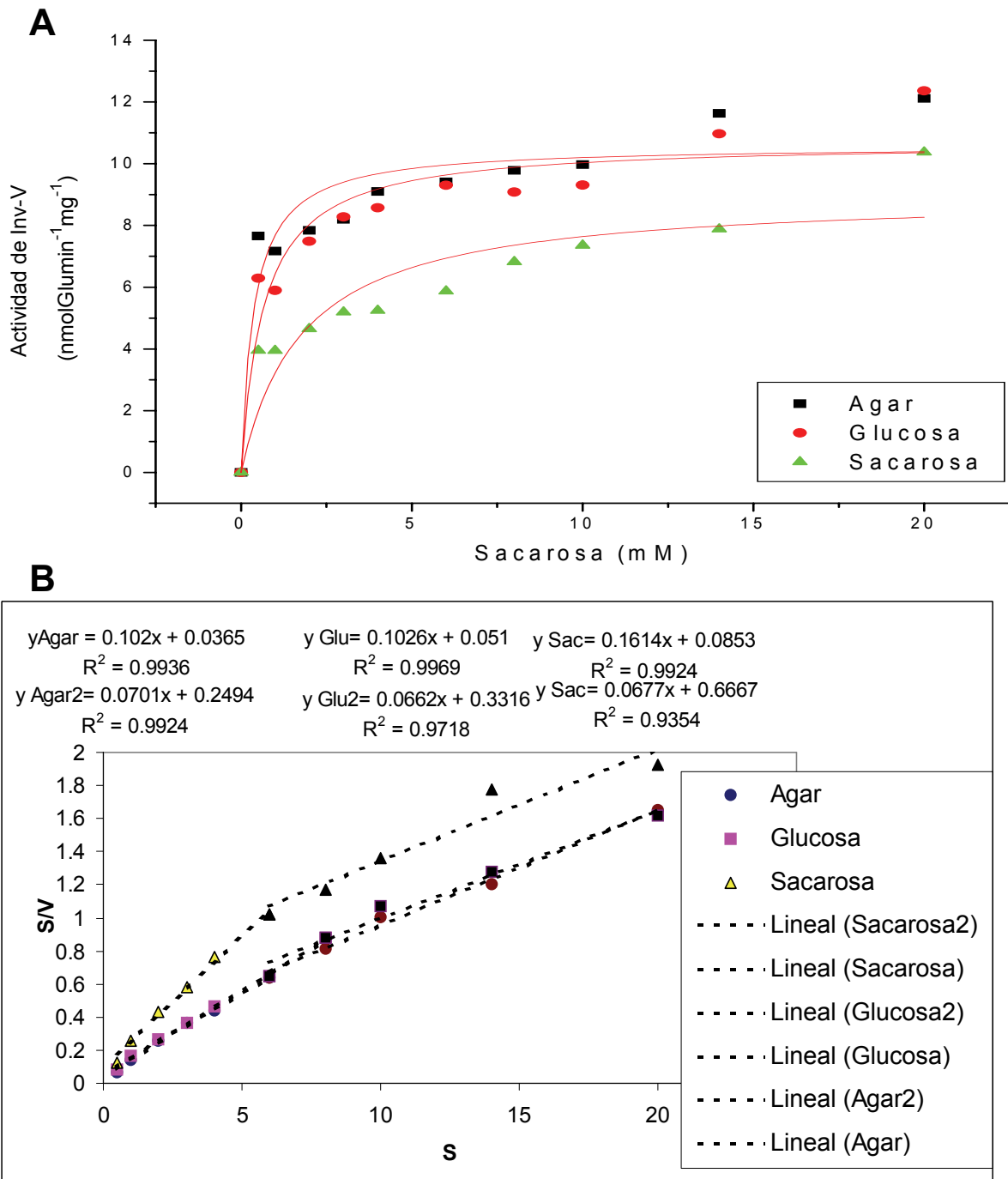


Figura 18. Curvas de saturación con sacarosa de la actividad de Inv-V de embriones de maíz. A) Cinética actividad de Inv-V a diferentes concentraciones de sustrato. B) Re gráfico de Hanes de los datos en A. Los valores de regresión de las dos rectas que se describen para cada una de los tratamientos de los embriones se muestran en la gráfica. Con el anterior tratamiento se obtuvieron los valores de Km y Vmax de las dos posibles enzimas, las cuales se muestran en la Tabla 4.

El embrión se encuentra formado del eje embrionario y el escutelo, es probable que estemos observando que el escutelo presenta otra enzima diferente a la encontrada en el eje embrionario. Por lo anterior, se trazaron dos líneas rectas sobre los datos que fueron graficados según Hanes, la primera desde 0.5 hasta 6 mM de sacarosa y otra de 6 a 20 mM del sustrato. A partir de los datos de regresión de cada una de las curvas se obtuvieron los parámetros cinéticos para las dos posibles enzimas presentes en la preparación de tejido embrionario de maíz.

Tabla 4. Efecto de la incubación con glucosa y sacarosa en los parámetros cinéticos de las Inv-V de los embriones de maíz. Los valores de Km y Vmax de dos enzimas en cada extracto enzimático, fueron obtenidos de los datos de regresión lineal mostrados en la gráfica de Hanes (Figura 18B).

Incubación en:		Km (mM)	Vmax (nmolGlumin⁻¹mg⁻¹)
Agar	Enz1	0.36	9.80
	Enz2	3.55	14.27
Glucosa	Enz1	0.49	9.74
	Enz2	5.0	15.10
Sacarosa	Enz1	0.53	6.20
	Enz2	9.85	14.77

La Enzima1 de cada preparación de embriones presentó una Km en el intervalo de 0.36 a 0.53 mM, un valor similar al encontrado en la preparación de ejes embrionarios de maíz (Tabla 3). La Enzima 2 presentó valores de Km al menos 10 veces mayores al de la Enzima1 encontrada en los tres tratamientos examinados.

La imbibición de los embriones en sacarosa produce una disminución en la actividad máxima de la Inv-V (Figura 18A), tal y como observamos cuando se midió la actividad a 100 mM del sustrato (Figura 16B). Al comparar los parámetros cinéticos de las enzimas presentes en esta preparación con las encontradas al embeber el tejido en agar y glucosa, encontramos que la diferencia se encuentra en la Vmax que presenta la Enzima1, que es 2.8 veces menor a la encontrada en la enzima de embriones embebidos en Agar.

5.6 Niveles de actividad de la In-CW de tejido embrionario embebido en diferentes carbohidratos.

La actividad de la invertasa ácida de la pared celular de ejes fue mayor a la encontrada en los embriones de maíz, tal y como observamos anteriormente en la Figura 14, sin embargo, en ninguno de los dos tejidos se encontró que la invertasa de la pared celular cambiara en actividad al ser embebido el tejido en diferentes carbohidratos (Figuras 19A y B).

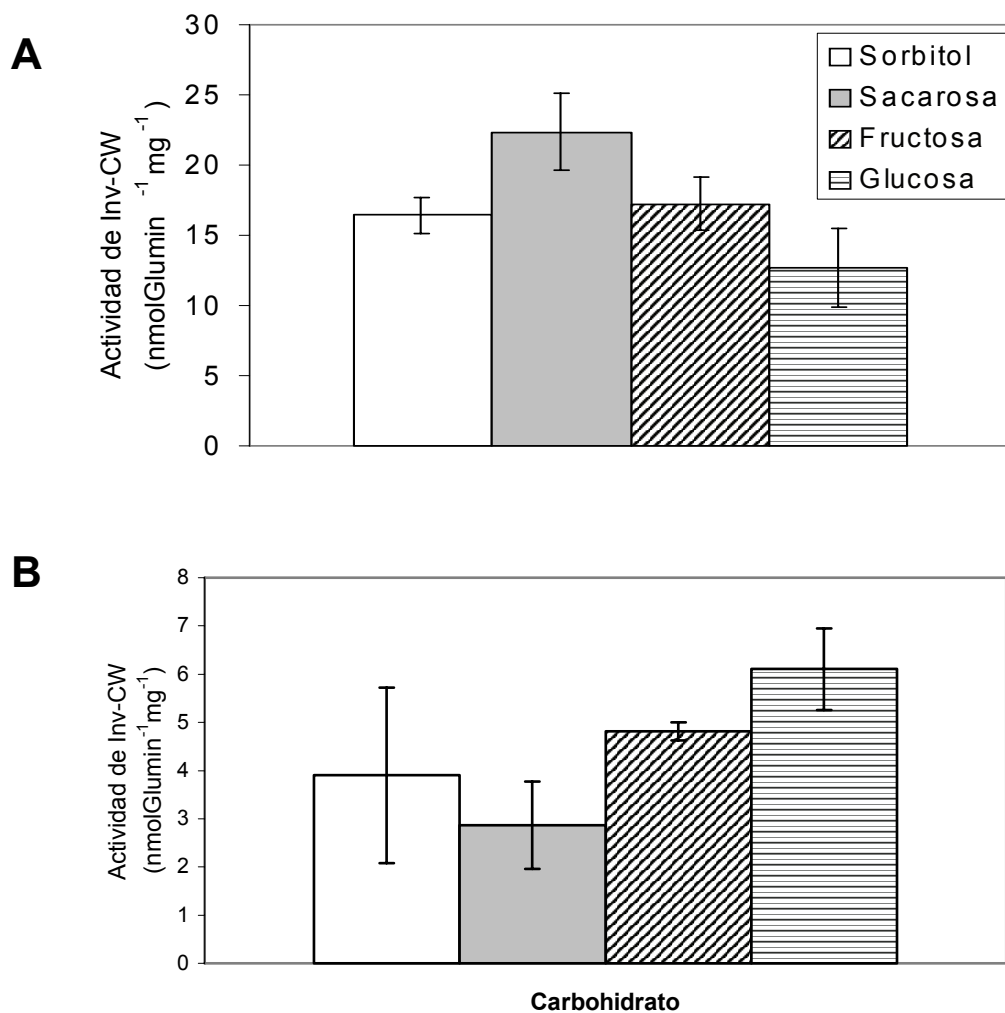


Figura 19. Actividad de In-CW de tejido embrionario de maíz embebido en diferentes carbohidratos. A. Ejes embrionarios y B. Embriones de maíz, embebidos en 50 mM de sorbitol, sacarosa, glucosa o fructosa.

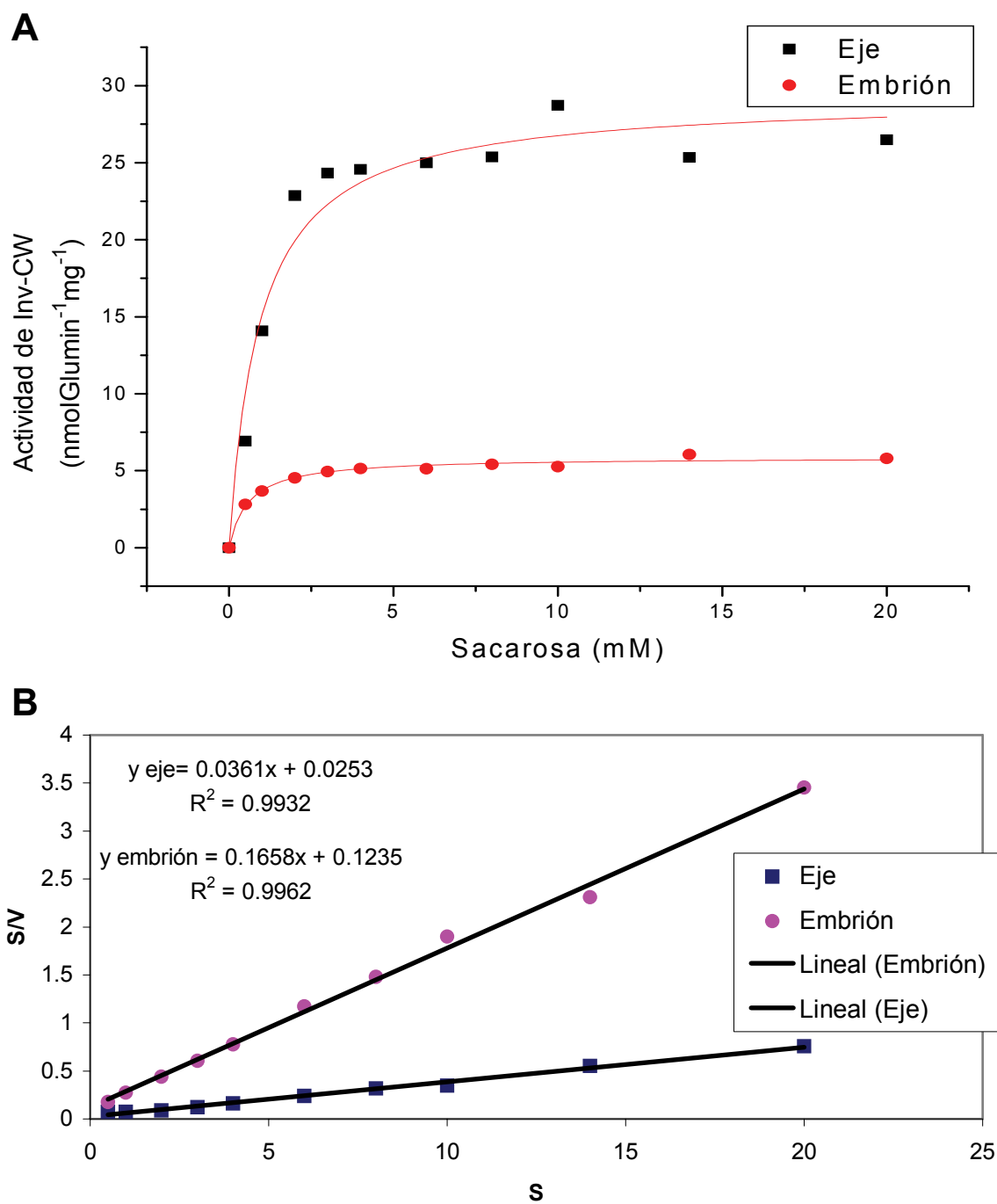


Figura 20. Curvas de saturación de sustrato las In-CW de tejido embrionario de maíz. **A.** Cinética de actividad de las Inv-CW, **B.** Gráfico de Hanes de los datos en A. A partir de los datos de regresión lineal se obtuvieron los datos cinéticos. En ejes embrionarios la Km es de 0.7 ± 0.2 mM y la Vmax de 27.7 ± 1.2 nmol Glumin⁻¹mg⁻¹; en embriones, la Km es de 0.75 ± 0.06 mM y la Vmax de 6.03 ± 0.11 nmolGlumin⁻¹mg⁻¹.

Se determinaron los parámetros cinéticos de la Inv-CW de los ejes y embriones de maíz sólo cuando fueron embebidos en agar, encontrándose que ambas enzimas presentan comportamiento Michaeliano. La afinidad por el sustrato es similar entre la enzima de ejes y embriones, 0.7 mM; pero la V_{max} de la enzima en los ejes embrionarios es 4.6 veces mayor a la de los embriones. Lo anterior sugiere que hay una mayor cantidad de la enzima en los ejes o bien a que no hay cantidades similares del inhibidor natural de la enzima en ejes que en embriones.

DISCUSIÓN.

Movilización de carbohidratos solubles y lípidos durante la germinación del tejido embrionario de maíz.

La germinación es un proceso que esencialmente comienza y necesita del aporte de agua, ya que la semilla seca se encuentra generalmente con contenidos de humedad bajos (5 a 15%) y la entrada de agua permite la rehidratación de los componentes celulares y la activación de los procesos bioquímicos para conducir a la semilla hacia la formación de una nueva planta. El final del proceso de germinación se ha definido como la aparición o emergencia de las estructuras de la nueva plántula, que en el caso del maíz es la radícula. La movilización de reservas de la semilla se ha descrito que ocurre en tiempos cercanos a la emergencia de la radícula, pero que en realidad corresponde a la movilización masiva de las reservas generalmente almacenadas en tejidos extraembrionarios y que es el abasto importante de nutrimentos en el periodo comprendido desde la salida de la radícula hasta que la plántula se transforma en un organismo fotosintéticamente activo (Bewley y Black, 1994; Bewley, 2001).

Sin embargo, durante la etapa germinativa, también se requerirá de la movilización de reservas para la producción de energía, la síntesis de nuevos compuestos como los nucleótidos, proteínas, pared celular, y membranas entre otros. Las moléculas que funcionan como reservas durante la germinación son la sacarosa, la glucosa, la fructosa, la estaquiosa, la rafinosa, las proteínas, aminoácidos y los lípidos que generalmente se encuentran en el propio tejido en crecimiento o en la vecindad de éste.

Examinamos la movilización de reservas durante la germinación y el estadio temprano posgerminativo, principalmente como la movilización de algunos carbohidratos solubles. Encontramos que esencialmente la sacarosa es el carbohidrato que es movilizadо rápidamente durante el periodo germinativo, el eje embrionario desnudo es capaz de movilizar alrededor del 57% de la sacarosa en las primeras 8 h, similar a la velocidad de degradación de la sacarosa por el embrión,

64% en 8 h. Sin embargo, el eje embrionario llega a consumir a las 40 h el 94% de la sacarosa que contenía desde el día 0, mientras que el embrión degrada el 85% del contenido inicial de sacarosa en 24 h, tiempo después empieza a acumular sacarosa.

A pesar de que en general se minimiza el papel de la movilización de reservas en el periodo germinativo, algunos autores colocan en sus medios de imbibición o germinación a la sacarosa como fuente carbonada (Eastmond *et al.*, 2000; Stacey *et al.*, 2006). En un estudio en maíz, encontraron que los ejes embrionarios de maíz son capaces de alcanzar el 75 a 80% de germinación en ausencia de sacarosa y aún cuando se aumente la concentración de sacarosa en el medio (0.1 a 10%) el aumento en el porcentaje de germinación es mínimo. Pero lo que sí se modifica al colocar a los ejes embrionarios en sacarosa es que éstos acumulan un mayor peso seco, sobre todo a concentraciones mayores de 1% de sacarosa. También la longitud de la plántula que se produce es mayor si se coloca al eje embrionario a beber en sacarosa, desde concentraciones tan bajas como 0.1%, aunque concentraciones de 10% de sacarosa en el medio disminuyen la longitud de la plántula, probablemente debido a efectos osmóticos (Styer y Cantliffe, 1984). Lo anterior sugiere que el uso de la sacarosa en el eje embrionario es un requisito no para una germinación exitosa, sino para la producción de una plántula vigorosa.

En *Arabidopsis* se demostró que la adición de glucosa más aminoácidos al medio de cultivo es capaz de atenuar la inhibición que el ácido abscísico produce en la germinación, lo que corrobora que la movilización de las reservas durante el periodo germinativo es necesaria para continuar con la emergencia de la radícula y llevar al desarrollo vigoroso de la plántula (Garcarrubio *et al.*, 1997)

In vivo, la fuente de la sacarosa adicional en el eje embrionario de maíz durante la germinación es el escutelo, ya que como observamos, el embrión es capaz de empezar a acumular sacarosa después de las 24 h, resultado del equilibrio entre su síntesis y uso (transporte y metabolismo). Corroboramos que la sacarosa se encontraba en el escutelo, observando que después de las 12 h comienza su

acumulación y que la síntesis puede ocurrir a través del uso de los productos de la degradación de los lípidos.

La degradación de lípidos es un evento temprano en la germinación, comienza aún antes de que la hidratación llegue al 30% ya que las lipasas son activas a concentraciones de agua tan bajas como el 3% (Bewley y Black, 1994). En este estudio observamos que antes de las 24 h hay una degradación activa de lípidos, es decir la degradación comienza antes de que observemos la acumulación de sacarosa.

Los triacilgliceroles son una de las fuentes de carbono del tejido embrionario, su hidrólisis produce glicerol y ácidos grasos. El primero entra a la vía glucolítica a nivel de la dihidroxiacetona-fosfato, mientras que los ácidos grasos se transformarán por la β -oxidación en acetil-CoA. La acetil-CoA puede ser utilizada en varios procesos, precursor de la síntesis de nuevos ácidos grasos para las membranas, sustrato respirable en la mitocondria y del cual se podrán obtener moléculas con enlaces de alta energía y poder reductor, o bien como sustrato para la formación de nuevas moléculas de carbono como sacarosa, a través del ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis (Eastmond y Graham, 2001).

A pesar de que se ha postulado que la degradación de lípidos se usa esencialmente para la síntesis de sacarosa, se ha observado en diferentes especies que al inicio de la germinación el carbono es utilizado en la respiración, que sería una de las fuentes iniciales de poder reductor y energía. Eastmond y colaboradores (2000), sugieren que lo anterior está ocurriendo, ya que semillas de *Arabidopsis* denominadas icl-1 e icl-2, mutantes que son incapaces de sintetizar a la isocitrato liasa, son capaces de germinar y presentan una degradación de lípidos y producción de CO₂ (respiración) ligeramente mayor a la de las semillas silvestres, además de un decremento entre 5 a 10 veces en los carbohidratos solubles. No obstante el desarrollo posterior de la plántula se detiene si no hay una fuente adicional de carbono en forma de azúcares.

El ciclo del glioxilato es una variante del ciclo de Krebs, en el que se utilizan dos unidades de acetil-CoA para la producción de 1 molécula de 4 carbonos, el succinato. Posteriormente, el succinato es usado en el ciclo de Krebs para la formación de malato, el cual sale de la mitocondria en forma de oxalacetato, sustrato de la gluconeogénesis. La preservación de las moléculas de carbono del acetil-CoA son las que llevarán al final a la síntesis *de novo* de carbohidratos. Los transcritos de las dos enzimas clave en este proceso, la isocitrato liasa y la malato sintasa, se incrementan en tiempos cercanos a la protrusión de la radícula, permaneciendo transitoriamente hasta que la plántula es fotosintéticamente activa (Eastmond y Graham, 2001). En escutelos de maíz se ha medido la actividad de las dos enzimas regulatorias del ciclo del glioxilato, iniciando su actividad a las 24 h, después aumentan para alcanzar un máximo a los 4 días, pero a los 7 días la actividad es exigua (Longo y Longo, 1970). Sabemos que los embriones germinan alrededor de las 24 h y que es a partir de este tiempo en el que encontramos un aumento en el contenido de sacarosa. Sería interesante conocer si la sacarosa se sigue incrementando y es semejante a lo que Longo y Longo observaron respecto a la actividad de la isocitrato liasa y la malato sintetasa, además de conocer si la concentración tan baja que se encuentra en los ejes a las 24 h, es una de las señales que le permite al escutelo comenzar la síntesis de sacarosa en el embrión. Lo anterior lo sugerimos, ya que varios trabajos han encontrado que la degradación de lípidos de reserva o la de la actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato se retarda cuando se añade sacarosa o glucosa al medio en donde germina el tejido embrionario (Longo y Longo, 1970; To *et al.*, 2002).

La In-CW en la movilización de sacarosa del tejido embrionario de maíz.

La utilización de la sacarosa como fuente de carbono y energía, depende de su hidrólisis hacia hexosas. Se han involucrado a las invertasas como enzimas importantes en el control de la diferenciación de las células y en el desarrollo de las plantas, a través de su capacidad de regular los niveles de hexosas en ciertos tejidos específicos, coordinando la capacidad de aporte de las células fuente con la de la

toma de las células demanda (Sturm, 1999). En este estudio tenemos que los ejes embrionarios son un tejido fuertemente demandante de nutrimentos, mientras que el escutelo es un tejido fuente, por lo que las invertasas son enzimas que deben estar funcionando activamente durante la germinación. Adicionalmente, era interesante conocer la capacidad de las invertasas durante la germinación del tejido embrionario de maíz, debido a que en experimentos previos en el laboratorio han demostrado que a pesar de que el eje embrionario requiere de nutrimentos, no es capaz de tomar la sacarosa del medio, debido a que no contiene transportador de sacarosa (Greaves-Fernández, 2001; Zavala-Zendejas, 2001), por lo que serían las hexosas producidas de la hidrólisis de la sacarosa en los apoplastos, las que estarían transportándose y soportando la actividad de las células del eje embrionario.

Observamos que la actividad de la invertasa de la pared celular es baja y similar en ejes y embriones en las primeras 12 h de imbibición, pero a las 24 h el eje embrionario aumenta su actividad rápidamente alcanzando su máximo a las 40 h, que fue 16 veces más alta que la actividad en el eje embrionario seco. Por su parte el embrión, aumentó su actividad a partir de las 40 h pero no logra alcanzar la actividad que se presenta en el eje embrionario. Lo anterior es sugerente de que el eje embrionario se está comportando como un tejido fuertemente demandante de nutrimentos, a través de una actividad alta de su invertasa de pared celular.

El valor de K_m para la enzima presente en ejes y embriones es de 0.7 mM, su alta afinidad le permitiría hidrolizar la sacarosa que las células del escutelo se encuentran transportando a los apoplastos. Debido a que la velocidad de la enzima en el eje embrionario es 4.6 veces mayor a la del embrión, sugerimos que la sacarosa que se le llega a escapar a la invertasa de pared celular del escutelo, es transportada hacia el floema que conecta al eje embrionario y ya en el apoplasto del eje embrionario es hidrolizada. Postulamos lo anterior debido a que esto ocurre en las plantas adultas, en donde la actividad de la invertasa de pared celular de las hojas es nula o baja, mientras que después de que la sacarosa es movilizada a través del floema, los tejidos demanda presentan una actividad alta de su invertasa apoplástica, lo anterior

para abastecer de las hexosas al tejido demanda, para incrementar la fuerza de demanda del tejido y también para la producción de las señales del desarrollo (Roitsch *et al.*, 2003).

En el proceso del desarrollo de semillas de avena se observó que la invertasa de la pared celular aumenta al cuarto día después de la antesis¹, para posteriormente disminuir gradualmente y llegar al día 12 con una actividad mínima. La mayor actividad se encuentra en el tiempo preciso en el que el tejido se encuentra en la fase de rápido crecimiento y la alta concentración de hexosas podría ser la responsable del avance de la actividad mitótica del embrión en desarrollo (Weschke *et al.*, 2003). Durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz, observamos que la actividad de la invertasa de pared celular se incrementa desde el tiempo cero hasta las 8 h, pero la mayor actividad se encuentra a tiempos posteriores a la salida de la radícula, 30 a 40 h, que es el intervalo de tiempo en donde hay mayor actividad de las invertasas, tiempos en los que probablemente el eje está solicitando el aporte mayor de nutrimentos del escutelo.

Lo anterior también se ha observado durante el desarrollo de la semilla de maíz, en donde la invertasa de pared celular tipo 2, INCW2, se expresa temporalmente y coincidentemente con las células del endospermo en división (Cheng y Chourey, 1999).

¿Cuáles serían las señales para solicitar el aporte de más nutrimentos?, sugerimos a los carbohidratos y las hormonas, ya que se ha postulado que la expresión de las invertasas ácidas es regulada por estos factores. En *Arabidopsis*, la adición de GA4 (giberelina tipo 4, una giberelina activa) induce a las invertasas tanto vacuolares como a una de pared celular (Mitsuhashi *et al.*, 2004). En nuestro sistema experimental, la germinación, se conoce que a tiempos cercanos a la salida de la

¹ **Antesis.** Fase de expansión de una flor en la cual se libera el polen de las anteras. (Quijada Rosas 1992)

radícula se incrementa la síntesis y transporte de giberelinas, lo que ayuda a la movilización del almidón de las reservas del endospermo (Thomas y Rodríguez, 1994). Por lo que es de esperarse que la inducción de la síntesis de α -amilasa no sea la única que responda al giberélico y que las invertasas podrían también verse afectadas por la presencia de la hormona, sola o en conjunto, al nivel de carbohidratos presentes en ese estadio del desarrollo. El nivel de carbohidratos se conoce que es necesario, ya que la reducción de carbohidratos en los escutelos de avena durante la germinación lleva a la estimulación de la síntesis y liberación de GA y cuando el nivel de carbohidratos se incrementa por el aumento en la degradación de almidón o por la actividad metabólica del tejido, se reduce la síntesis de GA (Thomas y Rodríguez, 1994).

En cuanto a la regulación de la Inv-CW del tejido embrionario de maíz por azúcares, encontramos que 24 h de imbibición del tejido embrionario en sacarosa, glucosa o fructosa no modifican la actividad de la invertasa de la pared celular tanto del eje como del embrión. Es probable que la concentración o el tiempo de exposición en los carbohidratos solubles no sea la adecuada para inducir la expresión de la enzima, o bien de reprimir a su inhibidor natural, ya que en cultivos de maíz en desarrollo se ha encontrado que cuando se mantienen por 14 a 16 días en un cultivo sin carbohidrato, la actividad de la Inv-CW1 es 5.1, 5.3 y 4.1 veces menor que cuando se añade 15% de sacarosa, fructosa y glucosa, respectivamente (Cheng y Chourey, 1999). Otra explicación podría ser que a las 24 h la actividad ya sea la máxima para la concentración de carbohidratos que se encuentra en ese momento, y que la adición de más carbohidratos no muestre un impacto en la producción de más enzima y por tanto mayor actividad. Aunque también podría necesitarse un efecto conjunto de cierta concentración de GA y de carbohidratos para estimular la transcripción de los genes de la invertasa de la pared celular, y que con 24 h de exposición al carbohidrato todavía no se alcanza.

Lo que sí observamos cuando el tejido se embebe en carbohidratos, es el cambio en el contenido de carbohidratos, lo cual era sugerente de un cambio en la actividad de

uso de sacarosa. Por ejemplo, la imbibición de los ejes embrionarios en sacarosa y fructosa ocasiono un incremento en sacarosa y fructosa de más de 2 veces, aunque glucosa también da aumento ligero. Lo que indica que el eje embrionario se encuentra en un estado metabólico distinto que cuando se embebe el tejido en agar. Cuando se embebe en sacarosa, el tejido debe degradar más sacarosa, por lo que produce más glucosa y fructosa, siendo glucosa un metabolito más fácilmente asimilable, el tejido empieza a acumular la fructosa. Ésto lo postulamos ya que la mayor parte de las hexocinasas presentan Kms por glucosa en el rango micromolar, 30-100 μM , mientras que la Km para fructosa se encuentran en el intervalo milimolar, 2.5 a 26 mM (Tabla I en López-Hernández, 2007). Al embeber el tejido en fructosa, el eje disminuye su actividad de hidrólisis de sacarosa, ya que es un tejido que a las 24 h no tiene la capacidad de sintetizar sacarosa, lo que lleva a una acumulación de sacarosa y de la propia fructosa. Ya que en el eje la actividad de la invertasa de pared celular no se afecta por la imbibición de carbohidratos, la otra posible explicación es que se encuentre modificado el metabolismo de la sacarosa en el interior de las células y no en los apoplastos.

La Inv-V en la movilización de sacarosa.

Durante las fases I y II de la germinación (0 a 24 h) las Inv-V se activan, en las primeras 8 h la actividad de invertasa vacuolar en el embrión es mayor que la del eje embrionario, sin embargo a las 12 h el patrón cambia y el eje embrionario es el que presenta la mayor actividad. La actividad de la invertasa responde a la necesidad de movilizar la sacarosa almacenada en la vacuola y coincide con la disminución en el contenido de sacarosa que se detectó durante esta etapa en el eje y el embrión, 42 y 37.5% menos sacarosa a las 8 h, respectivamente.

En la fase III o posgerminativa, la actividad de la invertasa vacuolar del embrión aumenta gradualmente, mientras que la actividad en el eje presenta un máximo a las 36 h. Durante todo el tiempo examinado de las 24 a las 60 h, el eje embrionario

presenta mayor actividad que el embrión, lo que coincide con la escasa cantidad de sacarosa que se detecta en este tejido a estos tiempos, 5% de la que presentaba al tiempo 0 y sugiere que el eje embrionario se encuentra, atrayendo nutrientes para potenciar su crecimiento a través de su actividad de Inv-V.

En semillas de maíz se ha descrito la presencia de dos isoformas de invertasas vacuolares, aunque en otras plantas como en avena se han descrito no sólo invertasas sino también fructosiltransferasas. En arroz se han encontrado 19 genes putativos de invertasas, 9 de ellos de pared celular, 2 de enzimas vacuolares y 8 alcalinos o neutros (Ji *et al.*, 2005).

En los ejes embrionarios de maíz detectamos una Inv-V con una Km para sacarosa de 0.3 mM y en los embriones completos encontramos una Inv-V más con una Km 10 veces mayor 3.5 mM. La invertasa puede presentar valores de Km variados dependiendo de la isoforma en una misma planta o en diferentes plantas, de 5 mM en Arabidopsis para la INV1 e INV3, en fresa de 3.5 mM, en avena de 8.1, 1 y 1.7 mM para las invertasas I, IIA y IIB, en azucena 1, 6.4 y 6.6 mM para IT1, IT2 e IT3 y en la pera japonesa 3.3 y 4.6 mM AIV I y AIV II (Hashizume *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 1994; Obenland *et al.*, 1993; Randwala *et al.*, 1992, Tang *et al.*, 1996). Por lo anterior, el valor de Km encontrado en el embrión del maíz es semejante a los encontrados en otras plantas y podría corresponder a una forma específica localizada en el escutelo o bien a una forma de enzima que aparece en el eje embrionario cuando se encuentra en el embrión completo. Mientras que la forma presente en el eje embrionario, presenta una Km ligeramente menor a las descritas.

La actividad de la invertasa soluble durante la primera parte del desarrollo del maíz es crítica, aunque también se ha sugerido como necesaria en muchas estructuras que se encuentran en el proceso de alargamiento como los tallos, vainas, flores y en ciertos estadios del crecimiento de las hojas (Xu *et al.*, 1996). En maíz se han identificado dos genes para invertasas, *lvr1* e *lvr2*, con un nivel de expresión diferente tanto en diferentes tejidos como en el desarrollo, el transcrito de *lvr1* tiende

a encontrarse en estructuras reproductivas (antera madura, corona del grano), mientras que *Ivr2* se distribuye en un espectro más amplio de tejidos no sólo los reproductivos sino también los tejidos demanda (Xu et al, 1996).

Ambos genes responden a la disponibilidad de carbohidratos, pero de manera diferente, el transcrito para *Ivr1* disminuye gradualmente conforme las células están sujetas a condiciones de ayuno a carbohidratos, llegando a no ser detectado a las 48 h. Concentraciones elevadas de glucosa (2 y 4%) reprimen su transcripción, mientras que *Ivr2* responde de manera opuesta, el transcrito de *Ivr2* drásticamente se degrada después de 12 h sin el suministro de carbohidratos, pero se induce con concentraciones tan bajas de glucosa como del 0.2% y mantiene ese nivel aún con 4% de glucosa. Lamentablemente no se tiene información en la literatura de la K_m para sacarosa de las dos invertasas vacuolares que nos pudiera ayudar a asignarles el nombre adecuado a las enzimas que encontramos. Sin embargo, por el efecto de la incubación en carbohidratos sobre la actividad las enzimas, sugerimos que la forma de enzima que se encuentra en el eje embrionario podría ser producto del gen *Ivr2*, ya que con 24 h de exposición a glucosa, la actividad de la enzima disminuye un 39% y al embeber a los ejes en sacarosa, a pesar de no ocurrir un cambio en la V_{max} de la enzima, la K_m se incrementa ligeramente. Cuando se midió la actividad de Inv-V en el embrión, la forma con la K_m baja que correspondería a la enzima que se encuentra en el eje se ve afectada en su actividad máxima cuando el embrión es embebido en sacarosa, disminuyendo la actividad un 37%. Lo que es indicativo de que la forma de enzima en el eje es más sensible a la exposición de carbohidratos que la forma que se encuentra en el embrión completo y que podría corresponder al escutelo.

Generalmente se ha observado que las invertasas se modulan por carbohidratos, en este trabajo se encontró que la invertasa vacuolar que corresponde a la de alta afinidad por sacarosa se inhibe por glucosa y por sacarosa, aunque en este último caso sólo cuando se encuentra cubierto el eje por el escutelo, debido a que la V_{max} disminuye y su K_m no cambia, el efecto de la incubación podría deberse a un cambio

en la cantidad de enzima que se sintetizó o bien a que el inhibidor proteico específico de la enzima se incrementó en número y por lo tanto la enzima despliega menor actividad. Una de las maneras de conocer si la cantidad de enzima es menor es realizando ensayos con anticuerpos específicos. Otros experimentos que se podrían realizar es la detección de la enzima *in situ* para conocer si efectivamente la enzima vacuolar que presenta baja afinidad por sacarosa es la que se encuentra de manera específica en el escutelo, o bien si la enzima del eje se encuentra uniformemente distribuida en el tejido o hay zonas en las que se tiene una actividad mayor como podrían ser la radícula y el hipocótilo o coleóptilo.

En resumen, encontramos que efectivamente las dos invertasas ácidas, la soluble o vacuolar y la insoluble o de pared celular se encuentran activas durante la germinación del maíz, aunque más durante el periodo post-germinativo temprano. Siendo el eje embrionario el que presenta la mayor actividad de las dos invertasas ácidas, lo que nos corrobora que el eje es el tejido fuertemente demandante de nutrimentos y que el intervalo máximo de demanda es a partir de las 30 h. El escutelo es un tejido que no sólo usa sino que sintetiza sacarosa a partir de su propia reserva de lípidos o bien de la glucosa que el endospermo proveerá, es por ello que el excedente de sacarosa es transportado, mediante el transportador de sacarosa para proveer de carbono al eje embrionario (Figura 21A).

A pesar de que se ha postulado que los carbohidratos alteran la expresión de las invertasas, sólo se encontró que la invertasa de la vacuola era afectada por éstos y sólo cuando el tejido se incubaba en glucosa o sacarosa. Al parecer, sólo una de las Inv-V, la de alta afinidad, es la que disminuye su actividad con la imbibición en glucosa y sacarosa. Probablemente sea el producto del gen *Ivr2* el que se altera por la exposición del tejido a glucosa, ya sea por su unión de la Inv a la proteína inhibidora o bien al aumento en la transcripción del gene (Figura 21B).

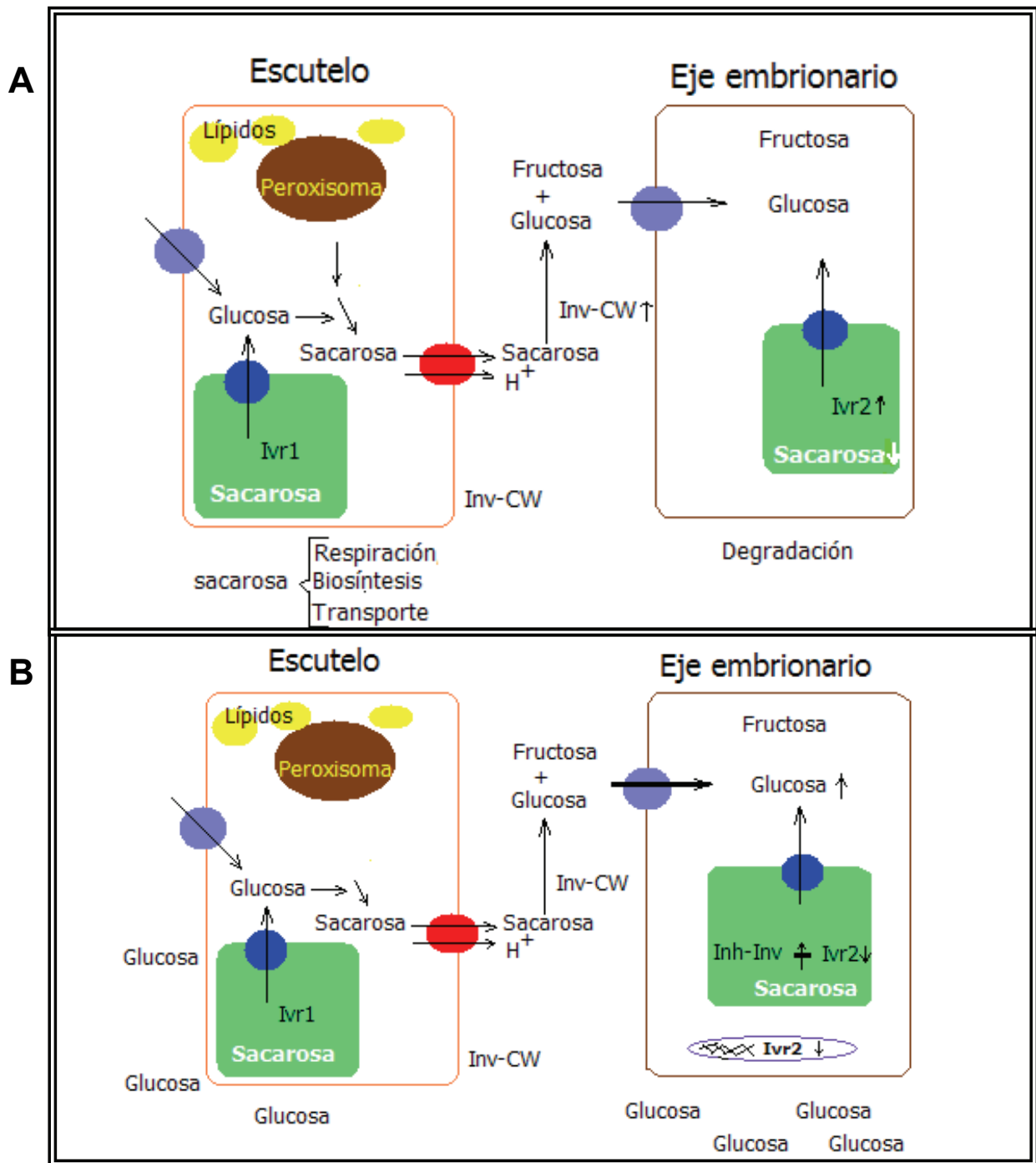


Figura 21. Modelo sobre el reparto de carbohidratos en los embriones de maíz a las 24 h de germinación. A. El escutelo presenta una alta actividad metabólica, mediante su Inv-V lleva a cabo la hidrólisis de sacarosa, aunque también sintetiza sacarosa al usar los productos de degradación de los lípidos o la glucosa que proviene del endospermo. El exceso de sacarosa se exporta al eje embrionario quién no tiene transportador de sacarosa, por lo que la sacarosa es usada por las Inv-CW de ambos tejidos. El eje puede sobrevivir un tiempo sin el aporte de sacarosa ya que su Inv es activa **B.** La imbibición en glucosa disminuye la actividad de la Inv-V, pero sólo la del eje, ya que no es necesaria más Inv por el abastecimiento suficiente de carbohidratos al eje embrionario. Se sugiere un aumento en la unión a su inhibidor natural (inh-Inv) o a la disminución en la transcripción del gene Ivr2.

7. CONCLUSIONES.

1. El eje embrionario presenta una actividad de degradación de sacarosa alta durante el periodo germinativo (0 a 24 h), llegando a un 5% de la sacarosa inicial a las 60h de germinación.
2. El embrión degrada a la sacarosa durante las primeras 12 h de imbibición y posteriormente a este tiempo comienza a sintetizar sacarosa, el balance entre síntesis y degradación es favorable para la síntesis después de las 24 h.
3. La invertasa ácida de la pared celular del eje embrionario es 4.6 veces más activa que la del embrión, sugerimos que esta enzima es la que produce la mayor parte de las hexosas que son transportadas hacia el eje embrionario.
4. La Inv del eje embrionario es activa al inicio de la germinación, probablemente ayuda a la movilización del carbono almacenado en la vacuola para sustentar el metabolismo en las células del eje, y es probable que esta sea la responsable de la actividad de degradación alta que observamos en las primeras 24 h de germinación.
5. La Inv del embrión y posiblemente del escutelo se encuentra poco activa, sugiriendo que el embrión no se encuentra acumulando reservas, sino que las está transportando hacia el exterior.
6. La mayor actividad de ambas invertasas ácidas se produce después de la salida de la radícula, alrededor de las 30 h. Sin embargo, el eje embrionario es el que presenta un máximo de actividad entre las 30 y 40 h en ambas enzimas, máximo que no se presenta en el embrión completo y que podría sugerir que es el tiempo en el que el eje se encuentra demandando más nutrientes del escutelo.
7. La Inv-CW no cambia por la exposición del tejido embrionario a carbohidratos. Pero la invertasa ácida de la vacuola sí. La glucosa y la sacarosa modifican a la forma de la enzima con afinidad alta por la sacarosa (0.4 mM) presente en el tejido embrionario y sugerimos que podría ser a la forma descrita en la literatura como Ivr2. Mientras que la forma con una Km alta (3.5 mM) podría provenir del gen Ivr1, ya que no es sensible a la adición exógena de carbohidratos.

PERSPECTIVAS

1. Identificar si las isoformas de Inv de baja y alta afinidad por sacarosa y que encontramos de manera diferencial en ejes y embriones, corresponden a los productos de los genes *Invr1* e *Invr2*. Lo anterior mediante ensayos de RTPCR.
2. Con la finalidad de determinar si el cambio en la V_{max} corresponde a un cambio en la cantidad de proteína, se realizaran inmunoréplicas tipo Western tanto de extractos totales o citoplásmicos de ejes como de embriones expuestos a glucosa o sacarosa.
3. Detección *in situ* de la actividad de la Inv usando diferentes concentraciones de sustrato, para determinar si la forma con baja afinidad por sacarosa es la que se encuentra confinada a los ejes embrionarios de maíz, mientras que la forma de alta afinidad se expresa en el escutelo.
4. Determinar si la actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato, la malato sintasa o de la isocitrato liasa aumentan conforme aumenta el proceso germinativo y paralela el curso temporal de aumento en la contenido de sacarosa en el escutelo. Planeamos realizar lo anterior mediante la detección *in situ* de ambas actividades.

REFERENCIAS

- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066
- Bewley JD. 2001. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). *Enc. Life Sci.* Nature Publishing Group, pp 1-8
- Bewley JD, Black M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination.* Plenum Press, New York.
- Black M. 2001. Seeds. *Enc. Life Sci.* Nature Publishing Group, pp 1-6
- Bradford KJ. 2004. Germination: Imbibition, activation and reserve mobilization. In *Seed Production and quality.* 85-94.
- Cheng WH, Chourney PS. 1999. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theor. Appl. Genet.* 98: 485-495.
- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5669-5674.
- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5669-5674.
- Eastmond PJ, Graham IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6: 72-78.
- Ehneb R, Roitsch T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant J.* 11: 539-548.
- Enríquez-Arredondo C, Sánchez-Nieto S, Rendón-Huerta E, González-Halphen D, Gavilanes-Ruíz M y Díaz-Pontones D. 2005. The plasma membrane H⁺-ATPase of maize localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Sci.* 169:11-19.
- Garciarrubio A, Legaria JP, Covarrubias AA. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *203:182-187.*

- Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión de los RNAm del transportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
- Hashizume H, Tanase K, Shiratake K, Mori H, Yamaki S. 2003. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*. 63: 125-129.
- Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodríguez RL. 1998. Three cis-elements required for rice α -amilase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* 36: 331-341.
- Ji K, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J. 2005. Structure, evolution, and expression of two invertase gene families of rice. *J. Mol. Evol.* 60:615-634.
- Kingston-Smith AH, Walker RP, Pollock CJ. 1999. Invertase in leaves: conundrum or control point? *J. Exp. Bot.* 50: 735-743.
- Longo CP, Longo GP. 1970. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiol.* 45: 249-254.
- López-Hernández I. 2007. Efecto del estrés hídrico sobre la actividad de las hexocinasas de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Lovegrove A, Hooley R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5: 102-110.
- Martin T, Oswald O, Graham IA. 2002. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128, 472-481.
- Miller WB, Ranwala AP. 1994. Characterization and localization of three soluble invertase forms from *Lilium longiflorum* flower buds. *Physiol. Plant.* 92: 247-253.
- Mitsuashi W, Sasaki S, Kanazawa A, Yang Y-Y, Kamiya Y, Toyomasu T. 2004. Differential expression of acid invertase genes during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 602-608.
- Obenland DM, Simmen U, Boller T, Wiemken A. 1993. Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol.* 101: 1331-1339.

- Pinfield-Wells H, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Job K, Larson TR, Graham IA. 2005. Sucrose rescues seedling establishment but not germination of *Arabidopsis* mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *Plant J* .43: 861–872.
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant J*. 31: 639–647.
- Quijada Rosas, M. 1992. Glosario de Términos de Genética, Fitogenética y Afines. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. 436 pp.
- Ramírez-Palma T. 2007. El estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Ranwala AP, Suematsu C, Masuda H. 1992. Soluble and wall bound invertase in strawberry fruit. *Plant Sci*. 84: 59-64.
- Rausch T, Greiner S. 2004. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 253– 261.
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot*. 54: 513-524.
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol*. 108: 285-294.
- Roitsch T, González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci*. 9: 606-613.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* S185-S205.
- Sánchez-Nieto S, Tuena de Gómez-Puyou M, Rodríguez-Sotres R, Carballo A, Gavilanes-Ruiz M. 1998. Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 1414: 175-187.
- Srivastava LM. 2002. *Plant Growth and Development. Hormones and environment*. Academic Press, San Diego, CA, Estados Unidos. Pag: 447-464, 503-519.

- Sturm A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121: 1-7
- Styer RC, Cantliffe DJ. 1984. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiol.* 76: 196-200.
- Sturm A., Tang GQ., 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4:401-407.
- Tang Guo-Qing, Lüscher M, Sturm A. 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11: 177-189.
- To JPC, Reiter W-D, Gibson SI. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biol.* 2: 1-11.
- Tang X, Ruffner HP, Scholes JD, Rolfe SA. 1996. Purification and characterization of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 198: 17-23.
- Thomas BR, Rodríguez RL. 1994. Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106: 1235-1239.
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuck R, Weber H, Wobus U. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 33: 395-411.
- Xu J, Avigne WT, McCarty DR, Koch KE. 1996. A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: Evidence from a maize invertase gene family. *Plant Cell* 8: 1209-1220.
- Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz: Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.