

190
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INHIBIDOR DE SINTESIS DE PROTEINAS
Y DE LA GERMINACION DE SEMILLAS
AISLADO DE TUBERCULOS DE
Solanum tuberosum L.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

CARLOS SANCHEZ MORAN

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

Resumen	1
Introducción	2
I. Estructura de la semilla	2
II. Reservas de almacenamiento en semillas	4
III. Contenido de agua en las semillas	5
IV. Germinación de semillas	5
V. Eventos tempranos en la germinación	6
a) Imbibición	6
b) Pérdida de solutos	9
VI. Metabolismo de la germinación	10
a) Respiración-consumo de oxígeno	10
b) Síntesis de proteínas. Mecanismo y medida	12
c) Síntesis de DNA y división celular	16
VII. Factores que afectan la germinación	17
a) Agua	17
b) Gases	17
c) Temperatura	18
d) Luz	19
e) Inhibidores de la germinación	20
VIII. Tubérculos de papa (<u>Solanum tuberosum</u> L.)	20
IX. Estado de latencia de tubérculos de papa	22
a) Definición de latencia	22
b) Duración del período de latencia en tubérculos de papa	23
X. Métodos para interrumpir la latencia de tubérculos de papa	24

XI. Métodos para prolongar la latencia de tubérculos de papa	24
XII. Cambios efectuados en el tubérculo durante y después del periodo de latencia	25
a) Respiración	25
b) Enzimas	26
c) Contenido de carbohidratos	27
d) Compuestos nitrogenados	28
XIII. Latencia, su modificación por acción hormonal ...	30
a) Auxinas	30
b) Inhibidores del crecimiento	31
c) Giberelinas	32
d) Citocininas	32
XIV. Inhibidores ácidos como una de las causas de la latencia de tubérculos de papa	33
Antecedentes	34
Hipótesis y Objetivos	37
Metodología	38
1. Obtención de ribosomas y sobrenadante de tejido fresco	38
2. Obtención de lavado ribosomal de tejido fresco	39
3. Concentración de proteínas del lavado ribosomal por sulfato de amonio	39
4. Determinación de la concentración y pureza de ribosomas	40
5. Determinación de proteínas	41
a) Método de Lowry	41
b) Método espectrofotométrico	41

6. Bioensayo con diferentes semillas	42
a) Prueba de germinación para semillas de maíz (<u>Zea mays</u>)	42
b) Prueba de germinación para semillas de trigo (<u>Triticum aestivum</u>) y semillas de ajonjolif - (<u>Sesamum indicum</u>)	42
7. Tratamiento del lavado ribosomal (L.R.p80) con PMFS	43
8. Cromatografía de filtración en gel	44
9. Determinación de aminoácidos por el método de Rozen	44
10. Hidrólisis enzimática de la fracción III	45
11. Hidrólisis básica de la fracción III	45
12. Incorporación de leucina radioactiva en ejes embrionarios de maíz (<u>Zea mays</u>)	46
Resultados	48
I. Extracción del L.R.p80	48
II. Optimización del bioensayo de germinación de diferentes semillas	50
III. Inhibición de la germinación de diferentes semillas por L.R.p80	55
IV. Purificación del inhibidor presente en el L.R. p80	57
V. Características de la fracción III	67
VI. Incorporación de leucina-H ³ durante la germina- ción de ejes embrionarios de maíz	75
Discusión	80
Conclusiones	92
Bibliografía	93

Se conoce que cuando ribosomas de tejido de papa latente son lavados con 300 mM de KCl se separa de ellos una fracción que tiene la capacidad de inhibir la incorporación de leucina tritiada en un sistema in vitro de tejido de papa (33).

Con el fin de determinar el efecto de la fracción asociada a ribosomas de papa latente sobre un proceso dependiente de síntesis de proteínas como lo es la germinación, se optimizaron las condiciones para la germinación (volumen, tiempo, recipiente, sales y luz) de semillas de maíz, trigo y ajonjolí. En la papa latente se encontró que que la fracción asociada a ribosomas es capaz de inhibir la germinación de los tres tipos de semillas utilizados. La fracción asociada a ribosomas fue concentrada con sulfato de amonio y tratada con PMFS para eliminar la actividad de proteasas dependientes de sulfhidrilo.

Posteriormente por cromatografía en Sephadex G-100 la fracción inhibitoria de síntesis de proteína in vitro se logró purificar 52 veces.

Se determinó que la fracción asociada a ribosomas de papa latente también inhibe la incorporación de leucina tritiada en ejes embrionarios de maíz (sistema in vivo). Es inestable al calor (92°C) y almacenamiento a -70°C. Su naturaleza es proteica ya que es capaz de generar α -amino libres después de ser hidrolizada tanto por álcali como por acción enzimática y puede ser generada a partir de un precursor proteico de peso molecular mayor.

Se discute su posible papel de contribuir a ayudar a mantener la latencia de tubérculos de papa debido a su capacidad de inhibir síntesis de proteínas.

I N T R O D U C C I O N

I. Estructura de la semilla.

Las angiospermas (plantas con flores) y gimnospermas (coníferas, cícadas, etc.) constituyen las Espermátófitas (plantas con semillas) siendo la diferencia entre ellas el grado en que los óvulos estén expuestos en el momento de la polinización. En las gimnospermas, los granos de polen tienen acceso directo al óvulo, mientras en la mayoría de las angiospermas, los óvulos están encerrados por los carpelos y el polen queda sobre una superficie estigmática, en ésta germina para formar el tubo polínico en el cual lleva los núcleos masculinos, hasta el núcleo de la ovocélula dentro del saco embrionario (1).

En este trabajo se hará referencia a las semillas de angiospermas.

La semilla de angiospermas (figura 1) se desarrolla del óvulo fertilizado. Están compuestas generalmente de las siguientes partes:

1) El embrión, el cual está constituido por el eje embrionario con uno o más cotiledones (2). La parte de arriba del cotiledón es el epicotilo con las primeras hojas (plumula). La parte del eje, inmediatamente abajo del cotiledón es el hipocotilo que se prolonga en la base hacia la raíz embrionaria (radícula). La identificación de éstas partes es difícil en las monocotiledóneas particularmente en las gramíneas en las cuales, el único cotiledón es reducido formando un escutellum.

2) El endospermo, el cual proviene de la fusión de los dos núcleos polares con el otro núcleo masculino del tubo del polen (2). Las semillas pueden ser categorizadas como endosper-

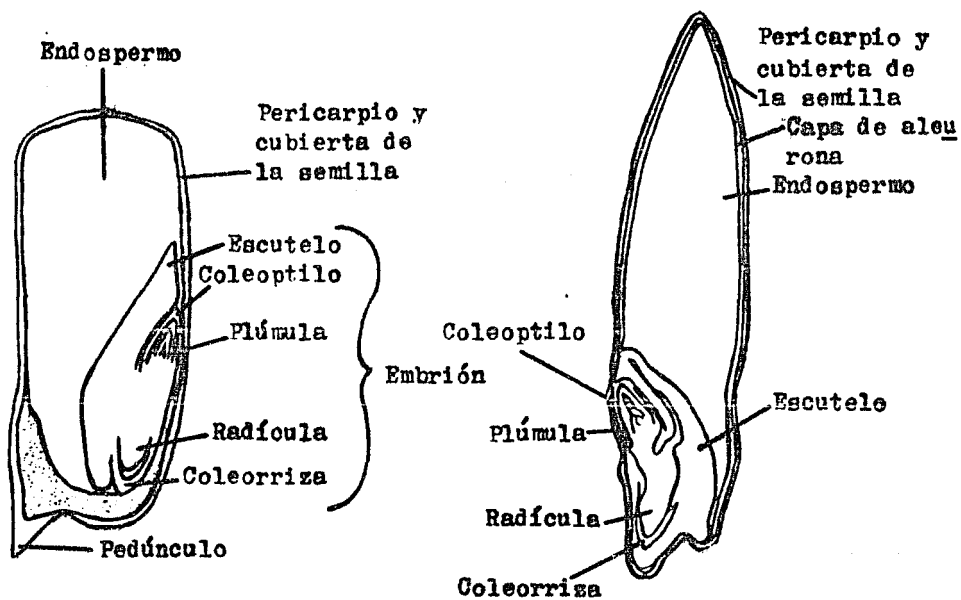
a) Zea maysb) Triticum aestivum

Figura 1. Estructura de Maíz (a) y Trigo (b) en donde el pericarpio y la cubierta de la semilla - están fuertemente unidos (ref. 4).

micas o no-endospermicas en relación a la presencia o ausencia del endospermo respectivamente en la semilla madura (2,3). El endospermo puede tener pocas células o ser relativamente masivo y es la fuente principal de reservas alimenticias para el embrión germinado.

3) El perispermo, que es originado a través del desarrollo de la nucela (2) que forma un tejido especial de almacenamiento de alimentos para el embrión durante la germinación.

4) La testa o cubierta de la semilla la que es formada a partir de uno o ambos integumentos que rodean al óvulo (2 y 3). La testa es frecuentemente la única barrera protectora entre el embrión y el medio ambiente externo (2). Algunas veces la testa existe en una forma rudimentaria y la estructura externa prominente es el pericarpio o cubierta del fruto proveniente de la pared del ovario. en éstos casos, la unidad de dispersión no es una semilla sino un fruto. La naturaleza protectora de la cubierta de la semilla puede ser atribuida a la presencia de una cutícula interna y externa (2).

La testa puede ser impermeable al agua y/o al oxígeno si contiene sustancias hidrofóbicas como cutina, lignina, pectina, suberina y hemicelulosa (3).

II. Reservas de almacenamiento en semillas.

Además de los constituyentes químicos normales encontrados en todos los tejidos de la planta, las semillas contienen cantidades extra de sustancias almacenadas como fuente de reservas alimenticias para sostener el crecimiento temprano de la plántula. Estas son principalmente: carbohidratos, grasas, aceites y proteínas. Las semillas contienen otras reservas menores pero no menos importantes (por ejemplo: fitina); de éstas

tas algunas son nutricionalmente indeseables o aún tóxicas al hombre (por ejemplo: alcaloides) (2).

III. Contenido de agua en las semillas.

Las semillas maduras generalmente tienen un contenido de agua de menos del 20% de su peso fresco aunque pocas especies tienen semillas que no pueden tolerar la desecación. En éstas, si el contenido de humedad cae por debajo del 30% se presenta su muerte (5). El contenido preciso de agua en las semillas depende de la naturaleza de las principales reservas que contiene; semillas ricas en almidón tienen un mayor contenido de agua que aquellas que almacenan aceites. El contenido de agua de las semillas depende también de la humedad relativa de la atmósfera en la cual las semillas están almacenadas (6).

IV. Germinación de semillas.

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza con el inicio de la elongación del eje embrionario principalmente la radícula (2 y 5). Diferentes fisiólogos vegetales están de acuerdo en que una semilla ha germinado cuando la radícula protruye a través de su cubierta exterior (5). Por lo tanto incluye numerosos eventos, por ejemplo, hidratación de proteínas, cambios de estructuras subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y alargamiento de células, ninguno de los cuales por sí mismo determina la germinación. Pero sus efectos combinados transforman un embrión en reposo y deshidratado con metabolismo apenas detectable, en uno que tiene un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación no incluye el crecimiento de la plántula.

la, el cual comienza cuando la germinación finaliza (2). Estas dos fases pueden ser separadas fisiológicamente porque en la primera fase (lo que es propiamente germinación) la semilla puede ser desecada y sobrevive, en cambio durante la segunda fase (postgerminación o protrucción de la radícula) si la semilla es deshidratada muere (5).

V. Eventos tempranos en la germinación.

a) Imbibición.

El primer proceso que ocurre en la germinación es la toma de agua por la semilla lo que se denomina imbibición (2a, 4). La cantidad total de agua y/o solutos tomada durante la imbibición es generalmente muy pequeña y no puede exceder de dos a tres veces el peso seco de la semilla. La imbibición depende de varios factores como el movimiento del agua hacia la semilla; en donde el potencial de agua y la permeabilidad de la cubierta de la semilla son de gran importancia (4).

En el movimiento del agua desde el medio de germinación hacia la semilla, son particularmente importantes las relaciones de la semilla y el medio de germinación. El potencial de agua (Ψ) es una expresión del estado de energía del agua, la difusión neta del agua ocurre bajo un gradiente de energía de un potencial alto a uno bajo (por ejemplo: desde el agua pura hacia el agua que tiene solutos). El agua pura tiene un potencial alto, y por convención, se le asigna el valor de cero. Otros potenciales, por lo tanto, tienen valores positivos (> 0) o negativos (< 0). El potencial de agua en las células puede ser expresado como sigue:

$$\Psi_{\text{célula}} = \Psi_{\text{r}} + \Psi_{\text{m}} + \Psi_{\text{p}}$$

ésto significa que el potencial de agua de las células de la semilla está afectado por tres componentes:

1) El potencial osmótico (Ψ_{π}). La concentración de solutos disueltos en la célula influenciará la toma de agua, el aumento en su concentración disminuye el potencial de agua y -- por lo tanto se incrementa el gradiente de energía por lo cual el agua fluirá hacia el interior de la semilla.

2) El componente mátrico (Ψ_m). Este es contribuido por -- la habilidad de las matrices (por ejemplo: paredes celulares, almidón, cuerpos proteicos, etc.) de ser hidratados y retener a gua.

3) El potencial de presión (Ψ_p). Ocurre debido a que a medida que entra el agua a la célula su contenido se hincha y ejerce una fuerza sobre la pared celular externa. Los valores de Ψ_{π} y Ψ_m son negativos ya que tienen un potencial menor -- que el agua pura, y el Ψ_p está en dirección opuesta y por -- lo tanto de fuerza positiva. La suma de los tres términos genera el potencial de agua que es un número negativo, excepto en células completamente turgentes donde es aproximadamente de -- cero.

El potencial de agua puede ser expresado en términos de -- presión o energía, y se usa frecuentemente la unidad bar (1 -- bar = 10^3 dinas cm^{-2} , 10^2 J Kg^{-1} , o 0.983 atm).

El medio de germinación también tiene su propio potencial de agua, el cual es la suma de sus Ψ_{π} , Ψ_m y Ψ_p , sin embargo, de éstos solamente el Ψ_m juega un papel significativo (excepto en medios de germinación salinos donde el Ψ puede ser apreciable). La diferencia en el potencial de agua entre la semilla y el medio de germinación es uno de los factores -- que determinan disponibilidad y tasa de flujo de agua hacia --

la semilla. En un principio, la diferencia en el Ψ entre la semilla seca y el medio de germinación húmedo puede ser grande debido al alto Ψ_m de las cubiertas secas, paredes celulares y componentes en la semilla. Pero a medida que el contenido de humedad se incrementa durante la imbibición y las matrices llegan a estar hidratadas, el potencial de agua de las semillas se incrementa (se hace menos negativo) y el del medio circundante decrece a medida que le es succionada. Por lo tanto, la tasa de transferencia de agua desde el medio de germinación hacia la semilla declina con el tiempo y disminuye más rápidamente cuando el medio de germinación tiene una capacidad de retención baja (por ejemplo: suelos arenosos). La disponibilidad continua de agua hacia la semilla depende del potencial de agua prevaleciente en las zonas del medio de germinación alrededor de la semilla (2a).

Otros factores que pueden jugar un papel importante en la imbibición son: la estructura y composición de la semilla que va a determinar la permeabilidad de la cubierta de la semilla o fruto y la disponibilidad de agua en forma líquida o vapor en el medio ambiente (2a,4,5). El potencial de presión es de gran importancia en el proceso de germinación ya que puede provocar el rompimiento de la cubierta de la semilla. En la semilla el principal componente que imbebe agua es la proteína. Sin embargo, otros componentes también se hinchan. Los micélagos de varios tipos también contribuyen al hinchamiento así como parte de la celulosa y substancias pécticas. El almidón contribuye en menor medida al hinchamiento total de la semilla aún cuando grandes cantidades de él están presentes. Las proteínas muestran un mínimo de imbibición en su punto isoeléctrico, la cual aumenta en valor en ambos lados de éste pun

to (4).

El agua no es la única sustancia que puede entrar a la semilla durante la imbibición; bajo condiciones experimentales (o en el suelo) las semillas pueden ser expuestas a una solución más que a agua pura. Los solutos entonces entran a la semilla así como el agua (6).

b) Pérdida de solutos.

Cuando las semillas secas son colocadas en agua hay una salida de solutos de ellas. Muchas sustancias diferentes se filtran al exterior de las semillas y de los embriones incluyendo aminoácidos, azúcares, fenoles, iones de fosfato y potasio, ácido giberélico y proteínas. La tasa de pérdida no es la misma para cada sustancia. A medida que la imbibición avanza, la tasa de salida declina (2a,6).

Hay dos principales hipótesis que explican la pérdida de solutos durante la imbibición:

La primera explica la salida de solutos por desarreglo de membranas. Esta hipótesis ha sido propuesta por Larson (1968) y en 1970 por Perry y Harrison y requiere que las membranas estén originalmente arregladas. La entrada violenta del agua durante la imbibición produce estrés por fuerzas impuestas sobre las membranas celulares y el gradiente de potencial de agua es tan alto en el inicio de la imbibición que podría romper la organización de las membranas celulares, dispersando a los fosfolípidos y proteínas lejos de sus posiciones originales lo que ocasiona la pérdida de solutos (6).

La otra hipótesis establece que las membranas celulares de la semilla seca desde un inicio se encuentran desorganizadas y contienen poros que permiten la salida de solutos. La ---

pérdida de solutos puede ser entendida si se supone que las membranas constituyentes bajo condiciones de deshidratación adoptan una configuración diferente a la configuración que se alcanza en la semilla hidratada (2a,6).

Los fosfolípidos con un contenido de agua de menos del 20% se cree que adoptan una configuración hexagonal, de ésta manera una membrana en este estado no es lamelar sino presenta poros. Los solutos podrían salir a través de éstos canales pasivamente antes de que se establezca la bicapa lamelar, la cual se forma cuando los sistemas fisiológicos han sido establecidos después de que el agua ha penetrado en la semilla. La mayor proporción de pérdida corresponde a los estados muy tempranos de imbibición cuando la semilla tiene un contenido de agua de menos del 25% y no tiene bicapa lamelar (5).

VI. Metabolismo de la germinación.

Las semillas contienen predominantemente enzimas inactivas cuya activación es responsable de los eventos metabólicos que ocurren durante la germinación. Estas enzimas son resistentes a la desecación y se activan tan pronto como la imbibición empieza, este proceso de activación puede ser resultado de -- proteólisis o cambios de conformación (6).

Principales vías metabólicas que se activan durante la germinación:

a) Respiración-consumo de oxígeno.

La germinación de semillas es un proceso biológico que requiere energía. El ATP es considerado como la fuente principal de energía disponible para las actividades biológicas. Sin embargo, las semillas maduras no acumulan ATP. Su producción-

en el estado temprano de la germinación de la semilla es esencial para que la germinación tenga éxito.

Se conocen tres vías respiratorias que se activan en la semilla imbibida, a saber, glucólisis, ruta de los fosfatos de pentosas y el ciclo del ácido cítrico (7). La glucólisis, catalizada por enzimas citoplásmicas, opera bajo condiciones anaeróbicas para producir piruvato, el cual en ausencia de oxígeno puede ser reducido a etanol y CO_2 , o a ácido láctico. La respiración anaeróbica, también llamada fermentación (4b) produce dos moléculas de ATP por molécula de glucosa consumida. En presencia de oxígeno, la utilización de piruvato ocurre dentro de la mitocondria; la descarboxilación oxidativa del piruvato produce acetil CoA, la cual es completamente oxidada a CO_2 y agua a través del ciclo del ácido cítrico produciendo 36 ATPs por molécula de glucosa consumida. La generación de ATP ocurre durante la fosforilación oxidativa cuando los electrones son transferidos a lo largo de una cadena transportadora de electrones vía una serie de citocromos localizados en la membrana interna de las mitocondrias al oxígeno molecular. En la porción soluble del citoplasma extramitocondrial se lleva a cabo la vía de los fosfatos de pentosas que es una ruta importante porque produce NADPH, el cual sirve como donador de hidrógeno y de electrones en la biosíntesis reductiva, especialmente de ácidos grasos (2b).

La respiración en la semilla madura es extremadamente baja comparada con la respiración activa en la semilla germinada, y frecuentemente las medidas de respiración son alteradas por la presencia de una microflora contaminante. Cuando las semillas son colocadas en agua, hay una inmediata liberación de aire, la cual puede durar varios minutos y no está relacionada

con la respiración. Este aire liberado corresponde al de adsorción coloidal.

El consumo de oxígeno en muchas semillas sigue un patrón básico como se observa en la figura 2. En ésta gráfica se observa que la respiración involucra tres fases:

Fase I. Inicialmente hay un incremento muy marcado en el consumo de oxígeno el cual puede ser atribuido en parte a la activación e hidratación de enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y cadena de transporte de electrones. La respiración durante ésta fase se incrementa en forma lineal con el grado de hidratación de el tejido.

Fase II. El consumo de O_2 se estabiliza o se incrementa sólo ligeramente. La hidratación de las partes de la semilla ha sido terminada y todas las enzimas existentes están activadas. Supuestamente hay poco incremento en los niveles de las enzimas respiratorias o en el número de mitocondrias.

Fase III. Hay nuevamente una segunda subida en la actividad respiratoria que puede ser atribuida a un aumento en la actividad y en la síntesis de mitocondrias y enzimas respiratorias en las células proliferativas del eje en crecimiento (2b).

b) Síntesis de proteínas. Mecanismo y medida.

La síntesis de proteínas es esencial para que la germinación llegue a su fin y por lo tanto para que la radícula emerja (2b). Experimentos con inhibidores mostraron que no hay germinación si la síntesis de proteínas o de RNA se bloquean (6).

Un breve resumen del mecanismo de la síntesis de proteínas en plantas será presentado (8). La síntesis de proteínas se realiza en el citoplasma de una célula hidratada cuando los ribosomas (80S) se asocian con el RNA mensajero (mRNA). Esto se

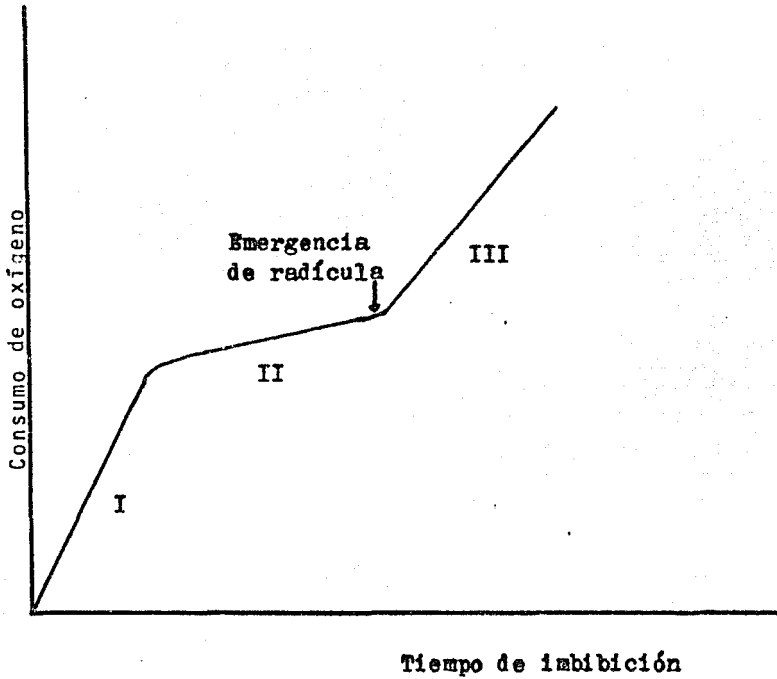


Figura 2. Patrón de consumo de oxígeno de semillas durante y después de la germinación (ref. 2b).

lleva a cabo en varios pasos. La iniciación de la síntesis de proteínas requiere la unión de la subunidad ribosomal pequeña (40S) y el RNA de transferencia iniciador (Met-tRNA₁^{Met}) a los sitios de iniciación sobre el RNA mensajero. Después de la formación de éste complejo de iniciación (40S₁) la subunidad ribosomal mayor (60S) se une y forma el complejo final (80S₁) - de iniciación y comienza la elongación. La formación del complejo de iniciación requiere factores proteicos solubles (factores de iniciación de 8 a 10 de ellos).

La elongación requiere de otros factores proteicos solubles para la transferencia de tRNA aminoacilados hasta su codón correspondiente sobre el complejo ribosoma-mRNA (80S₁) y para mover el mensaje a través del ribosoma (factores EF1 y -EF2 respectivamente). La formación del enlace peptídico es catalizada por la enzima peptidiltransferasa y los factores de terminación (RF) están involucrados en la liberación del péptido del complejo ribosoma-mRNA cuando la síntesis ha terminado.

Experimentalmente, la habilidad de una semilla para sintetizar proteína puede ser determinada usando tres métodos. El estado del sistema de síntesis de proteína puede ser deducido en cualquier tiempo por análisis de la proporción de polisomas (aquellos ribosomas unidos a mRNA) a monosomas (aquellos ribosomas no unidos a mRNA y por lo tanto no involucrados en la síntesis de proteína). Más comúnmente esto es logrado por la extracción del contenido ribosomal seguido por separación de ribosomas y polisomas por centrifugación en gradiente de densidad con sacarosa (9). Alternativamente, la actividad de polisomas y ribosomas puede ser determinada usando el ensayo de síntesis de proteínas in vitro (9).

Para la estimación de la actividad de los ribosomas extraídos se añade mRNA sintético (generalmente poli U) a la mezcla de ensayo (10). Los resultados obtenidos del análisis de polisomas y del ensayo in vitro indican la capacidad de la semilla para la síntesis de proteínas que se está produciendo. La mejor estimación de la síntesis de proteínas in vitro de una semilla puede ser obtenida siguiendo la incorporación de aminoácidos radioactivos en las proteínas durante un periodo de tiempo breve y definido de imbibición (11). Se debe considerar que no todas las semillas toman aminoácidos con igual facilidad debido a: las variaciones en el grosor de la cubierta, al tamaño (las semillas grandes tienen un tiempo mayor de difusión de los precursores radioactivos hacia su interior) y a otros factores - (2b).

Los polisomas están ausentes en las semillas secas pero rápidamente se incrementan inmediatamente después que las células se hidratan. Acompañando este aumento en polisomas hay un decremento en el número de ribosomas libres debido a que participan en la formación del complejo de síntesis de proteínas (12).

Evidencia de que la semilla tiene mRNA preformado, es el hecho de que la cordicepina y la α -amanitina no impiden la formación de polisomas (en embriones de trigo) durante el inicio de la germinación, ya que estos antibióticos previenen la síntesis de mRNA y también la poliadenilación (12).

Cuando embriones de trigo fueron germinados en un medio que contenía una mezcla de aminoácidos- C^{14} , la síntesis de proteínas fue medida cada 20 minutos durante las primeras dos horas de germinación en presencia y ausencia de 2 μ M de α -amanitina. A ésta concentración la α -amanitina es un potente inhibi

dor de la síntesis de RNA poli A, ya que inhibe la RNA polimerasa II. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre la tasa de síntesis de proteínas entre los embriones controles y los tratados. Esto demuestra que ésta síntesis de proteínas es independiente de la síntesis de RNA poli A y se lleva a cabo gracias al mRNA almacenado encontrado en los embriones quiescentes, el cual fue sintetizado durante el periodo de maduración de la semilla; y que juega un papel predominante en sostener la biosíntesis de proteína durante el inicio de la germinación (13). Aunque la síntesis de proteína puede tomar lugar en ausencia de síntesis de RNA (durante la imbibición temprana) llega a depender de ella antes de que la germinación termine (2b).

c) Síntesis de DNA y división celular.

La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por alargamiento celular (2b), y su subsecuente emergencia a través de la cubierta de la semilla puede o no ser acompañada de división celular (2b,6). Se supone que la síntesis de DNA y la división celular son fenómenos de postgerminación involucrados en el crecimiento del eje y el establecimiento de la plántula (6).

Si embriones de trigo son imbibidos con una solución que contiene timidina- C^{14} como precursor de DNA, se encuentra que en estado de germinación temprana (6-12 horas), únicamente se puede extraer DNA radioactivo, el cual no es de origen nuclear ni organelar y que probablemente se sintetizó dentro de compartimientos en el citoplasma celular. Sólo hasta las 18 horas de iniciada la germinación se puede extraer DNA radioactivo proveniente de núcleos y organelos celulares justamente antes de que se alcance el primer máximo en la división celular. Por lo

tanto los embriones de trigo poseen DNA citoplásmico no mitocondrial que reanuda su síntesis en un estado de germinación temprana antes de que se lleve a cabo la primera ronda de replicación del DNA nuclear (14).

Cuando embriones de trigo son imbibidos en una solución que contiene precursores radioactivos de DNA (Timidina- H^3 y desoxiadenosina- H^3) éstos se incorporan en el DNA nuclear durante los primeros 90 minutos de germinación. La afidicolina (un inhibidor de la DNA polimerasa α) no tiene efecto en la incorporación de precursores radioactivos de DNA en un sistema in vitro proveniente de embriones de trigo, en tanto que didsoxi TTP (inhibidor de la DNA polimerasa γ') inhibe la síntesis de DNA en forma apreciable. Estos resultados hacen suponer que la DNA polimerasa γ' juega un papel importante en la replicación del DNA durante los primeros 90 minutos de la germinación (15).

VII. Factores que afectan la germinación.

a) Agua.

El efecto de éste factor en la germinación se trató en lo que se refiere a imbibición como el proceso inicial de la germinación.

b) Gases.

La germinación es un proceso relacionado con células vivas y por lo tanto requiere un gasto de energía por éstas células. La energía que requieren las células vivas es generalmente abastecida por los procesos de oxidación, en presencia o ausencia de oxígeno (respiración y fermentación respectivamente). Esto involucra un intercambio de gases, una producción de CO_2 en

ambos casos y toma de O_2 en el caso de la respiración. Consecuentemente la germinación de semillas es marcadamente afectada por la composición del ambiente atmosférico (4). La mayoría de las semillas germinan en el aire, en una atmósfera que contiene 20% de oxígeno y un bajo porcentaje de CO_2 (0.03%).

Muchas semillas muestran bajo porcentaje de germinación si la tensión de oxígeno decrece apreciablemente por debajo del valor presente en la atmósfera. Condiciones de anaerobiosis conduce a la formación de plántulas anormales, lo que no sucede en presencia de oxígeno. En contraste, otras semillas muestran un incremento en la germinación si la cantidad de O_2 en el aire disminuye debajo del 20% (2b).

El efecto del CO_2 es generalmente inverso al del O_2 . La mayoría de las semillas no germinan si la tensión de CO_2 es aumentada apreciablemente. Muy altas concentraciones de CO_2 , inhiben la germinación y parecen tener un efecto favorable en la preservación de las semillas (4).

La presión parece no tener efecto marcado sobre la germinación de semillas (2b), así que los cambios son debidos a las concentraciones de los gases.

c) Temperatura.

Las diferentes semillas tienen diferentes rangos de temperaturas dentro de los cuales germinan (4). A muy bajas o muy altas temperaturas la germinación de todas las semillas no se efectúa. Hay un rango de temperaturas dentro del cual una semilla germina. Generalmente tienen un rango de temperatura óptimo, abajo y arriba del cual la germinación se retarda pero no se impide. La temperatura óptima es aquella en la cual el mayor porcentaje de germinación es obtenido en el tiempo más corto.

Las temperaturas máxima y mínima para la germinación son las - temperaturas más altas y más bajas respectivamente en las cuales ocurrirá la germinación (4).

La temperatura en la cual diferentes semillas germinan es tá determinada por la fuente de las semillas, diferencias genéticas entre las especies así como la edad de la semilla. Algunos ejemplos de rangos de temperatura en los cuales la germinación se logra están dados en la tabla 1 (4).

Semillas	Temperatura (°C)		
	Mínima	Optima	Máxima
<u>Zea mays</u>	8-10	32-35	40-44
<u>Triticum aestivum</u>	3-5	15-31	30-43
<u>Hordeum sativum</u>	3-5	19-27	30-40
<u>Avena sativa</u>	3-5	23-31	30-40

Tabla 1. Rangos de temperatura en los cuales la germinación se logra para diferentes semillas (ref.4).

d) Luz.

El efecto de la luz en la germinación de las semillas difiere con las distintas especies. La mayoría de las plantas cultivadas generalmente germinan igualmente bien en la luz y en la oscuridad. Por lo contrario, entre otras plantas hay mucha variabilidad en la conducta de las semillas con respecto a la luz. De acuerdo a éste factor, las semillas se pueden clasificar de la siguiente manera: i) aquellas que germinan solamente en la luz, ii) aquellas que germinan solamente en la oscuridad, - iii) aquellas que germinan después de una breve iluminación y

iv) aquellas que son indiferentes a la presencia o ausencia de la luz durante la germinación (2c,4).

e) Inhibidores de la germinación.

Hay un gran número de sustancias que pueden inhibir la germinación (4a). Todos aquellos compuestos los cuales son generalmente tóxicos a los organismos vivos pueden impedir la germinación de las semillas debido simplemente a que éstas son dañadas mortalmente, por ejemplo: el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y los creosoles.

Es posible inhibir la germinación de las semillas si éstas son colocadas en un medio de germinación con un potencial de agua mayor al de las semillas, con lo cual, se impide el flujo de agua hacia la semilla no permitiendo una adecuada imbibición y por lo tanto su germinación.

Otro tipo de inhibición es causada por sustancias las cuales son conocidas por interferir en ciertas vías metabólicas. Compuestos tales como cianuro, azida, fluoruro, hidroxilamina y otros inhiben la germinación al inhibir la respiración (4a).

VIII. Tubérculos de papa (Solanum tuberosum L.)

El tubérculo de papa es un tallo subterráneo modificado - cuya función es la de almacenar el almidón (figura 3). En la superficie posee yemas laterales en grupos de 3-5. Una yema representa una rama lateral del tallo subterráneo. El tubérculo es un sistema morfológico ramificado; las yemas (ojos) del tubérculo tienen una disposición rotada alterna del extremo proximal del tubérculo (donde va inserto el estolón) hasta el extremo distal, donde las yemas son más abundantes. La yema apical - del extremo distal es la que primero se desarrolla y domina el

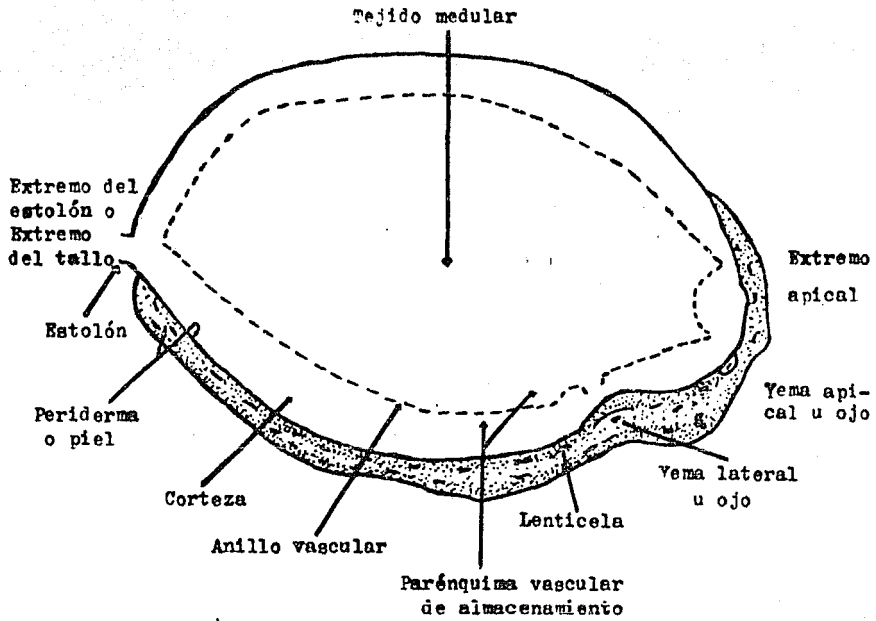


Figura 3 El tubérculo de papa (Solanum tuberosum L.)
(ref. 18).

crecimiento de todas las yemas restantes (16).

La parte exterior del tubérculo no maduro presenta una epidermis la cual es posteriormente reemplazada por un periderma en el tubérculo maduro. La yema apical retiene la epidermis y consiste de células del tipo empalizada cubiertas con una cutícula (17). La parte exterior del tubérculo maduro se denomina periderma; en seguida se encuentra la corteza que es una franja estrecha difícilmente visible a simple vista; ambas secciones forman la cáscara. La médula o eje del tallo modificado se ramifica hacia los ojos o yemas del tubérculo. El parénquima vascular de almacenamiento rellena los espacios entre la médula y la corteza; contiene algunos cordones de floema. Este tejido está separado en dos porciones por el anillo vascular. El tubérculo es aproximadamente 2% de cáscara, 75-85% de parénquima vascular y 14-20% de médula (16a).

La superficie del tubérculo permite o evita la entrada de patógenos, regula la tasa de intercambio gaseoso o pérdida de agua y protege contra los daños mecánicos. La superficie no es fija o estática sino que se regula y se mantiene así misma a través de reacciones de curación de heridas las cuales tienen influencia en la incidencia y severidad de enfermedades, en la preservación, en el almacenamiento de los tubérculos y en su brotación (18).

Las lenticelas están localizadas abajo de los estomas en el periderma del tubérculo, permiten el intercambio gaseoso y pueden ser sitios de infección para varios parásitos (18).

IX. Estado de latencia de tubérculos de papa.

a) Definición de latencia.

Muchas yemas son incapaces de brotar durante ciertos periodos de su desarrollo (5), aún bajo condiciones apropiadas para el crecimiento. Este estado es llamado latencia, cuando las yemas no pueden brotar como un resultado de causas endógenas - (5,19). Después de terminado el estado de latencia, las yemas entran en un estado quiescente en donde normalmente no pueden brotar porque las condiciones externas tales como temperatura o fotoperiodo son desfavorables.

Las yemas de los tubérculos de papa son latentes no solamente después de que los tubérculos son cosechados sino también durante las últimas semanas antes de la cosecha, cuando los tubérculos aún están desarrollándose en la planta madre. Por otro lado no existe alguna diferencia fundamental entre la latencia de las yemas de los tubérculos de papa y aquella de otras plantas.

Al final del periodo de quiescencia los tubérculos germinan a temperatura ambiente y aún a bajas temperaturas (19).

b) Duración del periodo de latencia en tubérculos de papa.

La longitud del periodo de latencia del tubérculo de papa (19) puede fluctuar desde 5 a 20 semanas según la variedad y dentro de la misma variedad puede variar de año en año. El tamaño del tubérculo después de la cosecha es también de importancia. Tubérculos pequeños tienen un tiempo mayor de latencia que tubérculos grandes provenientes de una misma variedad de cultivo.

La longitud del día durante el desarrollo del tubérculo tiene efecto sobre la longitud del periodo de latencia. Papas cultivadas bajo condiciones de días cortos tienen un periodo de latencia menor que aquellas cultivadas bajo días largos.

X. Métodos para interrumpir la latencia de tubérculos de papa.

El periodo de latencia puede ser interrumpido por diversos tratamientos. Si los tubérculos latentes son despojados de la cáscara, la latencia será interrumpida debido a que en la cáscara existen inhibidores del crecimiento. Anaerobiosis temporal o reducción de la concentración de oxígeno a 2% en el medio ambiente produce el término de la latencia así como con CO_2 a concentraciones de 10 a 50% (19). Cuando se remueve la cáscara alrededor de las yemas éstas también tienden a brotar (20).

La brotación de yemas apicales de tubérculos de papa latente (en obscuridad a 15°C) se incrementa ya sea aumentando la humedad relativa hasta 100% o abasteciendo con agua al corte basal de los tubérculos (21).

Para estimular la brotación de tubérculos de papa se usa una solución que contiene una mezcla de ácido giberélico (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ethrel (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la proporción 3:2 (22).

XI. Métodos para prolongar la latencia en tubérculos de papa.

La brotación de tubérculos de papa latente puede ser prevenida por medio de agentes químicos como: el ácido naftaleno-cético y la hidrazida maleica. Si la latencia es inducida o prolongada por tratamiento con agentes químicos también puede ser interrumpida de nuevo con un tratamiento con sustancias que interrumpen la latencia (19).

Se puede retardar la brotación de las yemas de tubérculos de papa al final del periodo de latencia por medio de un trata

miento con vapor caliente a 60°C con $95\frac{1}{2}$ H.R. (Humedad Relativa) durante 60 minutos. Dos tratamientos con vapor caliente aplicados a tubérculos de papa durante su periodo de almacenamiento bajo condiciones ambientales, retarda su brotación por un periodo de 3-4 meses (22).

XIII. Cambios efectuados en el tubérculo durante y después del periodo de latencia.

a) Respiración.

Las vías respiratorias que actúan en bajo nivel en tubérculos de papa latentes son: glucólisis, ciclo del ácido cítrico y ruta de los fosfatos de pentosas, cuyo funcionamiento fue descrito en la parte correspondiente a metabolismo de la germinación de semillas.

La respiración cambia por diversos motivos.

Los tubérculos de papa latente son capaces de respirar aeróbicamente y anaeróbicamente por un tiempo limitado (18). A causa de que el periderma del tubérculo es una barrera para la difusión de gases, la difusión toma lugar a través de las lenticelas. Las tasas de difusión entre las lenticelas individuales son diferentes, la difusión depende de los espacios intercelulares expuestos del tejido subyacente del tubérculo. Dentro del tubérculo, la difusión gaseosa toma lugar a través de los espacios intercelulares los cuales ocupan cerca del 1% del volumen del tubérculo.

El oxígeno en el tubérculo está presente en la atmósfera de los espacios intercelulares y disuelto en la savia celular. El dióxido de carbono se difunde a través de las lenticelas a una tasa de aproximadamente 80% de la del oxígeno.

Si existe una capa delgada de agua en la superficie del -

tubérculo ésta puede detener la difusión de oxígeno a través de las lenticelas y reducir el centro del tubérculo a condiciones anaeróbicas después de 6 horas a 10°C y en 2 horas a 21°C. Las tasas de respiración de los tubérculos latentes pequeños, medianos y grandes son esencialmente similares por unidad de volumen bajo condiciones ambientales adecuadas. La respiración de los tubérculos de papa después de la cosecha es frecuentemente tres veces mayor que la de los mismos tubérculos una semana más tarde, ésta respiración más alta está en parte asociada con daños mecánicos durante la cosecha y almacenamiento (18).

Cuando la latencia del tubérculo es interrumpida (19) por clorhidrina etilénica la respiración se incrementa. El incremento en la respiración no parece ser la causa para la terminación de la latencia ya que, el alcohol isopropílico disminuye la respiración al interrumpir la latencia (19).

b) Enzimas.

Algunas actividades enzimáticas se ven alteradas durante y después de la latencia.

La actividad de la catalasa se eleva inmediatamente después de la cosecha y disminuye durante el almacenamiento a 5°C. La actividad de la tirosinasa o polifenoloxidasas disminuye en forma muy marcada en tubérculos almacenados a 2 y 25°C, siendo más grande la disminución en la última temperatura (19).

La actividad de la fosforilasa se incrementa durante el crecimiento del tubérculo hasta su cosecha, y al terminar el período de latencia se eleva temporalmente de nuevo (19).

La hidrólisis del almidón en tubérculos latentes es en su mayor parte debida a la actividad hidrolítica de la enzima glucan fosforilasa ya que la actividad de la amilasa es casi nula (23).

Los tubérculos latentes tienen baja capacidad para formar hexosas, ya que las actividades de la invertasa y la sacarosa - sintetasa son muy bajas además de que la amilasa se encuentra casi ausente (23).

El tratamiento con clorhidrina etilénica en tubérculos latentes incrementa la actividad de la amilasa, la catalasa y peroxidasa en comparación con los tubérculos no tratados. Esto sucede 24 horas después de iniciado el tratamiento (19).

c) Contenido de carbohidratos.

Otro de los cambios observados durante la latencia de tubérculos es el cambio en contenido de carbohidratos.

En tubérculos latentes el contenido de hexosas, varía entre las diferentes variedades así como en los tubérculos de la misma variedad crecidos bajo diferentes condiciones o bajo las mismas condiciones. En muchos tubérculos el contenido de glucosa es mayor que el de fructosa.

El contenido de hexosas en los tubérculos maduros latentes no es determinado primariamente por el metabolismo de los tubérculos cosechados sino por el metabolismo que ocurre durante el desarrollo del tubérculo (23).

El rompimiento del estado de latencia de los tubérculos con agentes químicos (por ejemplo: tiocianuro, tiourea o clorhidrina etilénica) incrementan en forma notable el contenido de sacarosa; consecuentemente, al mismo tiempo el contenido de almidón disminuye mientras que el contenido de azúcares reductores no cambia significativamente. El incremento del nivel de sacarosa no es la causa de la terminación de la latencia ya que ésta no puede ser interrumpida al inyectar sacarosa en los tubérculos latentes o al ser sumergidos en soluciones de sacarosa. (19).

d) Compuestos nitrogenados.

Los compuestos nitrogenados se ven alterados en la latencia en cantidad y en su distribución.

Los tubérculos de papa tienen muy pequeños cambios en los niveles de nitrógeno total desde el tiempo de cosecha hasta el final del periodo de latencia (19). En tubérculos latentes los niveles de nitrógeno total se incrementa con el tiempo en los tejidos internos. Esto se debe a una translocación de aminoácidos desde los tejidos externos hacia los internos (19).

El tejido de papa blanca, como el de otros tejidos vegetales de almacenamiento contienen monosomas, lo cual es documentado por trabajos de microscopía electrónica en el estado de latencia de éstos tejidos (24). Cuando el tejido de papa latente es herido, los monosomas se arreglan en complejos polisomales. Este proceso es probablemente dependiente de síntesis de novode mRNA como es sugerido por la tasa de incorporación de precursores radioactivos (uridina- H^3) a polisomas durante las dos primeras horas después de la herida (25). El contenido de proteína se incrementa también cuando los tubérculos dejan el periodo de latencia en forma natural (19).

El tratamiento con clorhidrina etilénica a tubérculos de papa latentes además de interrumpir la latencia produce un incremento del tripéptido glutatión. La aplicación exógena de glutatión puede interrumpir la latencia de tubérculos de papa. El contenido de glutatión el cual es bajo en tubérculos recién cosechados muestra un incremento transitorio durante la latencia y su concentración máxima se ha alcanzado al finalizar el periodo de latencia (19).

Se ha descrito que los tubérculos de papa contienen una variedad de inhibidores de endopeptidasas de serina (inhibido-

res de carboxipeptidasa pancreática) que son de naturaleza proteica y estables al calor (26). Las cantidades totales de inhibidores de carboxipeptidasas (ICP)/g de tejido (fresco) han sido determinadas en varios tejidos de la planta de papa. Los tubérculos son los que tienen las más altas concentraciones de los inhibidores mientras que los brotes inducidos en forma natural de tubérculos almacenados a 6° y 8° C así como en las hojas y tallos tienen concentraciones notablemente menores (26).

Se han descrito 3 formas de éste inhibidor (ICP-I, ICP-II y ICP-III). ICP-II fue la forma más abundante en todos los tejidos estudiados (tubérculo, brotes, tallo y hojas).

ICP-I y ICP-III se encuentran en cantidades significativas en tubérculos y tallos. Para explicar la variabilidad en las cantidades relativas de las formas de los inhibidores hay al menos dos posibilidades. Primero, pueden haber diferencias en las tasas de síntesis o degradación de los inhibidores en forma individual en el tejido específico. La segunda posibilidad es que hay dos precursores, uno de ellos da origen a ICP-II y a ICP-III y el otro precursor produce ICP-I. Por consiguiente las diferencias en las cantidades totales de los inhibidores y de las cantidades relativas de cada forma en un tejido específico, podrían ser debidas a diferencias en las actividades de las enzimas responsables del procesamiento de los precursores respectivos de los isoinhibidores (26).

Kitamura y Maruyama han purificado y caracterizado una proteasa dependiente de sulfhidrilo proveniente de tubérculos de papa en brotación. Sin embargo no hay evidencias sobre el papel de ésta enzima en la degradación de las proteínas de tubérculos de papa (27). También se ha descrito la presencia de un inhibidor de proteasa dependiente de sulfhidrilo presente en -

los tubérculos de papa. Estos autores sugieren que este inhibidor tiene la función de controlar la actividad proteolítica endógena ya que este inhibidor actúa sobre proteasas dependientes de cisteína de origen vegetal (28).

Una proteína presente en tubérculos de papa es la glicoproteína patatina (29). Constituye más del 20% de la proteína soluble en tubérculos de papa maduros (30). La patatina copurifica con una actividad de esterasa cuya función celular también se desconoce (31). El contenido de patatina disminuye desde 30 mg/g en tubérculos latentes hasta 9 mg/g en tubérculos brotados en forma natural durante el almacenamiento a 4°C. Sin embargo, la pérdida de patatina en almacenamiento fue aproximadamente igual a la pérdida de las otras proteínas en extractos de tubérculos así que el porcentaje de patatina basado en proteína soluble cambia sólo ligeramente (de 37% a 28%) (30).

XIII. Latencia, su modificación por acción hormonal.

En el periodo de latencia existen cambios en los niveles endógenos de hormonas (19), así como también se puede modificar la latencia por aplicación exógena de ellas.

a) Auxinas.

Durante el periodo de latencia los tubérculos tienen concentraciones muy bajas de auxinas. En el tubérculo latente la cantidad mayor de auxina se encuentra en la capa externa. Durante el periodo de latencia el contenido de auxinas es muy bajo, el cual aumenta más tarde obteniéndose valores más altos poco antes del brotamiento de las yemas. La aplicación exógena de auxinas en concentraciones biológicas estimula el crecimiento de los brotes cuando éstos tubérculos son pobres en auxina -

endógena (es decir: tubérculos latentes).

El ácido indolacético no tiene efecto en el crecimiento de los brotes de tubérculos de papa latentes a menos que su latencia haya sido interrumpida previamente con clorhidrina etilénica. Es probable que en éste caso el ácido indolacético no tenga influencia sobre la latencia, sino solamente sobre el crecimiento de los brotes (19).

b) Inhibidores del crecimiento.

En los tubérculos de papa existen diversos inhibidores del crecimiento (19). Del extracto de cáscara de tubérculos de papa latentes se pueden obtener sustancias ácidas por medio de cromatografía en papel que inhiben la actividad de crecimiento del ácido indolacético en coleóptilos de avena. Sus valores de R_f están comprendidos entre 0.52 y 0.74. A ésta mezcla de sustancias inhibidoras se le ha denominado β -inhibidor el cual también se ha encontrado en otras plantas.

Se ha demostrado que el ácido abscísico (ABA) puede inhibir el crecimiento de yemas de tubérculos de papa. El β -inhibidor proveniente de cáscara de tubérculos de papa latentes contiene ácido abscísico entre sus componentes. Se ha encontrado también que el nivel del ABA disminuye cuando el periodo de latencia termina (19).

La presencia de inhibidores ácidos en tubérculos de papa ha podido ser bien correlacionada con su periodo de latencia. Cuando la latencia de tubérculos de papa se interrumpe en forma natural o después de un tratamiento con clorhidrina etilénica o con glutatión, el nivel del β -inhibidor de la cáscara del tubérculo disminuye.

Se ha encontrado que si tubérculos de papa latentes son despojados de su cáscara, llegan a brotar más fácilmente que a-

quellos en que no ha sido eliminada. Esto indica que los inhibidores fueron removidos con la cáscara y que los tubérculos debido a ésto, fueron más capaces de brotar. Por consiguiente, aplicando β -inhibidor (exógeno) proveniente de papas latentes es posible prolongar el periodo de latencia de tubérculos enteros (19).

c) Giberelinas.

Los niveles de giberelinas muestran un aumento transitorio antes del término de la latencia de los tubérculos de papa, pero antes de la brotación de las yemas, los niveles de éstas - sustancias se incrementa de nuevo.

Si los tubérculos de papa en la latencia son tratados con giberelinas su latencia será interrumpida. Se ha encontrado que el nivel del β -inhibidor en extractos de cáscara de papas tratadas con ácido giberélico disminuye tres días después de iniciado el tratamiento (19).

d) Citocininas.

Los niveles de citocininas (zeatina e isopenteniladenina) muestran un incremento transitorio antes de que la latencia termine.

La aplicación exógena de citocininas puede interrumpir la latencia de varios tipos de plantas. La latencia en los tubérculos de papa también puede interrumpirse por citocininas. Cuando se aplican citocininas a tubérculos de papa latente, se observa que el nivel del β -inhibidor disminuye después de 24 horas de iniciado el tratamiento. Los inhibidores presentes en el tubérculo de papa pueden también inhibir el efecto de las citocininas (19).

XIV. Inhibidores ácidos como una de las causas de la latencia de tubérculos de papa.

Las papas en latencia contienen inhibidores del crecimiento como es el β -inhibidor que desaparecen cuando la latencia finaliza en forma natural (19,32), o cuando los tubérculos son expuestos a tratamientos que interrumpen la latencia. Consecuentemente, los inhibidores ácidos parecen ser de importancia en el mantenimiento de la latencia de tubérculos de papa. Si éstos es así, surge la pregunta de como éstos inhibidores ejercen su influencia.

Se ha sugerido que los inhibidores ácidos reaccionan con grupos SH y de ésta forma inactivan enzimas dependientes de --sulfhidrilo las cuales son necesarias para el crecimiento de las yemas del tubérculo.

Se ha demostrado que el ácido abscísico inhibe la síntesis de DNA y RNA, proceso que puede ser revertido por citocininas. Se puede suponer que el ácido abscísico inhibe el crecimiento al inhibir la síntesis de DNA y que las citocininas estimulan el crecimiento porque promueven su síntesis.

El ácido abscísico no es el único componente del complejo β -inhibidor. La identificación de las otras sustancias es la labor para el futuro para una mejor comprensión del papel de éstos en la latencia.

A N T E C E D E N T E S

Normalmente el desarrollo de una planta se ajusta a las estaciones del año en una forma que le permita sobrevivir en periodos de condiciones ambientales desfavorables. Esta adaptación casi siempre implica una interrupción temporal del crecimiento y la disminución del metabolismo colocando a la planta en un estado que se denomina latencia.

El inicio de la latencia implica en algunos casos el desarrollo de estructuras especializadas resistentes como por ejemplo tubérculos en el caso de la planta de papa.

Se han llevado a cabo intentos para obtener información que permita dilucidar la naturaleza del mecanismo(s) que permite a los tubérculos de papa mantenerse en estado latente.

Entre la información que se ha descrito se encuentra el tratar de entender la latencia del tubérculo a través de conocer los diversos cambios que se efectúan durante y al término de la latencia.

Se conocen algunos cambios que se efectúan en el tubérculo de papa cuando éstos interrumpen el estado latente ya sea en forma natural o por medio de diversos tratamientos. Así, al interrumpir o terminarse la latencia de los tubérculos de papa pueden observarse aumento en las actividades metabólicas como ejemplo: aumento en la respiración, la actividad de diversas enzimas se incrementa (amilasa, fosforilasa, catalasa, peroxidasa, etc.) (19).

Con la acumulación de información de datos como los anteriormente descritos se contribuye a la descripción del estado de latencia y a su observación a nivel molecular pero no a la comprensión del mecanismo que opera para establecer o mantener el estado latente.

Por consiguiente los cambios metabólicos que se efectúan en el tubérculo al final de su periodo latente nos indican que el estado latente no es un proceso simple y para permanecer en él pueden actuar factores muy diferentes.

Una de las hipótesis que trata de explicar el estado latente del tubérculo de papa es la presencia de inhibidores del crecimiento.

Cuando se remueve la cáscara alrededor de las yemas de los tubérculos de papa éstos brotan (20) el mismo resultado se logra si la cáscara del tubérculo de papa se elimina en forma total. Esto se explica porque en la cáscara existen inhibidores del crecimiento que mantienen el estado latente (19).

De los tubérculos de papa latentes se ha extraído una mezcla de sustancias ácidas la cual se ha denominado β -inhibidor el cual tiene la capacidad de prolongar la latencia de tubérculos de papa. Entre los componentes del β -inhibidor se encuentra el ácido abscísico el cual es un inhibidor del crecimiento (19).

También se ha encontrado que la concentración del β -inhibidor disminuye cuando la latencia del tubérculo termina o se interrumpe (19,32) en tanto que hay un aumento de las sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas, citocininas).

Se ha propuesto que el balance entre los inhibidores y promotores del crecimiento en el tubérculo de papa determina que éste se encuentre o no en estado latente.

Cuando el tubérculo está latente la presencia de ácido abscísico produce la inhibición de síntesis de DNA y RNA en tanto que las citocininas promueve dicha síntesis (19).

También se ha propuesto que el agua es un factor limitan-

te en los tubérculos latentes ya que es posible producir la brotación de las yemas apicales de tubérculos latentes (en oscuridad a 15°C) ya sea aumentando la humedad relativa hasta 100% o abasteciendo con agua a un corte basal de los tubérculos (21).

Cocotle (33) encontró que cuando se mide la síntesis de proteínas por incorporación de leucina tritiada en un sistema in vivo, se encuentra que ésta actividad es muy baja en tejido de papa latente y se incrementa cuando las rebanadas de éste tejido son incubadas a tiempos largos.

También observó que cuando los ribosomas extraídos de tejido de papa latente eran lavados con 300 mM de KCl éstos incrementaban su capacidad de incorporar aminoácidos radioactivos en un sistema in vitro. Esto se logró porque de los ribosomas de papa latente se separa una fracción la cual impide que haya una eficaz actividad de síntesis de proteínas.

La fracción asociada a ribosomas de papa latente tiene la capacidad de inhibir la incorporación de leucina tritiada en un sistema in vitro de tejido de papa.

En éste trabajo se propone que la fracción inhibitoria de síntesis de proteína in vitro asociada a ribosomas de papa latente pueda ser un factor más que contribuye a ayudar a mantener la latencia de tubérculos de papa inhibiendo síntesis de proteínas. Con lo cual este trabajo puede contribuir a comprender los mecanismos del estado latente.

H I P O T E S I S Y O B J E T I V O S

Para poder iniciar el estudio de la fracción inhibitoria de síntesis de proteínas in vitro asociada a ribosomas de tubérculos de papa latente se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

Si la fracción unida a ribosomas de papa latente es proteína entonces podrá ser purificada como tal.

Como la fracción unida a ribosomas de papa latente inhibe la síntesis de proteínas in vitro entonces también deberá de inhibir la germinación ya que éste es un proceso fisiológico dependiente de la síntesis de proteínas.

Con el fin de demostrar las hipótesis anteriores se plantearon los siguientes objetivos:

Purificación de la fracción asociada a ribosomas de papa latente.

Conocer las características y naturaleza de la fracción inhibitoria.

Mostrar la inhibición de la germinación por el inhibidor purificado por bioensayo de germinación y - por síntesis de proteínas.

M E T O D O L O G I A

1. Obtención de ribosomas y sobrenadante de tejido fresco.

Los ribosomas fueron extraídos usando el método de Davis et al. (34).

Las papas se lavan con agua corriente. Se pasa un algodón empapado con cloralex al 10% v/v en agua desionizada. Se enjuagan varias veces en agua desionizada y se secan. Se pelan y se pesan 128 g, se cortan en pedazos pequeños y se muelen con --- 160 ml de regulador de molienda (0.03 M de acetato de magnesio, 0.2 M de sacarosa, 0.2 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.06 M de --- cloruro de potasio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol) en un vaso de licuadora con réstato en posición 50, 4 veces durante 10 - segundos con intervalo de 30 segundos entre cada molida. El homogenado se filtra a través de 4 capas de gasa sobre un vaso de precipitado previamente enfriado y se centrifuga por 15 minutos a 20000 xg. El sobrenadante se coloca sobre un colchón de sacarosa (2 ml de sacarosa 0.5 M y 2 ml de sacarosa 1 M en -- 0.04 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.02 M de cloruro de potasio, 0.01 M de acetato de magnesio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol) y se centrifuga por tres horas y media a 100000 xg. El sobrena--- dante obtenido en el paso de centrifugación anterior se almacena a -70°C. El precipitado se disuelve en el volumen mínimo de solución A (0.002 M tris-ácido acético pH 7.6, 0.001 M de acetato de magnesio, 0.02 M de cloruro de potasio y 0.004 M de 2-mercaptoetanol). Se centrifuga por 60 minutos a 100000 xg. El -- precipitado obtenido en el paso anterior se resuspende en la - solución B (0.002 M tris-ácido acético pH 7.6, 0.001 M de acetato de magnesio, 0.02 M de cloruro de potasio, glicerol al 25%

y 0.004 M de 2-mercaptoetanol) en un volumen mínimo para que se disuelva. Se centrifuga a 9000 xg durante 10 minutos. El precipitado se descarta y al sobrenadante se le determina la concentración de ribosomas por el método espectrofotométrico (ver punto 4). Se mide el volumen final y se guarda a -70°C . A esta última fracción se le denomina ribosomas K_{20} .

2. Obtención de lavado ribosomal de tejido fresco.

A una mezcla de varias extracciones de ribosomas K_{20} , se les agrega cloruro de potasio para obtener una concentración final de 300 mM, se agita continuamente por 60 minutos a 4°C y se centrifuga a 157000 xg, 60 minutos. Al sobrenadante obtenido se le denomina lavado ribosomal (L.R.).

3. Concentración de proteínas del lavado ribosomal por sulfato de amonio.

Al lavado ribosomal se le agrega la cantidad adecuada de sulfato de amonio sólido hasta obtener 80% de saturación a -4°C con agitación constante. Se agita 60 minutos más y se deja reposando a 4°C -15 minutos. Se agita 15 minutos más y se transfiere al tubo de centrifuga. Centrifugar a 20000 xg durante 15 minutos a 4°C . Se obtiene un precipitado que se denomina lavado ribosomal p80 (L.R.p80) y un sobrenadante el cual se denomina lavado ribosomal S_{100} (L.R. S_{100}). El precipitado L.R.p80 se disuelve en agua desionizada en la cantidad suficiente y se pone a dializar exhaustivamente contra la solución de diálisis (0.002 M tris-ácido acético pH 7.6, 0.1 M de acetato de potasio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol). Al precipitado L.R.p80 dializado se le determina el contenido de proteínas por los métodos de Lowry y espectrofotométrico.

El sobrenadante del sulfato de amonio L.R.S₁₀₀ se dializa exhaustivamente contra agua desionizada y se liofiliza. Se disuelve en un volumen mínimo y se dializa contra la solución de diálisis. Se determina su contenido de proteínas por el método de Lowry. El L.R.S₁₀₀ no mostró ningún efecto sobre la germinación de semillas en los bioensayos de germinación.

4. Determinación de la concentración y pureza de ribosomas.

Este método consiste en medir la densidad óptica a 260 nm y sustituir este valor en la siguiente igualdad:

$$\text{mg/ml de ribosomas} = \frac{\text{D.O.}_{260} \times \text{F.D.}}{20}$$

siendo D.O.₂₆₀ la densidad óptica medida a 260 nm de la muestra y F.D. es el factor de dilución de la muestra (por lo general la solución de ribosomas se lleva a una dilución de 1:200).

El rendimiento total de ribosomas se obtiene multiplicando mg/ml de ribosomas por el volumen total de la muestra, el resultado será la cantidad total de ribosomas en mg:

$$\text{mg/ml de ribosomas} \times \text{volumen total} = \text{mg ribosomas totales}$$

Para obtener la pureza de los ribosomas K₂₀ se utilizan las relaciones de densidad óptica a 260nm/280nm y 260nm/230nm. Si consideramos que en forma aproximada la cantidad de ácidos nucleicos y proteínas que forman parte de los ribosomas es igual, la relación de densidades ópticas de 260nm/280nm debe darnos la unidad. Si es mayor que la unidad quiere decir que la cantidad de proteínas es menor que la de ácidos nucleicos y si es menor a dicha unidad lo contrario es realidad. Semejante a lo anterior ocurre con la relación de 260nm/230nm puesto que a longitudes de onda de 230nm el enlace peptídico presente en --

las proteínas absorbe fuertemente (35).

También se hace una dilución (1:500) de una mezcla de ribosomas K_{20} con el fin de obtener su espectro de absorción, éste se lee desde 220nm hasta 460nm en un espectrofotómetro.

5. Determinación de proteínas.

a) Método de Lowry.

El método de Lowry (36) consiste en la formación de un complejo colorido entre el cobre en solución básica y el reactivo de Folin. El cobre forma un complejo con las proteínas, el cual reduce el reactivo de Folin para dar un color azul intenso que puede ser medido espectrofotométricamente.

Se usan volúmenes de 10 a 200 μ l de muestra problema, ésta se mezcla con 4 ml de solución alcalina (50 partes de solución C y una parte de solución D; C es una solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N; D es una mezcla en partes iguales de sulfato de cobre al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2%). Se esperaron 10 minutos y se agrega 0.4 ml de reactivo de Folin diluido en agua (1:2.5), se mezcla, se espera 30 minutos y se lee contra un blanco preparado de la misma forma en el que en lugar de la muestra problema se usa agua; se lee a 750nm. Los valores obtenidos de absorbancia se interpolan en una curva patrón de albúmina bovina.

b) Método espectrofotométrico.

Este método (35) se utiliza también para determinar las cantidades de proteínas de las muestras problema. Consiste en medir directamente de las muestras problema la densidad óptica a 260nm y 280nm y sustituir los valores obtenidos en la siguiente igualdad:

$$\text{mg/ml de proteína} = (1.48 \times \text{D.O.}_{280} - 0.74 \times \text{D.O.}_{260}) \times \text{F.D.}$$

Siendo D.O.₂₈₀ la densidad óptica medida a 280nm

D.O.₂₆₀ la densidad óptica medida a 260nm

F.D. factor de dilución de la muestra problema (por lo general se utilizaron diluciones 1:20).

Para obtener el rendimiento total de proteína multiplicamos mg/ml de proteína por el volumen total de la muestra, el resultado será la cantidad total de proteína en mg:

$$\text{mg/ml de proteína} \times \text{volumen total} = \text{mg de proteína total}$$

6. Bioensayo con diferentes semillas.

a) Prueba de germinación para semillas de maíz (Zea mays).

Las semillas de maíz se lavaron con una solución de cloralex al 5% v/v durante 10 minutos. Se lavan con agua desionizada estéril 4 veces (500 ml en cada ocasión). Se secan con papel estéril. Se colocan 25 semillas sobre papel filtro estéril dentro de una caja de petri de 9 cm de diámetro previamente esterilizada. Se agregaron 10 ml de la solución a probar el efecto sobre la germinación. La solución estaba formada de diferentes concentraciones de muestra de proteína en 1.0 ml de solución 80-20 (80mM acetato de potasio, 20mM cloruro de potasio y 2mM Tris-ácido acético pH 7.6) y 9 ml de agua. Los controles consistieron de 10 ml de agua o 1 ml de solución 80-20 y 9 ml de agua. Las cajas petri se cierran y se cubren totalmente con papel aluminio. Después de 72 horas bajo condiciones de obscuridad a 26°C, se cuentan el número de semillas germinadas en cada caja petri. El criterio de germinación utilizado fue la protrusión de la radícula de la semilla de maíz.

b) Prueba de germinación para semillas de trigo (Triticum aestivum) y semillas de ajonjolí (Sesamum indicum).

Las semillas de trigo y ajonjolí se lavan con agua desionizada estéril dos veces (250 ml en cada ocasión). Se secan con papel estéril (las semillas se dejan encima del papel estéril alrededor de 10 minutos cerca de un mechero Bunsen con el fin de obtener un mejor secado de las semillas y facilitar su manejo). Se colocan 25 semillas sobre un papel filtro estéril que se encuentra colocado en el fondo de un frasco Gerber también estéril, se cuida que las semillas queden separadas unas de otras. Se agregan 2 ml de la solución a probar el efecto sobre la germinación. La solución estaba formada de diferentes concentraciones de la muestra de proteína en 0.2 ml de solución 80-20 y 1.8 ml de agua. Los controles consistieron de 0.2 ml de solución 80-20 y 1.8 ml de agua o 2 ml de agua. Los frascos se tapan con papel aluminio estéril. Después de 48 horas bajo condiciones de: luz durante 12 horas seguidas de 12 horas en oscuridad a una temperatura de 26°C ; se cuenta el número de semillas germinadas y no germinadas teniendo como criterio de germinación nuevamente la protrucción de la radícula.

Nota: Tanto para a) y b) las semillas que se utilizan se escogen de tal manera que sean las que presentan la mejor apariencia externa. Las que muestran daños, color diferente o tamaño más pequeño que la mayoría de las semillas disponibles se desechan.

El porcentaje de germinación en a) y en b) se calcula contra el control (0.2 ml de solución 80-20 y 1.8 ml de agua).

7. Tratamiento del lavado ribosomal (L.R.p80) con PMFS.

Se descongela el volumen disponible de lavado ribosomal (L.R.p80) y se le agrega PMFS (floruro de fenil metil sulfonilo) 0.1 M en etanol absoluto hasta obtener la concentración de

5 mM y 5% respectivamente (37). Se mezcla y se incuba en un baño de agua a 30°C durante 30 minutos, agitando esporádicamente varias veces durante ese tiempo. Se guarda a -70°C.

8. Cromatografía de filtración en gel.

El Sephadex es una sustancia versátil para la separación de moléculas con diferentes pesos moleculares, que actúa como un tamiz molecular. El Sephadex en medio acuoso se hincha; ya en equilibrio se coloca en la columna y se deja sedimentar. Así, los gránulos de Sephadex expandidos retienen moléculas con pesos moleculares variables según su límite de exclusión. El Sephadex G-100 tiene un límite de exclusión de 100 000. Se puede determinar el peso molecular sabiendo el volumen de exclusión de moléculas de peso molecular conocido.

En la columna de vidrio se transfiere la resina de Sephadex G-100 previamente expandido hasta formar una columna de 1 cm de diámetro y 59.2 cm de altura. La columna se equilibra previamente con solución (80 mM acetato de potasio, 20 mM cloruro de potasio, 2 mM tris-ácido acético pH 7.6 y 5% etanol).

Se aplica un volumen no mayor de 3.5 ml de muestra y se eluye con la misma solución con la cual está equilibrada la columna. Se colectan fracciones de 1 ml.

La velocidad de la columna se mantiene constante siendo ésta de 1 ml/4.5 minutos.

A cada fracción colectada se le determina su absorbancia a 280 nm.

9. Determinación de aminoácidos por el método de Rosen.

Para el método de Rosen (38) se preparan las soluciones siguientes:

Solución citrato pH 5.0: 21.008g de ácido cítrico monohidratado se disuelven en 200 ml de NaOH al 4%.

Solución B: 0.8g de SnCl_2 dehidratado se disuelven en 500 ml de solución citrato pH 5.0.

Solución F: 20g de Ninhidrina se disuelven en 500 ml de metil celosolve.

Reactivo ninhidrina: Mezcla de las soluciones B y F (1:1).

Procedimiento: A 2 ml de reactivo ninhidrina se le adiciona 0.5 ml de muestra (neutralizada a pH 7.0), la mezcla se agita y se calienta a ebullición durante 20 minutos en baño María. La coloración máxima se desarrolla después de 10-12 minutos. Inmediatamente después remover del baño de agua y añadir 5 ml de n-propanol al 50%. Se agita vigorosamente, dejar que se enfríe a temperatura ambiente y leer en un espectrofotómetro a 570 nm - contra un blanco que se prepara de la misma forma con 0.5 ml - de agua en lugar de la muestra.

10. Hidrólisis enzimática de la fracción III.

Una mezcla de 50 μl de la fracción III (1.52 mg/ml), 10 μl de proteasa K (1 mg/ml) y 160 mM tris-ácido acético pH 7.5 en un volumen final de 300 μl . Se incuba a 37°C en baño María durante 30 minutos. La reacción se detiene al disminuir la temperatura de incubación a 4°C. La cantidad de aminoácidos libres se determina por el método de Rosen.

11. Hidrólisis básica de la fracción III.

La hidrólisis de la fracción III se lleva a cabo con un tratamiento de NaOH 5 N a 15 lb/pulg² de presión en una autoclave durante 20 minutos, posteriormente se neutraliza la muestra a pH 7 y se le determina el contenido de aminoácidos li---

bres por el método de Rosen.

12. Incorporación de leucina radioactiva en ejes embrionarios de maíz (Zea mays).

Se colocaron 5 ejes embrionarios de maíz por cada vial y se agregó 60 μ l de solución de imbibición (80mM de acetato de potasio, 20mM de cloruro de potasio y 1mM de tris-ácido acético pH 7.6). Se incubó el sistema por 32 horas a 25°C para el control y la fracción inhibitoria.

Después de las 32 horas se trasladaron los ejes embrionarios de control y fracción inhibitoria a otros viales conteniendo 60 μ l de solución de germinación (80mM de acetato de potasio, 20mM de cloruro de potasio, 1mM de tris-ácido acético pH 7.6 y 4 μ Ci de leucina- H^3). Este sistema se incubó durante 37 horas más a 25°C.

Al término de la incubación los ejes embrionarios se sacaron del vial y se homogeneizaron con 1.5 ml de solución de imbibición en un politrón (PCV-2, Kinematic). El homogeneizado se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga clínica. El sobrenadante obtenido se centrifuga a 25000 xg por 30 minutos. Del sobrenadante obtenido se toma una alícuota de 1 ml y se le agrega la cantidad necesaria de ácido tricloroacético con L-leucina hasta alcanzar una concentración final de ácido tricloroacético al 16%-0.06 M L-leucina. El sistema se deja a 4°C durante 30 minutos. El precipitado obtenido en este último paso se colecta en un filtro de fibra de vidrio GF/A. Los filtros se lavan 3 veces con 2 ml de ácido tricloroacético al 5% a 4°C. Los filtros se dejan secar con una lámpara de 250 W durante 30 minutos.

Cada filtro se coloca en un vial con 10 ml de líquido de

centelleo (150 mg de POPOP, 2.5 g de PPO en 500 ml de tolueno)-
y se cuenta la radioactividad en un contador de centelleo Pac-
kard Tri-Carb mod. 3255.

R E S U L T A D O S

I. Extracción del L.R.p80.

Con el fin de poder iniciar el estudio del factor inhibitorio de síntesis de proteínas in vitro asociado a ribosomas de tubérculos de papa latente fue necesario estandarizar la metodología para la obtención de: ribosomas de tubérculos de papa latente, lavado ribosomal y su concentración con sulfato de amonio (L.R.p80); así como la determinación de su contenido de proteína como se describe en la metodología.

Para la estandarización de la extracción de ribosomas, a los ribosomas K_{20} obtenidos como se describe en la metodología, se les determinó la pureza utilizando las relaciones de densidad óptica de 260nm/280nm y 260nm/230nm (punto 4 de métodos), los valores obtenidos se muestran en la tabla I. Se puede observar que los dos valores de relaciones de densidad óptica fueron semejantes para las diferentes mezclas de ribosomas K_{20} (de la 1 a la 9) siendo los promedios de éstas relaciones de 1.56 y 1.03 respectivamente. Los valores obtenidos nos dan información de la contribución relativa de ácidos nucleicos y proteínas contenidos en los ribosomas K_{20} .

Debido a la presencia de las bases púricas o pirimídicas, los ácidos nucleicos muestran una fuerte absorción en el ultravioleta con un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm; mientras que las proteínas exhiben una máxima absorción a 280nm debido principalmente al contenido de aminoácidos como tirosina y triptofano y otra absorción secundaria a 230nm por la presencia del enlace peptídico (35).

En base a éste conocimiento se puede leer el espectro de absorción desde 220nm hasta 460nm en un espectrofotómetro, co-

Tabla I
Pureza de ribosomas K₂₀

Mezcla de ribosomas K ₂₀	No. de extracciones en la mezcla	D.O. ₂₆₀	D.O. ₂₆₀
		D.O. ₂₈₀	D.O. ₂₃₀
1	3	1.64	1.04
2	5	1.58	0.99
3	9	1.6	1.02
4	6	1.604	1.013
5	4	1.59	1.01
6	4	1.57	1.006
7	9	1.6	1.02
8	6	1.605	0.989
9	11	1.59	1.03
No. de extracciones totales 57		Promedio 1.56	Promedio 1.03

Tabla II
Contenido de proteína en L.R.p80

No. de ex- tracciones en la mezcla	Proteína (mg/ml)	L.R.p80 (ml)	Proteína Total (mg)	mg de Proteína total/extracción
6	3.04	3.0	9.12	1.5
9	2.5	6.0	15.0	1.6
11	5.2	4.2	21.24	1.98
No. total de extracciones 26			Promedio	Promedio 1.693

no otra forma de determinar la pureza de los ribosomas K_{20} . En la figura 1 se observa que la muestra tiene un máximo de absorción a 260nm y una absorción menor a 280nm. A longitudes de onda mayores de 280nm la absorción disminuye casi en forma total.

Una vez que los ribosomas K_{20} fueron obtenidos se procedió a la obtención del L.R.p80 como se indica en los puntos 2 y 3 de métodos. El contenido de proteína total en el L.R.p80 medido por el método de Lowry (punto 5 de métodos) se muestra en la tabla II. La proteína total aumenta conforme se incrementa el número de extracciones en la muestra. El promedio de proteína total por extracción es de 1.693 mg.

II. Optimización del bioensayo de germinación de diferentes semillas.

Se establecieron los bioensayos de germinación con semillas de maíz, trigo y ajonjolí para conocer el efecto que tiene el L.R.p80 en un sistema in vivo como es la germinación de semillas, la cual es dependiente de síntesis de proteínas. Fue necesario comprobar que los efectos mostrados por el L.R.p80 sobre la germinación son debidos a su contenido macromolecular y no por los efectos generados por la solución en la cual está disuelto tales como el pH y la fuerza iónica.

Debido a que la solución en la cual se encuentra el L.R.p80 contiene sales de cloruro de potasio y acetato de potasio, fue necesario probar soluciones con diferentes concentraciones de éstas sales para determinar aquella solución que proporcionara un alto porcentaje de germinación con las semillas utilizadas.

Para el bioensayo de germinación de semillas de maíz se mantuvo constante el volumen de 10 ml de solución de prueba en

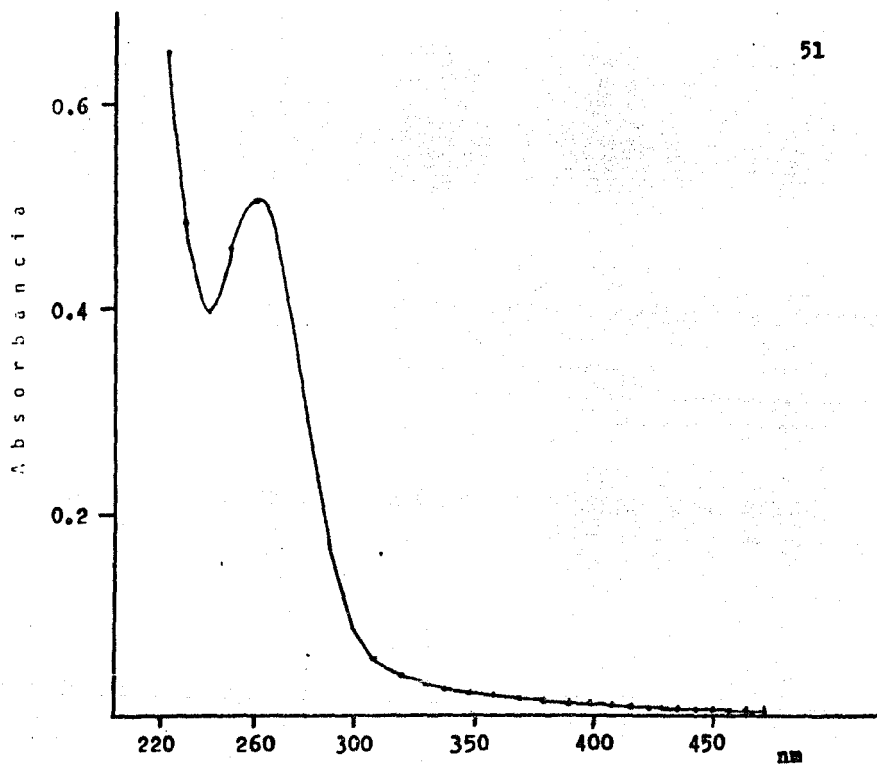


Figura 1 Espectro de absorción de ribosomas K₂₀.

las cajas petri el cual fue determinado previamente (39) así - como las 72 horas de incubación. A partir de éstas condiciones - en los controles con H_2O se obtiene un buen porcentaje de germinación. Como puede observarse en la tabla III, A), si se aumenta el número de semillas de 10 a 25 en el control de H_2O el - porcentaje de germinación se mantiene (93%) (Tabla III, A) con lo que se observa que ni el espacio ni el volumen de solución - son limitantes. Se probó el efecto sobre la germinación con diferentes soluciones (10 ml) en las cuales la concentración de acetato de potasio y cloruro de potasio fue variada. Las soluciones que muestran mayor porcentaje de germinación son la solución 80-20 y la solución 8-2 tanto con 10 o 25 semillas, mientras que las otras soluciones con combinaciones diferentes de sales dieron un porcentaje de germinación menor que el control de agua.

En la optimización de los bioensayos con semillas de ajonjolí y trigo se mantiene constante el número de semillas, así - como la temperatura ($26^{\circ}C$). Como se observa en la tabla III, B) y III, C) el volumen de 6 ml en caja petri muestra muy bajo porcentaje de germinación con ambas semillas tanto para el control de H_2O como para las soluciones 80-20 y 8-2. La disminución del volumen a 2 ml en frasco Gerber favorece en forma apreciable la germinación a un tiempo menor (48 horas) siendo - la solución 8-2 en ambas semillas la que muestra el mejor porcentaje de germinación (97%); valor muy cercano al alcanzado - por los controles de H_2O (98-99%).

La tabla IV muestra el efecto del volumen de solución sobre la germinación de semillas de ajonjolí y trigo. Utilizando - dos soluciones diferentes y agua como control se determina el porcentaje de germinación con 2 y 6 ml de volumen. El control -

Optimización del sistema de germinación

Semilla	No. de Semillas	Solución	Volumen (ml)	Tiempo (hr)	Recipiente	Germinación %
A Maíz	10	H ₂ O	10	72	Caja Petri	93
	10	100-0	10	72	" "	89
	10	0-100	10	72	" "	83
	10	50-50	10	72	" "	86
	10	70-30	10	72	" "	86
	10	0-20	10	72	" "	70
	10	80-20	10	72	" "	92
	10	8-2	10	72	" "	92
	25	H ₂ O	10	72	" "	93
	25	80-20	10	72	" "	92
	25	8-2	10	72	" "	93
	25	H ₂ O	2	48	Gerber	98
	25	H ₂ O	6	96	Caja Petri	36
	25	80-20	2	48	Gerber	92
	25	80-20	6	96	Caja Petri	32
	25	8-2	2	48	Gerber	97
	25	8-2	6	96	Caja Petri	38
	25	H ₂ O	2	48	Gerber	99
25	H ₂ O	6	96	Caja Petri	36	
25	80-20	2	48	Gerber	94	
25	80-20	6	96	Caja Petri	66	
25	8-2	2	48	Gerber	97	
25	8-2	6	96	Caja Petri	44	

Solución 2mM Tris-ác.acético pH 7.6 con: 100-0 (100mM KAc); 0-100 (100mM KCl); 50-50 (50mM KAc y 50mM KCl); 70-30 (70mM KAc y 30mM KCl); 0-20 (20mM KCl); 80-20 (80mM KAc y 20mM KCl); 8-2 (8mM KAc y 2mM KCl). Donde KAc. es Acetato de potasio.

Tabla IV
Efecto del volumen sobre la germinación

	Ajonjolí*		Trigo*	
	Volumen		Volumen	
	2ml	6ml	2ml	6ml
Control	98	36	99	36
Sol. 80-20	94	32	94	66
Sol. 0-100	94	10	30	26
Sol. 8-2	96	54	98	40

* % de germinación

Sol. 2mM tris-ác.acético pH 7.6 con: 80-20 (80mM KAc y 20mM KCl);
0-100 (100mM KCl); 8-2 (8mM KAc y 2mM KCl).

Tabla V
Efecto del tiempo sobre la germinación

	Ajonjolí*		Trigo*		Maíz*	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	48 hr	72 hr
Control	46	98	40	99	68	99
Sol. 100-0	-	-	-	-	46	99
Sol. 80-20	38	94	36	96	46	97
Sol. 8-2	46	97	40	97	43	98

* % de germinación

Sol. 2mM tris-ác.acético pH 7.6 con: 100-0 (100mM KAc); 80-20
(80mM KAc y 20mM KCl); 8-2 (8mM KAc y 2mM KCl).

Icubación de semillas en condiciones de luz (ajonjolí y trigo) y oscuridad (maíz).

(H₂O) y las diferentes soluciones coinciden en un mayor porcentaje de germinación con 2 ml de volumen para ambas semillas,-- siendo nuevamente el porcentaje de germinación con las soluciones 80-20 o la 8-2 casi igual que al control.

En la tabla V se muestra el tiempo óptimo en forma comparativa para la germinación de semillas de ajonjolí, trigo y maíz. Se encontró que el tiempo óptimo para alcanzar un buen porcentaje de germinación con semillas de ajonjolí y trigo es a las 48 horas, siendo la solución 8-2 la que se acerca más al porcentaje alcanzado por el control. Por el contrario las semillas de maíz requieren de un tiempo mayor para germinar. El tiempo óptimo para obtener un alto porcentaje de germinación con éstas semillas fue de 72 horas tanto con agua como con cualquiera de las soluciones, siendo nuevamente la solución 8-2 la que muestra más alto porcentaje de germinación.

En la tabla VI se muestra el efecto de la luz sobre la germinación de ajonjolí, trigo y maíz, utilizando 3 diferentes soluciones y agua como control. El porcentaje de germinación que se obtiene tanto con semillas de trigo como de ajonjolí, bajo condiciones de obscuridad continua no muestra diferencias significativas con respecto al encontrado en condiciones de luz durante 48 horas. Utilizando semillas de maíz se observa que el porcentaje de germinación mejora en todos los casos cuando las condiciones son de obscuridad continua durante 72 horas. Con los tres tipos de semillas las soluciones 80-20 y/o 8-2 dieron los mejores porcentajes de germinación.

III. Inhibición de la germinación de diferentes semillas por L.R. p80.

Con las condiciones optimizadas de germinación (luz, tempe

Tabla VI
Efecto de la luz sobre la germinación

	Ajonjolí*		Trigo*		Maíz*	
	48 hr oscu- ridad	48 hr Luz	48 hr oscu- ridad	48 hr Luz	72 hr oscu- ridad	72 hr Luz
Control	92	94	92	96	96	90
Sol. 100-0	86	93	78	76	89	70
Sol. 30-20	94	94	95	96	97	73
Sol. 8-2	96	97	97	97	97	84

* % de germinación.

Sol. 2mM tris-ác.acético pH 7.6 con: 100-0 (100 mM KAc); 30-20 (30mM KAc y 20mM KCl); 8-2 (3mM KAc y 2mM KCl).

ratura, volumen y solución) se mide el efecto de la proteína -- del L.R.p80 sobre la germinación en los tres tipos de semillas

Se ensayaron diferentes concentraciones de proteína (L.R.p80) sobre la germinación de semillas de maíz, trigo y ajonjolí (Tabla VII y figura 2). Se observa que para los tres tipos -- de semillas utilizadas, al aumentar la concentración de proteína -- del L.R.p80, el porcentaje de inhibición de la germinación -- aumenta hasta un máximo, siendo este de 0.11 mg/ml para semi--- llas de maíz y de ajonjolí y de 0.15 mg/ml para semillas de -- trigo; a concentraciones mayores, la inhibición se revierte no totalmente, pero siempre se sigue observando.

IV. Purificación del inhibidor presente en el L.R.p80.

Con el fin de purificar el factor inhibitorio presente en el L.R.p80 éste fue aplicado en cromatografía en columna de Se phadex G-100 (dimensiones: 0.9 cm X 26 cm). El L.R.p80 se trata previamente con 5 mM de PMFS para inhibir las proteasas dependientes de sulfhidrilo. El esquema de elución se muestra en la figura 3. Para su estudio las fracciones fueron separadas en -- cuatro regiones; fracciones: I, IIA, IIB y III, siendo la frac--- ción III la que eluye al final.

A cada una de las cuatro fracciones separadas, concentra-- das y dializadas, se les midió su efecto sobre la germinación -- de semillas de ajonjolí. En la figura 3 se señalan las fraccio-- nes separadas y en la tabla VIII su efecto sobre la germina--- ción. Los porcentajes de inhibición obtenidos con las cuatro-- fracciones separadas, se comparan con el valor de inhibición de la muestra aplicada: L.R.p80. La inhibición se encontró en la -- fracción IIB y III, siendo la primera de 77% y la segunda del 17%. La fracción I manifiesta una inhibición mucho menor.

Tabla VII

Efecto del L.R. p⁸⁰ sobre la germinación de diferentes semillas
Maíz (Zea mays)

L.R. p ⁸⁰ (mg/ml)	% de Germinación ⁺	% de Inhibición
0.015	78	22
0.03	60	40
0.072	42	58
0.108	38	62
0.11	35	65
0.15	56	44
0.3	73	27
0.596	80	20

Trigo (Triticum aestivum)

L.R. p ⁸⁰ (mg/ml)	% de Germinación	% de Inhibición
0.015	83	17
0.11	52	48
0.15	50	50
0.3	67	33

Ajonjolí (Sesamum indicum)

L.R. p ⁸⁰ (mg/ml)	% de Germinación	% de Inhibición
0.015	85	15
0.11	44	56
0.15	60	40
0.3	76	24

+ Calculado con respecto al control (ausencia de L.R.).

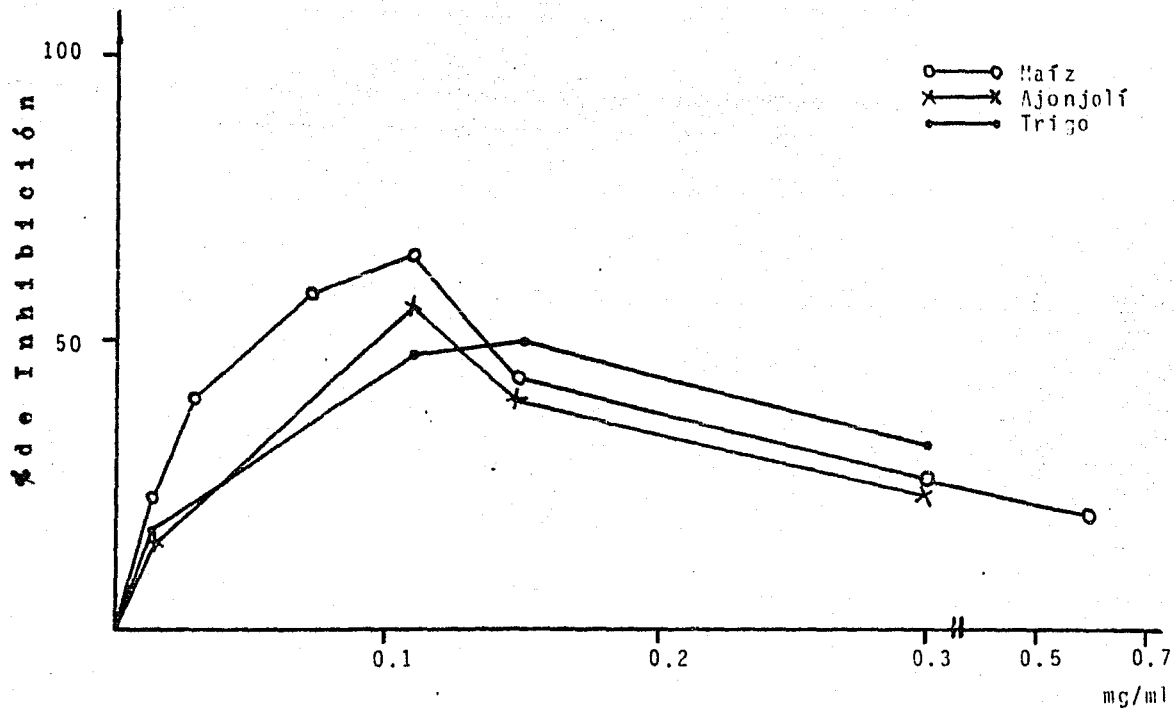


Figura 2 Inhibición de la germinación por el L.R.p30.

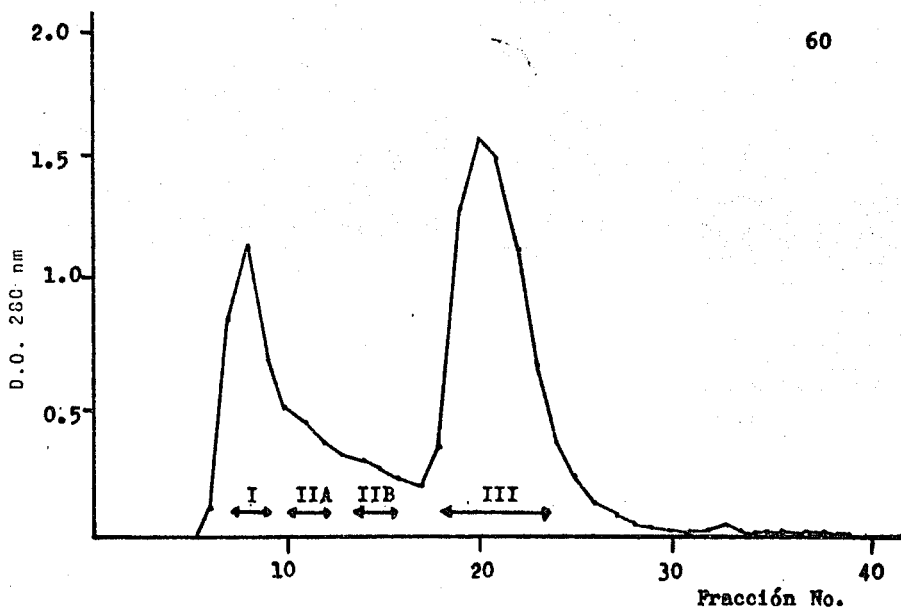


Figura 3 Cromatografía en columna Sephadex G-100 del L.R. p80 (L.R. p80, después de 10 días de su obtención). 2.5 ml con 5.9 mg de L.R. p80 -- tratados con 5mM de PMPS en 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-Tris-ácido acético - pH 7.6 fueron aplicados a la columna (0.9 - cm X 26 cm) y eluido con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1 ml cada 3.5 minutos.

Tabla VIII
Localización del inhibidor en los eluatos del
Sephadex G-100 (de la figura 3).

Muestra o Eluato	Concentración mg/ml	Inhibición* %
L.R. p80	0.1	56
Fracción I	0.03	22
Fracción IIA	0.015	16
Fracción IIB	0.015	77
Fracción III	0.015	17

* Bicensayo de germinación con semillas de ajonjolí.

Debido a que la inhibición se encuentra en tres fracciones y siendo dos de ellas de menor contenido proteico, se pensó que con una columna más resolutive el inhibidor pudiera ser concentrado preferencialmente en una fracción.

Se decidió aumentar las dimensiones de la columna para la cromatografía en Sephadex G-100 (1.0 cm X 59.2 cm). En ésta nueva columna se cromatografió el L.R. p80 tratado previamente con 5 mM de PMFS, después de 5 días de haber sido obtenido. En la figura 4 se muestra el patrón de separación logrado bajo estas últimas condiciones. El esquema de elución es similar al obtenido con la primera columna de cromatografía en Sephadex G-100. De nuevo se encuentra que la fracción III muestra mejor separación, se juntaron las fracciones colectadas en las tres regiones (fracciones I, II y III). Con cada una de estas fracciones se les determinó nuevamente la inhibición en la germinación de semillas de trigo, se encontró que la fracción III dió el mayor porcentaje de inhibición (Tabla IX).

Por último la fracción III dos días después de haber sido obtenida fue recromatografiada una vez más en la columna de Sephadex G-100 bajo las mismas condiciones de su obtención. En la figura 5 se observa el patrón de elución de la fracción III, el volumen en el cual eluye sigue siendo el mismo que mostró en la primera cromatografía a partir de L.R. p80.

Para conocer si había aumentado la pureza de las fracciones I, II y III después que se ha realizado la cromatografía con Sephadex G-100 se calculan las veces de purificación para estas tres fracciones como se muestra en la tabla X. La fracción I presentó un rendimiento del 8.6% con respecto a la proteína total de la fracción original de la cual procedía aunque su concentración por gramo de tejido fue mayor que la de las -

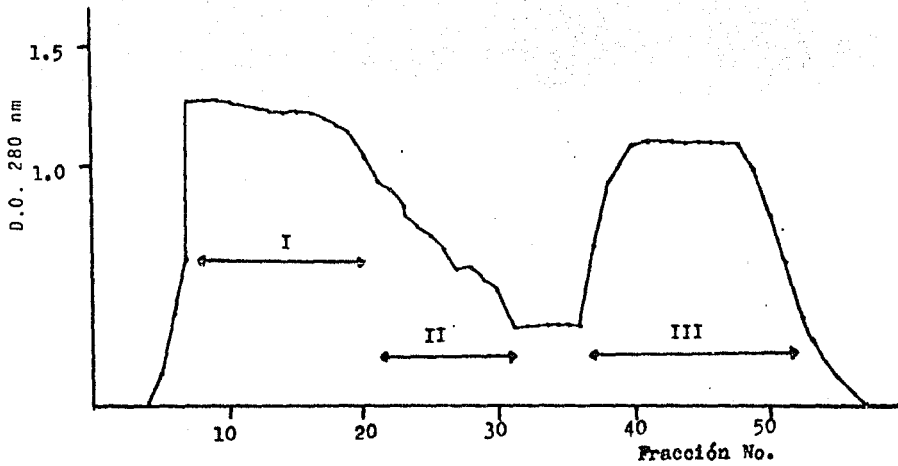


Figura 4 Cromatografía en columna de Sephadex G-100 del L.R.p80 (L.R.p80 después de 5 días de su obtención). 4.5 ml con 7.6 mg de L.R.p80 fueron tratados con 5mM de PMFS en 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6 fueron aplicados a la columna (1.0cm X 59.2cm) y eluido con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

Tabla IX
Localización del inhibidor en los eluatos de la
columna de Sephadex G-100 (de la figura 4)

Muestra o Eluato	Concentración mg/ml	Inhibición* %
L.R. p80	0.1	56
Fracción I	0.0015	12
Fracción II	0.0015	21
Fracción III	0.0015	39

* Bioensayo de germinación con semillas de trigo.

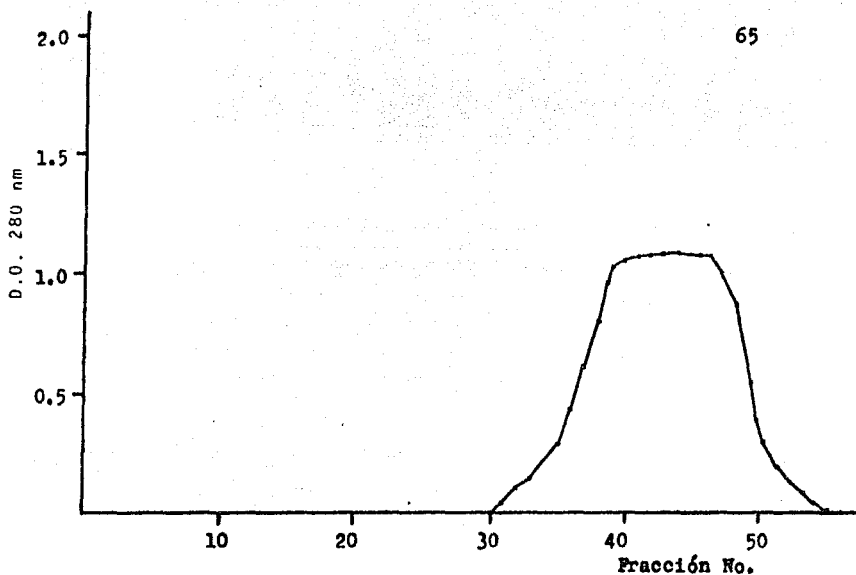


Figura 5 Recromatografía en columna Sephadex G-100 de la fracción III. Después de 2 días de su obtención la fracción III (2.9 mg) concentrada, dializada y disuelta en 2 ml de 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6 fue aplicada a la columna (1.0cm X 59.2cm) y eluida con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

Tabla X

Purificación de la fracción inhibitoria de papa.

Fracción	Proteína Total μ g	Rendi- miento %	Concen- tración g Teji- do.	Actividad* inhibito- ria %	Activi- dad es- pecífi- ca.	Purifi- cación
L. R. 80 p	11750	100.0	7.650	50	6.5	1.0
Frac. I	1020	8.6	2.310	30	12.5	1.5
Frac. II	1722	13.4	1.265	42	33.2	5.1
Frac. III	1258	10.6	0.115	35	400.0	52.0

* Actividad medida en bioensayo con semillas de trigo.

dos fracciones restantes, su grado de purificación fue muy pequeño siendo sólo de 1.5 veces. La fracción III mostró la mayor actividad específica (400.0), su purificación fue de 52 veces - pero su concentración por gramo de tejido fresco y su rendimiento fueron pequeños (0.115 y 10.6 respectivamente).

Por lo tanto se concluye que la fracción III es la que muestra la mayor actividad específica conteniendo la actividad inhibitoria. Por consiguiente fue con ésta fracción con la que se hicieron los estudios posteriores.

V. Características de la fracción III.

Se realizaron diferentes experimentos para obtener un mayor conocimiento acerca de la naturaleza química de la fracción III. En la figura XI puede observarse que tanto el L.R. p80 como la fracción III al ser calentadas a 92°C durante 5 minutos pierden totalmente la capacidad de inhibir la germinación de semillas de maíz manifestándose de esa manera su inestabilidad al calor, en forma independiente de la concentración utilizada.

Para saber si la fracción III mantiene la capacidad inhibitoria de la germinación con el transcurso del tiempo, se hicieron bioensayos con semillas de trigo a diferentes períodos de tiempo de almacenamiento a -70°C . En la tabla XII puede observarse que el porcentaje de inhibición de la germinación disminuye a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor.

Posteriormente se hidrolizó la fracción III con el fin de determinar si ésta era capaz de producir grupos funcionales α -amino libres. En la tabla XIII se muestran los resultados obtenidos después de la hidrólisis tanto alcalina como enzimática. En ésta tabla se observa que para ambos ensayos, a mayor -

Tabla XI

Inestabilidad al calor del L.R.p80 y de la fracción III

Muestra	Concentración mg/ml	% de Inhibición *	
		Sin calentar	Calentada 5' - 92°C
L.R.p80	0.072	58	0.0.
"	0.108	62	0.0
Fracción III	0.015	23	0.0
"	0.0015	39	0.0

* Bioensayo hecho con semillas de maíz para el L.R.p80 y de trigo para la fracción III.

Tabla XII

Inestabilidad al almacenamiento de la fracción III

Fracción	Concentración mg/ml	Variable	Inhibición* %
L.R. p80	0.15	5d a -70°C	50
Fracción III	0.0015	34d "	39
"	0.0015	42d "	34
"	0.0015	91d "	20

* Bioensayo con semillas de trigo.

Tabla XIII

Medición de α -aminos liberados después de hidrólisis de la fracción III.

μg de proteína	$\Delta_{570\text{nm}}$ a) Hidrólisis alcalina	$\Delta_{570\text{nm}}$ b) Hidrólisis con proteasa K
25	0.057	-
80	0.155	0.382
160	0.309	0.981
80 (sin hidrolizar)	0.006	0.007

a) Hidrólisis alcalina: 5N NaOH. 20 minutos a 15 lb/pulg²

b) Hidrólisis con proteasa K: 8 μg proteasa K en 100 mM acetato de potasio, 20mM tris-ác.acético pH 7.5, 30 minutos a --- 37°C. Después de hidrólisis el pH se ajustó a 5.5 y se midió α -NH₂ por el método de Rosen.

$\Delta_{570\text{nm}}$ es la diferencia de absorvancia obtenidas a cada concentración después de hidrólisis.

concentración de la fracción III, los valores de densidad óptica del hidrolizado se incrementan, lo cual demuestra un aumento de los α -amino libres, confirmando la naturaleza proteica de la fracción III.

Entre otras de las características se estudió el cambio de peso molecular de la fracción inhibitoria.

Se llevó a cabo la cromatografía del L.R.p80 así como la recromatografía de las fracciones I y III en Sephadex G-100 a diferentes tiempos de su obtención, para determinar si el tiempo de almacenamiento afectaba sus perfiles de elución.

En la tabla XIV se muestra el tiempo de generación de las diferentes fracciones a partir del L.R.p80. El L.R.p80 después de 5 días de su obtención su perfil de elución presenta las fracciones I, II y III (figura 4) pero si es recromatografiado después de 39 días de almacenamiento aparece en forma predominante la fracción III (Tabla XIV y figura 6).

La fracción I que proviene del L.R.p80 (L.R.p80 con 11 días de almacenamiento) se separa y después de 25 días de almacenamiento a -70°C , fue recromatografiada en Sephadex G-100 bajo las mismas condiciones en que fue obtenida. No obstante que únicamente fue colocada la fracción I en la columna, el patrón de separación resultante (figura 7) muestra la presencia de las fracciones I y II⁺ encontrándose en ésta última las regiones correspondientes a las fracciones II y III (figura 4), sin estar definida la fracción III.

La fracción II⁺ de la cromatografía anterior fue concentrada, dializada, resuspendida en 1 ml y almacenada a -70°C durante 37 días después de los cuales se recromatografió una vez más con Sephadex G-100 bajo las condiciones estandarizadas (punto 8 de métodos). El propósito de realizar lo anterior fue

Tabla XIV

Tiempo de generación de las diferentes fracciones

	Muestra colocada				
	<u>L.R. p⁸⁰</u>	<u>L.R. p⁸⁰</u>	<u>I</u>	<u>II⁺</u>	<u>III</u>
Días después de su obtención	5 a 11	39	25	37	7 a 28
Fracción encontrada.	I, II y III	III	I y II ⁺	III	III

En columna Sephadex 7-100 (1 cm X 59.2 cm).

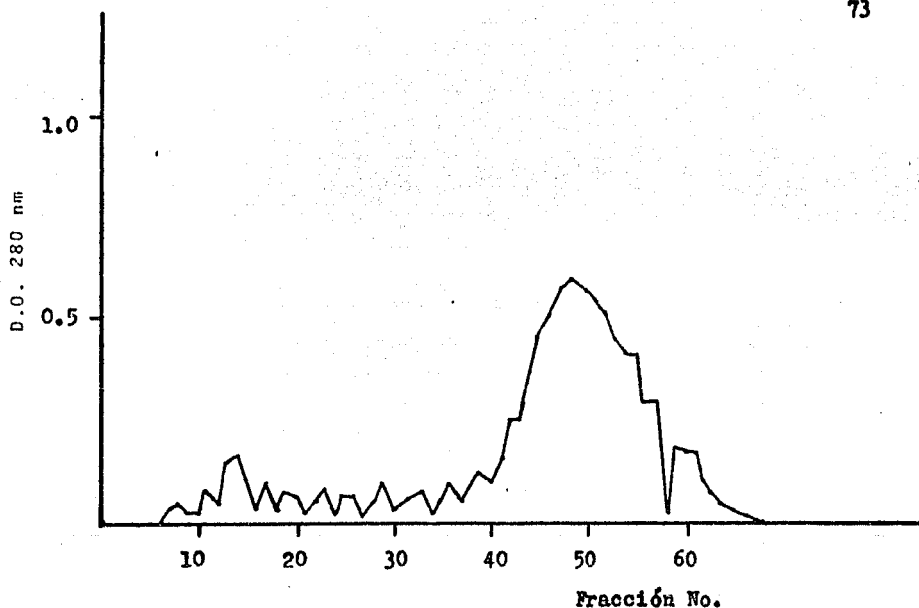


Figura 6 Efecto del almacenamiento en el peso molecular de la fracción inhibitoria. El L.R.p80 (1.8 mg disueltos en 2.5 ml de 80mM Acetato de potasio -20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6) fue tratado con 5mM de PMS después de 39 días de su obtención y aplicado a una columna de Sephadex G-100 (1.0cm X 59.2cm). Se eluyó con -- 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

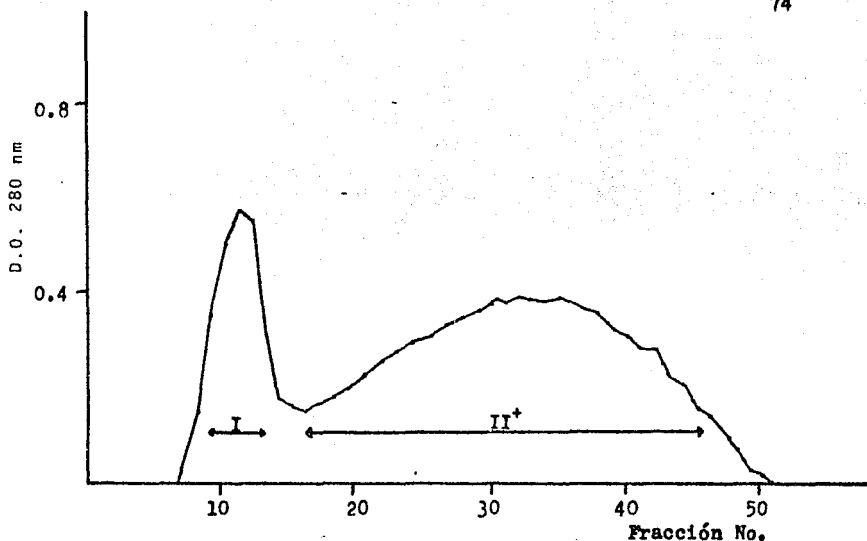


Figura 7 Recromatografía en columna Sephadex G-100 de la fracción I después de 25 días de su obtención.- La fracción I (2.7 mg) se concentró y se disolvió en 1.4 ml de 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6. Se aplicó a la columna (1.0cm X 59.2cm) y se eluyó con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1 mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

el determinar si la fracción II⁺ continúa transformándose hacia pesos moleculares más pequeños. En la figura 8 se puede apreciar que en el esquema de elución resultante se encuentra únicamente la fracción III. Estos resultados proporcionan evidencias de que el tiempo de almacenamiento tanto del L.R. p80 - como de las fracciones I y II⁺ favorece a la transformación hacia la fracción III de un peso molecular menor.

La fracción III después de 28 días de su obtención fue re cromatografiada en columnas de Sephadex G-100 bajo las condiciones estandarizadas para determinar su estabilidad durante su almacenamiento (punto 8 de métodos). En la figura 9 se observa el patrón de elución obtenido, en el cual se encuentra únicamente la fracción III, mostrando que ésta fracción se mantiene estable en cuanto a peso molecular aún a tiempos largos de almacenamiento a -70°C.

VI. Incorporación de leucina-H³ durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

En los experimentos anteriores se demostró que la fracción asociada a ribosomas de tubérculo de papa latente es capaz de inhibir la germinación de semillas de maíz, trigo y ajonjolí. Para demostrar que la inhibición de la germinación de dichas semillas es debida a la inhibición de la síntesis de proteínas por la fracción inhibitoria, se estableció un experimento de incorporación de leucina-H³ en un sistema in vivo (ejes embrionarios de maíz) según punto 8 de métodos.

Los resultados se muestran en la tabla XV en donde se observa que a una concentración tan baja de la fracción III como 3 µg/ml se obtiene un porcentaje elevado de inhibición en la incorporación de leucina-H³ siendo éste valor de 90.5%. Aumen-

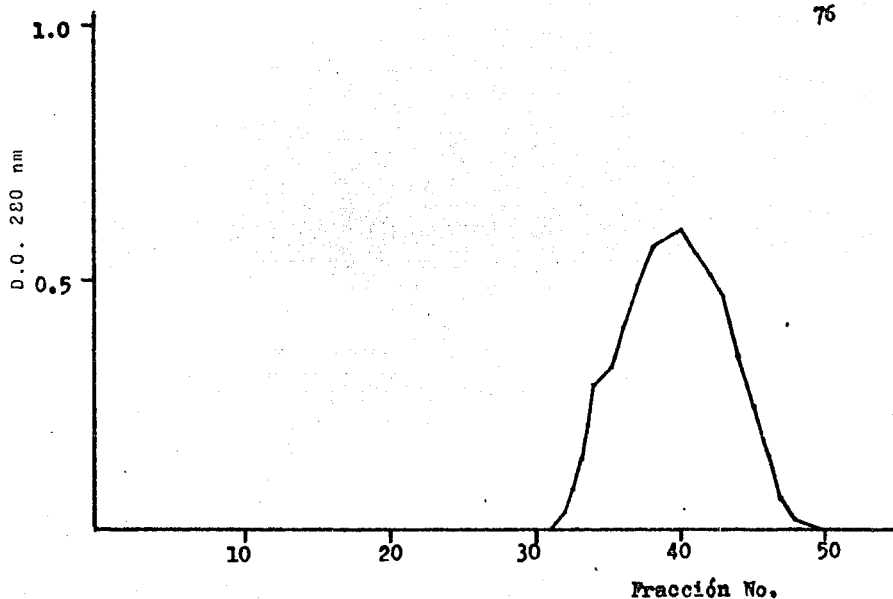


Figura 8 Recromatografía en columna Sephadex G-100 de la fracción II⁺ después de 37 días de su obtención. La fracción II⁺ (1.9 mg) concentrada, dializada y disuelta en 1ml de 80mM de Acetato de potasio -20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6; fue aplicada a la columna (1.0cm X 59.2cm) y eluida con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se colectaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

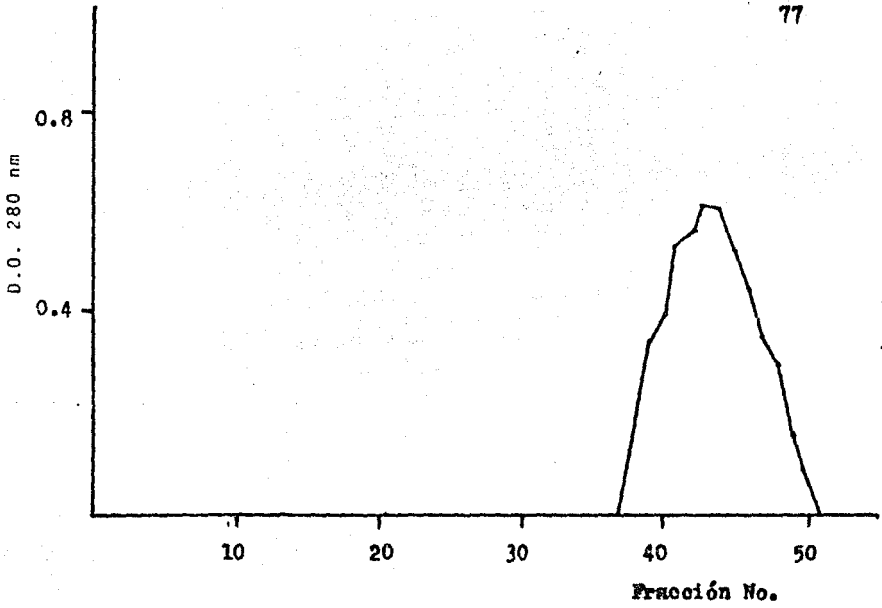


Figura 9 Recromatografía en columna Sephadex G-100 de la fracción III después de 28 días de su obtención. La fracción III (1.2 mg) concentrada, dializada y disuelta en 1ml de 80mM de Acetato de potasio-20 mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6 fue aplicada a la columna (1.0cm X 59.2cm) y eluida con 80mM de Acetato de potasio-20mM de KCl-1mM de Tris-ácido acético pH 7.6-5% etanol. Se coleccionaron fracciones de 1ml cada 3.5 minutos.

Tabla XV

Incorporación de leucina- H^3 por ejes embrionarios de maíz (*Zea mays*), en presencia de la fracción III de Solanum tuberosum L.

Fracción III Concentración $\mu\text{g/ml}$	Radioacti- vidad cpm/volumen total	Incorpora- ción de leucina- H^3 %	Inhibición de la incor- poración de leucina- H^3
-	11540	100.0	-
3	1098	9.5	90.5
30	2083	18.1	81.9
60	379	3.3	96.7

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

tando la concentración de la fracción inhibitoria hasta un valor de 60 $\mu\text{g/ml}$ (un incremento de 20 veces) la inhibición de la incorporación de leucina- H^3 solo aumenta hasta 96.7%.

Este experimento muestra que efectivamente, la fracción — III tiene capacidad de inhibir la síntesis de proteínas durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

D I S C U S I O N

Como la fracción inhibitoria de síntesis de proteínas (in vitro) a estudiar está asociada a los ribosomas (K_{20}) de tejido de tubérculos de papa latente, fue necesario estandarizar el procedimiento para la obtención de éstos ribosomas (punto 1 de métodos). La información acerca de su pureza fue obtenida utilizando dos métodos: el de obtener las relaciones de densidad óptica de 260nm/280nm y 260nm/230nm y por el espectro de absorción en el ultravioleta. Los resultados obtenidos con el primer método (Tabla I) nos indican que los valores obtenidos son reproducibles de extracción a extracción y por lo tanto se puede pensar que la pureza de los ribosomas K_{20} que se están utilizando es constante. El segundo método nos proporciona otra evidencia de la pureza. Como es de esperarse para un espectro de ribosomas, la figura 1 muestra a 260nm un máximo de absorción y a 280nm una absorción menor. Esto se debe a que en el ribosoma el contenido de ácidos nucleicos es ligeramente mayor al de proteínas. A longitudes mayores de 260nm la absorbancia disminuye casi en su totalidad lo que indica que la muestra no contiene sustancias contaminantes.

Una vez que fue posible obtener ribosomas K_{20} de pureza reproducible, se procedió a lavarlos con 300 mM de KCl para separar de ellos la fracción inhibitoria de síntesis de proteínas in vitro (33) la cual se denomina lavado ribosomal (L.R.). Esta fracción se concentra con sulfato de amonio al 80% de saturación con lo cual se obtiene el lavado ribosomal p80 (L.R. p80). Debido a que la cantidad de proteína en L.R. p80 es pequeña (1.69 mg/extracción) el número de extracciones en cada mezcla de ribosomas utilizada para obtener L.R. varía de acuerdo-

a las necesidades del momento. Una extracción equivale a 128 g de tejido de tubérculo de papa latente, lo que significa que la cantidad de proteína presente en el L.R. p80 viene a representar un $1.32 \times 10^{-3}\%$ del tejido fresco.

Con el fin de demostrar si la fracción extraída con 300 mM de KCl (L.R. p80) inhibe un proceso fisiológico dependiente de síntesis de proteínas como es la germinación, se diseñó un bioensayo de germinación para diferentes semillas (maíz, trigo y ajonjolí).

El bioensayo de germinación se optimizó en cuanto a parámetros de: recipiente, volumen, tiempo, sales y luz.

En el movimiento del agua hacia la semilla es importante las relaciones de la semilla con el medio de germinación. El potencial de agua del medio de germinación debe ser mayor a aquel que se encuentra dentro de la semilla para que ésta logre una adecuada imbibición (2a). Con atención a lo anterior, se probaron diferentes concentraciones de sales en el medio de germinación para determinar cual de éstas sería la que proporcionaría altos porcentajes de germinación para las semillas (maíz, trigo y ajonjolí). Los resultados muestran (Tabla III) que la solución 8-2 que tiene la menor concentración de acetato de potasio, cloruro de potasio y tris-ác. acético pH 7.6 rindió los porcentajes de germinación más altos, esto puede ser debido a que se logró una adecuada imbibición para las tres especies de semillas utilizadas.

Las soluciones de germinación 100-0, 0-100, 50-50, 70-30 y 80-20 no obstante que poseen fuerza iónica igual entre ellas, rinden porcentajes de germinación diferentes (Tabla III). Este hecho indica que las sales de acetato de potasio y cloruro de potasio en sí mismas tienen influencia en la germinación. Con

la solución 80-20 se obtienen porcentajes de germinación altos, lo que significa que la germinación se favorece con una relación en la que la concentración de acetato de potasio es mayor (80 mM) que de cloruro de potasio (20 mM).

Con las soluciones 80-20 y 8-2 la proteína contenida en L.R.p80 se mantiene en solución, siendo éstas concentraciones adecuadas para los bioensayos de germinación.

El volumen del medio de germinación puede determinar que una semilla logre o no logre germinar. Si la cantidad de solución en el recipiente de germinación no es suficiente, las semillas no lograrán su imbibición y por lo tanto no germinarán. En el otro extremo, el volumen de solución puede ser excesivo en el medio de germinación de tal manera que, (no obstante la semilla se imbibía) la germinación no se lleve a cabo debido a que la solución de germinación impide el consumo de oxígeno al cubrir a la semilla, sin que se manifieste una efectiva activación de la germinación (4). Así, puede explicarse el resultado obtenido en el caso de semillas de trigo y ajonjolí, con un volumen de 6 ml de solución de germinación en cajas petri, en donde se observó muy bajos porcentajes de germinación (Tabla IV). No siendo el caso para las semillas de maíz (Tabla III).

En la tabla V se observa que el tiempo óptimo de germinación para semillas de trigo y ajonjolí es de 48 horas mientras que para semillas de maíz es de 72 horas (tiempos en los cuales los porcentajes de germinación son tan altos como 97-98% y tan cercanos a los alcanzados por los controles de agua).

Se probó el efecto de la luz sobre la germinación de los tres tipos de semillas utilizadas. Como se observa en la tabla VI. Para trigo y ajonjolí el porcentaje de germinación es ligeramente mayor bajo condiciones de luz, en tanto que para las se

millas de maíz, las condiciones de obscuridad favorecen el porcentaje de germinación.

Con los resultados obtenidos se logró determinar las condiciones óptimas para la germinación, que son las siguientes:

Para semillas de maíz: número de semillas en caja petri: 25, solución de prueba: 8-2, volumen: 10 ml, tiempo: 72 horas en obscuridad continua (Tablas III:A, V y VI). Para las semillas de trigo y ajonjolí: número de semillas en frasco Gerber: 25, solución de prueba: 8-2, volumen: 2 ml, tiempo: 48 horas - con una secuencia continua de intervalos de luz y obscuridad - cada 12 horas (Tablas III:B) y C), IV, V y VI). Estas condiciones fueron consideradas óptimas ya que con ellas se obtienen los porcentajes de germinación más altos.

Una vez que el bioensayo de germinación para las tres especies de semillas (maíz, trigo y ajonjolí) fue optimizado, el siguiente paso fue el de determinar el efecto del L.R. p80 sobre la germinación de éstas semillas. Los resultados obtenidos en los bioensayos de germinación se muestran en la tabla VII y figura 2. Se observa que el L.R. p80 es capaz de inhibir la germinación de los tres tipos de semillas utilizadas. La utilización de los tres tipos de semillas apoyan el pensar que ésta inhibición no es un artificio presente en sólo una de ellas y siendo semillas tan diferentes sugieren el pensar que el proceso de inhibición debe seguir caminos equivalentes en las tres especies de semillas. Lo que llevaría a pensar en un mecanismo de inhibición de la germinación generalizado.

La concentración del L.R. p80 requerida para alcanzar el máximo de inhibición de la germinación, para semillas de maíz y ajonjolí (0.11 mg/ml) es menor que la necesaria para lograr el máximo efecto en semillas de trigo (0.15 mg/ml). Como es conoci

do, la composición de la cubierta de las semillas puede ser distinta (2a) lo que se manifiesta en una diferente permeabilidad en ellas. Debido a esto, la permeabilidad de la cubierta de trigo sería diferente que la de maíz y ajonjolí lo que explica la necesidad de utilizar mayor concentración de proteína en el L.R.p80 para obtener también un máximo porcentaje de inhibición. También puede pensarse que aunque las permeabilidades de maíz y ajonjolí fuesen iguales que la del trigo, la actividad proteolítica que se detecta al inicio de la germinación (2) puede ser mayor en trigo que en las otras semillas, pudiendo actuar ésta actividad proteolítica sobre la actividad inhibitoria del L.R.p80.

En la figura 2 se observa que a concentraciones de L.R.p80 superiores a las necesarias para alcanzar el porcentaje máximo de inhibición se revierte parcialmente la inhibición de la germinación. Este efecto se observa con los tres tipos de semillas utilizados. Debido a que en el inicio de la germinación se lleva a cabo la activación de una actividad proteolítica (2) se puede suponer que ésta actividad puede funcionar como un mecanismo de defensa de la semilla contra agentes externos de naturaleza proteica. Si en la semilla existe un mecanismo de defensa tal sería ésta acción proteolítica la responsable de la disminución de la inhibición de la germinación en presencia de altas concentraciones de L.R.p80. También puede entenderse el decremento en la inhibición por el hecho de que a medida que se aumenta la concentración del L.R.p80 en el medio de germinación se formen agregados moleculares de la fracción inhibitoria los cuales se les dificulte la entrada en las semillas.

Si el L.R.p80 es capaz de inhibir la germinación de semillas de maíz, trigo y ajonjolí, quiere decir que en él existe al

gu(os) componente(s) que entra(n) a las semillas e impiden su germinación. Es posible que ésto se deba a la inhibición de síntesis de proteínas de semillas al inicio de su germinación, ya que, el L.R. p80 como se ha mencionado, es capaz de inhibir la síntesis de proteínas de tubérculos de papa en un sistema in vitro (33). La entrada del factor inhibitorio a la semilla se explica porque durante el proceso de imbibición de la semilla, el agua no es la única que puede entrar sino también pueden haber solutos que logran hacerlo favorecidos por el desarreglo en las membranas de las células de las semillas al principio de la germinación (2a).

Utilizando el bioensayo de germinación fue posible monitorear la fracción inhibitoria asociada a los ribosomas de papa latente a través de su purificación.

Como primer paso se eliminó la actividad de proteasas dependientes de grupos sulfhidrilo. El L.R. p80 fue tratado con PMFS (Fluoruro de fenil metil sulfonilo) el cual es un inhibidor de proteasas dependientes de sulfhidrilo (37) y del que ya se había probado que inhibe la proteasa ácida en el L.R. de tubérculos de papa latentes (33). Con el tratamiento previo con PMFS se esperaba que la actividad inhibitoria de la germinación no se debiera a proteasa ácida, por otro lado, si ésta proteasa ácida está inhibida, el factor inhibitorio no estaría expuesto a ser degradado.

Posteriormente para purificar el factor inhibitorio presente en el L.R. p80 (previamente tratado con PMFS) se utilizó una columna de Sephadex G-100 (0.9 cm X 26 cm) la cual no resultó satisfactoria ya que la fracción con mayor capacidad inhibitoria de germinación (fracción IIB) determinado por el bioensayo con semillas de ajonjolí (Tabla VIII) no muestra una se

paración bien definida (figura 3) por lo cual fue necesario incrementar la resolución de la columna de Sephadex G-100 aumentando sus dimensiones (1 cm X 59.2 cm). Utilizando una columna de mayor resolución se observó que la fracción que se obtuvo - bajo éstas condiciones tiene concentrada la mayor capacidad inhibitoria, ya que en el bioensayo con semillas de trigo con ésta fracción se encontró el porcentaje más alto de inhibición - de la germinación (Tabla IX y figura 4).

La fracción III fue recromatografiada en columna de Sephadex G-100 de resolución mayor (figura 5). Esta última fracción es la que muestra la mayor purificación (52 veces) y la mayor actividad específica (400.0) como se observa en la tabla X. Por tanto se considera a ésta fracción como el principal componente inhibitorio en el L.R.p80.

Con el propósito de conocer las características de la --- fracción inhibitoria se probó su efecto sobre la germinación - de semillas, previamente calentada a 92°C durante 5 minutos o - después de diferentes tiempos de almacenamiento. Los resultados indican (Tabla XI) que su capacidad inhibitoria se pierde por completo, lo cual quiere decir que es inestable al calor e inestable al almacenamiento a -70°C (Tabla XII). Estos datos sugieren aun más el que la acción inhibitoria de la germinación se deba a la presencia de una molécula de naturaleza proteica ya que puede pensarse que la fracción inhibitoria pierde su actividad por desnaturalización. La naturaleza proteica también --- puede inferirse ya que la actividad inhibitoria puede ser purificada por procedimientos utilizados para la purificación de - proteínas como son: precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de permeación.

Otro dato que apoya el pensar que la naturaleza del inhi-

bidor es proteica se debe a que por hidrólisis tanto alcalina como enzimática puede incrementarse la formación de grupos α -amino libres que reaccionan con el reactivo de ninhidrina (Tabla XIII). Debido a que la hidrólisis alcalina no se llevó a cabo en condiciones de vacío, no se obtuvo el mismo nivel de degradación observado en presencia de proteasa K.

La inestabilidad térmica de la actividad inhibitoria aún a -70°C podría deberse a cambios en su estructura. Teniendo como variable diferentes tiempos de almacenamiento siempre a -70°C se realizaron varios experimentos.

En la tabla XIV se muestra que si el L.R. p80 se cromatografía en Sephadex G-100 de 5 a 11 días (después de su obtención) se observa el mismo perfil de elución con las fracciones I, II y III; pero a tiempos tan largos como a 39 días se obtiene en forma predominante la fracción III. Este hecho sugiere que la fracción III puede ser generada a partir de una proteína de peso molecular mayor. Esta observación se confirma cuando la fracción I (obtenida a partir de un L.R. p80 de 5 días) es recromatografiada después de 25 días de su obtención, y en su perfil de elución además de la fracción I se encuentra también la fracción II⁺, lo que significa que esta fracción II⁺ fue originada a partir de la fracción I. Si ésta fracción II⁺ se almacena durante 37 días a -70°C y posteriormente se recromatografía una vez más en condiciones idénticas, en el perfil de elución obtenido se observa únicamente una fracción, la cual está localizada en la región de la fracción III. Esto indica que la fracción II⁺ puede originar la fracción III que conserva su capacidad inhibitoria de la germinación de semillas.

Como se ha mencionado, el L.R. inhibe la síntesis de proteínas in vitro de tubérculos de papa (33). La actividad inhibito

ría que ha sido purificada del L.R.p80 debe entonces inhibir también la síntesis de proteínas. Sin embargo podía ser posible que en el proceso de purificación la actividad inhibitoria de la germinación, ésta se separase de la actividad inhibitoria de síntesis de proteínas. Por consiguiente era necesario el demostrar si en la fracción más purificada (fracción III) se encontraban las dos actividades presentes.

Se realizó un experimento de incorporación de leucina- H^3 por ejes embrionarios de maíz en presencia de la fracción III. Los resultados obtenidos con este experimento indican (Tabla-IV) que la fracción III es capaz de inhibir la incorporación de leucina- H^3 hasta un 96.7%. Con éstos datos podemos proponer que la fracción III inhibe la germinación de semillas de trigo, maíz y ajonjolí debido a su efecto inhibitorio de síntesis de proteínas.

En los últimos años sólo se ha puesto atención en el estudio de los inhibidores ácidos como una de las causas de mantener la latencia de tubérculos de papa. Se ha propuesto que el balance entre los inhibidores y promotores del crecimiento en el tubérculo de papa determina que éste se encuentre o no en estado latente (19).

En éste trabajo se propone la participación de la fracción asociada a ribosomas de papa latente (fracción III) como otro factor más que ayude en mantener la latencia de éste tejido.

Se sabe que el tejido de papa latente tiene muy bajo nivel de síntesis de proteínas como lo indica los datos encontrados por Cocotle en donde la incorporación de leucina- H^3 en ribosomas de tejido latente fue de 25 veces menor que el obtenido con ribosomas de tejido que había sido estimulado por da

No mecánico (33). La ausencia de polisomas en tejido latente -- así como de retículo endoplásmico rugoso (24,33) confirman -- también la baja actividad de síntesis de proteínas. Además, en los tejidos latentes la concentración de inhibidores ácidos -- es superior que en tejido brotado (19); puede entonces pensar se que su mayor concentración juega un papel importante al igual que la fracción III en mantener la latencia, ya que la -- fracción III se encuentra asociada al ribosoma facilitándole y contribuyendo entonces a mantener un nivel bajo de síntesis de proteínas en la latencia.

Como aquí se describe, la actividad inhibitoria de la -- fracción III decrece a medida que aumenta el tiempo de almace -- namiento, lo que hace pensar que éste inhibidor debe ser produ -- cido en forma constante durante el periodo de latencia con el fin de que la actividad de síntesis de proteínas en éste teji -- do se mantenga siempre en bajo nivel. Este proceso de forma -- ción del factor inhibitorio puede ser realizado a partir de -- precursores de mayor peso molecular como lo son las fraccio -- nes I y II⁺ obtenidas a partir de L.R.p80, las cuales, con el transcurso del tiempo se transforman en la fracción III. En la literatura se han descrito datos que apoyan ésta reflexión. La proteína patatina de tubérculos de papa (29) es sintetizada -- como un precursor mayor. Esta es procesada para originar la -- proteína madura perdiendo un péptido cuyo tamaño puede ser e -- quivalente a los péptidos de señal (29). Este tipo de procesa -- miento es común en proteínas de exportación. Estas proteínas -- son sintetizadas por ribosomas unidos a membrana y cuando son terminadas se liberan con la eliminación previa del péptido -- señal.

En los tubérculos de papa latentes existen inhibidores --

de endopeptidasas y sus concentraciones disminuyen con la brotación. Su función celular es desconocida (26). De los brotes de tubérculos de papa se ha purificado y caracterizado una proteasa dependiente de sulfhidrilo cuya función aún es desconocida (27). En el tubérculo latente existen inhibidores de proteasas dependientes de sulfhidrilo, se ha propuesto que su función es la de controlar la actividad proteolítica endógena del tubérculo (28).

Por último, se sabe que cuando la latencia de los tubérculos de papa se interrumpe en forma natural o por agentes químicos, la síntesis de proteínas se incrementa (19). Debe existir entonces un mecanismo que permita tanto la formación dosificada de éste péptido inhibitorio (fracción III) así como la desaparición de la presencia del mismo cuando el tubérculo germine.

Una posibilidad es que las proteasas dependientes de sulfhidrilo (27) puedan actuar hidrolizando la fracción proteica con capacidad inhibitoria de síntesis de proteínas asociada a ribosomas, anulando su acción una vez que el periodo de latencia del tubérculo finaliza. Si la especificidad de la(s) proteasa(s) es más selectiva podría(n) permitir la formación dosificada del inhibidor de síntesis de proteínas (fracción III) a partir de su precursor. También podría pensarse en la acción conjunta de inhibidores de proteasas y la fracción III. Por un lado, los inhibidores de proteasas (28) pueden estar controlando la actividad de proteasas dependientes de sulfhidrilo en el tubérculo latente disminuyendo la proteólisis. Al mismo tiempo, la fracción proteica asociada a ribosomas (fracción III) al inhibir la síntesis de proteínas no permite la síntesis de nuevas proteínas. Como consecuencia de estos dos efectos, se mantendría en un nivel bajo y constan

te de proteínas totales en el tubérculo. Por tanto, es posible pensar en un mecanismo que regule las actividades de proteasas, sus inhibidores y el nivel presente del inhibidor de síntesis de proteínas (fracción III) siendo responsable que el tubérculo de papa se mantenga en estado latente, o germine.

C O N C L U S I O N E S

La fracción asociada a ribosomas de tubérculos de papa latente:

Inhíbe la germinación de semillas (maíz, trigo y ajonjolí).

Inhíbe la incorporación de leucina- H^3 en ejes embrionarios de maíz.

Es inestable al calor ($92^{\circ}C$) y almacenamiento a $-70^{\circ}C$.

Es de naturaleza proteica.

Se ha purificado 52 veces.

Puede ser generado de un precursor proteico de peso molecular mayor.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Sporne, K.R.
The Morfology of Angiosperm.
Ed. Hutchison, Univ. Library, London (1974)
Angiosperm. Cap. I, p.1.
- 2.- Bewley, J.D. and Black, M.
Seed: Physiology of Development and Germination.
Ed. Plenum Press, New York (1985)
Germination, Structure and Composition. Cap.I p.1-27.
- 2a.-ibid. Storage, Imbibition and Germination. Cap.III p.89-133.
- 2b.-ibid. Cellular Events During Germination and Seedling
Growth. Cap.IV, p. 135-173.
- 2c.-ibid. Dormancy and Control of Germination. Cap.V, p.175-235.
- 3.- Tran, V.N. and Cavanagh, A.K.
Structural Aspects of Dormancy.
Cap.I p.1-43.
En: Seed Physiology. Vol.II Germination and Reserve Mobilization. Ed. Murray, D.R., Academic Press, New York (1984).
- 4.- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A.
The Germination of Seed.
Ed. Pergamon Press, Oxford (1975).
Cap.III p.21-45.
- 4a.-ibid. Dormancy, Germination, Inhibition and Stimulation.
Cap.IV, p.46-75.
- 4b.-ibid. Metabolism of Germinating Seed.
Cap.V, p.76-125.

5.- Berrie, A. M. W.

Germination and Dormancy.

Cap. XIX, p. 440-468.

En: Advanced Plant Physiology. Ed. Wilkins, M. B. Great Britain (1984).

6.- Simon, E. W.

Early Events in Germination.

Cap. III, p. 77-115.

En: Seed Physiology. Vol. III. Germination and Reserve Mobilization. Ed. Murray, D. R., Academic Press, New York (1984).

7.- Perl, M.

ATP Synthesis and Utilization in the Early Stage of Seed Germination in Relation to Seed Dormancy and Quality.

Physiol Plant. 66:177-182, (1986).

8.- Donald, P. W.

Protein Biosynthesis: Mechanisms and Regulation.

Vol. VI, p. 491-529.

En: The Biochemistry of Plants. Ed. Stum p, t, P. K. and Conn, E. E. Academic Press, New York, (1981).

9.- Blomendal, H., Benedetti, E. L. and Bont, W. S.

Preparation and Characterization of Free and Membrane-Bound Polysomes p. 313-327.

Methods in Enzymology Vol. XXX (1974)

- 10.- Bewley, J.D. and Larsen, K.M.
Endosperm and Embryos of Mature Dry Castor Bean Seed
Contain Active Ribosomes.
Phytochemistry. 18:1617-1619, (1979).
- 11.- Peumans, W.J., Carlier, A.R. and Delaey, B.M.
Preparation and Characterization of a Highly Active
Cell-Free Protein Synthesizing System from Dry Pea
Primary Axes.
Plant Physiol. 66:584-587, (1980).
- 12.- Spiegel, S. and Marcus, A.
Polyribosome Formation in Early Wheat Embryo Germination
Independent of Either Transcription or Polyadenylation.
Nature. 256: 228-230, (1975).
- 13.- Rushton, P.J. and Bray, C.M.
Stored and de novo Synthesised Polyadenylated RNA and
Loss of Vigour and Viability in Wheat Seed.
Plant Science. 51: 51-59, (1987).
- 14.- Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J.
Characterization of the Early Synthesized DNA in Germi-
nating Triticum aestivum Embryos.
Phytochemistry. 17: 1481-1484, (1978).
- 15.- Marciniack, B., Bucholc, M. and Buchowicz, J.
Early DNA Synthesis During the Germination of Wheat
Embryos.
Phytochemistry. 26: 331-334, (1987).

- 16.- Montaldo, A.
Cultivo y Mejoramiento de la Papa.
Ed. I.I.C.A. San José Costa Rica (1984)
Planta de papa. Botánica, Cap. II, p. 39-96.
- 16a.-ibid. Estructura del tubérculo de papa.
Cap. III, p. 97-138.
- 17.- Peterson, R.L., Barker, W.G. and Howarth, M.J.
Development and Structure of Tuber. Cap. IV, p. 123-152.
Potato Physiology. Ed. Id, P.H., Academic Press, (1985).
- 18.- Hooker, W.J.
Compendium of Potato Diseases. Introduction p. 1-6.
Ed. Hooker, W.J., American Phytopathological Society,
U.S.A. (1984).
- 19.- Hemberg, T.
Potato Rest.
Cap. XI, p. 353-388.
En: Potato Physiology. Ed. Id, P.H. Academic Press
(1985).
- 20.- Thimann, K.V.
Hormone Action in the Whole Life of Plant.
p. 292, The University of Massachusetts, Press, (1977).
- 21.- McIntyre, G.I. and Quick, W.A.
Control of Sprout Growth in the Potato. Effect of Humidity and Water Supply.
Can. J. Bot. 62: 2140-2145, (1984).

- 22.- Rama and Narasimham.
Heat Treatments for the Control of Sprouting of Potatoes During Storage.
Ann. appl. Biol. 1087: 597-603, (1986).
- 23.- Morrel, S. and Rees, T.
Control of the Hexose Content of Potato Tubers.
Phytochemistry. 25: 1073-1076, (1986).
- 24.- Ralf, B.
Ultrastructural Changes in Wounded Plant Storage Tissue Cells.
Cap. I, p.1-42.
En: Biochemistry of Wounded Plant Tissues. Ed. Kahl, G., Walter de Gruyter, New York (1978).
- 25.- Wiegat, B and Kahl, G.
Enhancement of Polyribosome Formation and RNA Synthesis of Gibberellic Acid in Wounded Potato Tuber Tissue.
Plant Physiol. 64: 863-866, (1979).
- 26.- Hass, G.M. and Derr, J.
Distribution of Carboxipeptidase Inhibitors in Potato Plant.
Plant Physiol. 64: 1029-1031, (1979).
- 27.- Kitamura, N and Naruyama, Y.
Purification and Properties of Cysteine Proteinase in Sprouting Potato Tubers.
Agric. Biol. Chem. 50: 381-390, (1986).

- 28.- Rodis, P. and Hoff, J.E.
Naturally Occurring Protein Crystals in the Potato.
Plant Physiol. 74: 907-911, (1984).
- 29.- Kirschner, B. and Hahn, H.
Patatin, a Major Soluble Protein of the Potato (Solanum tuberosum L.) Tuber is Synthesized as Large Precursor.
Planta. 168: 386-389, (1986).
- 30.- Racusen, D.
Occurrence of Patatin During Growth and Storage of Potato Tubers.
Can. J. Bot. 61: 370-373, (1983).
- 31.- Racusen, D.
Esterase Specificity of Patatin From Two Potato Cultivars.
Can. J. Bot. 64: 2104-2106, (1986).
- 32.- Saunders, P.
Phytohormones and Bud Dormancy. p.423-445 en la serie
Phytohormones and Related Compounds Vol.II, Phytohormones and Development of Higher Plants.
Ed. Letham, D.S., Goodwin, P.B. and Higgins, T.J.V. (1978).
- 33.- Cocotle, R.Y.
Actividad Diferencial de Síntesis de Proteínas Durante la Respuesta a Herida en Solanum tuberosum L.
Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM (1984).

- 34.- Larkins, B.A. and Davies, E.
Polyribosomes From Peas.
Plant Physiol. 55: 749-756, (1975).
- 35.- Layne, E.
Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Protein. p.447-454.
En: Methods in Enzymology. Vol.III (1957)
- 36.- Lowry, O and Rosebrough, N.
Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).
- 37.- Drivdahl, R.H. and Thiman, K.V.
Proteases of Senescing Oat Leaves.
Plant Physiol. 61: 501-505, (1978).
- 38.- Rosen, H.
A Modified Ninhydrin Colorimetric Analysis for Amino Acids.
Arch. Biochem. Biophys. 67: 10-15, (1957).
- 39.- Barquera, A. B. L.
Bioensayo Para la Determinación de un Inhibidor de Síntesis de Proteínas de Tejido de Solanum Tuberosum L.
Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM (1985).