

135.
224



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

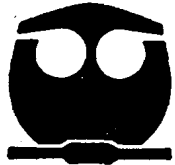
“ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS ATP_{asas} DE H⁺
EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE MAIZ
CON DIFERENTE SENSIBILIDAD AL
DETERIORO”

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SOBEIDA SANCHEZ NIETO





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.

ÍNDICE

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	2
FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	6
ATPASA MITOCONDRIAL	12
ATPASA DE CLOROPLASTO	15
ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA	23
ATPASA DE TONOPLASTO	26
II. OBJETIVOS	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
SIEMBRA DE SEMILLAS	31
MEDICIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN Y ACUMULACIÓN DE BIOMASA	31
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL	32
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	34
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP	34
TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FOSFATOS	38
IV. RESULTADOS	41
V. DISCUSIÓN	70
VI. CONCLUSIONES	81
VII. BIBLIOGRAFÍA	82

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La semilla es el resultado de la fecundación del óvulo por un núcleo masculino, lo que la hace esencialmente una pequeña planta cuyas actividades vitales están reducidas al mínimo (1). Un rasgo característico de la semilla es el de contener cantidades apreciables de reservas de nutrientes, aportadas por la planta madre. Entre éstos se incluyen lípidos, proteínas, carbohidratos, fosfato orgánico y varios compuestos inorgánicos, los cuales permitirán el crecimiento y posterior establecimiento de la planta (2).

Las sustancias de reserva de la semilla y la capacidad de ésta para originar un organismo autosuficiente, han sido aprovechadas por el hombre para el cultivo de plantas, para su alimentación y como materia prima para la fabricación de productos de uso común. Son numerosas las semillas utilizadas para el cultivo agrícola, especialmente los cereales. De estos últimos, los más explotados son el trigo y la avena en Europa, el arroz en Asia, y el maíz en América y África (1).

En México, el consumo del maíz bajo diversas presentaciones es muy abundante, sin embargo, su producción es insuficiente para la demanda tan grande de la población. Es claro entonces el papel relevante que las semillas juegan no sólo como vehículo que sirve para mantener su especie, sino como medio para mantener la supervivencia del hombre y el resto de especies animales. De aquí que sea importante la obtención de semillas con un alto índice de germinación, con resistencia a plagas y que generen plantas con altos rendimientos en cantidad y calidad del fruto.

Un evento que merece gran atención en la semilla es el de la germinación. Este proceso comienza con la entrada de agua al grano, permitiendo que las actividades metabólicas (que se encuentran suspendidas) se inicien, permitiendo el posterior

establecimiento de la plántula como organismo autótrofo. Para que el fenómeno de la germinación se lleve a cabo, deben coincidir las condiciones ambientales y la propia capacidad o características bioquímicas de la semilla (1). La movilización de las reservas alimenticias precede a los signos visibles de la germinación por muchas horas. A medida que el crecimiento progresa, la demanda de materiales para obtener energía y para la formación de nuevos tejidos aumenta, lo cual es costado por la digestión de las sustancias de reserva (3).

La respiración y la síntesis de proteínas, entre muchas otras actividades metabólicas, son las que proporcionarán los elementos necesarios para que se lleven a cabo los procesos de elongación y división celular, necesarios para la formación de órganos en la planta (4).

La semilla de maíz (que es la planta que nos ocupa), contiene la reserva de nutrientes en una estructura llamada endospermo, de donde son absorbidos y digeridos por otra estructura llamada escutelo para presentarlos finalmente en forma asimilable al embrión (3). Este último está provisto de las herramientas estructurales y fisiológicas para manejar estos procesos, pero necesita del abasto de solutos. Es aquí donde los sistemas que realizan el transporte de iones y moléculas orgánicas (de simplicidad relativa) a través de las membranas de las células, adquieren vital importancia.

ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

En una célula vegetal, los sistemas membranales están ampliamente distribuidos, realizando un papel estructural al delimitar organelos y un papel funcional al permitir el movimiento selectivo de distintas sustancias de un compartimento a otro.

El proceso que compete a un metabolito puede estar aislado y confinado al organelo que contenga el sistema enzimático correspondiente. Asimismo, la entrada de sustratos hacia estos compartimientos (organelos), influye sobre las características del procesamiento de cada metabolito (5, 6).

Existe en la célula vegetal una primera barrera para el paso de solutos: la pared celular. Esta estructura rodea y protege a la célula del medio externo y no es significativamente permeable al agua y los solutos. Está compuesta en gran parte de celulosa (polímeros en unión $\beta(1,4)$ de D-Glucosa), por celulosanos y sustancias pécticas (Acido poligalacturónico con uniones (1,4)) además de pequeñas cantidades de proteína estructural; todo ello le da la característica de rigidez para funcionar además como soporte mecánico (5, 7).

Adyacente a la pared celular se encuentra la membrana plasmática. Su composición es variable, pero su arquitectura es la de todas las membranas biológicas: generalmente contiene cerca del 40% de su peso seco como lípidos y un 60% como proteínas, formando un complejo lamelar mantenido por interacciones hidrofóbicas. Usualmente los carbohidratos están presentes en 1-10% del total de su peso seco (6).

Los lípidos de la membrana son anfipáticos, es decir contienen un grupo hidrofílico (soluble en agua) llamado cabeza y un grupo llamado cola, que es hidrofóbico (insoluble en agua). El grupo hidrofílico está formado por glicerol, esfingosina (sustituídos por compuestos como galactosa y otros azúcares) o esteroides, además de fosfatos o compuestos que contienen nitrógeno. El contenido de ácidos grasos, que proporciona la parte hidrofóbica, es variable, así como su composición, pero los más abundantes son los ácidos palmítico y oleico (6, 8).

Además, los lípidos pueden presentarse en varios estados físicos, a temperatura fisiológica existen en forma líquida, pero entre 12 y 18° C se encuentran en forma de gel, conteniendo las

cadenas hidrocarbonadas cristalizadas; con un estado de baja movilidad de las proteínas (6, 7). El papel de los fosfolípidos es el de proporcionar una estructura continua y aislante que contiene otras moléculas, como proteínas y carbohidratos.

El contenido de carbohidratos en la membrana es relativamente bajo; por lo general, éstos aparecen como constituyentes de los glicolípidos y glicoproteínas. Esto contrasta con la composición de la pared celular, en la cual los carbohidratos son el principal componente de su estructura. Los principales monosacáridos, tanto de glicolípidos como de glicoproteínas son: D-galactosa, D-glucosa, D-fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Uno de los papeles de las glicoproteínas es el de ser receptoras de señales (p. ej. hormonas) en la superficie de la célula (7).

Las proteínas de membrana, en contraste con los lípidos, están especializadas en una variedad de funciones importantes para la entrada de nutrientes a la célula y para el mantenimiento del equilibrio osmótico entre la célula y el ambiente.

Las proteínas de membrana se clasifican en dos tipos, con base en la capacidad de éstas para disociarse de la membrana: pueden ser integrales o periféricas (6, 8). Las proteínas periféricas están débilmente asociadas a las membranas y al someterlas a tratamientos de lavado con sales o manipulaciones con cambios de pH se solubilizan. Al obtenerse de esta manera, por lo general no hay problemas de contaminación con otros constituyentes de la membrana, como los lípidos.

Las proteínas integrales están fuertemente asociadas a las membranas, por estar parcialmente embebidas en la porción lipídica. Para aislarlas es común utilizar tratamientos drásticos que involucran el rompimiento de la membrana con detergentes o agentes caotrópicos. Los agentes caotrópicos reducen las interacciones con el agua, desestructurando la membrana lipídica. La separación y caracterización de proteínas de membrana se dificulta mucho, por lo que se recurre a procedimientos de

fraccionamiento con técnicas como electroforesis en gel, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico (en presencia de detergentes) y otros medios de disgregación para su purificación (6, 7, 8).

Se han propuesto varios modelos de la estructura de la membrana, considerando sus componentes químicos y la observación en microscopio electrónico, difracción de Rayos X, etc. Se ha propuesto la formación de una doble capa de lípidos, tomando en cuenta sus características anfipáticas. El modelo que proporciona la mejor descripción sobre la estructura de la membrana fue propuesto por Singer y Nicholson en 1972 (6) y es llamado el modelo del mosaico fluido (Figura 1).

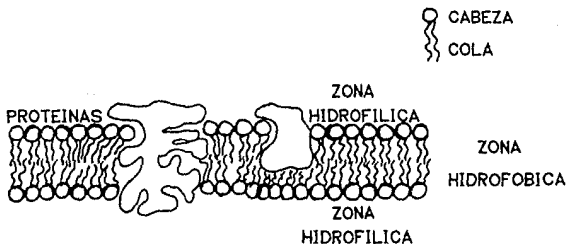


Figura 1. Modelo del Mosaico Fluido.

Los lípidos se organizan principalmente en una capa bimolecular con las cabezas polares apuntando hacia afuera. El modelo ilustra como las proteínas "flotan" en la bicapa lipídica. Las proteínas integrales están embebidas en el fluido lipídico con una alta capacidad de movimiento lateral. Las características anfipáticas de las proteínas determinan su movilidad y su topología en la membrana. Los grupos polares se encuentran en el exterior de la capa hidrofóbica, mientras que los grupos hidrofóbicos están interaccionando con los ácidos grasos de los lípidos (6).

FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La estructura de las membranas está adaptada para prevenir que las moléculas polares o eléctricamente cargadas pasen libremente a través de ellas. La gran mayoría de los cationes y aniones no pasan a través de la membrana, por ejemplo: K^+ , Na^+ , H^+ , Cl^- , PO_4^- , NO_3^- , ADP^{3-} , ATP^{4-} , glucosa 6-fosfato²⁻ y los intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (succinato²⁻, oxalacetato²⁻ y citrato³⁻). Es posible que muchos de los cientos de intermediarios metabólicos conocidos en la célula sean moléculas polares o cargadas, impermeables a la membrana (6).

También tenemos el caso de moléculas sin carga neta pero polares, como la glucosa y varios aminoácidos. La entrada de todos estos iones y moléculas es facilitada por proteínas específicas, que funcionan uniendo y transportando estos solutos. Tales proteínas llamadas genéricamente transportadores, acarreadores o permeasas integran los sistemas de transporte transmembranal.

Es común encontrar compuestos que no se hallan en igual concentración en dos compartimientos separados por una membrana, esto quiere decir que el compuesto es transportado preferentemente hacia uno de los lados (8). Los mecanismos por los cuales los solutos atraviesan las membranas pueden ser:

1. Difusión pasiva
2. Transporte por proteínas acarreadoras
 - a) Difusión facilitada
 - b) Transporte activo

En la Difusión Pasiva los solutos pasan libremente a través de la membrana, gracias a su solubilidad en los lípidos de ésta. En este caso, la velocidad de difusión libre del soluto es proporcional a su liposolubilidad y a su diferencia de concentraciones en ambos lados de la membrana (8).

El transporte mediado por Proteínas Acarreadoras facilita la entrada de solutos no liposolubles, polares o con carga, y puede darse de dos maneras: existe un sistema llamado de Transporte Pasivo o de Difusión Facilitada (5), en éste, el transporte de solutos hacia el interior de la célula se ve facilitado por la baja concentración del soluto en el interior; moviéndose así a favor de un gradiente de concentración.

El segundo sistema descrito para el transporte de solutos por proteínas acarreadoras es el llamado Transporte Activo, proceso que se efectúa llevando los solutos al interior de la célula, en donde la concentración del soluto es alta y/o mayor que en el exterior; por lo cual, el transporte tiene que ser costeado con energía proveniente de la célula misma (ATP). Por lo tanto, un proceso de transporte activo no puede llevarse a cabo por sí mismo, sino que ocurre solamente si se acopla a algún otro proceso que le pueda proporcionar energía libre, como una reacción exergónica (9).

Se pueden distinguir dos caminos para el acoplamiento entre el transporte de un soluto en contra de la fuerza que origina su gradiente de concentración y una reacción exergónica. El transporte activo primario, que depende directamente del acoplamiento de la reacción de hidrólisis de ATP a una "bomba" de solutos a través de la membrana, y el transporte activo secundario, que utiliza la energía de un gradiente electroquímico establecido por un primer soluto, para que el segundo soluto pueda entrar (10). Una modificación del transporte activo es la traslocación de grupos, proceso en el cual la sustancia puede ser transportada sufriendo durante el transporte una modificación estructural (4).

La energía que provee el manejo del proceso de Transporte activo está dado por la molécula de adenosín trifosfato (ATP, ref. 9), Figura 2. El ATP es un compuesto que contiene enlaces anhídrido ester-fosfato de carácter híbrido, ya que se comportan como enlaces parcialmente simples y también parcialmente dobles; con una energía de estabilización llamada de resonancia. Al

hidrolizarse, este compuesto produce un cambio en la energía de resonancia, que conduce a la liberación de energía libre (ΔG , ref. 9), la cual puede ser usada para realizar un trabajo en forma de movimiento, transporte, ensamble de organelos y reparación; actividades muy importantes en la célula (4).

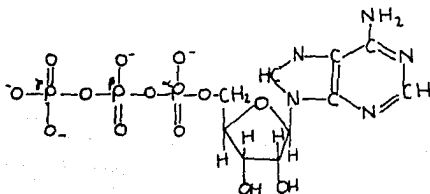


Figura 2. Molécula de ATP.

En los cloroplastos y mitocondrias de las células vegetales ocurren ciertos procesos de transferencia de electrones, localizados en las membranas de dichos organelos. Tales reacciones redox están acopladas a la generación de ATP (9).

Peter Mitchell, propuso en 1961 un mecanismo hipotético de acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP. El sugirió que el flujo de electrones a través del sistema de moléculas transferidoras conducía protones a través de las membranas de los cloroplastos, mitocondrias y células bacterianas; lo cual conducía a crear un gradiente electroquímico de protones en la membrana (9).

Dicho gradiente electroquímico tiene dos componentes: uno eléctrico y otro químico (también llamado osmótico). El eléctrico se forma por el movimiento neto de una diferencia de cargas o potencial eléctrico ($\Delta\psi$). El otro componente, se crea por la

diferencia de concentración de protones (ΔpH) en ambos lados de la membrana. Ambos crean un potencial electroquímico de protones ($\Delta \mu H^+$) (9, 10). El protón tiende a equilibrarse con la concentración interna de H^+ que es menor y es conducido (disipando el gradiente de concentración), a través de la $ATP_{SINTETASA}$, la cual aprovecha esta energía de disipación para formar el enlace anhídrido-éster entre el ADP y el Pi (fosfato inorgánico).

La fuerza o energía que genera el gradiente de concentración de protones se denomina fuerza proto-motriz y se expresa de la siguiente manera:

$$\Delta \mu H^+ = \Delta \psi - z \Delta pH$$

Donde $\Delta \mu H^+$ es el potencial electroquímico de protones y z es un factor de conversión de unidades de pH a unidades en que se expresa el potencial eléctrico (ψ).

Ya que la síntesis de ATP se lleva a cabo favorecida por el gradiente de concentración de protones, esta propuesta fue llamada Teoría Quimiosmótica (9).

Las enzimas que se encargan de catalizar la síntesis y/o hidrólisis del ATP se encuentran embebidas en las membranas de varios organelos de la célula y son las ATP_{ASAS} , las cuales podemos clasificar en dos grupos: $ATP_{SINTETASAS}$ y $ATP_{HIDROLASAS}$ o ATP_{ASAS} sintéticas y ATP_{ASAS} hidrolíticas.

Como ya se mencionó, las $ATP_{SINTETASAS}$ aprovechan el $\Delta \mu H^+$ formado por las moléculas transferidoras de H^+ y electrones durante la fotofosforilación y la fosforilación oxidativa (en cloroplastos y mitocondrias respectivamente), para la síntesis de ATP. El flujo de retorno de protones a través de la membrana (catalizado por la $ATP_{SINTETASA}$), disipa el gradiente fosforilando al ADP; esto ocurre de manera similar en bacterias, mitocondrias y cloroplastos (Figura 3a).

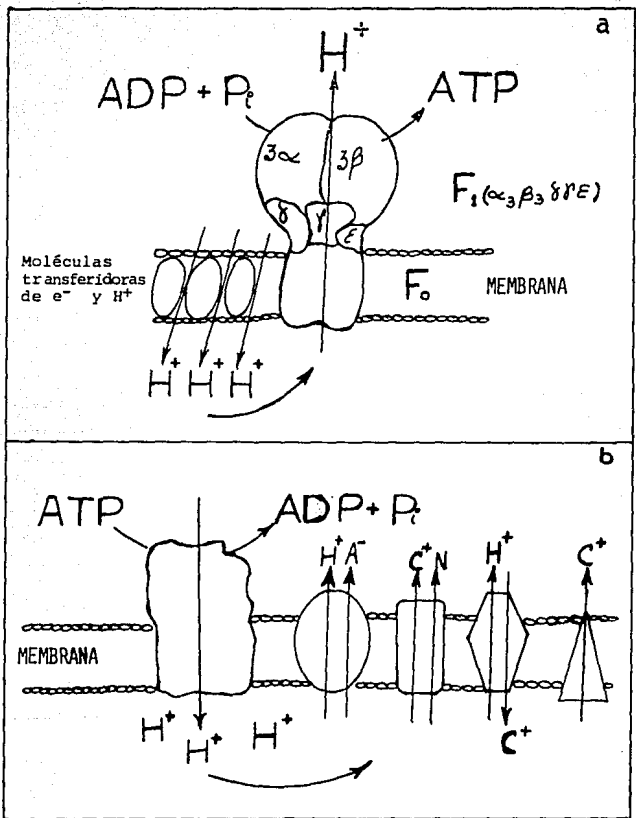


Figura 3a.) Síntesis de ATP por la ATPASA de mitocondria y/o cloroplasto.

Figura 3b.) ATPASA como bomba primaria acoplada al sistema de transporte de solutos.

El segundo grupo está formado por las ATPasas que hidrolizan ATP; la reacción global catalizada por la ATPasa supone la hidrólisis del fosfato γ (terminal) del ATP para dar ADP y ortofosfato, generando una expulsión electrogénica de protones u otros iones (Figura 3b). El gradiente electroquímico así formado, provee la fuerza necesaria para el transporte de cationes, aniones, aminoácidos, azúcares y reguladores del crecimiento, según lo predice la Hipótesis Quimiosmótica de Mitchell (10). Dentro de este grupo de ATPasas se encuentran las de organelos como vacuola, lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membrana plasmática.

El transporte de solutos que se lleva a cabo tras la formación de un gradiente electroquímico de H^+ (generado por la hidrólisis de ATP a través de una bomba primaria), es un proceso no específico en el que se acoplan el transporte, energéticamente desfavorecido y una reacción energéticamente favorecida, como lo es la hidrólisis del ATP en donde el ΔG° es de $-30,544$ Joules/mol (ΔG en células intactas es de $-51,883$ Joules/mol).

Debido a su importancia, las ATPasas han sido profundamente estudiadas (más en animales que en plantas), y se tienen avances muy notorios en el conocimiento de su estructura y función. Se ha descrito su presencia en varias membranas de organelos de células vegetales: mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, aparato de Golgi, vacuola y membrana plasmática. A continuación se hace una revisión somera de lo que se ha logrado en su caracterización.

ATPASA MITOCONDRIAL.

La cadena transportadora de electrones es un conjunto de proteínas que se encuentran dispuestas en forma asimétrica en la membrana. Tales proteínas se encargan de transferir tanto los protones como los electrones (producto de la oxidación de sustratos), desde la matriz mitocondrial hasta el citoplasma de la célula (en el caso de los H^+), generando el $\Delta\mu H^+$, el cual es utilizado cuando el sistema se encuentra acoplado a la ATPSINTETASA (ATPasa mitocondrial) para la formación de ATP (Figura 3a), fenómeno que se ha denominado Fosforilación Oxidativa.

La ATPasa mitocondrial pertenece a la familia de las ATPASAS F_0F_1 , nombre que obedece a la propiedad que tienen de disociarse en dos partes: un componente soluble en agua (llamado F_1), que contiene los sitios de unión de nucleótidos y catálisis y un componente integral de membrana (F_0), que contiene el canal conductor de protones.

Para estudiar a la ATPasa mitocondrial se han usado:

a) Mitocondrias enteras que se obtienen mediante ruptura de la célula y una posterior centrifugación diferencial. Cuando las mitocondrias se someten a un gradiente de densidad, se equilibran a una densidad de 1.18 a 1.20 g/cc (10, 11).

b) Vesículas de membrana mitocondrial (también llamadas partículas submitocondriales), que son el resultado de haber sometido a las mitocondrias a un proceso de sonicación y en donde el sitio catalítico de la enzima queda expuesto al exterior (12).

c) La porción F_1 solubilizada, que puede ser removida de la membrana en la forma catalíticamente activa por tratamiento con EDTA o por aplicación de fuerza de sonicación (13), llevando a cabo la catálisis en la dirección inversa (hidrólisis de ATP).

El sector F₁ de la ATPasa mitocondrial obtenida de raíz de avena contiene 3 copias de las subunidades llamadas α y β , con pesos moleculares de alrededor de 58 y 55 kDa respectivamente, contiene además una sola copia de subunidades pequeñas llamadas γ , δ y ϵ con pesos de alrededor de 36, 22-26 y 14 kDa, respectivamente. Los valores de estos pesos moleculares varían muy poco con respecto a los reportados para otros organismos (10, 13, 14), sin embargo, existen ciertas semejanzas: en la subunidad β se encuentra el sitio activo de la enzima y la subunidad α contiene un sitio de unión a nucleótidos. En experimentos con mitocondrias de mamíferos se ha observado que las subunidades β (catalíticas) interaccionan entre sí y que el índice de hidrólisis de ATP se incrementa hasta 20 veces cuando el ATP se une al segundo sitio catalítico de la enzima (15). Existen discrepancias acerca del número de sitios catalíticos funcionales, parece que los tres sitios son funcionales pero sólo 2 están activos durante la catálisis (16).

La porción F₀ es muy variable en relación a los tipos de polipéptidos que contiene, de acuerdo a diferentes células: la F₀ de *E. coli* se encuentra formada por tres subunidades a, b y c con pesos de 30, 15 y 8 kDa, respectivamente, las cuales presentan una estequiometría de a₂b₂c₁ (12). La subunidad c es un pequeño polipéptido hidrofóbico (12), algunas veces referido como proteolípido, el cual parece ser bloqueado por dicitclohexilcarbodiimida (DCCD). Evidencias de manipulación genética muestran que posiblemente DCCD se une al residuo aspartico ó glutámico, localizado en una zona de aminoácidos hidrofóbicos (15) y de esta manera bloquea el transporte de H⁺, inhibiendo la actividad de la ATPasa mitocondrial.

La ATPasa mitocondrial puede utilizar varios nucleósidos trifosfato como sustrato. En raíz de avena, la enzima presenta mayor actividad en presencia de ATP que de GTP, mientras que la ATPasa mitocondrial de maíz utiliza como sustratos los nucleótidos en el siguiente orden:

GTP > ITP > 2deoxi-ATP > ATP > eteno-CTP > UTP (17).

El estudio cinético de hidrólisis de ATP muestra la existencia de cooperatividad entre sitios catalíticos, tal como se sabe que ocurre para la ATPasa que proviene de otros organismos. La K_m para ATP en plantas es de 0.5 a 0.8 mM (10, 17) y para GTP en maíz es de 1mM (17). La F_1 -ATPasa de plantas muestra una marcada inhibición por AMP-PNP (5'-adenililimidodifosfato) con aparente cooperatividad positiva para la unión de AMP-PNP a altas concentraciones, lo que apoya la cinética de hidrólisis de interacción entre los sitios catalíticos de la F_1 de mitocondrias de maíz (17).

El requerimiento de iones metálicos para la F_1 -ATPasa de maíz es el siguiente: $Mg^{2+} = Ca^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$ y es similar al que tiene la ATPasa mitocondrial de corazón de res. Los aniones estimulan a la enzima en el siguiente orden: $HCO_3^- > Cl^-$, $Br^- > I^- = SO_4^{2-}$; mientras que los cationes no tienen efecto sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial (17). La enzima exhibe su mayor actividad a pH 8.0.

El mecanismo de reacción para la síntesis de ATP ha sido motivo de controversia (18, 19), se han propuesto dos posibilidades para que ocurra: una es el acoplamiento indirecto en el cual el movimiento del H^+ a través de la F_0 es acompañado por un cambio conformacional que es transmitido a través de las subunidades y sus interacciones a los sitios catalíticos. La otra es el acoplamiento directo, en el cual el protón trasladado es conducido a través de F_0 y F_1 al sitio donde se lleva a cabo la catálisis (6, 12, 16).

La estructura específica de la ATPsintetasa está relacionada con su función y se ha propuesto un mecanismo llamado rotacional en el que las subunidades α - β rotan (a contra corriente) y que al yuxtaponerse con las subunidades γ - δ en presencia de ADP y Pi forman ATP y lo liberan al medio. Lo anterior no ha sido establecido con certeza pero se tienen evidencias experimentales de que tal mecanismo rotacional podría ocurrir (12, 16, 19, 20).

ATPASA DE CLOROPLASTO.

Observando membranas de mitocondria y cloroplasto por microscopía electrónica, se han encontrado esferas de 90 Å de diámetro, unidas por un pequeño tallo a la superficie de la membrana (9, 12); la similaridad morfológica sugiere que utilizan mecanismos catalíticos análogos.

La ATPasa de Cloroplasto al igual que la ATPasa mitocondrial pertenece a la familia de las ATPASAS F_0F_1 ; utiliza el gradiente formado durante la fotólisis del agua en la fase luminosa de la fotosíntesis (en los complejos de los fotosistemas I y II que se encuentran en la membrana del tilacoide) para la síntesis de ATP (Figura 3a), proceso que se ha llamado Fotofosforilación.

La CF_1 , como es llamada la porción F_1 de la ATPasa de Cloroplasto (21), está formada por las siguientes subunidades: α , β , γ , ϵ , y δ con pesos de 60, 56, 39, 14 y 19 kDa, respectivamente. Las subunidades β contienen a los sitios catalíticos, las subunidades α tienen los sitios de unión a nucleótidos (al menos seis sitios), ϵ es el inhibidor de la enzima cuando hidroliza ATP, δ es la subunidad que sirve como puerta entre CF_1 y CF_0 para el paso de los protones y γ parece regular la salida de protones desde CF_0 hacia CF_1 . Lo anterior se sabe ya que al reconstituir las subunidades α y β con γ se logra acoplar la hidrólisis de ATP al transporte de protones.

La porción CF_0 está formada por subunidades llamadas I, II, III y IV de 15, 13, 8 y 19 kDa de peso, respectivamente. Sobre la función de cada una hay poco reportado, existe evidencia de que las subunidades I, II y IV podrían servir de conexión de CF_0 con CF_1 , mientras que las subunidades III (se han reportado al menos seis) parecen formar parte del canal de protones. Deben pasar tres protones a través de la ATPasa de Cloroplasto para sintetizar una

molécula de ATP, ésta es una diferencia con la ATPasa mitocondrial ya que aparentemente esta última necesita dos protones trasladados para sintetizar una molécula de ATP (9, 22).

La ATPasa de Cloroplasto puede usar los siguientes sustratos: ATP, GTP > ITP > CTP; los nucleósidos difosfatos son escasamente hidrolizables, mientras que el AMP, la Fructosa 6-Fosfato y el AMP-PNP inhiben la actividad de la enzima. Los cationes divalentes son requeridos para la actividad de la ATPasa en el siguiente orden de afinidades: $Mg^{2+} = Mn^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+}$. Las Kms para ATP-Mg para CF₁ de espinaca y chícharo son de 0.2 mM y 0.5 mM respectivamente y la Km para ATP-Mn en chícharo es de 0.4 mM. El vanadato y el molibdato inhiben la actividad de la enzima; en espinaca, también la oligomicina llega a inhibirla (23, 24). El pH óptimo para la actividad de esta enzima se encuentra alrededor de 8.0, que es el valor de pH fisiológico del estroma (23).

Los mecanismos de catálisis propuestos son similares a los de la mitocondria aunque más complejos ya que el sistema se encuentra muy regulado: se apaga en ausencia de luz y en algunos casos se ha reportado estimulación por calmodulina (22).

ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Para el estudio de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática existen dos alternativas: a) El uso de vesículas de membrana aisladas, que contienen a la proteína dependiente de ATP para el transporte de protones (ATPasa- H^+), exponiendo el sitio catalítico hacia el exterior de ésta y permitiendo así el libre acceso del ATP externo (vesículas llamadas "inside-out"). b) La enzima pura seguida de reconstitución en vesículas de fosfolípidos (10, 25, 26), o bien c) solubilizada en detergente (27, 28).

El método de obtención de las vesículas de membrana plasmática involucra la ruptura de la célula, lo cual da por resultado la liberación de organelos intactos y pedazos de membranas, que tienden a cerrarse por interacciones hidrofóbicas de manera espontánea para formar vesículas. Una posterior centrifugación diferencial separa la fracción denominada MICROSMAL, que contiene a las vesículas de membrana plasmática y además las de otros organelos (10, 29). Varios autores colocan la fracción microsomal en un gradiente de densidad (por lo general de sacarosa o dextran), para obtener una fracción enriquecida de vesículas de membrana plasmática, ya que éstas se equilibran en el gradiente a una densidad de 1.13 a 1.17 g/cc (10, 25, 30, 31). Es difícil obtener una preparación de vesículas de membrana plasmática que no se encuentren contaminadas con otras membranas, por lo cual la solubilización de la enzima es una alternativa. La metodología general consiste en la solubilización de la ATPASA de H^+ de las vesículas con detergentes, los más efectivos son los zwitteriónicos como la lisolecitina y el zwittergente-14, seguida de una precipitación con NH_4SO_4 . El residuo es sometido posteriormente a un gradiente de glicerol (11, 27, 28, 32). Existen muchos protocolos para obtener a la ATPASA- H^+ pura, ya que la recuperación de ésta debe hacerse con pocas o ninguna alteración en su capacidad catalítica.

La proteína purificada muestra una clara afinidad por fosfolípidos como la lisofosfatidilcolina, el fosfatidilglicerol y fosfolípidos extraídos de sonicados de soya entre otros; formando proteoliposomas en los cuales se puede estudiar la actividad de ATPASA- H^+ (10, 33). El requerimiento de fosfolípidos varía, encontrándose que es más alto para la ATPASA de levadura que para la de plantas, aunque también depende del tipo de tejido original (10, 33, 34).

La ATPASA de membrana plasmática purificada está enriquecida por un polipéptido de peso molecular cercano a 100 kDa. Las preparaciones que contienen exclusivamente a este polipéptido efectúan el transporte de protones (dependiente de la hidrólisis del ATP) después de la reconstitución en liposomas, lo

que indica que no necesita más de una subunidad para llevar a cabo el proceso; si bien no se descarta la posible participación de otros polipéptidos en la regulación de la enzima (35).

En contradicción con lo anterior, estudios realizados mediante inactivación por radiación (que es un método utilizado para determinar el peso molecular de proteínas multiméricas), sugieren que la ATPasa funciona como un dímero (35). Al remover los detergentes de la ATPasa purificada de *S. pombe* y *N. crassa* se observó que se agregaban en 8 y 6-10 monómeros respectivamente (15). Resultados de estudios cinéticos (que más adelante se detallan), también hacen suponer que la ATPasa-H⁺ de membrana plasmática es un oligómero.

El uso de anticuerpos ha aportado evidencias claras de que las ATPasas de membrana plasmática de diferentes sistemas tienen componentes antigénicos comunes (15, 35). La secuencia de aminoácidos del polipéptido de 100 kDa se ha logrado determinar en: la Ca²⁺-ATPasa de retículo cardioplásmico de conejo, la (Na⁺+ K⁺)ATPasa de riñón de oveja, la (H⁺+ K⁺)ATPasa de estómago de rata, la K⁺-ATPasa de *E. coli*, la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* y la H⁺-ATPasa de zanahoria. (15, 35). Al comparar las secuencias, se encuentra que existen zonas de alta homología y para algunas de ellas se sabe su función, como es la del sitio de unión a ATP y el sitio donde se forma el intermediario fosforilado (35).

Kyte and Doolittle (35) con un método simple examinaron el perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos para conocer la estructura de la proteína en la membrana. Los resultados mostraron que la membrana lipídica es atravesada de 8 a 10 veces por la ATPasa (en forma de α -hélices transmembranales). Tres porciones del polipéptido se proyectan en mayor proporción hacia el citosol: un tallo N-terminal de cerca de 115 aminoácidos y 2 largas asas de 130 y 300 aminoácidos; ésta última, contiene el sitio que es fosforilado durante la catálisis por lo cual es la que está involucrada en la unión del ATP y su hidrólisis (15). Existe una zona en la que varias de las hélices transmembranales son anfipáticas, con los residuos polares localizados en la misma

cara de la hélice, por lo que, los grupos polares de varias hélices pueden formar un canal para el transporte del protón (35).

La estructura de la ATPasa de Ca^{2+} se determinó a 2.5 nm de resolución por reconstitución de imágenes tridimensionales, mediante la tinción negativa de los cristales de la proteína membranar, lo cual apoya lo encontrado con el perfil hidropático (35), según se muestra en la Figura 4.

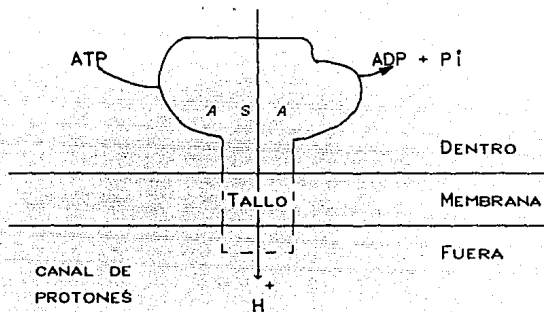


Figura 4. Estructura de la ATPasa de Ca^{2+} (35).

Se debe enfatizar que los estudios anteriores respecto al sitio que une e hidroliza ATP y el acceso de cationes a un canal polar, han servido para considerar el posible mecanismo de la catálisis y extrusión de protones por la ATPasa.

Una de las características de la ATPasa de membrana plasmática es la de ser altamente específica para el ATP como sustrato; otros ésteres fosfóricos como GTP, UTP, ITP, CTP, ADP, IDP, AMP, PPi, PPPi, p-nitrofenolfosfato y glucosa 6-fosfato dan sólo el 5% de la actividad observada con ATP (32, 36). Una K_m relativamente alta para el ATP, de 0.7 a 4.8 mM, ha sido

determinada para la ATPasa en vesículas de membrana y de 1 a 4 mM para la enzima solubilizada y purificada (10, 15, 25, 30, 32, 35, 37).

El mecanismo de reacción de la hidrólisis de ATP y transporte de H^+ por la ATPasa de membrana plasmática de plantas, muestra gran similitud con la encontrada en animales, hongos y levaduras que forman parte de la familia de las ATPasas llamada E_1E_2 (38). Se ha descrito que éstas forman un intermediario fosforilado. Por estudios en microsomas de plantas en geles de poli(acrilamida) bajo condiciones ácidas y en presencia de detergentes catiónicos, se ha mostrado el polipeptido de 100 kDa fosforilado. Se sugiere que el enlace es covalente de tipo acilfosfato, sensible a pH alcalino y a hidroxilamina y que es formado en la cadena polipeptídica con los residuos de ácido glutámico o aspártico que se encuentran en el sitio activo de la enzima (39, 40).

Se ha reportado que la ATPasa de *S. cerevisiae*, exhibe una curva sigmoide en una gráfica V contra $[S]$ (15). Estos datos apuntan hacia un modelo con cooperatividad entre sitios o alternativamente por un modelo que asume diferentes estados conformacionales de la enzima, que puede hidrolizar ATP por una vía paralela. En *N. crassa* se encontró algo similar y se determinó un coeficiente de Hill de 2, lo cual indica que hay de 2 a más sitios activos interactuando (15). En estudios de la ATPasa de plantas se ha encontrado que el ADP (producto de la hidrólisis del ATP), produce inhibición en la enzima, lo cual sugiere que la unión de ADP a la enzima puede estabilizar la conformación del sitio activo; no se sabe aún si el ADP se une a este sitio o a otro (36).

Se ha descrito que las ATPasas del tipo E_1E_2 actúan durante la catálisis en 2 conformaciones y lo hacen de manera cíclica (15, 35) (Figura 5). La ATPasa en la conformación E_1 une al catión a transportar y es fosforilada por el ATP (unión covalente); el siguiente paso ocurre rápidamente transformándose la conformación E_1 a la E_2 y moviéndose así el catión del lado

interno de la célula hacia el externo y formando una unión débil con el fosfato (unión iónica), luego la enzima se desfosforila y libera al catión hacia la parte externa de la membrana. Durante la reacción ocurre un cambio de voltaje a través de la membrana dado por el transporte del catión a través de ésta.

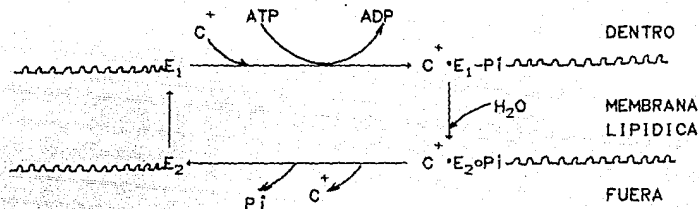


Figura 5. Mecanismo de catálisis de la ATPasa del tipo E1E2.

El pH óptimo de actividad de la ATPasa de membrana plasmática de plantas es de 5.5 a 6.5 y tiene que ver con el papel fisiológico de ésta (10, 15, 37), lo cual se detallará más adelante.

Para que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis del ATP es necesario que en el medio se encuentre el Mg^{2+} (15). Se ha observado que en ausencia de Mg^{2+} la actividad se reduce al 7% (62), lo cual indica un requerimiento alto por cationes divalentes ($Mg^{2+} = Co^{2+} > Mn^{2+} \gg Zn^{2+} > Ca^{2+} = 0$) (25). El sustrato real de la enzima es entonces $ATPMg$, aunque concentraciones altas de ATP, Mg o ADP inhiben fuertemente a la enzima. Un modelo propuesto de la observación de la curva sigmoideal encontrada es el de que existe un sitio de unión para $ATPMg$ y dos sitios de unión a Mg^{2+} ya que existe evidencia de que el Mg^{2+} y el ATP causan un cambio conformacional que por adición de Mg^{2+} protege a la ATPasa de la inactivación por tripsina (15).

La presencia de cationes monovalentes estimula significativamente a la enzima y se ha encontrado la siguiente secuencia de estimulación $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ (10), lo que al parecer está asociado con las características fisiológicas de la célula y de lo cual se hablará mas adelante.

Los aniones aparentemente no tienen efecto sobre el rango de hidrólisis del ATP (10, 25). El DES (dietilestilbestrol) y la DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) inhiben a la ATPasa de membrana plasmática, aunque su especificidad aún no ha sido establecida adecuadamente (10, 41).

Un inhibidor que se sabe es altamente específico para la ATPasa de membrana plasmática es el Vanadato. Esto ocurre debido a que dicho compuesto compite con el fosfato para formar el intermediario fosforilado, el Vanadio (V) puede adoptar una estructura de bipirámide trigonal (que se parece al estado de transición del Pi durante la reacción), lo cual lo hace altamente efectivo como inhibidor (10), mostrando una K_i de $1 \mu M$ (15).

El papel fisiológico de la ATPasa- H^+ de membrana plasmática en plantas aún no está totalmente establecido. Ya que se ha observado que hay una acidificación del medio externo en células intactas de plantas, se apunta a la ATPasa como factor regulador del pH de la célula (aunque no sea el único). Por control experimental del pH del medio, se ha encontrado cómo el componente eléctrico aumenta y su magnitud permite a la célula el transporte de nutrientes en contra de la fuerza generada por un gradiente de concentración de 100,000:1; de aquí que se piense que la ATPasa de H^+ proveería la energía que puede ser usada para el transporte de solutos a través de su acción de construir un gradiente de concentración expulsando H^+ a expensas de la hidrólisis del ATP (15).

El crecimiento de plantas se encuentra controlado entre otras cosas por factores físicos (luz), fitoreguladores (auxina) y fitotoxinas (fusicosina), los cuales parecen actuar de manera indirecta activando a la ATPasa (33, 42, 43); modificándose así el

pH intracelular. Esto ocasionaría una acidificación del medio externo, resultando en un cambio de flexibilidad de la pared celular facilitando así la acumulación de K^+ y nutrientes en la célula lo que proporcionaría la presión osmótica y los metabolitos requeridos para el crecimiento. Existen varias indicaciones de que las cinasas de proteínas pueden regular a la $ATPase-H^+$ del tipo E_1E_2 por fosforilación de la misma, ya que ésta es sustrato de su actividad de cinasa (44).

ATPASA DE TONOPLASTO.

La fracción microsomal contiene vesículas provenientes de diferentes membranas, mayoritariamente las del tonoplasto y la membrana plasmática; el tonoplasto es la membrana que envuelve a la vacuola. Cuando se quiere obtener una fracción enriquecida en tonoplasto, los microsomas se colocan en un gradiente de densidad de manera semejante a como se hace para obtener una fracción enriquecida de vesículas de membrana plasmática, con la diferencia de que las vesículas de tonoplasto se equilibran a una densidad de 1.10 - 1.13 g/cc (10, 11). En estas vesículas se encuentra la ATPasa de tonoplasto, cuyo sitio catalítico queda viendo hacia el exterior tal y como se encuentra originalmente (hacia el citoplasma), por lo que el tipo de vesículas es llamado al derecho (rightside-out) y en donde se puede medir la actividad de hidrólisis de ATP y de transporte.

Para obtener a la enzima purificada, el tratamiento con detergentes es obligado y similar al que se realiza para la ATPasa de membrana plasmática, aunque se sabe que los detergentes bajan la actividad de la enzima y no es posible reconstituirla en presencia de lípidos (10, 30, 45, 46) como sucede para la ATPasa de membrana plasmática (15). Los detergentes que se han probado con mejor resultado para solubilizar la enzima sin afectar su

actividad son el Desoxicolato de sodio (DOC), el Octil- β -D-glucopiranosido (OG) y el Zwittergente 3-16 (10, 11).

Por estudios de inactivación con radiación, se observó que la ATPasa de tonoplasto tiene un peso molecular en la membrana que es de aproximadamente 500 kDa (15, 46); aunque difiere dependiendo del material experimental empleado. Por otros estudios se ha visto que la enzima es un complejo multisubunitario (30) parecido al que tiene la ATPasa mitocondrial, ya que parece estar compuesto de una parte integral de membrana y un complejo hidrofílico con capacidad de catálisis (47).

Se ha reportado que la parte hidrofílica de la ATPasa de Tonoplasto tiene una composición muy semejante a la de la F_1 de mitocondrias (13, 47), ya que consta de cinco diferentes subunidades A, B, C, D y E, de pesos moleculares aproximados de 70, 60, 41, 34 y 33 kDa, respectivamente; si bien otros autores reportan la posibilidad de la existencia de un mayor número de polipéptidos, entre 8 y 10, que conformarían a la enzima (31, 48, 49). Las dos subunidades de la porción hidrofílica de la ATPasa de Tonoplasto que han sido mejor caracterizadas son la A y la B, la subunidad A es protegida con ATP de la inhibición por el 7cloro-4nitrobenzo-2oxa-1,3diazole (NBD-Cl) y la N-etilmaleimida (NEM). Ya que el NBD-Cl marca preferencialmente a la subunidad β de la ATPasa mitocondrial (que contiene el sitio activo de la enzima), se infiere por analogía que la subunidad A de la ATPasa de Tonoplasto es la que contiene el sitio catalítico de la enzima (13, 15, 31, 47, 48, 49). La subunidad B parece formar parte de la regulación de la catálisis aunque aún no se conoce con certeza su función (13, 49).

La subunidad A de diferentes especies está altamente conservada ya que existe cerca del 62% de homología entre las subunidades correspondientes de la ATPasa de plantas y hongos. Por otra parte, existe escasa similitud entre las subunidades A y β y entre B y α (cerca del 25%) de las ATPasas de estos mismos organismos; por lo que se propone que la ATPasa de tonoplasto no pertenece al tipo de ATPasa FoF₁ (13).

El sector integral de membrana de la ATPasa de tonoplasto, contiene un proteolípido de aproximadamente 16 kDa de peso molecular que une DCCD, que ha sido extraído con cloroformo/metanol (47) y el cual se ha reportado que existe en varias copias (46, 47). Esta subunidad de 16 kDa purificada, al ser reconstituida en proteopolisomas, aparentemente es capaz de funcionar como canal de protones (13, 48), en forma análoga a lo que ocurre con el proteolípido de 8 kDa de la F_0 mitocondrial.

La enzima es altamente específica para el ATP como sustrato, aunque puede usar PPi, ITP y GTP con menos del 30% de actividad que la observada con ATP (50, 51). Se ha reportado que la K_m para el ATP en plantas es de 0.1 a 0.2 mM (10, 28), mostrando una cinética de reacción del tipo Michaeliano, con lo cual se supone la existencia de un solo sitio catalítico (28). La actividad aumenta 17 veces al añadir Mg^{2+} y el orden de preferencia de cationes divalentes es el siguiente: $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+}$ (28); los cationes monovalentes no tienen efecto aparente sobre la actividad de hidrólisis de ATP (10, 25, 50). La ATPasa de tonoplasto es estimulable por aniones en el siguiente orden: Cl^- (cualquier sal de cloruro) $> Br^- > acetato^- > HCO_3^- > I^- > SO_4^-$ (46), mientras que la actividad es fuertemente inhibida por NO_3^- y SCN^- (51), por lo cual éstos han sido utilizados como inhibidores específicos de la ATPasa de tonoplasto.

Los inhibidores específicos de la ATPasa Mitocondrial no tienen efecto sobre la ATPasa del tonoplasto con excepción del DCCD, que inhibe pero a una concentración 10 veces mas alta que la usada para inhibir a la ATPasa mitocondrial (46, 51). La actividad no se ve afectada por Na_3VO_4 lo cual indica que el mecanismo de reacción no involucra la formación de un intermediario fosforilado, como ocurre con la ATPasa de membrana plasmática.

Todos los datos anteriores sobre sensibilidad a inhibidores, cationes y aniones y sobre composición polipeptídica encontrada, son evidencias de que la ATPasa de tonoplasto pertenece a un tipo de ATPasa distinto a los ya encontrados (E_1E_2 y F_0F_1).

El pH óptimo para la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de tonoplasto se encuentra entre el intervalo de 7.0 a 8.0 (10, 52). El interior de la vacuola es ácido, en donde la contribución a esta acidez por la ATPasa de tonoplasto es muy importante. Se ha medido la diferencia de voltaje, usando microelectrodos cuando la enzima se encuentra trabajando y se ha encontrado que esta diferencia de potencial eléctrico puede ser usada para transportar moléculas al interior de la vacuola a una concentración 1000 veces más alta que en el citoplasma (53).

La vacuola es un organelo en donde se almacenan algunos aminoácidos cargados positivamente, moléculas de polifosfatos y varias enzimas hidrolíticas (53), además se ha encontrado que hay acumulación de azúcares, Ca^{2+} y ácidos orgánicos (malato y citrato) que podrían ser transportados aprovechando el gradiente electroquímico formado por la ATPasa de tonoplasto (10).

OTRAS ATPASAS.

Todavía es poco lo reportado en la literatura acerca de la existencia de ATPasas en aparato de Golgi y retículo endoplásmico, sin embargo no se descarta tal posibilidad. En la fracción microsomal se han tratado de separar las vesículas de Golgi y el retículo endoplásmico de otras vesículas (tonoplasto y membrana plasmática) pero no ha sido posible lograrlo. Las vesículas se equilibran en un gradiente de densidad a 1.10 y 1.13

g/cc, para retículo endoplásmico y Golgi respectivamente (54). Tomando estos picos del gradiente de densidad, se observa en micrografías cómo las vesículas se encuentran en esa zona, aunque están contaminadas con vesículas de membrana plasmática principalmente.

Para diferenciar de manera específica unas vesículas de otras, se recurre a medir la actividad de las enzimas que se sabe se encuentran específicamente en dichos organelos, las cuales son llamadas marcadores específicos. La actividad de la NADPH-Citocromo c Reductasa es usada como marcador específico del retículo endoplásmico mientras que la UDPasa latente y la Glucansintetasa I lo son de Golgi; la UDPG-esterol-glucosiltransferasa es usada como marcador de membrana plasmática. Con estos marcadores ha sido posible diferenciar las vesículas de Golgi y el retículo endoplásmico de las de membrana plasmática, que es el principal contaminante. Se ha encontrado evidencia experimental sobre la presencia de ATPasas en estos organelos pero no se ha podido diferenciar claramente de la debida a otras ATPasas (54).

Con toda la información precedente sobre la estructura y la función de las ATPasas de H^+ , es evidente que ellas constituyen un factor importante en cualquier proceso fisiológico de una planta. En estadios muy tempranos de su desarrollo, es decir partiendo de la semilla, el papel de estas enzimas debe ser fundamental. Durante el desarrollo de la plántula, cuando se expresan todas sus capacidades metabólicas y de crecimiento, las ATPasas de H^+ también deben ser importantes.

Como ya se mencionó las ATPasas de H^+ forman parte vital en el metabolismo, por lo que una alteración o disminución en su actividad enzimática, afectaría gravemente el desarrollo de la plántula. Cuando una semilla presenta deterioro físico o

isiológico, que puede deberse a factores ambientales adversos (presentes durante su formación y/o almacenamiento), es probable que su actividad metabólica se encuentre alterada. Es poco lo que se encuentra en la literatura sobre la actividad de las ATPASAS de H⁺ en plantas bajo estas condiciones, algunos de los estudios que se han realizado son: el efecto del estrés salino sobre la actividad de las ATPASAS de varias plantas (55, 56, 57), la relación de la dormancia con la actividad de la ATPASA de membrana plasmática (58) y la activación de la ATPASA vacuolar por frío (59).

Nosotros disponemos de dos líneas de maíz desarrollados por el Centro de Investigación y Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), las cuales nos fueron proporcionadas por los Doctores Jorge Ramírez González y Ernesto Moreno, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Estas dos líneas tienen características fenotípicas muy diferentes a lo largo de su desarrollo, desde la semilla hasta la planta adulta. Tales características se resumen en la Tabla I.

TABLA I.

Características fenotípicas de las dos líneas de maíz.

ETAPA	CARACTERISTICA	LINEA 48	LINEA 53
Semilla	Viabilidad	Alta	Baja
	Susceptibilidad al deterioro	Resistente	Sensible
Plántula ó	Crecimiento	Rápido, Homogéneo	Sensible, Heterogéneo
		Resistente a plagas	Sensible a plagas
Planta adulta	Floración	Sincrónica	Asincrónica
	Productividad	Grande	Pequeña

Las líneas 48 y 53 presentan características muy diferentes en muchos aspectos. En los estudios que expondremos en este trabajo, nos referiremos a la línea 48 como la RESISTENTE (al deterioro) y a la línea 53 como la SENSIBLE (al deterioro), si bien ésta es solo una de las muchas propiedades fenotípicas a las que nos pudimos haber referido en ambas líneas de maíz.

Los datos de la Tabla I nos expresan claramente las características que conforman dos grados de vigor muy diferentes en dos líneas de un cultivo. Esta característica es muy importante desde el punto de vista agronómico, por lo cual quisimos estudiar uno de los aspectos bioquímicos como son las ATPasas microsomales que pueden estar involucrados en el vigor de una planta.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar un estudio comparativo de dos ATPASAS de H^+ en dos líneas de maíz con diferente sensibilidad al deterioro por almacenamiento, con el propósito de determinar si existe una relación entre el vigor de una planta y la actividad de sus ATPASAS de H^+ .

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Determinar los niveles de ATPASAS microsomales en las líneas de maíz 53 y 48, en estadios tempranos posteriores a la germinación.
- 2) Identificar por inhibición específica de la actividad de hidrólisis del ATP, a las ATPASAS integrantes de los microsomas: ATPASA de membrana plasmática y ATPASA de tonoplasto.
- 3) Establecer, con ayuda de los inhibidores específicos, los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de las ATPASAS identificadas en la fracción microsomal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

SIEMBRA DE SEMILLAS.

Las semillas de maíz de las líneas B-48 (Resistente) y T-53 (Sensible) fueron lavadas en agua corriente o bien desinfectadas con Cloralex al 2% (solución comercial marca AlEn que presenta una concentración inicial de 6% de cloro activo). Posteriormente se sembraron de la siguiente manera: se colocaron 25 semillas sobre dos toallas de papel húmedas, una sobre otra, en forma transversal (si las semillas no habían sido desinfectadas se les añadió cis N(Triclorometil) tio-4ciclohexen-1,2dicarboximida (CAPTAN-50) para evitar la contaminación por hongos durante el periodo de incubación). Después se cubrieron con otra toalla de papel húmeda y se envolvieron a manera de "taco". Los tacos fueron colocados dentro de charolas de plástico sobre una base pequeña para que no fueran tocados por el agua depositada en el fondo de la charola. Al cerrar las charolas herméticamente se mantuvo un ambiente de alta humedad. Las charolas se colocaron en obscuridad y a 25°C en una estufa de cultivo (modelo FE-131) por los tiempos indicados más adelante para cada línea de maíz.

MEDICION DEL PORCENTAJE DE GERMINACION Y ACUMULACION DE BIOMASA.

Las semillas de las dos líneas de maíz se pusieron a germinar como se describió anteriormente, durante 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 12 días. Para cada tiempo se sembraron 3 tacos con 25 semillas cada uno, los cuales fueron procesados de la siguiente manera:

- a) Conteo del número de semillas germinadas, considerando como semilla germinada, aquella que tenía por lo menos 2 mm de radícula emergida de la testa. De aquí se obtuvo el porcentaje de germinación en cada tiempo.

b) De las semillas germinadas se disecaron los coleoptilos, las radículas y el endospermo remanente. Se pesaron por separado y después de haberlos secado (a 65°C en vacío durante 3 días), se obtuvo el peso seco del tejido. Este se dividió entre el número de semillas germinadas, dando el peso seco del tejido/plántula. Mediante la siguiente fórmula se obtuvo el Porcentaje de Peso Seco (% PS) de tejido/plántula a cada tiempo.

$$\% \text{ PS} = \left(\frac{\text{Peso Seco Tejido (Coleoptilo o Radícula)}}{\text{Peso Seco Plántula (Coleoptilo + Radícula + Endospermo)}} \right) \times 100$$

Los datos así procesados fueron utilizados para obtener el estado de desarrollo en el cual las dos líneas de maíz, resistente y sensible, son comparables.

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL.

Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. Los coleoptilos y las radículas se disecaron y se lavaron con agua bidestilada, se picaron con navaja de rasurar y después se homogenizaron en mortero con Medio I (Sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, ATP 1 mM, Tris/HCl 70 mM, pH 8.0, BSA 1%, PMSF 2 mM, DTE o DTT 4 mM y β -Mercaptoetanol 15 mM), en una relación de 1 g tejido:1.5 ml de Medio I. El homogenado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el residuo se rehomogenizó en la misma relación Tejido:Medio. La combinación de ambos filtrados se sometió a centrifugación diferencial, realizando tres centrifugaciones a diferentes velocidades (Figura 6). El sedimento de la centrifugación de 80,000g (35,000 rpm 30' Rotor Type 40.3) fue la fracción microsomal, la cual se resuspendió en un volumen pequeño de Medio II (Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 5 mM, pH 7.0, BSA 0.2%,

Glicerol 3.7%, PMSF 1 mM y DTE o DTT 1 mM; el β -Mercaptoetanol, el PMSF y el DTE o DTT se añadieron poco tiempo antes de usarse) para almacenarse en alícuotas a -70°C .

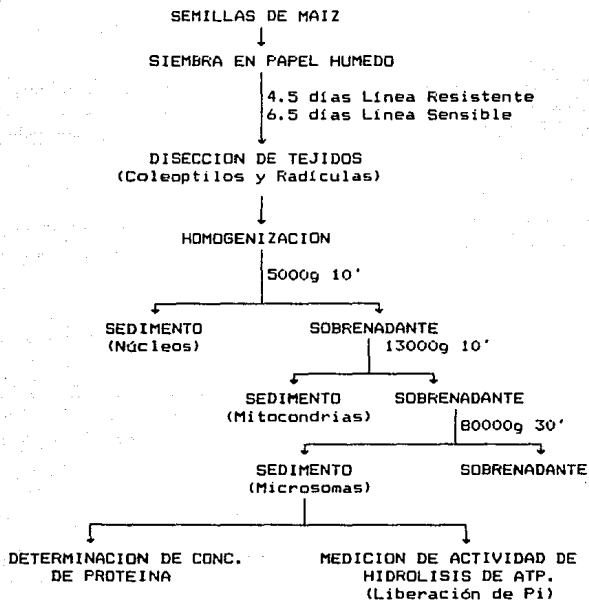


Figura 6. Diagrama de flujo del protocolo de obtención de la fracción microsomal.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

El método utilizado es una modificación del método de Lowry hecha por Peterson (60), en el cual los grupos aromáticos de las proteínas en medio alcalino reaccionan con el Cobre (II), combinado con la reacción de grupos amino con el reactivo de fenol (reactivo de Folin-Ciocalteu) para dar un complejo azul que puede ser leído espectrofotométricamente a 750 nm. El procedimiento fue el siguiente:

A 0.9 ml de agua bidestilada, se añadió un volumen de Medio II (con el que se resuspendieron los microsomas) o la muestra con proteína microsomal o la solución estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Se añadieron después 0.1 ml de DDC 0.15%, la mezcla se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y después se agregó 1 ml del Reactivo A, que consiste en partes iguales de agua bidestilada, NaOH 0.8 N, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% y CTC (Na_2CO_3 10%, CuSO_4 0.1% y $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0.2%). Diez minutos después se adicionaron 0.5 ml del Reactivo B (1 volumen de Folin Ciocalteu + 5 volúmenes de agua bidestilada). Se esperaron 30 minutos y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Pye Unicam modelo SP6 550) a 750 nm. Para la curva estándar de proteína se usaron de 10 a 60 μg de BSA. La concentración de proteína microsomal se calculó restando los valores de absorbencia del Medio II a los de absorbencia de la proteína microsomal e interpolando el resultado en la curva estándar de BSA.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP.

El ensayo se llevó a cabo en 150 μl o 300 μl de medio de reacción que se compone de Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20 mM (pH 7.0), CCCP 7 μM , ATP/Tris 1-10 mM (pH 7.0), MgCl_2 ó MgSO_4 1-10 mM

en los casos en que se indique. Cuando se inhibió específicamente alguna de las enzimas presentes en la fracción microsomal, se usaron los inhibidores específicos en las concentraciones indicadas en la Tabla II.

TABLA II

Concentraciones empleadas de inhibidores específicos de enzimas con actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal.

CONCENTRACIÓN	INHIBIDOR	ENZIMA INHIBIDA ESPECIFICAMENTE
100 mM	KNO ₃ o TrisNO ₃ ²⁵	ATPASA de Tonoplasto
150 μM	Na ₂ VO ₄ ^{41, 61, 62}	ATPASA de Membrana Plasmática
100 mM	DES ⁴¹	
1 ó 2 mM *	Na ₂ MoO ₄ ⁶¹	Fosfatasa ácida
1 ó 2 mM *	NaN ₃ ⁶¹	ATPASA Mitocondrial
33 μg/mg prot	Oligomicina ⁶³	

* En los casos de las cinéticas de hidrólisis de ATP, el NaN₃ y el Na₂MoO₄ se mezclaban a una conc. final de 2 mM cada uno.

El medio de reacción se incubó a 30°C y la reacción de hidrólisis se inició con la adición de 10-25 μg de proteína microsomal, se dejó proceder un tiempo entre 15-30 minutos, deteniéndose la reacción por adición de SDS 12% ó TCA 11%. La hidrólisis de ATP se midió como liberación de fosfatos. Se incluyeron blancos para la reacción de hidrólisis de ATP, en éstos se adicionó proteína microsomal después de haber añadido el SDS o el TCA. El cálculo de la actividad específica se hizo restando los valores de la absorbencia del blanco a la absorbencia de la muestra problema e interpolando en la gráfica del estándar de fosfatos. Los resultados se expresaron en nmol Pi/min/mg.

TABLA III

Constantes utilizadas para calcular las concentraciones de las especies libres y complejos en el medio de reacción.

CONSTANTES DE ESTABILIDAD METAL-LIGANDO * (M^{-1})	
LIGANDO	K_a
ATP ⁴⁻	73,000
H ₂ ATP ²⁻	20
HATP ³⁻	500

CONSTANTES DE DISOCIACIÓN DEL ÁCIDO (M^{-1})	
H ₂ ATP ²⁻	1.0×10^4 (pKa= 4.0)
HATP ³⁻	8.9×10^6 (pKa= 7.0)

CONSTANTES DE ESTABILIDAD GLOBALES ** (M^{-1})	
METAL-LIGANDO	β
MgATP	7.3×10^4
MgH ₂ ATP	1.78×10^{12}
MgHATP	4.45×10^9
MgATP ²⁻	8.9×10^{10}
HATP ³⁻	8.9×10^6

* $K_a = \frac{[M][L]}{[ML]}$; donde METAL (M) = Mg, L = LIGANDO (64)

** Estas constantes (β) fueron calculadas como los productos de las constantes de estabilidad por las constantes de disociación involucradas, ver fórmula.

$$\beta = \frac{[MgH_xL_z]}{[Mg]^y [H]^x [L]^z}$$

En los casos de los experimentos de hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de sustrato, se tomó en cuenta la presencia de Mg²⁺ en el medio de reacción (ya que se ha reportado que el complejo de ATP con Mg²⁺ es el sustrato real de las ATPasas, refs. 50, 59), calculándose la concentración de las especies libres y de los complejos correspondientes al pH en que se hicieron las mediciones de hidrólisis de ATP (pH 7.0). Se

usaron para ello las constantes de asociación de las especies y complejos involucradas (Tabla III), el programa usado (65) dió como resultado que la especie predominante a pH 7.0 es ATPMg. La equivalencia entre las concentraciones añadidas y la de la especie ATPMg se da en la Tabla IV.

TABLA IV

Especies añadidas		[mM]	Complejo	
ATP	MgCl ₂		ATPMg	[mM]
0.25	0.25		0.1798	
0.29	0.29		0.2107	
0.33	0.33		0.2418	
0.40	0.40		0.2965	
0.50	0.50		0.3751	
1.00	1.00		0.7728	
2.00	2.00		1.5786	
3.00	3.00		2.3901	
4.00	4.00		3.2045	
5.00	5.00		4.0210	
7.00	7.00		5.6575	
9.00	9.00		7.2973	
10.00	10.00		8.1181	

Los datos experimentales del estudio cinético de hidrólisis de ATP no presentaron un comportamiento Michaeliano, por lo cual para tratar de elucidar el porque de este comportamiento y así obtener los parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , h) de la o las enzimas con actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal, los datos fueron sometidos mediante un programa de regresión no lineal (basado en el algoritmo de Marquardt, ref. 66) a un ajuste a dos ecuaciones matemáticas, que propusimos considerando los dos casos que más probablemente describiesen nuestro sistema.

a) La primera ecuación empleada fue la siguiente:

$$v_o = \frac{V_{max} [s]^h}{K_m^h + [s]}$$

En donde consideramos que v_o es la actividad total de hidrólisis de ATP, producto de la actividad de una enzima que presenta cooperatividad homotrópica de algún tipo positiva o negativa, expresada a través del número de Hill (h).

b) La segunda opción se expresó con la siguiente ecuación:

$$v_o = \frac{V_{max1} [s]^h}{K_{m1}^h + [s]} + \frac{V_{max2} [s]^{h'}}{K_{m2}^{h'} + [s]}$$

En donde la actividad total de hidrólisis de ATP (v_o), es el resultado de la suma de las velocidades de dos enzimas que están actuando de manera simultánea a todas las concentraciones de ATPHMg (que fue considerado el sustrato real [s]), pero que presentan velocidades máximas distintas (V_{max1} y V_{max2}) con una K_m especial para cada una (K_{m1} y K_{m2}) y tomando en cuenta que podían presentar cooperatividad se incluyó un número de Hill (h y h') particular para cada una de ellas.

TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FOSFATOS.

Durante la reacción de hidrólisis de ATP se liberan al medio ADP y P_i , una forma de cuantificar la actividad de hidrólisis de ATP es midiendo el P_i liberado, por medio de una reacción colorimétrica. Los dos métodos que fueron utilizados en este trabajo están basados en la reacción en medio ácido entre el

Pi y el $(\text{NH}_4)_3\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ para dar el complejo $(\text{NH}_4)_3\text{PiMo}_{12}\text{O}_{24}$, de color amarillo, que en presencia de un agente reductor como el ácido ascórbico, vira a color azul lo cual hace más evidente la reacción. La diferencia de ambos métodos consiste en la magnitud de la interferencia que causa la presencia de fosfato orgánico lábil como el del ATP. A continuación se describen ambas metodologías.

El método de Ames (67) fue utilizado cuando el medio de reacción contenía ATP 1 mM. En este método, a 300 μl de H_2O bidestilada o muestra con Pi se le añadieron 700 μl de la mezcla que contenía 1 volúmen de ácido ascórbico al 10% más 5 volúmenes de molibdato de amonio 0.42% en H_2SO_4 1 N. La mezcla se incubó 20 minutos a 45°C y se leyó la absorbencia a 820 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam Modelo SF6 550. La curva estándar contenía de 10 a 150 nmoles de KH_2PO_4 . El método fue lineal solo hasta 60 nmoles de Pi (Figura 7).

El método de Chifflet (68) modificado por González *et al* (69) se utilizó cuando la concentración de ATP en el medio de hidrólisis fue mayor a 1 mM. En este método, a 150 μl de H_2O bidestilada o muestra con Pi se le añadieron 150 μl de SDS 12% y 300 μl de mezcla BC (molibdato de amonio 2% y ácido ascórbico 12%, disueltos por separado en HCl 1 N y mezclados en relación 1:1). La mezcla se incubó de 3 a 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron después 450 μl de reactivo E (citrate de sodio 2%, metaarsenito de sodio 2% y ácido acético 2%). Después de 20' se determinó la D. D. de la mezcla en el espectrofotómetro a 850 nm. La curva estándar contenía de 10 a 100 nmoles de KH_2PO_4 . La absorbencia fue lineal hasta 60 nmoles de Pi (Figura 7).

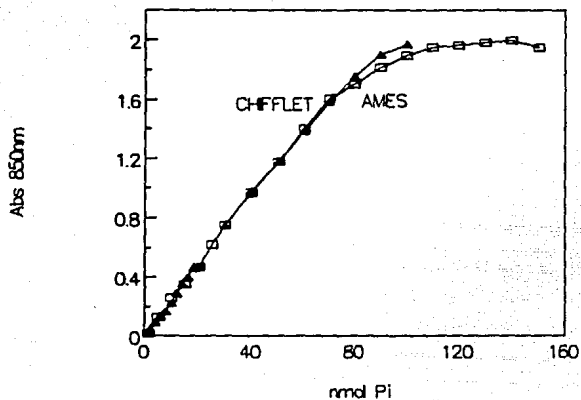


Figura 7. Curvas estándar de determinación de fosfato inorgánico por los métodos de Ames (O) y Chifflet modificado (Δ).

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

Para estudiar la actividad de hidrólisis de ATP por las ATPasas microsomales (que son las ATPasas de tonoplasto y membrana plasmática) y su relación con el vigor de la plántula, se utilizaron dos líneas de maíz que presentaban diferencias en sus características fenotípicas (Tabla I). Para poder establecer una edad equivalente en ambas líneas durante las primeras etapas de crecimiento de la plántula se hicieron los siguientes experimentos.

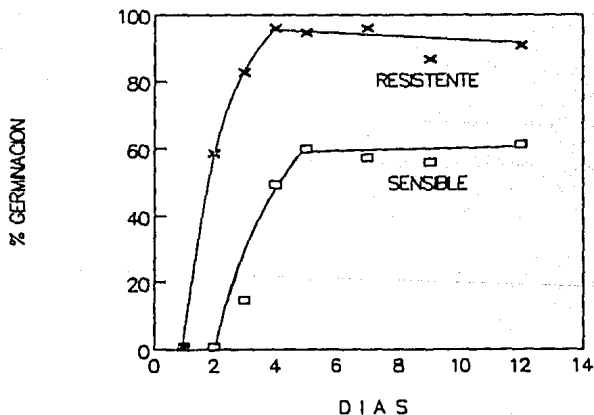


Figura 8. Curvas de % de germinación de las semillas de maíz de las líneas resistente (X) y sensible (O). El procedimiento fue descrito en Materiales y Métodos.

Se determinó el % de germinación a diferentes tiempos bajo condiciones idénticas según se describió en Materiales y Métodos y se determinó la biomasa alcanzada a esos tiempos tanto por el coleoptilo como por la raíz. Lo que se observó con respecto a la germinación (Figura 8), fue que a partir del segundo día la línea resistente comenzaba a germinar y al cuarto día alcanzaba un máximo del 96%; mientras que la línea sensible empezaba su germinación al tercer día y en el quinto alcanzaba un máximo de tan sólo el 60%. Estos datos indican que las dos líneas presentan diferencias significativas en su germinación, tanto en su velocidad de germinación como en el máximo alcanzado.

Además de la diferencia en germinación, observamos que el desarrollo en las dos líneas era distinto, al determinar la acumulación de biomasa en las dos líneas de maíz. La acumulación de biomasa en los coleoptilos expresada como peso seco/plántula durante 12 días se muestra en la Figura 9A. Encontramos que las cinéticas de crecimiento en ambas líneas eran muy parecidas hasta los 7 días, a partir de los cuales la línea sensible mostró un más lento y menor crecimiento. El mismo % peso seco/plántula de 4% fue alcanzado a los 4.5 días para la línea resistente y a los 6.5 días en la línea sensible. Así, establecimos que estos eran los tiempos en que se encontraban las plántulas en el estadio de desarrollo equivalente, para que al medir las actividades enzimáticas de ambas líneas las estuviéramos comparando con respecto a su mismo estadio de desarrollo.

Si observamos el experimento análogo pero en las radículas (Figura 9B), se tiene que la acumulación de biomasa fue similar en ambos casos aunque un poco menor para la línea sensible y también ambas líneas alcanzaron el 4 % peso seco/plántula a los mismos días que los coleoptilos. De acuerdo a estos resultados, se cosecharon las plántulas a los 4.5 días y 6.5 días para la línea resistente y sensible respectivamente, en los cuales ambas líneas alcanzaron un desarrollo equivalente. A partir de estas plántulas se obtuvieron las fracciones microsomales para comparar sus actividades de ATPasa.

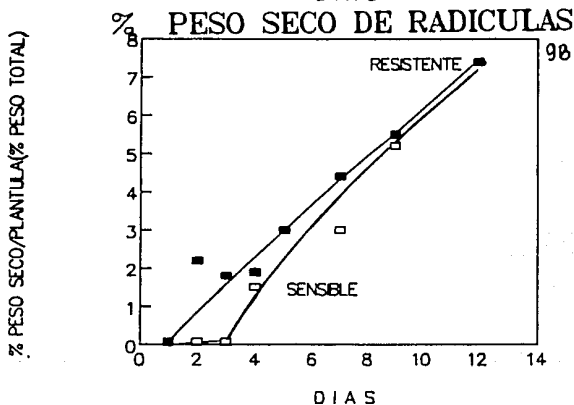
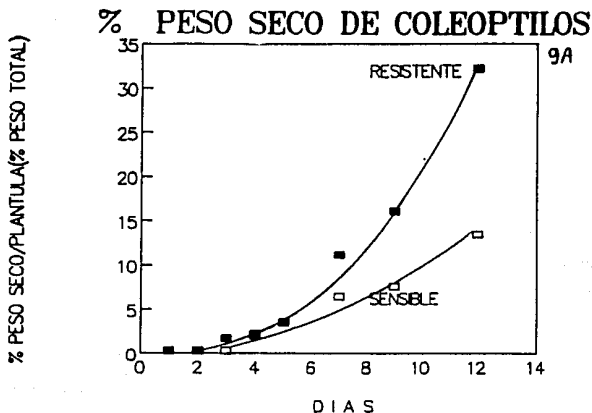


Figura 9A. Curva de crecimiento de plántulas de maíz de las líneas resistente (—■—) y sensible (—□—) al deterioro. Los coleoptilos de ambas líneas se cosecharon a los tiempos indicados y se expusieron a calor seco, tras de lo cual se obtuvieron los pesos secos por plántula como se describe en Materiales y Métodos.

Figura 9B. Curva de crecimiento de plántulas de maíz de las líneas resistente (—■—) y sensible (—□—) al deterioro. Las radículas se cosecharon a los tiempos indicados y se siguió el mismo procedimiento que en la Figura 9A.

Una vez obtenidas las fracciones microsomales, se procedió a medir la estabilidad de su capacidad de hidrólisis de ATP, tras haberse mantenido en congelación a -70°C durante diferentes tiempos. Para ello, la actividad de ATPasa se midió en un intervalo de 0 a 10 días. Los resultados para los microsomas de la línea resistente se muestran en la Tabla V, encontrándose que sí había actividad de hidrólisis de ATP y que se mantenía al menos por tres días sin variación significativa con respecto a la medida el día de la obtención de los microsomas. Sin embargo, a los 6 y 10 días se observó una pérdida del 20% de la actividad. Este mismo comportamiento se observó tanto en los coleóptilos como en las radículas de ambas líneas. Según estos resultados, los ensayos de actividad de hidrólisis de ATP se hicieron sólo durante la primera semana de obtención de la fracción microsomal.

TABLA V.

ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa MICROSMAL A TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A -70°C (RESISTENTE).		
nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹		
TIEMPO (DÍAS)	COLEOPTILOS	RADÍCULAS
0	49.6	54.2
1	41.3	56.4
2	46.8	53.7
3	45.8	54.2
6	38.8	42.4
10	38.5	40.0

Varias enzimas podrían ser las responsables de la actividad de hidrólisis de ATP encontrada. Para identificar los posibles componentes, se ensayó la sensibilidad de la hidrólisis de ATP a inhibidores específicos de enzimas en las concentraciones que se indicaron en la Tabla II (Ver Materiales y Métodos). Los resultados en la Tabla VI nos indican que existen cuatro componentes importantes que hidrolizaban ATP en nuestra preparación y que se evidenciaron gracias a la inhibición específica. La enzima que contribuyó con el 45.8% a la actividad total es la ATPasa de Tonoplasto que es inhibida por ND_3^- ; también

existió sensibilidad a dos inhibidores de la ATPasa de Membrana Plasmática, el Dietilestilbestrol (DES) y el Na_2VO_4 , aunque ambos ejercieron una inhibición diferente (55 y 30% respectivamente). El mejor inhibidor según algunos reportes es el Na_2VO_4 pues para el DES no se han establecido las condiciones en las que funciona como inhibidor específico, por lo cual seleccionamos al Na_2VO_4 como inhibidor específico para la ATPasa de membrana plasmática. Encontramos una contribución a la actividad de hidrólisis de ATP, aunque en menor proporción que los anteriores, por la ATPasa Mitocondrial y la Fosfatasa ácida, de 11.5 y 12.5% respectivamente. Estos dos últimos componentes se encontraron contaminando la fracción microsomal, pues su localización subcelular no correspondía a dicha fracción. Por lo anterior cuando se midió exclusivamente la actividad de las ATPasas de Tonoplasto y Membrana Plasmática, se incluyeron los inhibidores para estos contaminantes. Cuando se realizaron las mezclas de los inhibidores se observó que las mezclas de NO_3^- y $\text{VO}_4^{=}$ no producían las inhibiciones esperadas a partir de su adición independiente: éste no fue el caso de la Na^- y el $\text{MoO}_4^{=}$, por lo cual estos fueron los únicos inhibidores que pudieron ser añadidos simultáneamente cuando así se requirió.

TABLA VI

SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE LA HIDRÓLISIS DE ATP POR LA FRACCIÓN MICROSOMAL DE COLEOPTILOS DE MAÍZ.		
INHIBIDOR	ENZIMA INHIBIDA	% INHIBICIÓN
NO_3^-	ATPasa de Tonoplasto	45.8
$\text{VO}_4^{=}$	ATPasa de Membrana plasmática	30.0
DES		55.0
Oligomicina	ATPasa mitocondrial	11.5
Na^-		11.5
$\text{MoO}_4^{=}$	Fosfatasa ácida	12.5

Para obtener mejores resultados en la inhibición de las enzimas que hidrolizan ATP, algunos autores las incuban con el inhibidor antes de iniciar la reacción de hidrólisis por adición

de ATP, por lo cual probamos si se mejoraban las inhibiciones preincubando con los inhibidores específicos. Los resultados en la Figura 10 muestran el efecto de la preincubación de los inhibidores en la actividad específica. Encontramos que las inhibiciones de la actividad fueron mayores conforme se aumentó el tiempo de preincubación con el inhibidor, y que esto fue mas evidente para el KNO_3 . Una vez alcanzada esta inhibición se mantuvo estable al menos hasta los 6 minutos. También la inhibición por $NasVO_4$ y oligomicina se mejoró con la preincubación aunque menos que la del KNO_3 . Por los datos anteriores, en los ensayos en que se midió sensibilidad a inhibidores se preincubaron las membranas durante 5 minutos con ellos. Este efecto indica que estos inhibidores son también en alguna medida agentes inactivantes de las enzimas.

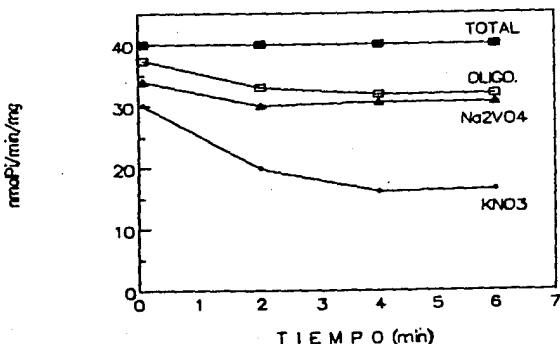
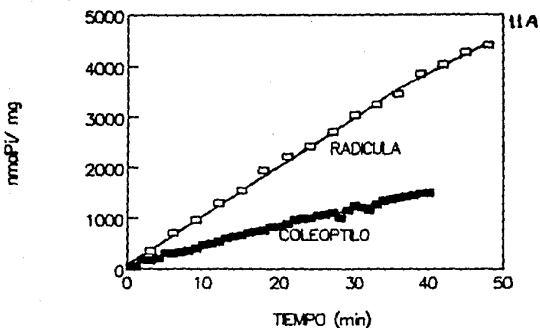


Figura 10. Establecimiento de las condiciones óptimas de preincubación con los inhibidores específicos. 25 μ g de membranas microsomales de coleóptilos, se preincubaron a los tiempos indicados en presencia de los inhibidores señalados, en el medio de reacción. Al cabo de cada tiempo, la reacción de hidrólisis de ATP se inició por adición del sustrato y se dejó transcurrir por 25 min. al cabo de los cuales se midió el P_i liberado por el método de Ames (Ver Materiales y Métodos). Las concentraciones de los inhibidores fueron 150 μ M $NasVO_4$, 100 mM KNO_3 y 33 μ g/mg prot. Oligomicina.

Microsomas línea resistente



Microsomas línea sensible

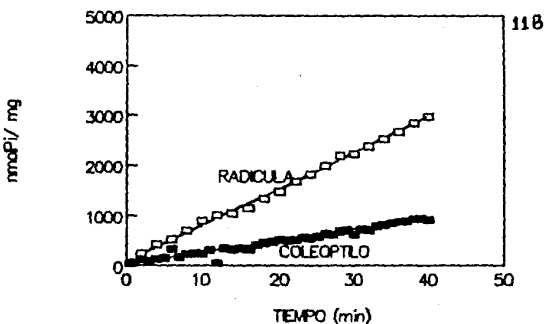


Figura 11A. Curso de tiempo de hidrólisis de ATP. 625 μg de proteína microsomal de coleoptilos (—■—) o radículas (—□—) de la línea resistente, se añadieron a 7.5 ml de medio de hidrólisis de ATP. De aquí, alícuotas de 300 μl se removieron a los tiempos indicados, añadiéndose a 30 μl de TCA. El Pi liberado fue determinado por el método de Ames.

Figura 11B. Curso de tiempo de hidrólisis de ATP. Utilizando proteína microsomal de coleoptilos (—■—) o radículas (—□—) de la línea sensible, el ensayo se realizó de manera similar al que se describió en la Figura 11A.

Ahora bien, hasta el momento se habían realizado los experimentos a tiempos cortos, y para poder establecer las condiciones de linealidad de la reacción enzimática con respecto al tiempo, se midió la liberación de Pi por hidrólisis de ATP a diferentes tiempos en los microsomas de las dos líneas de maíz.

En el curso de tiempo de hidrólisis de ATP de los microsomas de la línea resistente (Figura 11A), la curva de coleoptilos muestra que la actividad de hidrólisis de ATP fue lineal con respecto al tiempo durante 40 min. En la curva de radículas sucedió algo similar, si bien después de 40 minutos, la hidrólisis de ATP tendió a disminuir. En esta misma gráfica se aprecia que la liberación de Pi en las radículas fue del doble con respecto a la obtenida en los coleoptilos. En la Figura 11B se encuentra el experimento análogo pero en los microsomas de la línea sensible. Se observa que tanto en los coleoptilos como en las radículas la cinética fue lineal hasta los 40 minutos. Comparando la curva de liberación de Pi de los coleoptilos de la línea resistente, se observa que esta actividad fue de aproximadamente el doble que la determinada en la línea sensible. Por otra parte, la actividad mostrada en radículas de la línea sensible no fue significativamente distinta a la de la línea resistente. Estas diferencias fueron exploradas con mas detalle en el experimento que se muestra a continuación. De acuerdo a los anteriores resultados, las actividades de ATP fueron medidas a tiempos entre 20 y 30 minutos.

Los anteriores resultados experimentales indican que si existen diferencias en las actividades de hidrólisis de ATP por las fracciones microsomales de coleoptilos de las dos líneas y que aparentemente no había diferencia en las actividades hidrolíticas de las fracciones microsomales de las radículas respectivas. Los contribuyentes a esta actividad, en especial los debidos a la ATPasa de tonoplasto y membrana plasmática fueron investigados y comparados en ambas líneas de maíz.

TABLA VII.

ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP POR LA FRACCIÓN MICROSOMAL DE COLEOPTILOS DE LAS LINEAS RESISTENTE Y SENSIBLE		
ACTIVIDAD	HIDRÓLISIS DE ATP nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹ (INHIBICIÓN)	
	RESISTENTE	SENSIBLE
TOTAL	34.7 (0)*	13.4 (0)*
SENS A KNO ₃	17.2 (50) 37**	12.6 (94) 0**
SENS A Na ₂ VO ₄	7.9 (23)	8.2 (61)
SENS A OLIGOMICINA	5.7 (16)	3.1 (23)
SENS A Na ₂ MoO ₄	8.3 (24)	3.6 (27)

* O % de inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP por el inhibidor indicado a las concentraciones señaladas con respecto a la hidrólisis TOTAL.

** % de inhibición de la actividad de la ATPasa de tonoplasto calculada no por la inhibición directa por KNO₃, sino por la diferencia de la actividad total (34.7 nmolPi/min/mg = 100% para la línea resistente por ejemplo) y la suma de inhibiciones directas obtenidas por la adición de Na₂VO₄ y Na₂MoO₄ (21.9 nmolPi/min/mg = 63%). Estos valores son analizados en la discusión.

La actividad sensible al inhibidor se obtuvo como la diferencia entre la actividad TOTAL de hidrólisis de ATP y la actividad residual o insensible al inhibidor. El fosfato liberado fue determinado por el método de Ames.

La contribución a la actividad de hidrólisis de ATP de los componentes de la fracción microsomal de coleoptilos de ambas líneas de maíz se muestra en la Tabla VII. La actividad total de la fracción microsomal de la línea resistente fue de 34.7 nmol Pi/min/mg, que disminuyó un 50% cuando se añadió KNO₃ (inhibidor de la ATPasa de tonoplasto) al medio de reacción, por lo que se infiere que la ATPasa de tonoplasto contribuyó con 17.2 nmol Pi/min/mg a la actividad total. En presencia de Na₂VO₄, que es inhibidor de la ATPasa de membrana plasmática, la actividad se inhibió un 23%, resulta entonces que la ATPasa de membrana plasmática contribuyó con 7.9 nmol Pi/min/mg. También hubo contribución a la actividad total de hidrólisis de ATP por la ATPasa mitocondrial y por fosfatacídica, ya que se observó inhibición de la actividad total por oligomicina y molibdato de

sodio de 16 y 24% respectivamente. Nótese que la suma de % de inhibición es superior al 100%, indicando que existe cierta inhibición cruzada de los inhibidores.

En la línea sensible la actividad de hidrólisis de ATP fue de 13.4 nmol Pi/min/mg que resultó ser 2.6 veces menor que la encontrada en la línea resistente. Tal y como ocurrió con la línea resistente, también en la línea sensible la mayor contribución a la actividad total de hidrólisis de ATP se debió a la ATPasa de tonoplasto seguida por la de la ATPasa de membrana plasmática, ya que la actividad sensible a KNO_3 fue de 12.6 nmol Pi/min/mg y en presencia de Na_3VO_4 la actividad total fue inhibida un 61%, por lo que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática fue de 8.2 nmol Pi/min/mg. Comparando las ATPasas de tonoplasto y membrana plasmática en ambas líneas de maíz, se observó que la ATPasa de tonoplasto de la línea resistente es 1.4 veces mayor que la de la línea sensible, mientras que en la ATPasa de membrana plasmática de la línea resistente la actividad es ligeramente menor a la de la línea sensible.

La contribución a la actividad total por los contaminantes también se encontró en la línea sensible, en donde la ATPasa mitocondrial contribuyó un 23% y la actividad de la fosfatasa ácida fue de un 27%, siendo ambos porcentajes mayores a los encontrados en la línea resistente. Nuevamente encontramos que la suma de % de inhibición es mayor al 100%, lo cual nos confirma que hay inhibición cruzada, el inhibidor que probablemente sea el causante de tal inhibición poco específica es el KNO_3 , y los motivos por los cuales creemos que ocurre la inhibición cruzada se detallan más adelante en la discusión. Aunque el efecto de esta inhibición cruzada fue ignorado debido a que no se cuenta con la información suficiente para medir su magnitud.

Los valores de hidrólisis de ATP con lo que contribuyen los contaminantes en la actividad total de la fracción microsomal fluctuaban de preparación a preparación, por lo cual las diferencias en actividad total entre las líneas sensible y

resistente no solo se deben a las ATPasas microsomales (ATPasas de tonoplasto y membrana plasmática) sino también a la de los contaminantes. Es posible conocer con certeza la contribución de los contaminantes debido a que los inhibidores de su actividad son realmente específicos.

TABLA VIII.

FOSFATO PRODUCIDO POR LA FRACCIÓN MICROSOMAL DE COLEOPTILOS		
CONTRIBUYENTE	HIDRÓLISIS DE ATP nmol P _i min ⁻¹ mg ⁻¹	
	RESISTENTE	SENSIBLE
ATPASA MITOCONDRIAL	5.7	3.1
FOSFATASA ÁCIDA	8.3	3.6
CONTAMINANTES TOTALES	14.0	6.7
ATPASA MICROSOMAL	20.7	6.7

Ya que la magnitud de la diferencia entre la hidrólisis de ATP por la líneas resistente y la sensible era muy importante desde el punto de vista de nuestros objetivos, era necesario evaluar de una manera mas precisa tal diferencia. El hecho de que tuviéramos contaminantes en la fracción microsomal interfería con tal evaluación. La contribución al P_i liberado por las ATPasas microsomales se obtuvo de sustraer a la actividad total de hidrólisis de ATP de cada fracción microsomal, la contribución respectiva de los contaminantes a la actividad total. En la Tabla VIII encontramos que la actividad de la ATPasa mitocondrial en la línea resistente fue de 5.7 nmol P_i/min/mg, la fosfatasa ácida contribuyó con un actividad de 8.3 nmol P_i/min/mg en la actividad total de los microsomas de la línea resistente y con 3.6 nmol P_i/min/mg en la línea sensible. Si sumamos las actividades de estos dos componentes no microsomales, tenemos que en la línea resistente 14 nmol P_i/min/mg estuvieron dadas por los contaminantes mientras que en la línea sensible el valor correspondiente fue de 6.7 nmol P_i/min/mg. Cuando restamos la contribución de las actividades no microsomales a la actividad

total obtuvimos la actividad de las ATPasas microsomales que en la línea resistente fue de 20.7 nmol Pi/min/mg resultando ser 3.1 veces mayor al encontrado en la línea sensible.

TABLA IX.

ACTIVIDAD DE HIDRÓLISIS DE ATP POR LA FRACCIÓN MICROSMAL DE RADÍCULAS DE LAS LÍNEAS RESISTENTE Y SENSIBLE		
ACTIVIDAD	HIDRÓLISIS DE ATP nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹ (INHIBICIÓN)	
	RESISTENTE	SENSIBLE
TOTAL	70.6 (0)*	49.0 (0)*
SENS A KNO ₃	26.0 (37) 44**	31.9 (65) 28**
SENS A Na ₂ VO ₄	21.4 (30)	18.3 (37)
SENS A OLIGOMICINA	10.4 (15)	10.5 (21)
SENS A Na ₂ MoO ₄	7.8 (11)	6.6 (14)

* O % de inhibición de la actividad de hidrólisis de ATP por el inhibidor indicado.

La actividad sensible al inhibidor ** obtuvo de manera idéntica a como se describió en la Tabla VII.

** % de inhibición teórico calculado según se describió en la Tabla VII, estos valores son analizados más adelante en la discusión.

En las fracciones microsomales de las radículas se observó (Tabla IX) que la actividad total en la línea resistente fue de 70.6 nmol Pi/min/mg. El KNO₃ inhibió un 37% y el Na₂VO₄ un 30%, por lo que nuevamente la ATPasa de tonoplasto fue la que contribuyó mas al Pi liberado (26.0 nmol Pi/min/mg), seguida por la actividad de la ATPasa de membrana plasmática (21.4 nmol Pi/min/mg). La ATPasa mitocondrial estaba presente proporcionando el 15% de la actividad y la fosfatasa ácida un 11%. En la línea sensible la actividad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de radículas fue de 49.0 nmol Pi/min/mg, resultando ser 1.4 veces menor al encontrado en la línea resistente. La actividad total en los microsomas de la línea sensible fue inhibida 65% por KNO₃, es decir la ATPasa de tonoplasto proporcionó 31.9 nmol Pi/min/mg a la actividad total, mientras que la ATPasa de membrana plasmática contribuyó con 18.3 nmol Pi/min/mg ya que el Na₂VO₄

inhibió un 37% a la actividad de hidrólisis de ATP total. La suma de los % de inhibición de las radículas de la línea sensible fue superior al 100% lo cual nos confirma el posible efecto de inhibición cruzada de alguno de los inhibidores. Nuevamente se hizo necesario distinguir la magnitud de la diferencia entre las actividades de hidrólisis de ATP entre las ATPasas microsomaes de las líneas resistente y sensible, por lo que hubo que sustraer la actividad con la que contribuyeron los contaminantes.

TABLA X.

FOSFATO PRODUCIDO POR LA FRACCIÓN MICROSOMAL DE RADÍCULAS.		
CONTRIBUYENTE	HIDRÓLISIS DE ATP nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹	
	RESISTENTE	SENSIBLE
ATPASA MITOCONDRIAL	10.4	10.5
FOSFATASA ÁCIDA	7.8	6.6
CONTAMINANTES TOTALES	18.2	17.1
ATPASA MICROSOMAL	52.4	31.9

La contribución de los contaminantes a la actividad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de radículas (Tabla X) de la línea resistente, fue en total de 18.2 nmol Pi/min/mg que es ligeramente mayor a lo que contribuyeron en la línea sensible que fue de 17.1 nmol Pi/min/mg (hay que tomar en cuenta que la contribución al Pi liberado por lo contaminantes variaba de preparación a preparación). Después de restar el valor del Pi producido por los contaminantes a la actividad total de hidrólisis de ATP, de manera similar a como lo hicimos para los coleoptilos, resulta (Tabla X) que los microsomas de radícula de la línea sensible fue 1.6 veces menor en actividad que los de la línea resistente.

Para identificar cuál de las ATPasas microsomaes (la de tonoplasto y la de membrana plasmática) era la responsable de las

diferencias encontradas en la línea resistente comparada con la sensible, se procedió a tratar de hacer una diferenciación mediante un estudio cinético de velocidad de hidrólisis de ATP, atendiendo a que un estudio de este tipo aporta características específicas como afinidad de la enzima por el sustrato (K_m), el máximo de actividad que puede alcanzar la enzima en condiciones óptimas de concentración de sustrato (V_{max}) y la existencia de cooperatividad entre sitios para una enzima con multisubunidades (coeficiente de Hill), entre otras. Los anteriores parámetros pueden sugerirnos la identidad de las enzimas, ya que estos valores podían ser comparados con los de la literatura que establecen K_m s específicas para las ATPasas.

Los experimentos del estudio cinético de actividad de hidrólisis de ATP, se realizaron a diferentes concentraciones de ATP, tomando en cuenta que al pH en que la reacción se llevó a cabo, la especie predominante y sustrato real de la enzima era ATPMg (Ver Materiales y Métodos). Con el fin de expresar solo la actividad de las ATPasas microsomas, el medio de reacción incluyó NaNa y Na_2MoO_4 como se indicó en la Tabla II (Materiales y Métodos). La cantidad de proteína usada en todos los casos fue la misma, así como el tiempo de reacción.

Los valores experimentales de hidrólisis de ATP en los microsomas de los coleóptilos de la línea resistente se muestran en la gráfica 12A en la curva TOTAL. Cuando estos valores fueron graficados como dobles recíprocos se encontró que el comportamiento no era Michaeliano (ver Figura 12B en la curva Total). Varias pueden ser las causas por las cuales se puede presentar un comportamiento de este tipo, una de ellas es la de una enzima que muestra cooperatividad, otra es el de la mezcla de varias enzimas que pueden presentar además cooperatividad (una o varias de ellas). Por lo anterior los datos experimentales fueron ajustados mediante un programa de regresión no lineal a las ecuaciones matemáticas que describen los dos anteriores comportamientos (Ver Materiales y Métodos), para determinar los parámetros cinéticos de los componentes que hidrolizaban ATP en la fracción microsomal.

Coleoptilo resistente

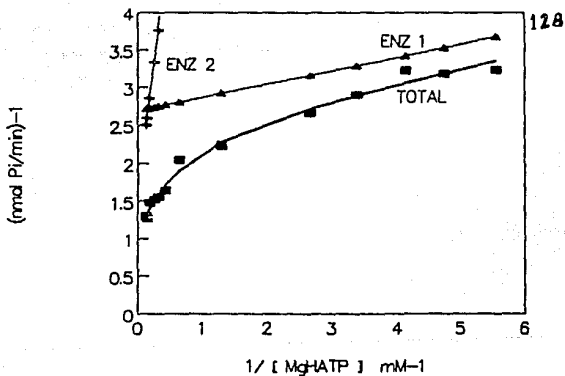
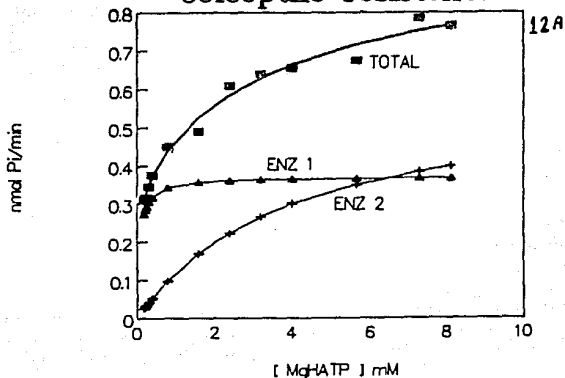


Figura 12A. Curva de velocidad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de los coleoptilos de la línea resistente a diferentes concentraciones de MgHATP. Los datos experimentales son los de la curva TOTAL (—■—) y las curvas de la Enz 1 (—▲—) y la Enz 2 (—◆—) fueron obtenidas con el tratamiento de regresión no lineal. Cada ensayo se llevó a cabo con 10 μ g de proteína microsomal incubándose durante 30 min. a 30°C. El Pi liberado se cuantificó por el método de Chifflet.

Figura 12B. Gráfica de dobles recíprocos de los valores de la Figura 12A.

El resultado obtenido mostró que eran dos enzimas las que hidrolizaban ATP en la fracción microsomal y que presentaban un número de Hill (h y h') cercano a uno, lo cual indica la no existencia de cooperatividad en ambas. De manera que para mejorar el comportamiento estadístico del ajuste los datos fueron procesados nuevamente con el programa de regresión no lineal usando la ecuación de velocidad que propone la mezcla de dos enzimas, fijando en esta ocasión el valor de h y h' en uno (comportamiento Michaeliano de ambas enzimas). De este modo el programa de regresión no lineal logró un ajuste en el se hace evidente la presencia de dos enzimas que se comportan de acuerdo a una cinética de Michaelis-Menten. Las dos curvas resueltas fueron denominadas Enzima 1 y Enzima 2, de acuerdo con los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de las dos enzimas (Figura 12B).

En la gráfica de actividad microsomal de los coleoptilos de la línea resistente (Figura 12A), se observa como la actividad de hidrólisis de ATP de las dos enzimas resueltas fue distinta dependiendo de la concentración de ATP. Observamos que a bajas concentraciones de ATP, la enzima que contribuyó mayoritariamente a la actividad era la Enzima 1 y que al aumentar la concentración de ATP, la Enzima 2 llegaba a contribuir tanto como la Enzima 1. Tenemos con esto que al cambiar la concentración de ATP se expresaban en diferente magnitud las actividades de hidrólisis de ATP las dos enzimas.

Coleoptilo sensible

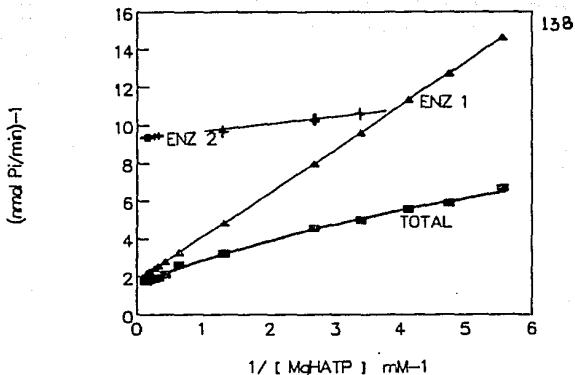
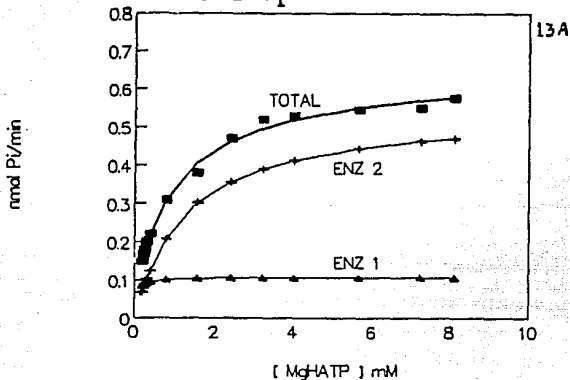


Figura 13A. Curva de velocidad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de los coleóptilos de la línea sensible a diferentes concentraciones de ATP, los datos experimentales están expresados en la curva TOTAL (—■—) y las curvas de la Enz 1 (—▲—) y Enz 2 (—●—) fueron obtenidas con el tratamiento de regresión no lineal. El experimento se llevó a cabo de manera idéntica a como se realizó con los coleóptilos de la línea resistente.

Figura 13B. Gráfica de dobles recíprocos de los valores de la Figura 13A.

Si comparamos lo anterior con lo obtenido para los microsomas de la línea sensible, lo que también encontramos es una cinética no Michaeliana para los datos experimentales (Curva TOTAL, Figura 13A), que se hizo evidente al trazar la curva como dobles recíprocos (Curva TOTAL, Figura 13B). Al hacerse el mismo tratamiento matemático que en los datos de hidrólisis de ATP de los coleoptilos de la línea resistente, obtuvimos los datos graficados en la Figura 13A. Las dos enzimas disecadas de la curva de hidrólisis de ATP total presentaban un comportamiento del tipo Michaeliano (Figura 13B), siendo evidente además que una tenía una alta K_m y la otra una baja. Algo muy interesante fue que en esta ocasión la enzima de alto K_m (Enzima 1) es la responsable de la mayor parte de la actividad, especialmente a altas concentraciones de ATP, en tanto que la de bajo K_m (Enzima 2) permanecía constante a lo largo de todas las concentraciones de ATP debido a que se saturaba a concentraciones muy bajas de ATP (Figura 13A). Esta situación es contraria a lo que ocurría con la línea resistente. La diferencia en las V_{max} alcanzadas por los dos componentes parece ser la diferencia más relevante en la hidrólisis de los microsomas del coleoptilo sensible comparada con la de la línea resistente. Los valores absolutos de estas constantes cinéticas, así como las diferencias, se muestran en la Tabla XI.

Con respecto a las radículas de la línea resistente (Figura 14A), encontramos de nuevo que la actividad total de hidrólisis de ATP (Curva TOTAL, Figura 14A) al ser graficada como dobles recíprocos no mostró un comportamiento Michaeliano (Curva TOTAL, Figura 14B). Al aplicar con el programa de regresión no lineal con las ecuaciones de velocidad propuestas para estos datos, se disecaron dos componentes (Ver Figura 14A), presentando ambos un típico comportamiento Michaeliano (Figura 14B). Las actividades de las dos enzimas, Enzima 1 y Enzima 2 (Figura 14A), muestran diferencias menos pronunciadas en el valor de K_m para ATPMg, aunque la Enzima de alto K_m (Enzima 1) tenía una actividad más alta que la Enzima 2 a cualquier concentración de sustrato empleada. La mayor diferencia al medir las actividades de ambas enzimas se encontró a bajas concentraciones de ATP, en donde la

Radícula resistente

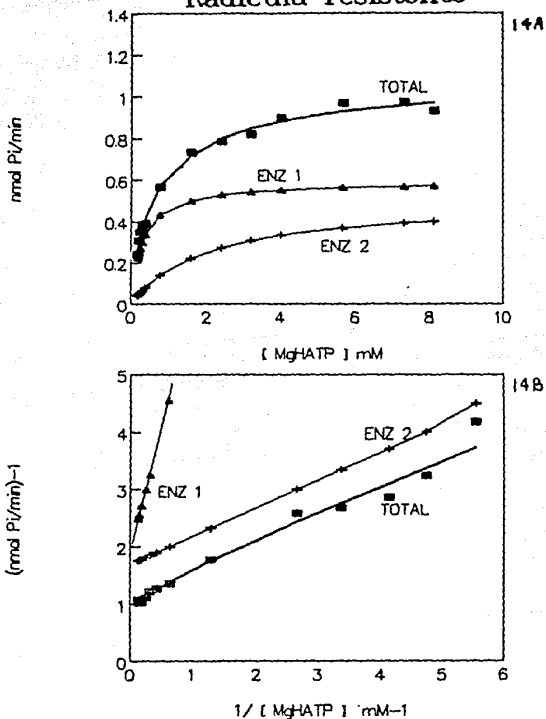


Figura 14A. Curva de velocidad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de las radículas de la línea resistente a diferentes concentraciones de MgHATP. Los datos experimentales se expresan en la curva TOTAL (—■—) y las curvas de la Enz 1 (—▲—) y Enz 2 (—◄—) fueron obtenidas con el tratamiento de regresión no lineal. El experimento se llevó a cabo de manera similar a como se realizó con los coleótilos de las dos líneas (Ver el pie de la Figura 12A).

Figura 14B. Gráfica de dobles recíprocos de los valores de la Figura 14A.

Enzima 1 fue la que proporcionó la mayor parte de la actividad. Aquí nuevamente vemos que influye de manera importante la concentración de sustrato para que se manifieste la actividad de una u otra enzima, como debe esperarse de acuerdo con los valores de K_m para ATPMg encontrados.

En concordancia con los datos anteriores, en los microsomas de las radículas de la línea sensible, cuando los datos experimentales que se muestran en la Figura 15A curva TOTAL, fueron graficados como dobles recíprocos se puso de manifiesto el comportamiento no Michaeliano (Figura 15B, curva TOTAL); el mismo tratamiento matemático antes mencionado permitió separar los dos componentes responsables de la hidrólisis de ATP (Figura 15A), de los cuales es posible determinar de nuevo la K_m y V_{max} correspondiente de cada enzima (Ver Figura 15B).

La actividad de la Enzima 1 (Figura 15A) no se vió afectada grandemente al aumentar la concentración de sustrato, ya que aún a concentraciones bajas de ATP la enzima se encontraba saturada y estaba trabajando a su máximo. La Enzima 2 se convirtió en el componente más importante de la actividad al aumentar la concentración de ATPMg por encima de 2 mM. Lo anterior es contrario a lo que sucede con los microsomas de las radículas de la línea resistente (Figura 14A) ya que la Enzima 2 no contribuyó de manera mayoritaria a la hidrólisis de ATP y tuvo una V_{max} menor a la de la línea sensible. La Enzima 2 parece hacer la diferencia entre las radículas, ya que la Enzima 1 extraída de ambas líneas de maíz presentó valores de actividad de hidrólisis de ATP muy similares.

Radícula sensible

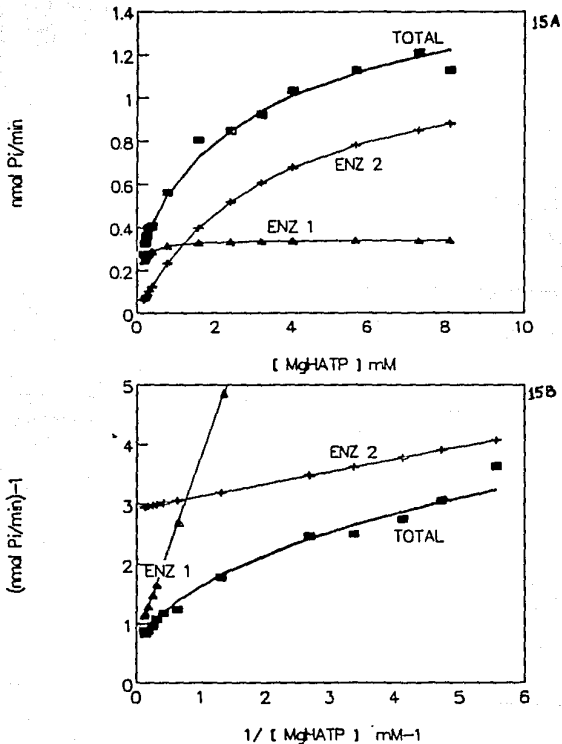


Figura 15A. Curva de velocidad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de las radículas de la línea sensible a diferentes concentraciones de MgHATP. Los datos experimentales se expresaron en la curva TOTAL (■) y las curvas de la Enz 1 (▲) y Enz 2 (◄) fueron obtenidas con el tratamiento de regresión no lineal. El experimento se llevó a cabo de manera similar a como se realizó con los coleóptilos y la radícula de la línea resistente.

Figura 15B. Gráfica de dobles recíprocos de los valores de la Figura 15A.

TABLA XI

	COLEOPTILO		RADÍCULA	
	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
Km1*	0.064 [±] 0.04 ^{***}	0.045 [±] 0.02	0.287 [±] 0.28	0.070 [±] 1.05
Vmax1**	0.370 [±] 0.07	0.107 [±] 0.02	0.590 [±] 0.60	0.341 [±] 0.16
Km2*	3.940 [±] 2.25	1.234 [±] 0.38	2.029 [±] 3.54	3.390 [±] 1.53
Vmax2**	0.590 [±] 0.07	0.540 [±] 0.03	0.502 [±] 0.52	1.508 [±] 0.13

* mM ATPMg; ** nmol Pi·min⁻¹; *** Límites de confianza.

Los valores de las constantes cinéticas Km y Vmax obtenidos de las gráficas anteriores, se resumen en la Tabla XI. Se denotaron como Km1 y Vmax1 a los valores correspondientes a la Enzima 1 y de manera equivalente para la Enzima 2 (Km2 y Vmax2). En los coleoptilos de la línea resistente se tiene que la Km1 es 62 veces menor a la Km2, lo que nos muestra que hay dos enzimas que podían ser diferenciadas claramente por su distinta afinidad al sustrato. Además presentan Vmax ligeramente distintas, siendo 0.37 nmol Pi/min/mg el valor de la Vmax1 y 0.59 el de la Vmax2. La Km1 de la fracción microsomal de los coleoptilos de la línea sensible es 27 veces menor que la Km2 de su Enzima 2, por lo cual es evidente que son dos las enzimas que hidrolizan ATP y que lo hacen a velocidad muy distinta dependiendo de la concentración de sustrato. La Vmax1 de la Enzima 1 de la fracción microsomal de la línea sensible es 4.4 veces menor que la Vmax2. Comparando las constantes cinéticas encontradas para los coleoptilos de la línea sensible con los de la línea resistente se observa que no hay diferencia significativa entre las Kms de las Enzimas 1, de modo similar ocurrió entre las Kms2 de las dos líneas. Lo que indica que las Enzimas 1 y 2 no presentaron diferente afinidad por el sustrato en ambas líneas de maíz. Sin embargo, al comparar las Vmax se encontró que la Vmax 1 de la línea resistente fue 3.5 veces mayor que la de la línea sensible, esta diferencia en Vmax

encontramos en la línea sensible con respecto a la de la línea resistente, ya que en sus V_{max} (V_{max2}) no fue observada ninguna diferencia.

En las fracciones microsomales de las radículas (Tabla XI) se obtuvo que también existía una diferencia considerable entre las K_m s 1 y 2 que hacen posible distinguir a dos enzimas distintas. Si comparamos las K_m s de las dos líneas resistente y sensible, se observa que no hay una diferencia significativa entre las K_m s 1 ni tampoco entre las K_m s 2 de ambas líneas. De manera análoga a los coleoptilos no hay diferencia en las afinidades de las enzimas por el sustrato. Las V_{max1} de las Enzimas 1 de las dos líneas no presentaron diferencias significativas, mientras que en las V_{max2} parece haber una pequeña diferencia, que favoreció en actividad a la línea sensible, ya que la V_{max2} de ésta es mayor a la de la línea resistente (3 veces).

Los parámetros cinéticos de los dos componentes que hidrolizan ATP en la fracción microsomal, presentaron dos K_m s distintas como ya se mencionó y que podían ser comparadas con los datos reportados en la literatura para enzimas que hidrolizan ATP en células vegetales. Esta comparación nos indicó que estas enzimas pueden corresponder, la de bajo K_m a la ATPasa de tonoplasto y la de alto K_m a la ATPasa de membrana plasmática, pues estos valores están cercanos a los reportados en la literatura (50, 59).

Con objeto de confirmar esta posibilidad, hicimos un experimento en el que se pudieran expresar o una u otra ATPasa de acuerdo a la concentración de ATP, utilizando además los inhibidores específicos de las ATPasas de tonoplasto y de membrana plasmática.

Las actividades de hidrólisis de ATP se realizaron a 1 y 10 mM de ATP (correspondientes a 0.77 y 8.12 mM de la especie ATPMg). Para diferenciar los componentes que hidrolizan ATP se incluyeron los inhibidores específicos para cada una de ellas a las concentraciones indicadas en Materiales y Métodos.

TABLA XII

COMPARACIÓN DE HIDRÓLISIS DE ATP EN MICROSOMAS DE COLEOPTILOS DE AMBAS LÍNEAS A DOS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO

ACTIVIDAD	LÍNEA RESISTENTE	
	1mM ATP NMOL Pi MIN ⁻¹ MG ⁻¹	10mM ATP NMOL Pi MIN ⁻¹ MG ⁻¹
TOTAL	45.6 (0)*	86.6 (0)*
SENS A NO ₃ ⁻	22.4 (49.1)	30.0 (34.6)
SENS A VO ₄ ⁼	1.8 (4.0)	14.8 (17.1)
SENS A N ₃ ⁻	5.8 (12.8)	10.6 (12.1)
SENS A MoO ₄ ⁼	0.0 (0)	8.9 (10.3)
CONTAM. TOTALES	5.8 (12.8)	19.4 (22.4)
MICROSOMAL	39.8 (87.2)	67.2 (77.6)
ACTIVIDAD	LÍNEA SENSIBLE	
	1mM ATP NMOL Pi MIN ⁻¹ MG ⁻¹	10mM ATP NMOL Pi MIN ⁻¹ MG ⁻¹
TOTAL	32.6 (0)*	63.4 (0)*
SENS A NO ₃ ⁻	15.3 (47.0)	19.7 (31.1)
SENS A VO ₄ ⁼	8.9 (27.4)	26.0 (41.0)
SENS A N ₃ ⁻	6.2 (19.0)	8.1 (12.8)
SENS A MoO ₄ ⁼	3.9 (11.0)	11.8 (18.6)
CONTAM. TOTALES	10.1 (30.0)	19.9 (31.4)
MICROSOMAL	22.5 (70.0)	43.5 (68.6)

(*) % DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPASA POR EL INHIBIDOR INDICADO.

La fracción microsomal de los coleóptilos de la línea resistente (Tabla XII) tuvo una actividad total de 45.6 nmol Pi/min/mg a 1mM, la cual se duplicó al aumentar la concentración de sustrato. La contribución de la ATPasa de tonoplasto a la actividad total fue de 22.4 nmol Pi/min/mg, la cual aumentó ligeramente (30.0 nmol Pi/min/mg) a 10mM ATP. Lo anterior indicaba que el incremento en la concentración de sustrato tenía poco efecto sobre la actividad de la ATPasa de tonoplasto, identificada por su sensibilidad a KNO₃, lo cual correlacionaba con que ésta enzima correspondiera a la Enzima 1 obtenida en los datos del estudio cinético, ya que presentaba una baja Km (Km1), y por tanto, ya a bajas concentraciones de sustrato la enzima se encuentra trabajando cerca del máximo de su actividad, y un aumento en la concentración de ATP proporcionaría poco o ningún efecto en ésta.

La ATPasa de membrana plasmática (inhibida por Na₂VO₄) a 1mM de ATP se encontró poco activa, tan sólo el 4% de la actividad de hidrólisis de ATP total fue proporcionada por ella (1.8 nmol Pi/min/mg), mientras que a 10mM de ATP aumentó considerablemente a 14.8 nmol Pi /min/mg. Analizando lo anterior, encontramos que la ATPasa de membrana plasmática resultó responder más al aumentar la concentración de sustrato, lo cual parece estar de acuerdo con la cinética de la Enzima 2 de la Figura 12A. La Km2 que presentaba la Enzima 2 (Tabla XI) mostró un requerimiento alto de concentración de sustrato para alcanzar su actividad máxima. Tal comportamiento parece indicar que la Enzima 2 corresponde a la ATPasa de membrana plasmática inhibida específicamente por Na₂VO₄. La contribución a la actividad de hidrólisis de ATP total por los contaminantes a 1mM ATP fue del 12.8% y aumentó un 22.4% a 10mM ATP. Al sustraer la actividad con la que contribuyeron los contaminantes, se obtuvo la actividad debida exclusivamente a los microsomas, la cual a 1mM ATP fue de 39.8 nmol Pi/min/mg y aumentó 1.7 veces al aumentar la concentración de sustrato, éste aumento se explica principalmente por el incremento en la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de membrana plasmática.

El mismo experimento pero en los coleoptilos de la línea sensible (Tabla XII) mostro que también había un aumento de dos veces en la actividad total medida a 1 y 10mM ATP (32.6 contra 63.4 nmol Pi/min/mg). Hubo un ligero aumento de la actividad sensible a KNO₃ (ATPasa de tonoplasto) de 15.3 a 19.7 nmol Pi/min/mg, al aumentar la concentración de sustrato, como se esperaba que ocurriera, si la ATPasa de tonoplasto correspondía a la Enzima 1, ya que no debería presentar un cambio notable en actividad al aumentar la concentración de ATP, por contar con un bajo valor de K_m (Tabla XI). La actividad de la ATPasa de membrana plasmática fue de 8.9 nmol Pi/min/mg a 1 mM y tuvo un aumento de 2.9 veces a 10mM ATP, esto concuerda con el comportamiento de los datos graficados para la Enzima 2 en la Figura 13A, por presentar una K_m alta (Tabla XI), y por tanto una actividad susceptible al incremento en la concentración del sustrato. Al sumar las actividades de los contaminantes, se obtuvo que 10.1 nmol Pi/min/mg era su contribución a la actividad medida a 1mM de ATP y que aumentó al doble a 10mM de ATP; al restar esta contribución a 1 y 10mM respectivamente a la actividad total, se obtuvo que la actividad microsomal fue de 22.5 a 1mM de ATP aumentando 1.9 veces al subir el ATP a 10mM. Comparando las actividades microsomales a 1 y 10mM de ATP en las dos líneas de maíz, se encontró que a 1mM de ATP la actividad microsomal de la línea resistente es 1.8 veces mayor que la de la línea sensible, mientras que a 10mM de ATP la diferencia fue de 1.5 veces mayor en la línea resistente que en la sensible.

TABLA XIII

COMPARACION DE HIDROLISIS DE ATP EN MICROSOMAS DE RADICULAS DE AMBAS LINEAS A DOS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO

ACTIVIDAD	LINEA RESISTENTE	
	1mM ATP NMOL PI MIN ⁻¹ MG ⁻¹	10mM ATP NMOL PI MIN ⁻¹ MG ⁻¹
TOTAL	54.2 (0)*	115.0 (0)*
SENS A NO ₃ ⁻	11.4 (21.0)	30.7 (26.7)
SENS A VO ₄ ⁼	6.4 (11.8)	29.3 (25.5)
SENS A N ₃ ⁻	7.8 (14.3)	5.4 (4.6)
SENS A MoO ₄ ⁼	1.0 (1.7)	14.0 (13.0)
CONTAM. TOTALES	8.8 (16.0)	20.2 (17.6)
MICROSOMAL	45.4 (84.0)	94.8 (82.4)
ACTIVIDAD	LINEA SENSIBLE	
	1mM ATP NMOL PI MIN ⁻¹ MG ⁻¹	10mM ATP NMOL PI MIN ⁻¹ MG ⁻¹
TOTAL	83.1 (0)*	167.3 (0)*
SENS A NO ₃ ⁻	24.2 (29.1)	44.2 (26.4)
SENS A VO ₄ ⁼	16.2 (19.5)	36.7 (22.0)
SENS A N ₃ ⁻	12.3 (14.8)	13.6 (8.1)
SENS A MoO ₄ ⁼	3.2 (3.8)	7.3 (4.4)
CONTAM. TOTALES	15.5 (18.6)	20.9 (12.5)
MICROSOMAL	67.6 (81.4)	146.4 (87.5)

(*) % DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPASA POR EL INHIBIDOR INDICADO.

En la Tabla XIII se muestran los resultados de un experimento análogo al anterior, pero en las fracciones microsomales de las radículas. En la línea resistente se obtuvo una actividad total a 1mM de ATP de 54.2 nmol Pi/min/mg con un incremento de 2.1 veces al aumentar a 10mM ATP. La actividad de la ATPasa de tonoplasto (actividad sensible a NO_3^-) fue de 11.4 nmol Pi/min/mg aumentando 2.7 veces a 10mM ATP. Según nuestra proposición, si la ATPasa de tonoplasto corresponde a la Enzima 1 con una Km para ATPMg de 0.287 (Tabla XI), el aumento en la actividad es justificado ya que a 1mM ATP (que equivale a 0.77 mM ATPMg) la enzima aún no se encontraría saturada y su actividad estaría por abajo de la Vmax, mientras que a 10mM ATP ya exhibiría la actividad máxima que puede alcanzar.

La ATPasa de membrana plasmática tuvo una actividad a 1mM de ATP de 6.4 nmol Pi/min/mg y a 10mM ATP de 29.3 nmol Pi/min/mg, siendo el aumento en actividad de 4.5 veces. Lo anterior es de esperarse si la Enzima 2 que muestra una alta Km (Tabla XI), corresponde a la ATPasa de membrana plasmática. La actividad total de los contaminantes a 1mM fue de 8.8 nmol Pi/min/mg y de 20.2 nmol Pi/min/mg a 10mM ATP, que al ser restados de la actividad total da como resultado la actividad microsomal que a 1mM fue de 45.4 nmol Pi/min/mg y a 10mM fue de 94.8 nmol Pi/min/mg siendo el aumento de 2.1 veces. Tal aumento fue debido al incremento en la actividad tanto de la ATPasa de tonoplasto como de la ATPasa de membrana plasmática a 10mM de ATP.

En la misma Tabla XIII tenemos los resultados para las fracciones microsomales de las radículas de la línea sensible. La actividad total a 1mM ATP fue de 8.3 nmol Pi/min/mg con un aumento de 2 veces a 10mM de ATP. Lo anterior no concuerda con los datos que veníamos obteniendo (Ver Figuras 11A, 11B y Tablas IX y X), en los cuales no había diferencia significativa en las actividades totales de las radículas de ambas líneas de maíz, mientras que ahora parece haber una diferencia de 1.5 veces mayor en la actividad medida a 1mM ATP en las radículas de la línea sensible con respecto a la línea resistente. Esta actividad alta de las

radículas de la línea sensible fue encontrada en otras tres preparaciones microsomales además de esta.

Continuando con los datos de las radículas de la línea sensible, encontramos también irregularidades en las actividades de ATPasas del tonoplasto y de la membrana plasmática. La actividad de ATPasa del tonoplasto, sensible a KNO_3 , fue de 24.2 y de 44.2 nmol Pi/min/mg, cuando la determinación se llevó a cabo en presencia de 1 y 10mM de ATP respectivamente. Tal incremento en la actividad fue de 1.8 veces. Comparando este dato con el valor de la K_m de 0.07mM ATP/mg de la Enzima 1 obtenida del tratamiento de regresión no lineal, encontramos que el aumento de 1.8 veces en el actividad debió ser menor, pues para las Enzimas 1 de coleoptilo con valores de K_m cercanos a éste, el aumento en la actividad fue de alrededor de 1.3 veces, aunque hay que recordar también que el KNO_3 podría ser relativamente inespecífico (las causas posibles de este efecto se describen en la discusión), por lo cual la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa de tonoplasto puede estar sobreestimada. En cuanto a la enzima de membrana plasmática, con sensibilidad a Na_2VO_4 , encontramos que a 1 y 10 mM de ATP, la actividad que se expresó fue de 16.2 y 36.7 nmol Pi/min/mg respectivamente. Tal diferencia es de 2.4 veces y uno esperaría que ésta correspondiera a una enzima con una K_m cercana a la de las Enzimas 2 de las radículas de la línea resistente (2.0mM ATP/mg), para la cual se observa un incremento de la actividad de 4.6 veces entre 1 y 10mM ATP. Sin embargo por analogía con los datos anteriores de los coleoptilos y la radícula resistente, así como por las razones que se mencionan en la discusión, consideramos que la enzima sensible a Vanadato es la correspondiente a la Enzima 2 obtenida del tratamiento de los datos obtenidos del estudio cinético de velocidad de hidrólisis de ATP.

V. DISCUSIÓN

DISCUSION

Las plántulas de las dos líneas de maíz presentaron características de germinación y crecimiento distintos, la línea resistente germinaba antes que la sensible. En cuanto al crecimiento, se observó que era muy similar entre las radículas mientras que entre los coleoptilos había una clara diferencia, siendo los de la línea resistente los que alcanzaban una mayor magnitud a tiempos tempranos que los de la línea sensible. Para establecer el tiempo equivalente de desarrollo en ambas plántulas (sensible y resistente), se realizó la determinación de la acumulación de biomasa a diferentes tiempos. Los resultados no los expresamos en peso húmedo, ya que el contenido de agua que pueden acumular las plántulas de las dos líneas de maíz podría ser distinto. Las diferencias en peso seco son mayores aún mas entre los coleoptilos que entre las radículas de las dos líneas, pero no expresan las diferencias reales o debidas solo al tejido formado, de manera que los valores fueron considerados como peso seco total (Figuras 9a y 9b). Varios son los tiempos en los cuales ambas plántulas presentan desarrollo equivalente, sin embargo preferimos escoger un intervalo de tiempo tal que se encontrara, antes de la aparición de la hoja por una parte, (los pigmentos verdes interfieren con la medición de actividad de hidrólisis de ATP, ref.70) y por otra parte un tiempo no muy pequeño para que la cantidad de tejido fuera suficiente para obtener de éste una fracción microsomal suficiente para nuestras mediciones. Por lo anterior el tiempo óptimo para cosechar las plántulas fue de 4.5 y 6.5 días para las líneas de maíz resistente y sensible respectivamente.

La actividad de las ATPasas de tonoplasto y membrana plasmática presentes en la fracción microsomal, disminuyó con el tiempo de almacenamiento a -70°C , debido posiblemente a un rearreglo de la proteína en la vesícula de membrana, por efecto de la congelación y descongelación continua o bien por la acción de proteasas que según se ha reportado (27) se encuentran presentes en este tipo de preparaciones. Sin embargo es importante señalar

que muchos de las preparaciones que obtuvimos fueron estables hasta por mas de dos semanas. Algunos autores han reportado que no hay disminución significativa de la actividad antes de 4-10 días (28, 29, 32), lo cual no es muy diferente a lo que nosotros obtuvimos.

De todas las membranas en la célula las que contribuyen mas a la superficie membranal son la membrana plasmática y el tonoplasto. Las vesículas que se forman a partir de ellas son las que se encuentran por lo tanto en forma mayoritaria en la fracción microsomal. La densidad de las vesículas formadas también es un factor importante para encontrar estas vesículas en dicha fracción, aunque no descartamos la posibilidad de encontrar vesículas de mitocondria y de otros organelos pero en menor proporción, por ello las ATPasas y las fosfatasa que se encuentran incluidas en todas estas membranas serían los componentes que hidrolizarían ATP en la fracción microsomal, tales enzimas fueron identificadas por su sensibilidad a inhibidores específicos.

Los inhibidores conocidos que afectan la actividad de la ATPasa de tonoplasto son el KSCN y el KNO₃. El primero es efectivo solo en preparaciones en que la enzima esta pura (10), y este no fue nuestro caso; el segundo se usa comúnmente no sólo en preparaciones de enzima aislada sino también en preparaciones como la nuestra, es efectivo a concentraciones altas en un intervalo de 50 a 200 mM (25, 46, 49, 61). Por lo anterior elegimos el KNO₃ para inhibir específicamente a la ATPasa de tonoplasto, y la concentración óptima que encontramos fue de 100 mM (datos no mostrados), que se encuentra dentro del intervalo de concentración mencionado. Hay que tomar en cuenta que por la concentración tan elevada de los iones K⁺ y NO₃⁻ la fuerza iónica del medio de reacción puede cambiar así como las constantes de estabilidad de los iones que se encuentran en el medio de reacción, entre ellos el Mg²⁺ que es constituyente fundamental en el ensayo ya que éste con el ATP son el sustrato de las ATPasas. De manera que el KNO₃ además de tener efecto sobre la ATPasa de tonoplasto lo puede tener sobre otras enzimas. Como ya se mencionó, parte de este

efecto podría ser la inhibición cruzada, la cual tuvo que ser ignorada por carecer de la información suficiente para determinar su magnitud. Otra forma de estimar la actividad de la ATPasa de tonoplasto, podría ser tomando en cuenta las inhibiciones parciales de los otros tres inhibidores (Oligomicina, Na_2VO_4 y Na_2MoO_4). La suma de estas, restada en la actividad total, nos daría una apreciación de la actividad de la ATPasa de tonoplasto, pero no a través de su inhibición por KNO_3 , cuya alta concentración puede introducir problemas como la de la inhibición inespecífica. El resultado de esta consideración (Tablas VII y IX) fue que efectivamente la actividad de la ATPasa de tonoplasto calculada de este modo es menor que la que obtenemos por la presencia de KNO_3 en el medio de reacción, con excepción de la fracción microsomal de las radículas de la línea resistente (Tabla IX) que de 37 % de inhibición sube a 44 % cuando hacemos el cálculo con las inhibiciones indirectas. En los siguientes experimentos en los que se trato de diferenciar a la ATPasa de tonoplasto y la ATPasa de membrana plasmática no se hizo esta consideración ya que hay que tomar en cuenta que el Na_2VO_4 no es un inhibidor 100% específico (sólo los inhibidores que se unen covalentemente al sitio activo de la enzima son 100% específicos), por lo que el valor que obtuvimos de la actividad de ATPasa de tonoplasto debida a una inhibición por KNO_3 no es totalmente cierto y puede estar ligeramente sobreestimado.

Para la ATPasa de membrana plasmática se han ensayado Na_2VO_4 (41, 55, 61) y DES (41), por lo cual probamos ambos inhibidores. Los resultados obtenidos de la adición del DES no fueron consistentes, mientras que los del Na_2VO_4 sí (no se mostraron los resultados), de manera que éste último fue el inhibidor usado para distinguir a la ATPasa de membrana plasmática.

Hemos llamado actividad contaminante a la producida por la ATPasa de mitocondria y la fosfatasa ácida (al pH en que medimos la reacción de hidrólisis de ATP, ésta última es la que causaría la principal contribución al fosfato liberado dentro del grupo de las fosfatasas), ya que por su localización subcelular no

deberían encontrarse en la fracción microsomal, sin embargo su contribución a la actividad está presente aunque fluctúa de preparación a preparación y no es posible dejar de tomar en cuenta la proporción con la que contribuyen a dicha actividad en cada preparación.

Para detectar a la fosfatasa ácida el inhibidor usualmente utilizado es el $\text{MoO}_4^{=}$ (61). Los valores de inhibición obtenidos fueron consistentes de manera que lo elegimos para inhibir específicamente a ésta enzima. En el caso de la ATPasa de mitocondria se han usado con frecuencia Na^+ (10, 29, 61) y oligomicina (37) como inhibidores específicos de su actividad, tanto en preparaciones enriquecidas de ATPasa mitocondrial como en preparaciones semejantes a la nuestra, por lo cual ambos fueron probados. La inhibición resultante fue muy semejante para los dos de manera que usamos indistintamente uno u otro, excepto cuando se hizo necesario realizar las mezclas de alguno de estos inhibidores con el $\text{MoO}_4^{=}$ (para eliminar la actividad debida solamente a los contaminantes) ya que solo la mezcla de Na^+ con $\text{MoO}_4^{=}$ daba el mismo resultado de inhibición total que la obtenida al sumar de manera independiente las inhibiciones parciales. La presencia adicional de $\text{VO}_4^{=}$ o NO_3^- en esta mezcla (para tener presentes solamente la actividad de la ATPasa de tonoplasto o la de la ATPasa de membrana plasmática) no fue efectiva, lo cual puede deberse a varios factores, entre ellos el que se formen complejos entre los inhibidores y así disminuya la concentración efectiva de los mismos por lo cual la inhibición resultante es menor a la esperada.

Se ha reportado (37) que el efecto inhibitor de oligomicina es mejor cuando se incuba con la enzima antes de iniciar la reacción catalítica, tal vez debido a que se lleva a cabo primero la interacción enzima inhibidor y después la de este complejo (EI) con el sustrato (EI-S), con lo que el inhibidor no compite con el sustrato durante la reacción enzimática. Este fue el motivo por el cual además de investigar el efecto de la preincubación de la enzima con oligomicina lo hicimos también con el Na_2VO_4 y el KNO_3 , la inhibición de cada uno de ellos sí se

mejoró, por lo cual en todos los experimentos en que se midió sensibilidad a inhibidores se preincubó previamente a la enzima con el inhibidor durante cinco minutos (Figura 5). Es pertinente hacer notar que otros autores no preincubaban a las membranas con los inhibidores (32, 33, 39, 48, 50). Sin embargo la obtención de una inhibición tras la preincubación también puede indicar un efecto inactivador, en especial en el caso del KNO_3 como ya se mencionó en Resultados.

Algo interesante en este estudio fue que la actividad de hidrólisis de ATP en los coleoptilos es menor que en las radículas, lo cual sucede tanto en la línea resistente como en la línea sensible (Figuras 11A y 11B). Lo anterior se piensa que se debe a que la radícula es el órgano de la planta que se encuentra en mayor contacto con las sales del suelo, necesitando entonces mayor actividad de sus ATPasas para poder abastecer a la planta de nutrientes. Los valores que hemos obtenido de alrededor de 45 nmol Pi/min/mg para los coleoptilos y de 80 nmol Pi/min/mg para las radículas en la línea de maíz resistente son similares a los que se han reportado para estos tejidos en maíz (11, 49).

Al comparar las actividades de hidrólisis de ATP de las fracciones microsomales de los coleoptilos, se observó que la línea resistente es 2 veces mayor en actividad que en la línea sensible, mientras que entre las radículas no hay una diferencia aparente. Sabemos que la hidrólisis de ATP medida es el resultado de cuatro enzimas y nosotros estábamos interesados en las actividades debidas solo a las ATPasas microsomales (ATPasa de tonoplasto y ATPasa de membrana plasmática) y no a la de los contaminantes (ATPasa mitocondrial y fosfatasa ácida), que podían ser los responsables de la diferencia encontrada en los coleoptilos o de una posible interferencia al no observar diferencias entre las radículas de las dos líneas de maíz. Al eliminar la actividad de los contaminantes (Tabla VIII) en la actividad total de los microsomas de los coleoptilos, la actividad de ATPasa microsomal resultante fue aún mayor (3.1 veces) en la línea resistente que en la línea sensible, por lo cual concluimos que la diferencia encontrada en la actividad total era debida a

las ATPasas microsomales.

En el caso de las radículas se encontró que la actividad de hidrólisis de ATP en la línea resistente (Tabla IX) era ligeramente mayor (1.4 veces) que la de la línea sensible. Sin embargo la actividad de la ATPasa microsomal (Tabla X), resultado de restar la actividad de los contaminantes a la actividad total de hidrólisis de ATP fue 1.6 veces mayor en la línea resistente con respecto a la línea sensible. La diferencia encontrada en ATPasa microsomal de las radículas entre las dos líneas no fue tan grande comparada con la encontrada en la ATPasa microsomal de los coleoptilos, y al evaluar estos resultados junto con los que se obtuvieron más tarde (Ver experimentos finales con los microsomas de radículas) se puede pensar que ésta diferencia entre radículas de la línea resistente y las de la línea sensible es muy pequeña si es que existe.

Tal vez el hecho de que existan mayores diferencias en la biomasa acumulada entre los coleoptilos que entre las radículas (Figuras 9A y 9B), sea un reflejo de porqué encontramos mayores diferencias en las actividades de hidrólisis de ATP en la ATPasa microsomal de los coleoptilos que entre la actividad de ATPasa microsomal en las radículas. Si lo anterior es cierto podríamos establecer que existe cierta relación entre la actividad de ATPasa y el desarrollo de los órganos en la planta. Los resultados obtenidos, sin embargo, no son concluyentes a este respecto, pues hay un gran número de procesos fisiológicos cuya expresión última es el vigor de la planta.

Las densidades de las vesículas de membrana plasmática y tonoplasto son muy distintas, de 1.13-1.17 y 1.10-1.13 g/cc respectivamente (10, 11, 25, 30, 31), de manera que esperábamos obtener una fracción enriquecida en cada una de ellas. Los resultados (no mostrados) no fueron los esperados ya que tanto en gradientes de 2, 3 y 5 diferentes concentraciones de sacarosa logramos encontrar una fracción enriquecida en ATPasa de tonoplasto (detectada por su sensibilidad a KNO_3) o de ATPasa de membrana plasmática (detectada ésta por su sensibilidad a $NaVO_4$),

pero cada una de ellas seguía contaminada con las otras. Es posible que por el método de homogenización empleado las vesículas formadas tanto de membrana plasmática como de tonoplasto fueran muy heterogéneas en tamaño y por lo tanto se distribuyeran inespecíficamente a lo largo de todo el gradiente, de manera que no era posible separar tal mezcla por gradientes de densidad de sacarosa. En la literatura se encuentran datos similares a los nuestros, en donde la contaminación por otras vesículas es de alrededor del 20-50% (11, 29, 30, 37, 42).

Ya que no fue posible obtener a las dos enzimas en sus respectivas vesículas purificadas, procedimos a realizar un estudio cinético de velocidad de hidrólisis de ATP (actividad medida en presencia de los inhibidores específicos de los contaminantes). Este estudio nos proporcionaría las constantes cinéticas específicas de las enzimas y podríamos hacer la comparación no solo de éstas entre las dos líneas de maíz sino también de estos valores con los reportes que hay en la literatura de los valores de K_m de las ATPasas. Los valores reportados para la ATPasa de membrana plasmática se encuentran entre 0.7-4.8 mM de ATPMg (21, 28, 37, 62) y para la ATPasa de tonoplasto el intervalo se encuentra entre 0.1-2 mM de ATPMg (49, 59). Pero para comparar estos valores tendríamos que tomar en cuenta las condiciones en que se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de ATP como son el pH, la temperatura y el sustrato utilizado, ya que cada uno modifica significativamente los valores de actividad (V_{max}) y afinidad encontrados (K_m). Nosotros llevamos a cabo la reacción a 25°C, a pH 7.0 (ya que deseábamos medir la actividad de hidrólisis de ATP de las dos enzimas en condiciones similares a las que ocurre en la célula, ya que ambas tienen el sitio catalítico viendo hacia el citoplasma donde el pH estimado es de 7.0), y consideramos como sustrato al complejo ATPMg, ya que éste se forma principalmente al pH en que llevamos a cabo la reacción y debido a que el sustrato de la enzima que ha sido identificado es el complejo de ATP con Mg (10, 25, 30, 62).

Los resultados indicaron que efectivamente de los dos componentes que hidrolizaban ATP en la fracción microsomal (en

presencia de los inhibidores de los contaminantes) uno es la ATPasa de tonoplasto y el otro la ATPasa de membrana plasmática y que esto era válido tanto para las fracciones microsomales de los coleoptilos de la línea resistente como los de la línea sensible.

Examinando de manera similar los datos de las ATPasas microsomales de las radículas, observamos primero que la actividad de hidrólisis de ATP total era mayor en la línea sensible que en la línea resistente pero solo en los datos de los experimentos de cinética (Figuras 14A y 15A). Lo anterior era distinto a lo que veníamos obteniendo en los experimentos iniciales (Figuras 11A y 11B, Tablas VIII y IX), ya que si bien había una pequeña diferencia entre las actividades de ATPasa de las radículas de las líneas resistente y sensible, ésta era mayor en la línea resistente con respecto a la sensible. Lo que hemos observado con respecto al crecimiento en la línea sensible es que un cambio en las condiciones ambientales como luz, humedad y temperatura parecen afectarlo, haciéndose mas evidente en las radículas. Las radículas de la línea sensible parecen por lo tanto tener tejidos más susceptibles a estos cambios respondiendo de manera distinta y dando la variación que hemos observado en sus actividades enzimáticas de hidrólisis de ATP. Quizá por ser el órgano que proporciona solutos a la planta, el desarrollo de esta estructura debe ser muy importante y por tanto mas sensible a las condiciones ambientales. Es posible que la variación en la actividad encontrada en estas radículas sea un reflejo de la modulación que puedan ser capaces de llevar a cabo cuando se presentan factores ambientales adversos para que la planta sea provista de la concentración de nutrientes adecuada para su desarrollo. De manera que al no haber una gran diferencia entre la biomasa de las radículas sus actividades de hidrólisis de ATP al principio mayores en la línea resistente y después mayores en la línea sensible sea un reflejo de que no hay una diferencia en sus actividades de ATPasas. Sin embargo aunque los datos son un tanto contradictorios entre los experimentos de actividad microsomal de radículas iniciales y los que se presentan al final, éstos últimos son consistentes entre sí en cuanto a la caracterización cinética.

Continuando con lo que obtuvimos en la cinética de hidrólisis de ATP, tenemos que los dos componentes que hidrolizan ATP en la fracción microsomal de radículas, al igual que en los coleoptilos presentan diferentes K_m y por lo tanto una actividad distinta dependiendo de la concentración de sustrato. La K_m de las radículas de la línea resistente fue mayor que la que presentan las radículas y los coleoptilos de la línea sensible, lo que hace que necesite mayor concentración de sustrato para tener su actividad máxima. Al confrontar los parámetros cinéticos de las radículas (Tabla XI) en las dos líneas de maíz, tenemos que la única diferencia significativa se encuentra en la V_{max} 2, siendo mayor en la línea sensible, de manera que la Enzima 2 de alto K_m que podríamos pensar que es la ATPasa de membrana plasmática (por los datos encontrados en la literatura y por analogía con lo que tenemos en los coleoptilos), es la que hace que encontremos mayor actividad de hidrólisis de ATP en la línea sensible con respecto a los encontrados en la línea resistente.

Verificamos que las Enzimas 1 y 2 correspondían la primera a la ATPasa de tonoplasto y la segunda a la ATPasa de membrana plasmática, tal y como lo hicimos con las fracciones microsomales de los coleoptilos: a dos concentraciones de sustrato y en presencia de los inhibidores específicos de estas enzimas. Los resultados (Tabla XIII) fueron similares a los que encontramos en los coleoptilos, la actividad de la ATPasa de tonoplasto o sensible a KNO_3 en la fracción microsomal de las radículas aumentó ligeramente de 1 a 10 mM de ATP lo cual correlaciona con que esta enzima sea la Enzima 1 que presenta una baja K_m . En cuanto a la ATPasa de membrana plasmática detectada por su sensibilidad a Na_2VO_4 , sí hubo un aumento en su actividad al aumentar la concentración de sustrato por lo cual correlaciona con que esta sea la Enzima 2 con una alta K_m .

En el caso de las radículas de la línea sensible la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa sensible a KNO_3 aumentó de 1 a 10 mM de ATP. Si esta enzima correspondiera por analogía a lo encontrado en las otras fracciones microsomales a la Enzima 1 con una baja K_m , que en este caso fue de 0.07, el aumento

ESTA TESIS DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

en actividad al aumentar la concentración de sustrato no debería ocurrir, aunque hay que tomar en cuenta que los límites de confianza son muy amplios (± 1.05) lo cual explicaría el aumento encontrado, además hay que recordar que la inhibición del KNO₃ no es del todo específica para la ATPasa de tonoplasto, y siendo que la actividad total que presentan estas radículas es muy alta, la probabilidad de que la inhibición cruzada se dé es elevada, de manera que el valor de actividad real de la ATPasa de tonoplasto debe ser menor al que obtenemos. La ATPasa de membrana plasmática aumentó su actividad al aumentar la concentración de sustrato, aunque ésta no fue tan grande como esperábamos que ocurriera por la Km que presenta, si bien también presenta límites de confianza amplios, de manera que podríamos explicar este pequeño aumento y asumir que la ATPasa de tonoplasto corresponde a la Enzima 1 con un bajo valor de Km y la ATPasa de membrana plasmática es la Enzima 2 con un valor alto de Km.

Los datos obtenidos ciertamente concuerdan con el hecho de que las ATPasas juegan un papel importante en el desarrollo de la planta, ya sea en su germinación o en su vigor, siendo esto más claro en los coleótilos que en las radículas. Los coleótilos de la línea resistente presentan mayor acumulación de biomasa que los de la línea sensible y también una mayor actividad de hidrólisis de ATP al menos por la ATPasa de tonoplasto (la V_{max} 1 de la línea sensible es menor que el de la línea resistente), esto posiblemente debido a que exista una menor abundancia de esta enzima en el tonoplasto de la células de los coleótilos de la línea sensible. La menor abundancia de la enzima en la línea sensible podría ser ocasionada por varias posibilidades, a) menor biosíntesis de la proteína, b) menor estabilidad al ataque de proteasas y c) ensamble defectuoso de las subunidades de la enzima ya sea al formar el oligómero y/o al ser incorporada en la membrana. En cuanto a las radículas no hubo una diferencia importante entre las dos líneas en cuanto acumulación de biomasa y al medir su actividad de hidrólisis de ATP parecía en un principio que esta era mayor en las radículas de la línea resistente que la de la línea sensible, aunque después encontramos lo contrario (Figuras 14A y 15A, Tabla XIII), siendo la ATPasa de membrana

plasmática la que por presentar una V_{max} mayor que la de la línea resistente favorecería en la actividad total de la fracción microsomal a las radículas de la línea sensible. Como ya se discutió en párrafos anteriores, tal vez la variación encontrada en la actividad de hidrólisis de ATP de las radículas de la línea sensible nos indique que no hay una diferencia importante entre las radículas de ambas líneas.

Aún es poco lo que existe en la literatura en cuanto al comportamiento de estas enzimas en plantas sometidas a factores adversos, algunos de los reportes han sido la inactivación de la ATPasa de vacuola por frío (59), la mayor actividad de la ATPasa de membrana plasmática de células dormantes en comparación con la actividad hidrolítica de células no dormantes (58) y el aumento de la actividad de hidrólisis de ATP como respuesta de la ATPasa a diferentes condiciones de estrés salino (55, 56, 57). Por los datos que obtuvimos consideramos que la actividad de las ATPasas están relacionadas con el desarrollo de la planta y además con la capacidad de ésta para resistir el deterioro ó bien por la capacidad de la plántula para sintetizar estas enzimas. Aunque no hay que olvidar que muchas otras enzimas que participan en el metabolismo de las células además de las ATPasas pueden estar implicadas en el proceso de desarrollo de una planta, y cualquier alteración en alguna de ellas puede afectar gravemente su desarrollo.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

a) La actividad de ATPasa microsomal de la línea resistente fue mayor que en la línea sensible, en los coleoptilos fue de 3.1 a 1.5 veces, mientras que en las radículas fue de alrededor de 1.5 veces mayor en la línea resistente, al menos en los experimentos iniciales siendo que al final fue de 1.5 veces mayor en la línea sensible.

b) De los dos componentes encontrados en la fracción microsomal de los coleoptilos solo uno de ellos presenta diferencias en las constantes cinéticas. El componente diferente tiene una V_{max} de alrededor de 3 veces mayor en la línea resistente que en la sensible.

c) Es probable que este componente sea la ATPasa de tonoplasto que se encuentra disminuida a través de su V_{max} en la línea de maíz con bajo vigor.

d) De las dos enzimas con actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal de las radículas sólo una presentó diferencias en las constantes cinéticas. La diferencia se encuentra en la V_{max} 2 que es de alrededor de 2.5 veces mayor en la línea sensible. Este componente diferente es la ATPasa de membrana plasmática que se encuentra favoreciendo en actividad a la línea de bajo vigor. Sin embargo cabe mencionar que los resultados con respecto a las radículas deben tomarse con reserva, debido a la irreproducibilidad de las actividades hidrolíticas de las preparaciones microsomales de la línea sensible.

e) La actividad diferente que encontramos en la ATPasa de tonoplasto en los coleoptilos de las dos líneas puede deberse a varios factores como son, menor biosíntesis de la proteína, menor estabilidad al ataque de proteasas y al ensamble defectuoso de las subunidades de la enzima ya sea al formar el oligómero y/o al ser incorporada en la membrana.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Bewley J. D. and Black M. (1978). *Physiology and Biochemistry of seeds. Vol 1. Development, Germination and Growth.* Springer-Verlag, Heidelberg. New York. pp 308.
2. Cronquist A. (1982). *Introducción a la botánica. Segunda edición, CECSA, México.* pp 848.
3. Grevlach V. A. y Edison J. (1970). *Las plantas, Introducción a la botánica moderna.* Limusa -Wiley S.A. México pp 679.
4. Ching T. M. (1982). *Adenosine triphosphate and seed vigor. From the physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination.* Khan A. A. editor. Elsevier Biomedical Press. New York pp 546.
5. Avers Ch. J. (1983). *Biología celular. Ed. Iberoamérica. México, D.F.* 532 pp.
6. Harrison R. and Lunt G. G. (1980). *Biological Membranes (Their Structure and Function).* Blackie Glasgow and London. pp 288.
7. Hall J. L., Flowers T. J. and Roberts R. M. (1982). *Plant cell structure and metabolism. Second edition, Longman Inc. New York.*
8. Hall J. L. y Baker D. A. (1982). *Membranas Celulares y Transporte de Iones. Primera edición, CECSA, México D. F.* pp 151.
9. Hinckle P. C. y McCarty R. E. (1988). *Cómo fabrican ATP las células. Investigación y Ciencia 20: 58-75.*
10. Sze H. (1985). *H⁺-Translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36: 175-208.*

11. Dupont F. M., Bennett A. B., and Spanwick R. M. (1982). Localization of a Proton-Translocating ATPase on Sucrose Gradients. *Plant Physiol.* 70: 115-119.
12. Boyer P. D. (1987) The Unusual Enzymology of ATP Synthase. *Biochemistry* 26: 8503-8507.
13. Nelson N. and Taiz L. (1989). The Evolution of H⁺-ATPases *TIBS* 14: 113-116.
14. Kimura T., Nakamura K., Kajiura H., Hattori H., Nelson N. and Asahi T. (1989). Correspondence of Minor Subunits of Plant Mitochondrial F₁ ATPase to F₁F₀ ATPase subunits of Other Organisms. *J. Biol. Chem.* 264: 3183-3186.
15. Bowman B. J. and Bowman E. J. (1986). H⁺-ATPases from Mitochondria, Plasma Membranes, and Vacuoles of Fungal Cells. *J. Membrane Biol.* 94: 83-97.
16. Mélese T. (1985). The Unfolding of a Catalytic Mechanism for the Remarkable ATP Synthase. From Recent Advances in Biological Membrane Studies. Edited by Lester Parcker 511-524.
17. Patridge B., Spitsberg V. L., Pfeiffer N. E. and Schuster S. M. (1985). Kinetic Analysis of Corn Mitochondrial F₁-ATPase. *Plant Physiol.* 77: 346-351.
18. Boyer P. D. (1975). A model for confirmation coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to Active Transport. *FEBS Lett.* 58: 1-6.
19. Mitchell P. (1985). Molecular mechanics of protonmotive F₀F₁ ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis. *FEBS* 182: 1-7.
20. Cross R. L. (1988). The Number of Functional Catalytic Sites on F₁-ATPases and the Effects of Quaternary Structural Asymmetry on Their Properties. *J. Bioenerg. Biomemb.* 20: 395-405.

21. Xue Z., Miller Ch. G., Zhou J-M. and Boyer P. D. (1987). Catalytic and noncatalytic nucleotide binding sites of chloroplast F₁ ATPase. Photoaffinity labeling and peptide sequencing. FEB 5260: 391-394.
22. Barber J. (1987). Composition Organization and Dynamic of the thylakoid Membrane in relation to it's function. In The biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. Academic Press, Inc. N. Y. pp 75-130.
23. McCarty D. R., Keegstra K. and Selman B. R. (1984). Characterization and Localization of the ATPase Associated with Pea Chloroplast Envelope Membranes. Plant Physiol. 76: 584-588.
24. Nguyen T-D and Siegenthaler P-A (1983). Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts. Properties of a membrane-bound ATPase. FEBS 991: 67-70.
25. Marré E. and Ballarin-Denti A. (1985). The Proton Pumps of the Plasmalemma and the Tonoplast of Higher Plants. J. Bioenerg. Biomemb. 17: 1-21.
26. Vara F. and Serrano R. (1983). Phosphorylated Intermediate of the ATPase of Plant Plasma Membranes. J. Biol. Chem. 258: 5334-5336.
27. Gallagher S. R. and Leonard R. T. (1987). Electrophoretic Characterization of a Detergent-Treated Plasma Membrane Fraction from Corn Roots. Plant Physiol. 83: 265-271.
28. O'Neill S. D. and Spanswick R. M. (1984). Solubilization and Reconstitution of Vanadate-Sensitive H⁺-ATPase from the Plasma Membrane of *Beta vulgaris*. J. Membrane Biol. 79: 231-243.

29. Giannini L. J., Gildensoph L. H., and Briskin D. P. (1987). Selective Production of Sealed Plasma Membrane Vesicles from Red Beet (*Beta vulgaris L.*) Storage Tissue. Arch. Biochim. Biophys. 254: 621-630.
30. Dupont F. M., Burk L. L. and Spanswick R. M. (1981). Characterization of a Partially Purified Adenosine Triphosphatase from a Corn Root Plasma Membrane Fraction. Plant Physiol. 67: 59-63.
31. Mettler I. J., Mandala S. and Taiz L. (1982). Characterization of In Vitro Proton Pumping by Microsomal Vesicles Isolated from Corn Coleoptiles. Plant Physiol. 70: 1738-1742.
32. Briskin D. P. and Poole R. J. (1984). Characterization of de Solubilized Plasma Membrane ATPase of Red Beet. Plant Physiol. 76: 26-30.
33. Cocucci M. C. and Marré E. (1984). Lysophosphatidylcholine-Activated, Vanadate-Inhibited, Mg^{2+} -ATPase from Radish Microsomes. Biochim. Biophys. Acta 771: 42-52.
34. Serrano R., Montesinos C. and Sánchez J. (1988). Lipid Requirements of the Plasma Membrane ATPases from Oat Roots and Yeast. Plant Sci. 56: 117-122.
35. Serrano R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. Biochim. Biophys. Acta 947: 1-28.
36. Tu S-I., Nagahashi G. and Sliwinski B. J. (1984). Regulatory effects of adenosine diphosphatase on the activity of the plasma membrane ATPase of corn roots. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1367-1373.

37. De Michelis M. I. and Spanswick R. M. (1986). H^+ -Pumping Driven by the Vanadate-Sensitive ATPase in Membrane Vesicles from Corn Roots. *Plant Physiol.* 81: 542-547.
38. Nelson N. (1988). Structure, Function, and Evolution of Proton-ATPases. *Plant. Physiol.* 86: 1-3.
39. Briskin D. P. and Poole R. J. (1983). Evidence for a β -aspartil Phosphate Residue in the Phosphorylated Intermediate of the Red Beet Plasma Membrane ATPase. *Plant Physiol.* 72: 1133-1135.
40. Vara F. and Serrano R. (1982). Partial Purification and Properties of the Proton-translocating ATPase of Plant Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 257: 12826-12830.
41. Colombo R., Bonetti A., Cerana R. and Lado P. (1981). Effect of Plasmalemma ATPase inhibitors, Diethylstilbestrol and Orthovanadate, on fusicoccin-induced H^+ Extrusion in Maize Roots. *Plant Sci. Lett.* 21: 305-315.
42. Gabathuler R. and Cleland R. E. (1985). Auxin Regulation of a Proton Translocating ATPase in Pea Root Plasma Membrane Vesicles. *Plant Physiol.* 79: 1080-1085.
43. Senn A. P. and Goldsmith M. H. M. (1988). Regulation of Electrogenic Proton Pumping by Auxin and Fusicoccin as Related to the Growth of *Avena* Coleoptiles. *Plant Physiol.* 88: 131-138.
44. Schaller G. E. and Sussman M. R. (1988). Phosphorylation of the plasma-membrane H^+ -ATPase of oat roots by calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173: 509-518.
45. Braver D., Hsu A-F and Tu S-I. (1988). Factors Associated with the Unstability of Nitrate-Insensitive Proton Transport by Maize Root Microsomes. *Plant Physiol.* 87: 598-602.

46. Moriyama Y. and Nelson N. (1989). Cold Inactivation of Vacuolar Proton-ATPases. *J. Biol. Chem.* 264: 3577-3582.
47. Lais., Randall S.K. and Sze H. (1988). Peripheral and Integral Subunits of the Tonoplast H^+ -ATPase from Oat Roots. *J. Biol. Chem.* 263: 16731-16737.
48. Bowman E. J., Mandala S., Taiz L. and Bowman B. J. (1986). Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 48-52.
49. Mandala S. and Taiz L. (1985). Partial Purification of a Tonoplast ATPase from Corn Coleoptiles. *Plant Physiol.* 78: 327-333.
50. Bennett A. B., O'Neill S. D. and Spanwick R. M. (1984). H^+ -ATPase Activity from Storage Tissue of *Beta vulgaris*. I Identification and characterization of an anion-sensitive H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 74: 538-544.
51. Marin B. (1983). Sensitivity of Tonoplast Bound Adenosine-Triphosphatase from *Hevea* to Inhibitors. *Plant Physiol.* 73: 973-977.
52. Admon A., Jacoby B. and Goldschmidt E. E. (1981). Some Characteristics of the Mg-ATPase of Isolated Red Beet Vacuoles. *Plant Sci. Lett.* 22: 89-96.
53. Schneider L. D. (1987). The proton pump ATPase of lysosomes and related organelles of the vacuolar apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 1-10.
54. Chanson A., McNaughton E. and Taiz L. (1984). Evidence for a KCl-Stimulated, Mg^{2+} -ATPase on the Golgi of corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 76: 498-507.

55. Braun Y., Hassidim M., Lerner H. R. and Reinhold L. (1986). Studies on H^+ -Translocating ATPases in Plants of Varying Resistance to Salinity. *Plant Physiol.* 81: 1050-1056.
56. Bruggemann W. and Janiesch P. (1989). Comparison of Plasma Membrane ATPase from Salt-treated and Salt-free Grown *Plantago maritima* L. *J. Plant Physiol.* 134: 20-25.
57. Peeler T. C., Stephenson M. B., Einspahr K. J. and Tompson, Jr G. A. (1989). Lipid Characterization of Enriched Plasma Fraction of *Dunaliella salina* Grown in Media of Varying Salinity. *Plant Physiol.* 89: 970-976.
58. Petel G. and Gendraud M. (1988). Biochemical Properties of the Plasmalemma ATPase of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Tubers in Relation to Dormancy. *Plant Cell Physiol.* 29: 739-741.
59. O'Neill S. D., Bennett A. B. and Spanwick R. M. (1983). Characterization of a NO_3^- -Sensitive H^+ -ATPase from Corn Roots. *Plant Physiol.* 72: 837-845.
60. Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
61. Gallagher S. R. and Leonard R. T. (1982). Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots. *Plant Physiol.* 70: 1335-1340.
62. O'Neill S. D. and Spanwick R. M. (1984). Effect of Vanadate on the Plasma Membrane ATPase of Red Beet and Corn. *Plant Physiol.* 75: 586-591.

63. De Michelis M. I., Rasi-Caldogno F. and Pugliarello M. Ch. (1984). On the inhibiting effect of oligomycin on Mg: ATP-Dependent ΔpH and $\Delta\psi$ in microsomal vesicles from radish. *Plant Sci. Lett.* 36: 111-117.
64. O'Sullivan, W. J. and Smithers, G. W. (1979). Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol.* 63: 294-336.
65. Rodríguez-Sotres Rogelio and Muñoz-Clares R. A. (1990). Kinetic Evidence of the Existence of a Regulatory Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol 276 No. 1. (en prensa).
66. Reich, J. G., Wangermann G., Falk M. and Rhode K. (1972). A general strategy for parameter estimation for isosteric and allosteric-kinetic data and binding measurements. *Eur. J. Biochem.* 26: 368-379.
67. Ames B. (1966). Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. *Methods Enzymol.* 8:115-118.
68. Chifflet S., Torriglia A., Chiesa R. and Tolosa S. (1988). A Method for the Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Labile Organic Phosphate and High Concentrations of Protein: Application to Lens ATPases. *Anal. Biochem.* 168: 1-4.
69. González P., Sánchez S. y Gavilanes-Ruiz M. (1989). Determinación de fosfato inorgánico en presencia de altas concentraciones de ATP. VI Reunión de Bioenergética y Biomembranas. Taxco, Gro. México.
70. Loomis W. D. Overcoming Problems of Phenolics and Quinones in the Isolation of Plant Enzymes and Organelles pp 528-544. In *Subcellular fractions derived from Plant tissue* (54).