

ANDRES BELVER CANO

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA, 1986

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS METABOLICOS Y ESTRUCTURALES
INDUCIDOS POR EL BORO EN RAICES Y
COTILEDONES DE PLANTULAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.)

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS METABOLICOS Y ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR EL BORO EN RAICES Y
COTILEDONES DE PLANTULAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)

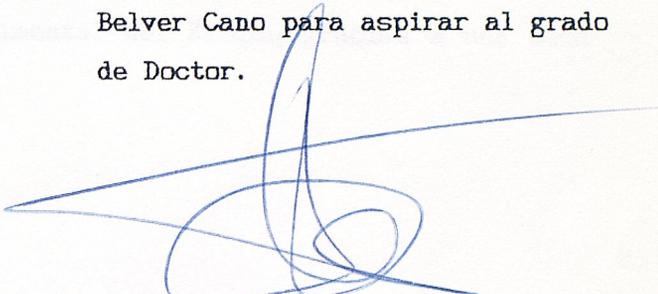
Andrés Belver Cano

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1986

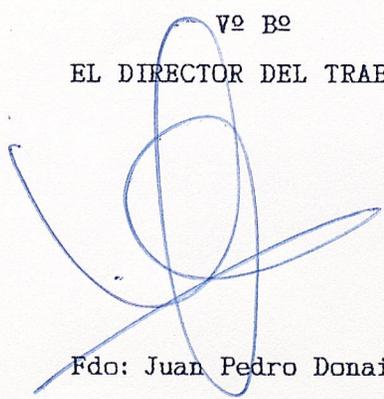
CAMBIOS METABOLICOS Y ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR EL BORO EN RAICES Y
COTILEDONES DE PLANTULAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)

Memoria que presenta el licenciado
en Ciencias Biológicas D. Andrés
Belver Cano para aspirar al grado
de Doctor.



Fdo: Andrés Belver Cano

Vº Bº
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo: Juan Pedro Donaire Navarro
Doctor en Farmacia
Investigador Científico del C.S.I.C.

La presente Memoria ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, gracias a una Beca del C.S.I.C.

[The body of the document contains several paragraphs of extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.]

A M^a Carmen

A mis padres

Aquellos que se han enfrentado alguna vez a un trabajo de esta envergadura, en un periodo tan crítico como es la fase de formación en la difícil y dura profesión de la investigación científica, conocen la ardua labor que conlleva la realización del mismo. Afortunadamente en mi caso, dicha labor ha sido mucho mas llevadera, al haber podido contar con el apoyo técnico y humano de diferentes compañeros y amigos. En este sentido, es para mí una gran satisfacción destacar el importantísimo papel desarrollado en esta Memoria Doctoral por el Dr. Juan Pedro Donaire Navarro, Investigador Científico del C.S.I.C., no sólo por su completísimo trabajo de dirección en la misma, dejando en todo momento constancia de su elevada capacidad profesional, sentido de la responsabilidad y de su constante optimismo contra viento y marea, consiguiendo crear una atmósfera estimulante y agradable para el trabajo, sino tambien por su gran categoría humana de la que me ha dejado reflejo, día a día, despues de muchísimas horas de convivencia y de la que creo ha derivado una sincera amistad. Por todo ello, agradezco profundamente haber contado con su apoyo científico y humano, en este difícil periodo de iniciación a la investigación científica.

Así mismo, deseo expresar mi sincero agradecimiento al grupo de Citología Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, en las personas de María Isabel Rodríguez, Matilde Garrido y María del Carmen Fernández, por la excelente asistencia científica y técnica en la parte concerniente a microscopía electrónica y fotografía incluida en esta Memoria, así como por su constante apoyo y amistad demostrados. Tambien, y de forma especial, a mis grandes amigas y compañeras de trabajo, Pilar Rodríguez y Marta Roldán,

que a pesar de sus muchas ocupaciones, encontraron siempre hueco para echar una mano en algunas fases de la elaboración de esta Memoria, y que con sus muestras de compañerismo y afecto me ayudaron a superar los momentos difíciles del trabajo cotidiano.

Del mismo modo, quiero resaltar la magnífica labor realizada por María Teresa Macias, en la parte mecanográfica, Juan Rodríguez Robledo, en la fotográfica y, especialmente, Manuel Martínez, en la rotulación de figuras y esquemas, demostrándome su gran profesionalidad y buen hacer, a pesar de sus circunstancias personales.

Mi agradecimiento también para el Dr. Juan José Lázaro Paniagua, Jefe de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín durante el periodo de realización de esta Memoria, por su disposición y generosidad, siempre presto a la resolución de cualquier problema que haya podido surgir en el laboratorio.

Finalmente, a mis compañeros y amigos, que con su aliento y muestras de afecto, han contribuido, en alguna manera, a la realización de este trabajo.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	12
II. PARTE TEORICA.....	16
1. FUNCIONES ATRIBUIDAS AL BORO EN PLANTAS.....	17
1.1 BORO Y METABOLISMO.....	18
1.1.1. Boro y aspectos generales del metabolismo.....	20
1.1.2. Boro y membranas.....	26
1.1.3. Interacción boro-hormonas.....	28
1.1.4. Boro y respiración.....	28
1.1.5. Boro y metabolismo lipídico.....	31
1.1.5.1. Metabolismo de lípidos en semillas oleaginosas.....	31
a. Degradación de lípidos.....	32
a.1. Hidrólisis de triglicéridos.....	32
a.2. Conversión de ácidos grasos en succinato.....	36
a.3. Conversión de succinato en sacarosa.....	39
a.4. Control de la movilización de los lípidos de reserva	39
a.5. Lipoxigenasa.....	40
b. Biosíntesis de lípidos acíclicos.....	46
b.1. Biosíntesis de ácidos grasos.....	47
b.2. Biosíntesis de fosfolípidos, glucolípidos y triglicé-	57
ridos.....	57
c. Factores que afectan al metabolismo de los lípidos ací-	70
licos.....	70
1.1.6. Boro y senescencia.....	73
III. PLAN GENERAL DE TRABAJO.....	85
IV. MATERIAL Y METODOS.....	87
1. MATERIAL VEGETAL.....	88
1.1. CONDICIONES DE CULTIVO.....	88
1.1.a. Condiciones de germinación y desarrollo.....	88
1.1.b. Estudios en condiciones de iluminación.....	89
1.1.c. Medios de cultivo.....	89

	Pág.
2. TECNICAS EXPERIMENTALES.....	89
2.1. PREPARACION DE LAS FRACCIONES CELULARES.....	89
2.1.a. Obtención de glioxisomas y mitocondrias de cotiledones...	90
2.1.b. Obtención de membranas microsomales de cotiledones.....	90
2.1.c. Preparación de microsomas de raices.....	91
2.1.d. Purificación de microsomas de raices.....	92
2.1.e. Actividad NADPH citocromo c óxidoreductasa asociada a mi- crosomas.....	92
2.1.f. Actividad de enzimas asociados a glioxisomas y mitocondrias	92
2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL EXAMEN A MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	93
2.2.a. Fijación con glutaraldehido.....	93
2.2.b. Deshidratación.....	94
2.2.c. Inclusión.....	94
2.2.d. Microtomía.....	94
2.2.e. Tinción de los cortes.....	95
2.2.f. Observaciones.....	95
2.3. UTILIZACION DE PRECURSORES RADIOACTIVOS.....	95
2.3.a. Elección del precursor.....	95
2.3.b. Condiciones de incubación.....	97
2.4. ENZIMAS DEL METABOLISMO LIPIDICO.....	99
2.4.a. Estudio de la CDP-colina: 1,2, diacilglicerol colina fosfotransferasa de microsomas de raices.....	99
2.4.b. Estudio del enzima lipoxigenasa de cotiledones.....	100
2.5. RESPIRACION, ACTIVIDAD PEROXIDASICA Y FORMACION DE ETILENO.	102
2.5.a. Medida de respiración y etileno en tejido entero.....	102
2.5.b. Determinación de etileno en microsomas.....	103
2.5.c. Actividad peroxidásica.....	104
2.6. EXTRACCION DE LIPIDOS.....	105
2.6.a. Extracción de lípidos totales.....	105
2.6.b. Extracción y metilación de ácidos grasos.....	106
2.6.c. Determinación de la radioactividad en las soluciones lipídicas.....	106

	Pág.
2.7. ANALISIS DE LIPIDOS.....	106
2.7.a. Separación de las categorías lipídicas.....	107
2.7.b. Separación de fosfolípidos.....	107
2.7.c. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales.....	109
2.7.d. Acidos grasos de diferentes categorías lipídicas.....	109
2.7.e. Dosificación de fosfolípidos, galactolípidos y lípidos neutros.....	109
2.7.f. Determinación de la actividad CDP-colina: 1,2 diacil- glicerol colinafosfotransferasa de microsomas.....	110
2.8. DETERMINACION DE PROTEINAS Y CLOROFILAS.....	110
2.9. EXPRESION DE LOS RESULTADOS.....	110
V. RESULTADOS.....	112
1. MORFOLOGIA DE RAICES DE PLANTULAS DE GIRASOL EN FUNCION DEL BORO.....	112
1.1. ESTUDIO MACROSCOPICO DE LA RAIZ.....	113
1.2. OBSERVACION AL MICROSCOPIO OPTICO.....	113
1.3. OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.....	114
2. EL BORO Y LOS LIPIDOS DE LA RAIZ.....	131
2.1. CONCENTRACION EN LIPIDOS DE LA RAIZ.....	131
2.1.a. Clases de moléculas lipídicas.....	132
2.1.b. Composición y contenido en ácidos grasos.....	133
2.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL BORO A NIVEL DE MICROSOMAS	133
2.2.a. Estudio comparativo de los lípidos de microsomas purifi- cados a partir de raíces desarrolladas en medios diferen- ciales de boro.....	142
2.2.b. Composición en ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes moléculas lipídicas.....	142
2.3. BIOSINTESIS DE LIPIDOS.....	143
2.3.a. Biosíntesis a nivel de tejido entero.....	151
2.3.b. Biosíntesis de fosfatidilcolina a nivel de microsomas...	152
3. MORFOLOGIA DE COTILEDONES DE PLANTULAS DE GIRASOL EN FUNCION DEL BORO.....	166
3.1. OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.....	166
4. EL BORO Y LOS LIPIDOS DEL COTILEDON.....	168

	Pág.
4.1. CONCENTRACION EN LIPIDOS DEL COTILEDON.....	168
4.1.a. Clases de moléculas lipídicas.....	180
4.1.b. Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes categorías lipídicas.....	180
4.1.c. Efecto de la luz sobre el metabolismo de cotiledones en función del boro.....	185
4.2. BIOSINTESIS DE LIPIDOS.....	185
4.2.a. Naturaleza de los lípidos sintetizados.....	188
5. EFECTO DEL BORO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS OXIDATIVOS, RESPIRACION Y FORMACION DE ETILENO.....	188
5.1. BORO Y ACTIVIDAD LIPOXIGENASICA.....	188
5.1.a. Estudio <i>in vivo</i>	188
5.1.b. Estudio <i>in vitro</i>	191
5.1.c. Efecto <i>in vitro</i> del boro sobre el enzima purificado de cotiledones.....	199
5.2. BORO Y ACTIVIDADES PEROXIDASA, MALATO Y CITRATO SINTASAS..	199
5.3. BORO Y RESPIRACION.....	199
5.4. BORO Y ETILENO.....	202
5.4.a. Estudio <i>in vivo</i> a nivel del tejido entero.....	202
5.4.b. Estudio <i>in vitro</i> a nivel de microsomas.....	204
 VI. DISCUSION.....	 211
 VII. CONCLUSIONES.....	 233
 VIII. BIBLIOGRAFIA.....	 237
 IX. ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	 276

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El estudio de los mecanismos de acción de los micronutrientes como moduladores del desarrollo y diferenciación celular representa uno de los temas importantes de investigación en Biología Vegetal. En este sentido, aunque las plantas muestran unos requerimientos de elementos minerales en un amplio grado de concentraciones, sin embargo, frente a un determinado elemento, los límites para un crecimiento normal, deficiente o tóxico vienen condicionados por valores característicos.

Al hilo de estos hechos, el estudio de las funciones del boro ha despertado un especial interés para los bioquímicos, al ser éste el único elemento conocido que es requerido por las plantas superiores del cual no se conocen funciones en el reino animal. Desde que Agulhom en 1910 demostró la esencialidad del boro en plantas, numerosos trabajos se han venido realizando para desentrañar el papel fisiológico y bioquímico de este elemento en el metabolismo vegetal. Así, se han descrito una amplia gama de alteraciones metabólicas en diferentes orígenes vegetales influenciadas por distintos niveles de boro, habiéndose observado una gran confusión al respecto derivada de la distinción de lo que pudieran ser acciones primarias de las consideradas secundarias.

En un intento de unificar la diversidad de acciones bajo una misma causa, esto es, la acción primaria del elemento, se han propuesto varias hipótesis de actuación, sin que ninguna haya demostrado ser satisfactoria para explicar la secuencia de respuestas o eventos metabólicos que se desencadenan por efecto de una nutrición anormal de boro. No obstante, como consecuencia de los trabajos de investigadores como TANADA (1974), ROBERTSON y LOUGHMAN (1974), POLLARD y col. (1977), HIRSCH y TORREY (1980), surgió con gran fuerza la hipótesis referente a la posible implicación del boro en aspectos relacionados con las membranas, sugiriéndose una acción directa del elemento sobre dichas estructuras en aras del mantenimiento de su integridad física y funcional. Esta idea no puede resultar extraña, teniendo en cuenta que las membranas celulares, concebidas como una barrera física de separación inter e intracelular, son zonas de gran actividad biológica, donde tienen lugar, entre otros, una serie de procesos vitales como fotosíntesis, cadena respiratoria y absorción

y transporte de nutrientes. Esta hipótesis de trabajo y los primeros resultados favorables derivados de ella, han determinado, en gran medida, la investigación que se presenta en esta Memoria Doctoral.

En nuestro estudio, se analizan algunos cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, íntimamente relacionados con los fenómenos de membrana, que se instauran en los tejidos como consecuencia de la actividad de enzimas específicos y conducentes, todos ellos, al desarrollo y diferenciación celular. Ello ha determinado que se investigue en función del boro, la concatenación metabólica existente entre aspectos concretos del metabolismo lipídico (cambios en la composición lipídica y en la actividad de enzimas específicos como CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colinafosfotransferasa de membranas radiculares y lipoxigenasa de cotiledones), actividad oxidativa y componentes hormonales del tipo del etileno, procesos profundamente interrelacionados entre sí y que adquieren especial relevancia en raíces y cotiledones de plántulas de girasol, en cuanto tejidos sometidos a importantes cambios ^{reg}gradativos y biosintéticos durante el periodo de postgerminación.

Por otra parte, en base a la realización de un análisis sintético y comparativo de la acción del micronutriente, también hemos estudiado los efectos del boro sobre un proceso concreto del desarrollo vegetal como es la senescencia, entendiéndose ésta como un estadio de la vida de la planta, dependiente de la conjunción de diversos factores internos y externos, que conlleva, antes o después, la muerte del organismo entero o, independientemente, de alguna de sus partes. Este proceso, inducido, entre otras causas, como respuesta a diferentes tipos de stress, entre los cuales se apuntan como muy importantes aquellos que derivan de estados de deficiencia o de toxicidad en determinados nutrientes minerales, puede representar un modelo funcional capaz de dar una interpretación válida e integradora del papel del boro en las plantas. De ahí que el estudio de los efectos del boro sobre la senescencia de raíces y, sobre todo, de cotiledones también haya constituido objetivo importante en este trabajo.

Finalmente, en cuanto a la elección del material vegetal utilizado, se ha optado por el girasol por dos motivos fundamentales: primero, debido a la especial sensibilidad al boro mostrada por esta planta, dado que el margen de concentraciones que producen crecimiento y desarrollo

adecuados es muy estrecho, y cuya consecuencia es siempre una drástica reducción de la cosecha. Por otro lado, es indudable la creciente importancia económica que está tomando este cultivo en nuestro país, muy especialmente en Andalucía, no sólo por la producción de aceite, que actualmente es el tercero en el consumo mundial después del de soja y cacahuete, sino también por sus aplicaciones de interés agropecuario, tales como la utilización de los residuos para la alimentación del ganado después de la obtención del aceite, o su utilidad como práctica agrícola en la rotación de cultivos de secano.

Todo ello, hace que este trabajo, con el cual se pretende la consecución de los objetivos científicos expuestos, cuyo estudio muestra también una derivación práctica al plantear importantes problemas en un cultivo como el girasol, aparezca sólo en un principio como investigación básica.

II. PARTE TEORICA

1. FUNCIONES ATRIBUIDAS AL BORO EN PLANTAS

El desarrollo histórico del estudio de la nutrición del boro ha conocido dos grandes etapas. Una primera, iniciada en 1910 con los trabajos de AGULHOM, demuestra la esencialidad del boro para el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores, al estudiar los distintos síntomas ocasionados por la deficiencia y toxicidad de este elemento en un gran número de especies vegetales (HEWITT, 1963; GUPTA, 1979) . En este sentido, dadas las frecuentes condiciones de deficiencia y toxicidad en boro de los suelos, el problema fue tomando una gran importancia desde el punto de vista agronómico a raíz de las graves alteraciones que producía en los cultivos y que daban lugar a una drástica reducción de la cosecha.

En una segunda etapa, con la llegada de la moderna metodología bioquímica y fisiológica, empieza a abordarse, en mayor profundidad, el estudio fisiológico y bioquímico del efecto del elemento sobre los procesos de desarrollo y crecimiento del vegetal. No obstante, y a pesar de las numerosas investigaciones realizadas hasta el momento, es posible indicar que, a diferencia del resto de los nutrientes minerales, el papel del boro no es bien conocido. Así, la mínima cantidad en que participa en el vegetal (1 - 100 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso seco), los numerosos síntomas bioquímicos asociados a condiciones de deficiencia y toxicidad, las propias peculiaridades químicas del elemento (el único micronutriente que actúa en forma aniónica), el no haberse demostrado hasta la fecha su participación como parte activa de un sistema enzimático (JACKSON y CHAPMAN, 1975), así como la falta de un isótopo radioactivo de boro, son algunas de las razones que explican la gran dificultad que plantea el conocimiento de su acción primaria.

El hecho de que el boro sea el único elemento conocido que es requerido por las plantas superiores y no así por animales, ha centrado la atención de los científicos en aquellas funciones del vegetal que no se corresponden a nivel animal. A este respecto, se ha comprobado que el no requerimiento de boro por los hongos aleja la posibilidad de una actuación del elemento sobre la pared celular (SHKOL'NIK y MAEVSKAYA, 1977); y su no

esencialidad para la mayoría de las algas (GERLOFF,1968), también sugiere que no tenga un papel específico en la fotosíntesis. Por otra parte, es requerido por plantas inferiores como los helechos y algunas diatomeas (SMYTH y DUGGER, 1980; DUGGER, 1983), habiéndose demostrado que algunas bacterias relacionadas con la fijación del nitrógeno utilizan boro, sobre todo cuando crecen en ausencia de nitratos como por ejemplo *Azotobacter chroococcus* y el alga verde azulada *Nostoc mucorum* (MENGEL y KIRKBY, 1978). No obstante, la demostración de una absoluta independencia del boro para aquellos orígenes que se ha indicado, incluido el Reino Animal, no es aún un capítulo definitivamente cerrado (NIELSEN, 1984).

A continuación, hacemos una descripción de las diferentes funciones propuestas para el boro en plantas. En un primer apartado, se incluye un breve estudio generalizado de los efectos del elemento en el metabolismo vegetal. Posteriormente, se hace especial hincapié en aquellas funciones que, de acuerdo con los objetivos marcados en esta memoria, se refieren a la implicación del elemento en aspectos concretos del metabolismo de raíces y cotiledones de plántulas de girasol.

1.1. BORO Y METABOLISMO

En 1983, PARR y LOUGHMAN indicaron las acciones más importantes atribuidas al boro en el desarrollo vegetal, incluidas en gran número de procesos metabólicos. La variedad de funciones atribuidas al boro hace pensar que las alteraciones provocadas por el elemento en cada uno de estos procesos sean secundarias más que primarias, manifestando la existencia, por el momento, de una acción generalizada e inespecífica del micronutriente en el metabolismo vegetal (LOVATT y DUGGER, 1984). En este sentido, existe unanimidad entre los investigadores al considerar que el mecanismo íntimo de acción puede ser explicado en base a la consideración de sus características químicas. Así, DUGGER (1983) piensa que dicho mecanismo subyace en la gran capacidad que presenta el boro para formar complejos con compuestos con grupos OH.

En la figura 1, se indican las reacciones conducentes a la formación de complejos entre el boro y compuestos conteniendo pares de grupos *cis*-hidroxilo adyacentes, siendo, en parte, el tipo de complejo formado una

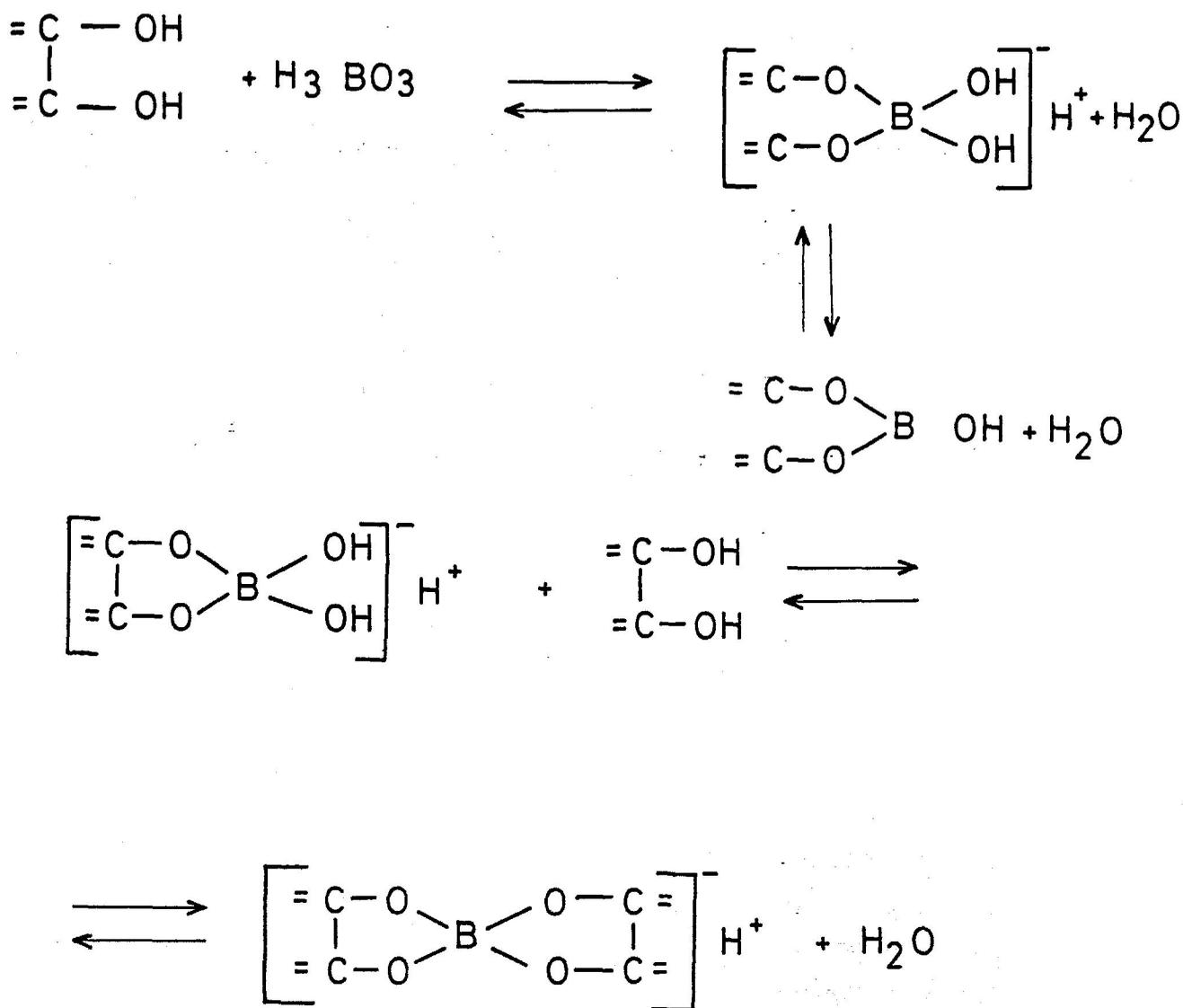


Figura 1. Formación de complejos entre el boro y componentes que contienen pares de grupos *cis*-hidroxilo adyacentes (DUGGER, 1983).

función del pH y de la razón borato:diol. Aunque estos complejos se forman preferencialmente en soluciones con baja y alta razón borato:diol, también se pueden formar con dioles que no tienen grupos OH en posición *cis*, como aquellos que posibilitan ciertas configuraciones en anillo con grupos *trans* 1-2 diol. Para DUGGER (1983), si estos complejos con grupos OH son sustratos o productos de reacciones enzimáticas, se posibilita la activación o inhibición de la vía metabólica correspondiente, lo cual puede ocasionar cambios en la concentración de ciertos metabolitos o impedir las reacciones de rutas metabólicas específicas, alterando el crecimiento y desarrollo de la planta.

1.1.1. Boro y aspectos generales del metabolismo

Aunque la mayor parte de los estudios realizados acerca de la influencia del boro sobre el crecimiento vegetativo se han efectuado sometiendo el material vegetal a condiciones de boro-deficiencia, sin embargo, condiciones de toxicidad han puesto de manifiesto efectos similares a los inducidos por la deficiencia (HUDAK, 1976a, 1976b). Así, en girasol y en tomate, uno de los efectos más comúnmente observados es la rápida detención de la elongación de la raíz, lo que sugiere la inhibición de la división y/o la elongación celular (KOUCHI y KUMAZAWA, 1975a). Las opiniones también se dividen entre aquellos que piensan que la deficiencia en boro conduce a una acumulación de células indiferenciadas (KROSING, 1978), y los que indican, por el contrario, un incremento en la maduración y diferenciación de las células próximas al ápice (MENGEL y KIRKBY, 1978).

Los primeros trabajos que relacionan el boro con la germinación del grano de polen incluyen efectos sobre el crecimiento del tubo polínico, regulación de la ruptura del grano, como resultado de la absorción no regulada de agua, y la posibilidad de que el boro en el tejido estigmático influya sobre el crecimiento del tubo polínico y sobre la compatibilidad de la fertilización cruzada (DUGGER, 1973; SHKOL'NIK, 1974). Actualmente se establece que, desde un punto de vista metabólico, el boro puede actuar facilitando la absorción y metabolismo de azúcares, incrementando la respiración o como cofactor en la biosíntesis de la pared del tubo polínico (MENGEL y KIRKBY, 1978).

La rápida detención del crecimiento de la raíz, uno de los primeros síntomas de la deficiencia en boro, fué la primera pista que condujo a los investigadores a pensar en una estrecha relación entre boro y el metabolismo de los ácidos nucleicos (WHITTINGTON, 1959). Trabajos posteriores apoyaron la idea de que el requerimiento de boro era necesario para la síntesis de ARN (TIMASHOV, 1968, 1969). Para ALBERT (1968) los síntomas de deficiencia en plantas de tomate se correspondían con un efecto negativo sobre la biosíntesis de ARN, el cual era debido a la inhibición de la formación de uracilo y otras bases pirimidínicas. Este supuesto fué apoyado inicialmente por BIRNBAUM y col. (1977) trabajando con óvulos de *Gorsipium hirsutum*, aunque estos mismos autores llegaron a la conclusión de que los síntomas de deficiencia en boro observados no están relacionados con la biosíntesis de ácidos nucleicos, sino con una inhibición de la síntesis de UDP-glucosa. Posteriormente, LOVATT y col. (1981) y LOVATT (1984) observaron que la biosíntesis de citosina y timina a partir de nucleótidos derivados de la uridina, se veía afectada por la ausencia de boro.

Respecto al ADN, COHEN y ALBERT (1974) y KRUEGER y col. (1979) comprobaron que la deficiencia en boro provocaba una significativa reducción en la incorporación de ³H-timidina en ADN, a la vez que una reducción en el contenido de este ácido nucleico. MOORE y HIRSCH (1983) mostraron resultados contradictorios con éstos, trabajando con ápices de raíces de girasol.

El incremento de la actividad ribonucleásica en plantas boro-deficientes es otro de los efectos atribuidos al boro, sugiriéndose que su acción sobre el metabolismo degradativo de ácidos nucleicos puede ser mucho más importante que sobre la biosíntesis (TIMASHOV, 1969; DAVE y KANNAN, 1980). Posteriormente, MOORE y HIRSCH (1983) sugirieron que la síntesis de ADN y ARN en tejidos boro-deficientes puede suponer la síntesis de proteínas especializadas que incrementan sus niveles en condiciones de stress de boro.

Aunque de lo expuesto se deduce que pudiera ser aceptada la implicación del boro en el metabolismo de los ácidos nucleicos, sin embargo, queda aún por demostrar la evidencia de que los cambios en el metabolismo de ácidos nucleicos se deba a un efecto primario del elemento.

Gran número de experimentos sobre la absorción y translocación de azúcares, utilizando sustratos marcados con ^{14}C aplicados exógenamente a la planta, mostraban un incremento en los niveles de estos compuestos en presencia de boro, postulándose que el boro pudiera formar complejos con los azúcares, haciendo más fácil, de esta forma, su absorción y transporte (SKOK, 1958; HEWITT, 1963). Más tarde, DUGGER (1973) propuso la hipótesis alternativa de una estimulación por el boro de la absorción y/o el movimiento de los azúcares, probablemente a través de una acción indirecta sobre su transporte a larga distancia, o debido a una acción sobre el metabolismo auxínico. Sin embargo, el aumento del contenido en azúcares en plantas con deficiencia en boro, así como la respuesta frente a este elemento observada en algunas reacciones enzimáticas de interconversión de carbohidratos, ha conducido a la hipótesis de que el boro actúa más bien sobre el metabolismo de estas sustancias que a nivel de su translocación. En este sentido, la interconversión entre monosacáridos y la biosíntesis de sacarosa pueden verse afectados por la nutrición anormal de boro, posiblemente debido a la inhibición de la biosíntesis de uracilo y de la UDP-glucosa fosforilasa (BIRNBAUM y col. 1977; PILBEAM y KIRKBY, 1983).

El ciclo de las pentosas fosfato (CPF) también se ha visto afectado en función del contenido en boro. LEE y ARONOFF (1967) pusieron de manifiesto que el complejo que forma el boro con el 6-P-gluconato inhibía la actividad del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, deprimiéndose la actividad de esta ruta metabólica en favor de la glucólisis. En ausencia de boro, el CPF se vería favorecido conduciendo, en última instancia, a la acumulación de compuestos fenólicos, síntoma característico de estados de deficiencia en boro. Asimismo, se obtuvieron resultados similares en razón de la modulación del enzima glucosa-6-P- deshidrogenasa por el boro (SHKOL'NIK y IL'INSKAYA, 1975; ALVAREZ-TINAUT y DONAIRE, 1978).

Respecto al efecto del boro sobre la formación de la pared celular, existe una clara relación entre la síntesis de sus elementos constitutivos y la disponibilidad del elemento (AUGSTEN y EICHHORN, 1976). RAJARATNAM y LOWRY (1974) detectaron un mayor contenido en hemicelulosa y sustancias pécticas, al tiempo que TIMASHOV (1977) observa una mayor incorporación de ^{14}C -glucosa en sustancias pécticas en hojas de girasol y soja deficientes en boro. Los estudios a nivel ultraestructural apoyan estos datos

experimentales, habiéndose observado, en raíz de girasol, cambios estructurales en el aparato de Golgi y engrosamientos de la pared celular tras las primeras horas de ser transferidas las plantas a medios boro-deficientes (KOUCHI y KUMAZAWA, 1976; HIRSCH y TORREY, 1980).

Existe la evidencia de que otros polisacáridos estructurales de la pared también pueden ser afectados por la nutrición de boro. Así, DUGGER y PALMER (1980), en óvulos de algodón boro-deficientes, mostraron que la UDP-¹⁴C-glucosa se incorporaba principalmente a β -1,3 glucanos, mientras que en óvulos cultivados en medios normales la incorporación se dirigía a β -1,3 y β -1,4 glucanos. Estos datos están de acuerdo con la deposición de callosa en plantas boro-deficientes (VAN DER VENTER y CURRIER, 1977).

Como ya se indicó anteriormente, uno de los síntomas más típicamente asociados a la boro-deficiencia en plantas es la acumulación de compuestos fenólicos (LEE y ARONOFF, 1967; SHKOL'NIK, 1974). Para estos autores, la alteración en el contenido de fenoles parece ser cualitativa, afectando principalmente a los ortodifenoles.

También se ha observado que la deficiencia en boro conduce a la formación de concentraciones supraóptimas de AIA dentro de las plantas (NEALES, 1960), habiéndose sugerido que este hecho podía ser responsable de todos los síntomas asociados a la boro-deficiencia (TORREY, 1965; COKE y WITTINGTON, 1968). Sin embargo, HIRSCH y col. (1982) demostraron que los tempranos síntomas inducidos por estados de boro-deficiencia no pueden ser correlacionados con los elevados niveles de auxinas, ya que al añadir AIA exógenamente dichos síntomas no se reproducían.

Es lógico pensar que la acumulación de fenoles en plantas no se deba sólo a una intensa actividad del CPF en ausencia de boro, sino también a la posible influencia del elemento sobre algún enzima clave de la ruta conducente a la síntesis de fenoles. En este sentido, SHKOL'NIK y MAEVSKAYA (1977) han observado un incremento de la actividad fenilalanina amonioliasa (PAL), lo cual debía conducir a un aumento de los niveles de fenoles. Sin embargo, GOMEZ-RODRIGUEZ y col. (1984), trabajando con plantas de girasol, no encuentran diferencias significativas en la actividad PAL medida con y sin boro en el medio de reacción, lo que hace pensar que éste no actúe directamente sobre los sustratos del enzima según se había propuesto

previamente. Del mismo modo, el aumento en la actividad PAL no se corresponde, en el tiempo, con el incremento de los niveles de fenoles en la planta. Ello les llevó a concluir que dicha actividad no es la principal responsable de la acumulación de ortodifenoles en condiciones de deficiencia en boro.

Respecto a la influencia del boro sobre enzimas oxidativos de fenoles, los resultados son confusos y contradictorios, habiéndose postulado que la catalasa podría estar relacionada con la acumulación de fenoles en plantas (AGARWALA y col. 1981). También se muestran contradictorios los resultados obtenidos en el caso de la peroxidasa, enzima que cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, (DUTTA y McILRATH, 1964; PACHECO y col. 1977). Para PARISH (1969), el ácido bórico facilitaría la unión, mediante enlace iónico, de la peroxidasa soluble a la pared celular. Contrariamente, SHIVE y BARNETT (1973) observaron en hipocotilos de plántulas de girasol deficientes en boro un elevado contenido de peroxidasa ligada covalentemente a las paredes y a distintas fracciones celulares. Sin embargo, el hecho de que un aumento en actividad enzimática pueda deberse a otros muchos factores como por ejemplo la formación de etileno y procesos senescentes, les llevó a concluir que un incremento tal debe ser entendido más bien como un fenómeno general, que se produce cuando el metabolismo de la planta sufre algún tipo de alteración, que como un efecto específico de la deficiencia de boro.

Los datos relativos a la influencia del boro sobre la polifenol oxidasa (PPO) parecen estar de acuerdo en asignar a este elemento un papel depresor de la actividad (GOPAL, 1970; AL'SHEVSKII y col. 1975). GOMEZ-RODRIGUEZ (1984) encuentra, en hoja de girasol, que la deficiencia y la toxicidad en boro disminuye e incrementa, respectivamente, la actividad PPO, proponiendo que un efecto tal pueda ser utilizado como parámetro indicador de los mismos. La falta de correlación entre el contenido de O-difenoles y la actividad PPO, la atribuye a la existencia de una compartimentación celular de estos compuestos, de forma que sólo una fracción del total es accesible al enzima.

Aunque es bien conocida la relación entre el requerimiento de boro y la intensidad de luz (TANAKA, 1966), sin embargo, existe escasa información

acerca de la implicación directa del boro en la fotosíntesis. Inicialmente, GAUCH y DUGGER (1954) no le atribuyeron ningún papel relevante en este proceso. Posteriormente, AUGSTEN y EICHHORN (1976) y SMYTH y DUGGER (1980) trabajando con *Wolffia arrhiza* y *Cilindrotheca fusiformis* en medios sin boro, observaron un aumento de la actividad fotosintética, hecho que relacionaron con un incremento en el nivel celular de potasio en dichas condiciones. Trabajos más recientes indican que, en deficiencia y en toxicidad, se producen modificaciones de la estructura fina de los cloroplastos (HUDAK, 1976), así como una disminución del contenido en clorofila y de la fijación fotosintética del CO₂ (LOVATT y BATES, 1984).

En 1978, PULICH presentó la evidencia de un fotocontrol del boro en hojas de *Halóphila engelmannii*, planta capaz de absorber boro en la oscuridad y excretarlo como respuesta a la luz. Dicha planta mostró una dependencia entre la excreción de boro y la fijación fotosintética del CO₂, sugiriendo estos autores la excreción selectiva de un complejo orgánico-bórico entre el elemento y un compuesto carbonado formado *de novo* durante el proceso fotosintético. Posteriormente, PEDASH y SEREDA (1983) observaron que, en oscuridad, la inyección de ATP exógeno a tallos de plantas de girasol crecidas en medios sin boro, eliminaba los síntomas de boro-deficiencia relacionados con la fotofosforilación oxidativa, concluyendo que este elemento es necesario para el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones de la fotofosforilación no cíclica.

Las hipótesis más recientes sobre los efectos del boro en plantas apuntan hacia una implicación del microelemento en aspectos relacionados con las membranas biológicas. En este sentido, se incluye a continuación el estado actual de las materias correspondientes a la interacción boro-membranas, a las principales vías metabólicas relacionadas con los constituyentes lipídicos, compuestos fundamentales de aquellas estructuras, así como a la formación de etileno y actividad respiratoria, en cuanto procesos, éstos últimos, asociados con fenómenos de degradación celular y de especial relevancia, todos ellos, en raíces y cotiledones durante el periodo de postgerminación, cuyo comportamiento, en función del boro, ha constituido objetivo fundamental de este trabajo.

1.1.2. Boro y membranas

La evidencia experimental acumulada en los últimos años apunta hacia la posibilidad de que el efecto primario del boro se establezca a nivel de las membranas. Las primeras indicaciones en este sentido provienen de las observaciones de que el transporte de nutrientes se encuentra tempranamente alterado en plantas sometidas a condiciones de boro-deficiencia, y a que dichos efectos remiten rápidamente cuando el boro se añade al medio de cultivo. ROBERTSON y LOUGHMAN (1974), POLLARD y col. (1977) y PARR y LOUGHMAN (1983) muestran que en dichas condiciones de boro se inhibe la absorción de fosfato, Cl^- y Rb^+ , revirtiendo el efecto al adicionar boro al medio. Recientemente, GOLBACH (1985), en raíces de girasol y cultivos de células de zanahoria en condiciones deficientes de boro, concluye que la inhibición del eflujo de fosfato y glucosa es mucho más marcada que la absorción. A este respecto, ROTH-BEJERANO e ITAI (1981) mostraron que el boro inducía la apertura estomática en epidermis de *Commelina communis* a través de un estímulo del influjo o eflujo de potasio de las células guardas.

En conexión con el movimiento transmembranario de cationes, es conocido el papel fundamental que juegan las ATPasas de membranas. POLLARD y col. (1977) observaron una reducción de la actividad ATPásica de vesículas microsomales de raíces boro-deficientes, la cual es restaurada casi completamente al tratar con boro. Estos autores postularon que el efecto inhibitor era debido, más que a una acción directa del boro sobre el enzima, a la alteración de la configuración de la membrana. Ello coincide con los resultados de GOLBACH (1985), que demostró que ATPasas preparadas a partir de medios sin boro no se afectan con concentraciones crecientes del elemento *in vitro*.

Similares explicaciones han sido dadas para las alteraciones observadas en la actividad de otros enzimas ligados a membranas, como la RNasa (DAVE y KANNAN, 1980) y enzimas relacionados con la incorporación de ácido orótico a fibras de celulosa (PILBEAM y KIRKBY, 1983).

Estudios de carácter electroquímico apoyan también la hipótesis de un efecto del boro a nivel de las membranas. VOROB'EV y PELKANOV (1973) mostraron en *Nitella symcarpa* una hiperpolarización de la membrana

plasmática en presencia de K^+ y una despolarización en presencia de Na^+ , inducidas por el boro, lo que les llevó a sugerir la alteración por este micronutriente de la permeabilidad selectiva al Na^+/K^+ . En hipocotilos de *Vigna radiata* deficientes en boro, TANADA (1974, 1978, 1982) comprobó una alteración del potencial de membrana generado por estímulos luminosos (luz roja) y gravitatorios, concluyendo que el boro es requerido para estabilizar la carga electrostática positiva generada en la membrana plasmática por acción del fitocromo y la gravedad.

Teniendo en cuenta que concentraciones en exceso de auxinas y fenoles, inducidas por deficiencia en boro, pueden también afectar al transporte de iones, se postuló que dichas sustancias podrían causar directamente las alteraciones relativas a este proceso (GLASS, 1973; ROBERTSON y LOUGHMAN, 1974). Sin embargo, se pudo demostrar que la aparición rápida de una reducción del transporte de iones por deficiencia de boro no se corresponde en el tiempo con un aumento de la concentración de estas sustancias (PARR y LOUGHMAN, 1983). Asimismo, la adición de concentraciones altas de auxinas no reproducía los síntomas típicos de boro-deficiencia (HIRSCH y col. 1982).

Desde otra perspectiva, los estudios a nivel ultraestructural han apoyado la afirmación de que una nutrición anormal de boro conduce tempranamente a la pérdida de la integridad de las membranas (HERICH y HUDAK, 1977; HIRSCH y TORREY, 1980). En relación a este hecho, se pudo observar que meristemas de plantas deficientes peseían bajos contenidos de fosfolípidos (SHKOL'NIK y KOPMAN, 1970).

Por otra parte, estudios de tipo analítico mostraron elevadas concentraciones de boro en membranas de protoplastos (TANADA, 1983).

Los efectos descritos, unido a la conocida interacción boro-calcio, elemento esencial para el mantenimiento de la integridad de las membranas, condujo a numerosos investigadores a postular la hipótesis de un posible papel del boro en el transporte de nutrientes en la célula. No obstante, es cuestionable, por el momento, si el efecto del boro sobre la membrana es directo o indirecto. Investigaciones futuras a nivel físico-químico y bioquímico permitirán arrojar nueva luz sobre tan importante problema.

1.1.3. Interacción boro-hormonas

Según WAGNER y MICHAEL (1971), la boro-deficiencia conduce a una disminución de la biosíntesis de las citoquininas, pudiendo explicarse la inhibición de la división celular a través de una implicación en el metabolismo del ARN.

Muchos síntomas de la deficiencia en boro son similares a los efectos causados por altas concentraciones de auxinas: inhibición de la elongación de la raíz, cambios en la dirección de la expansión celular de longitudinal a radial, empardecimiento de los ápices y proliferación de raíces laterales (HIRSCH y TORREY, 1980). Como se ha indicado anteriormente, el boro podría actuar sobre el contenido y metabolismo de las auxinas al provocar un incremento de su contenido endógeno. También podría actuar modificando la actividad AIA-oxidasa (SHKOL'NIK, 1974; JARVIS y col. 1983).

Los trabajos que relacionan al boro con las giberelinas son muy escasos, no existiendo hipótesis concretas respecto a su punto de conexión, constituyendo la formación y lignificación de los vasos del xilema, un proceso en el que parecen interaccionar estas hormonas (SKOK, 1968). Sin embargo, es en semillas en germinación donde estas hormonas tienen un papel regulador más importante. De aquí que se haya relacionado la función de las giberelinas con la activación de enzimas ya preexistentes, los cuales están compartimentados, o inactivados, por hallarse ligados a membranas, actuación que podría ser clave, si se demostrara, para comprender las interacciones del boro con las giberelinas.

1.1.4. Boro y respiración

Existe la opinión generalizada de que en tejidos deficientes en boro tiene lugar un incremento de la respiración; sin embargo, cuando los síntomas de boro-deficiencia se hacen más patentes tiene lugar una disminución de este proceso respecto al tejido control. SHKOL'NIK (1974) sugirió que ello podría ser debido a un mayor flujo de sustrato metabolizable hacia la ruta de las pentosas fosfato en detrimento de la glucólisis. SMYTH y DUGGER (1981), trabajando con diatomeas en medios sin

boro, observaron un aumento de la respiración y un incremento del flujo de sustrato respiratorio a través de la ruta de las pentosas fosfato, concluyendo que estos hechos eran más bien síntomas secundarios de la deficiencia en boro. En este sentido, existen algunas indicaciones previas donde se indica que el aumento de la respiración en mitocondrias aisladas de tejidos boro-deficientes puede derivar del desacoplamiento entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (TIMASHOV, 1968). En un trabajo posterior, TIMASHOV (1970) volvió a sugerir con mayor precisión que la deficiencia en boro puede provocar un incremento del transporte electrónico a través de una vía citocrómica resistente al cianuro.

El incremento de la respiración es un proceso metabólico característico durante el crecimiento y desarrollo de los órganos de reserva (frutos, cotiledones, tubérculos), y particularmente, en la senescencia de los tejidos (SATLER y THIMANN, 1983; WULSTER y col. 1984; FRENKEL, 1984), habiéndose sido investigado el papel del etileno en la estimulación de la misma (BIALE, 1960). Dichos estudios indican una correlación entre la sensibilidad al etileno y la resistencia a la inhibición de la respiración por cianuro. SOLOMOS y LATIES (1976a) mostraron que el etileno estimulaba la respiración al desviar el flujo de electrones en la cadena respiratoria, desde el sistema citocrómico convencional a una vía resistente al cianuro, sugiriendo que para que el etileno estimule la respiración, debe de estar presente la capacidad para la respiración cianuro-resistente (SOLOMOS y LATIES, 1976b). La existencia de una respiración cianuro-resistente, respiración alternativa, parece ser un fenómeno generalizado en vegetales (HENRY y NINS, 1975).

Actualmente, ha quedado establecido que este proceso, de origen mitocondrial, resulta de una derivación del flujo de electrones de la ruta citocrómica clásica, a nivel de ubiquinona, hacia una oxidasa alternativa, en la que el O_2 es el último aceptor, implicando la existencia de un solo punto de fosforilación para la formación de ATP (DAY y col. 1980; FRENKEL, 1984). Aunque la naturaleza de esta oxidasa alternativa no ha sido identificada aún, sí es conocida su inhibición por los ácidos hidroxámicos (por ej. SHAM) y su insensibilidad al cianuro (SCHOMBAUM y col. 1971). En este sentido, algunos autores han asociado la actividad lipoxigenasa a la oxidasa alternativa, en base al mismo comportamiento frente a inhibidores como el

SHAM y propilgalato, entre otros, y a su insensibilidad al cianuro (GOLDSTEIN y col. 1980). Sin embargo, MILLER y OBENDORF (1981) descartan esta relación, al mostrar que el disulfiram inhibía específicamente la respiración alternativa sin afectar a la actividad lipoxigenasa.

También se ha postulado la necesidad de la integridad o estabilización de la membrana mitocondrial, y de una dependencia de la síntesis de fosfolípidos, para la operatividad de la ruta alternativa, habiéndose sugerido que la presencia de un alto contenido de triacilgliceroles en el tejido cianuro-resistente, parece conferir un papel protector contra la degradación de fosfolípidos y galactolípidos de membrana (WARING y LATIES, 1977; THEOLOGIS y LATIES, 1980). Contrariamente, JAMES y SPENCER (1979) y MOROHASHI y MATSUSHIMA (1983) observan una máxima capacidad respiratoria cianuro-resistente cuando la degradación de la estructura y disminución de las actividades enzimáticas mitocondriales se hacen patentes. Recientemente, MAESHIMA y col. (1984) han mostrado en raíz de batata, que una deficiencia de fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial facilita la operatividad de la ruta alternativa.

A pesar de su amplia distribución en la célula vegetal, su papel fisiológico es aún incierto. Así, se ha especulado con su participación en la termogénesis, maduración de frutos, germinación de semillas, oxidación de NADH, transporte de iones y osmorregulación (LAMBERS, 1980). Dada la escasa capacidad fosforilante de este proceso, este mismo autor le confiere en raíces, un posible papel en la oxidación de azúcares translocados en exceso, sirviendo de esta forma como un proceso disipador de energía (LAMBERS, 1982).

En 1984, ROMANI, en una visión integrada de una serie de procesos en frutos en periodos de postrecolección, como respiración, formación de etileno y senescencia, postula que las células de estos órganos son homeoestáticos, es decir, que gran parte de los cambios fisiológicos que tienen lugar durante la senescencia tienden a compensar los stresses que se desencadenan con la senescencia y el etileno. Así, teniendo en cuenta que la maduración como tal no requiere cantidades adicionales de energía, el incremento respiratorio (la mayor parte cianuro-resistente) observado a lo largo de la misma, podría derivar de una respuesta homeostática o

compensatoria al stress, durante los primeros estadios de la senescencia, la cual disminuye a lo largo de la senescencia avanzada.

1.1.5. Boro y metabolismo lipídico

Dada la enorme importancia de los componentes lipídicos en el desarrollo y diferenciación vegetal y teniendo en cuenta los escasos estudios llevados a cabo sobre los efectos de los elementos minerales en el metabolismo de dichos compuestos estructurales y de reserva, prácticamente inexistentes en el caso del boro, cualquier modificación en los procesos de biosíntesis o degradación de estas moléculas inducida por este micronutriente, permitirá definir posibles acciones del mismo sobre dichos constituyentes celulares. De aquí, que un aspecto fundamental del presente trabajo haya sido la determinación del efecto del boro sobre la composición lipídica y la actividad de enzimas relacionados con procesos lipídicos y lipogénicos que se establecen tanto a nivel del tejido entero, como en membranas microsomales de raíz y cotiledones de plántulas de girasol.

1.1.5.1. Metabolismo de lípidos en semillas oleaginosas

Durante la germinación de las semillas tienen lugar importantes cambios metabólicos y estructurales que van a culminar con el establecimiento de una joven planta con capacidad de asumir una existencia autotrófica. Para ello, las semillas disponen de tejidos especializados en el almacenamiento de sustancias de reserva, elaboradas en el proceso de maduración, las cuales son utilizadas durante el desarrollo postgerminativo para satisfacer los requerimientos energéticos del crecimiento celular.

Las semillas oleaginosas acumulan durante su formación gran cantidad de lípidos, llegando a constituir hasta un 40 % de su peso fresco. Durante el crecimiento postgerminativo, la mayor parte de esta reserva lipídica es transformada en azúcares, principalmente sacarosa, moléculas éstas que se transportan al embrión para llevar a cabo el desarrollo de la nueva plántula (BEEVERS, 1969).

Al mismo tiempo que una degradación de lípidos, tiene lugar en cotiledones una síntesis de estas moléculas para el renovamiento y

formación de las estructuras celulares. Sin embargo, es a nivel de tejidos como la raíz, en pleno proceso de crecimiento, donde la biosíntesis lipídica alcanza una mayor intensidad en función de la gran actividad formadora de nuevas estructuras. En los esquemas de la figura 2 y 3 se describen los aspectos más importantes relacionados con el metabolismo lipídico y la compartimentación de estas rutas en plantas superiores.

a. Degradación de lípidos

En microorganismos y plantas superiores, la transformación de lípidos en azúcares se establece por una ruta metabólica inexistente en mamíferos (BEEVERS, 1980), la cual incluye: hidrólisis de los triglicéridos en sus constituyentes acílicos; β -oxidación de los ácidos grasos a acetil-CoA; transformación del acetil-CoA en succinato o malato; y formación final de sacarosa. Todas estas transformaciones presentan una compleja compartimentación en la que participan, al menos, cuatro estructuras subcelulares: cuerpo graso y/o esferosoma, glioxisoma, mitocondria y citosol (Fig. 4).

La elucidación de la secuencia de reacciones de la conversión de lípidos en azúcares, así como la formulación del ciclo del glioxilato en plantas fué posible gracias a los trabajos de KORNBERG y BEEVERS (1957) en endospermo de ricino, muy poco después de que KORNBERG y KREBS (1957) describieran, por vez primera, el ciclo del glioxilato en microorganismos. Posteriormente, LONGO y LONGO (1970), NEWMAN y BRIGGS (1976) y BEEVERS (1980) pusieron de manifiesto la validez de dicho modelo de reacciones para diversos orígenes vegetales que acumulan lípidos como reserva energética.

a.1. Hidrólisis de los triglicéridos

Los triglicéridos se acumulan en los cuerpos grasos durante la maduración de las semillas (WANNER y THEIMER, 1978). Posteriormente son hidrolizados por acción de las lipasas en ácidos grasos y glicerol a lo largo del proceso germinativo y desarrollo postgerminativo (MAZLIAK y TCHANG, 1983).

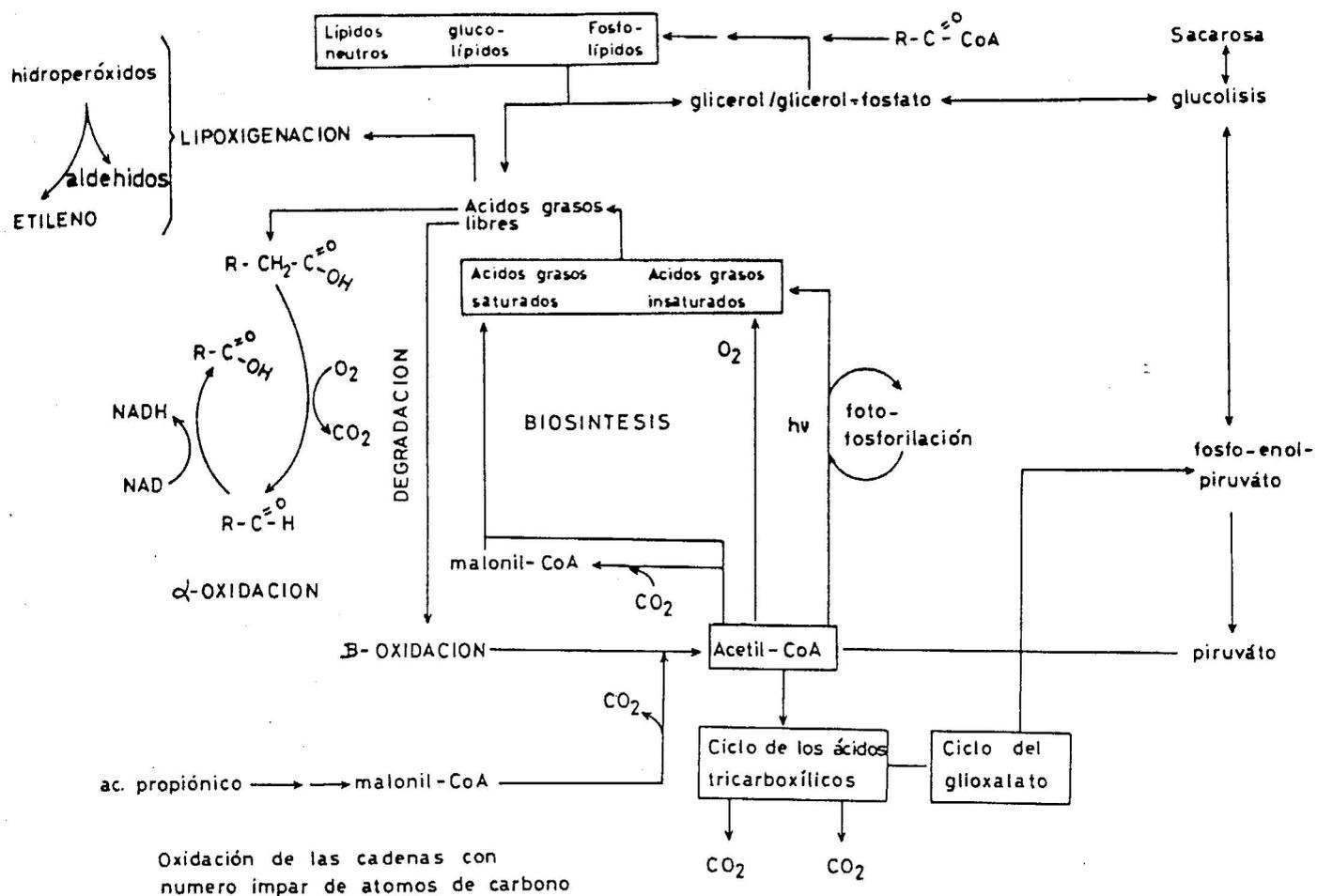


Figura 2. Metabolismo de lípidos en plantas superiores (modificación del esquema presentado por STUMPF (1962)).

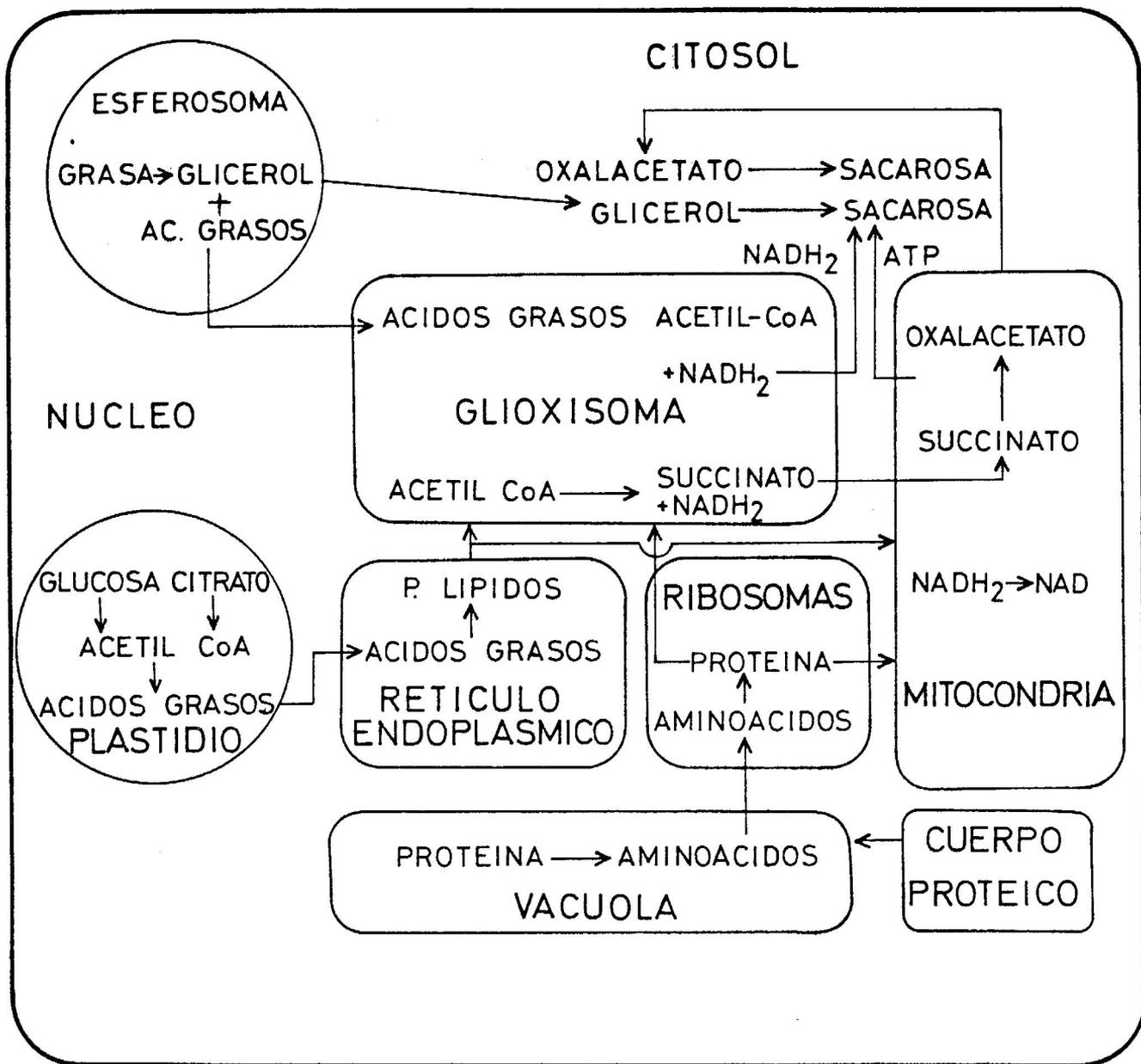


Figura 3. Compartimentación del metabolismo de lípidos y otras reservas en semillas, durante la germinación, según BEEVERS (1982).

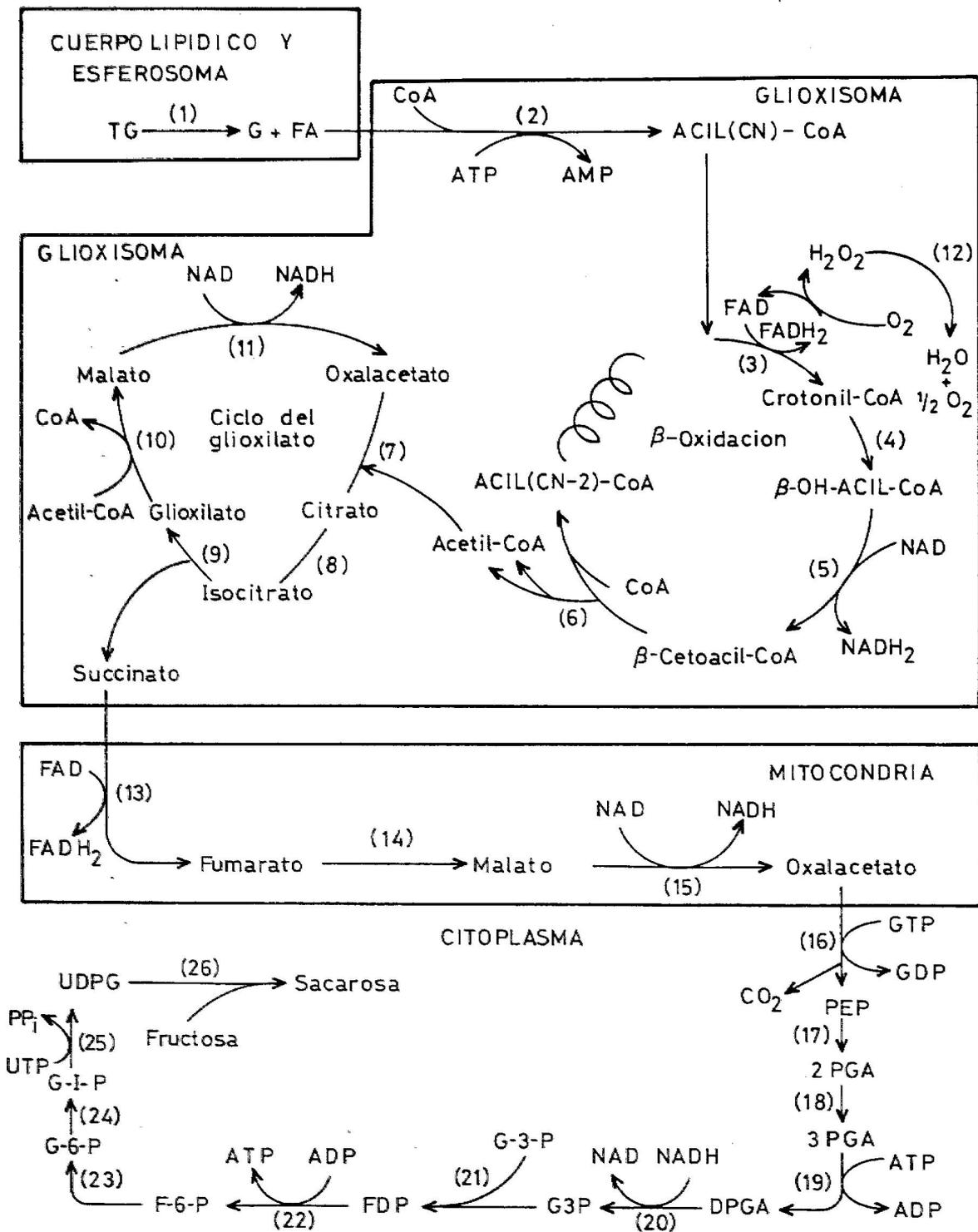


Figura 4. Compartimentación de los procesos de degradación de lípidos y su conversión en sacarosa durante la germinación de semillas oleaginosas. 1, Lipasa; 2, Acil-CoA sintetasa; 3, Acil-CoA oxidasa; 4, Hidratasa; 5, β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; 6, β -cetoacil-CoA tiolasa; 7, Citrato sintasa; 8, Aconitasa; 9, Isocitrato liasa; 10, Malato sintasa; 11, Malato deshidrogenasa; 12, Catalasa; 13, Succinato deshidrogenasa; 14, Fumarasa; 15, Malato deshidrogenasa; 16, Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; 17, Enolasa; 18, Fosfogliceromutasa; 19, fosfoglicerato quinasa; 20, Glicerinaldehído-3P deshidrogenasa; 21, Aldolasa; 22, Fosfofructoquinasa; 23, Fosfohexoisomerasa; 24, Fosfoglucomutasa; 25, UDPG pirofosforilasa; 26, Sacarosa sintetasa; T6, triglicérido; G, glicerol; FA, ácido graso.

De todas las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de lípidos, quizás sea el mecanismo de acción de las lipasas el peor conocido. La dificultad de trabajar con sustratos poco hidrosolubles, así como el hecho de que esta actividad enzimática se haya venido determinando con sustratos no naturales, han contribuido a aumentar la confusión en el conocimiento que se tiene sobre ellas. En este sentido, se considera como verdadera lipasa, triacilglicerol hidrolasa, aquella que utiliza triacilglicerol como sustrato, actuando sólo en la interfase agua-aceite (GALLIARD, 1980).

Las lipasas han sido aisladas de diferentes plantas oleaginosas, habiendo sido descritas algunas de sus propiedades (ORY, 1969; HUANG, 1981; LIN y col. 1982, 1983). Además de una lipasa ácida (pH óptimo entre 4.0 y 5.0), existe una lipasa alcalina en endospermo y cotiledones de semillas oleaginosas (pH óptimo entre 8.0 y 9.0), la cual presenta un máximo de actividad al cuarto día de germinación, coincidiendo con un aumento en la degradación de la reserva lipídica (ORY, 1969; MUTO y BEEVERS, 1974; HUANG y MOREAU, 1978). La ubicación de estas enzimas es controvertida, habiéndose asociado su actividad a las membranas de esferosomas y glioxisomas (WANNER y THEIMER, 1978; LIN y col. 1982, 1983). En cuanto al control fisiológico de dicha actividad hidrolítica, hormonas como el ácido giberélico y el ácido indolacético están implicadas en el mismo (TAVENER y LAIDMAN, 1972; MARRIOTTE y NORTHCOTE, 1975).

a.2. Conversión de ácidos grasos en succinato

Los ácidos grasos hidrolizados no se acumulan en la célula, debiendo constituir su utilización un proceso perfectamente controlado del cual no se conoce su regulación. La ruta gluconeogénica comienza con la conversión de los ácidos grasos en acil-CoA y continúa con la β -oxidación de éstos para rendir acetil-CoA (Fig. 3), siendo paso crucial de la gluconeogénesis en semillas oleaginosas, la conversión neta de 2 moles de acetil-CoA en succinato en el ciclo del glioxilato, gracias a la participación esencial de los enzimas isocitrato liasa (E.C. 4.1.3.1.) y malato sintasa (E.C. 4.1.3.2.). En endospermo de ricino, todo el acetato es canalizado hacia el ciclo del

glioxilato, obviándose su oxidación a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) (BEEVERS, 1982).

En 1956, STUMPF y BARBER aportan la primera evidencia de la β -oxidación en plantas. Se creía que el mecanismo de estas reacciones era similar al encontrado en mamíferos, sin embargo, COOPER y BEEVERS (1969) demuestran que la β -oxidación en semillas oleaginosas ocurre mayoritariamente en el glioxisoma y no en la mitocondria. Posteriormente, GERHARDT (1981, 1983) y MACEY y STUMPF (1983) pusieron de manifiesto la localización exclusivamente peroxisomal en tejidos fotosintéticos y en tejidos no grasos. Recientemente, se ha descrito un proceso de β -oxidación en mitocondrias de guisante, muy similar al de mamíferos, en el que parece funcionar un sistema transportador de ácidos grasos, constituido por una carnitina aciltransferasa de larga cadena, y un mecanismo oxidativo de palmitilcarnitina y palmitil-CoA por acción de una acil-CoA deshidrogenasa (WOOD y col. 1984). No obstante, desde el punto de vista funcional, cabría esperar un sistema mitocondrial de oxidación de ácidos grasos a acetil-CoA como el de mitocondrias de hígado (MACEY, 1983). En este sentido, WOOD y col. (1986) y BURGUESS y THOMAS (1986) consideran que la actividad β -oxidativa de mitocondrias sólo se manifiesta al romper la membrana interna, sugiriendo que en este proceso se forma un *pool* de acetil-CoA, diferenciado del glioxisomal, para la generación de ATP y para llevar a cabo procesos de síntesis en los plastidios.

La β -oxidación glioxisomal es diferente a la operante en mamíferos (Fig. 4). La activación del ácido graso a acil-CoA por medio de la acil-CoA sintetasa se produce en este orgánulo (COOPER y BEEVERS, 1969). El FAD reducido en el primer paso deshidrogenante es oxidado por una flavinooxidasa produciendo H_2O_2 , que es rápidamente descompuesta por la catalasa. El NADH producido en el segundo paso deshidrogenante, no es oxidado en el glioxisoma debido a la falta de un sistema convencional de transporte de electrones (BREIDENBACH y BEEVERS, 1967), sino que es transferido a la mitocondria para su posterior oxidación y formación de ATP por la lanzadera del malato, en el que se hayan implicados enzimas como la malato deshidrogenasa y la glutamato oxalacetato aminotransferasa (METTLER y BEEVERS, 1980; MACEY, 1983).

La conversión de acetyl-CoA en succinato, o alternativamente en malato, es independiente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT). Aunque se había sugerido que el ciclo del glioxilato ocurre a nivel mitocondrial, dada la existencia de enzimas comunes a ambos ciclos, sin embargo, pudo comprobarse en endospermo de ricino que los enzimas isocitrato liasa y malato sintasa, claves del ciclo del glioxilato, no existen en la mitocondria (BREIDENBACH y col. 1968). En este sentido, mediante observación al microscopio electrónico, pudo ponerse de manifiesto la existencia de un orgánulo que aparecía en estrecho contacto con los cuerpos lipídicos, caracterizado por tener una membrana simple, una matriz floculenta o finamente granular, sin ningún tipo de membranas internas, con actividades enzimáticas características (catalasa, uricasa, glicolato oxidasa) e inexistencia de ADN y ribosomas, al que se denominó glioxisoma (BEEVERS, 1979). Esta diferente compartimentación permite operar al ciclo del glioxilato independientemente del CAT, eliminando la competencia a nivel del isocitrato por parte del enzima isocitrato liasa (ciclo del glioxilato) e isocitrato deshidrogenasa (CAT) (BEEVERS, 1980).

En cuanto a la ontogenia de los glioxisomas ha quedado establecido que éstos se forman a partir del retículo endoplasmático durante la maduración de la semilla (TRELEASE, 1984; FUSSEDER y THEIMER, 1984). Sin embargo, tanto en este periodo como durante la imbibición, los enzimas glioxisomales muestran una baja actividad, aumentando durante la germinación (KUNCE y col. 1984). Para estos autores, un incremento tal es debido a una síntesis *de novo* de proteínas a nivel de polirribosomas libres, proteínas que posteriormente son incorporadas a los glioxisomas preformados. Estos resultados han sido ratificados recientemente por GIETT y HOCK (1986). Contrariamente, WANNER y col. (1982) habían indicado que el aumento de la actividad enzimática era debido a un incremento en el número de estos orgánulos.

Cuando la plántula sufre la transición de una nutrición heterótrófica a autótrófica por acción de la luz, las propiedades funcionales de la población de microcuerpos cotiledonares pasa de glioxisomal a ser peroxisomal (GERHARDT, 1978). El mecanismo por el cual se produce esta transición no está inequívocamente resuelto (BEEVERS, 1979), habiéndose propuesto varias hipótesis para explicar la biogénesis de los peroxisomas

(KINDL y LAZAROW, 1982; MAZLIAK y TCHANG, 1983). Trabajos más recientes apoyan la hipótesis que defiende la idea de la diferenciación funcional del glicoxisoma a peroxisoma por acción de la luz (SCHUH y GERHARDT, 1984).

a.3. *Conversión de succinato en sacarosa*

El ATP generado en la mitocondria por la oxidación del succinato glicoxisomal a oxalacetato y el poder reductor producido en el glicoxisoma son utilizados en la ruta inversa de la secuencia glucolítica (BENEDICT y BEEVERS, 1961). Desde esta perspectiva, la coexistencia de la ruta glucolítica y gluconeogénica planteaba el problema de su ubicación y regulación. A este respecto, aunque KOBR y BEEVERS (1968) detectaron la existencia de enzimas gluconeogénicos a nivel plastidial (lo que evitaba el solapamiento de ambas rutas), sin embargo, NISHIMURA y BEEVERS (1979) comprobaron una baja actividad de estos enzimas en plastidios. Posteriormente, DENNIS y MIERNYCK (1982) sugirieron que la gluconeogénesis y la glucólisis ocurren juntas en el citosol, lo cual supondría la existencia de ciclos fútiles a nivel de OAA - PEP y F6P - F1,6DP. Estos autores, en vista de la falta de compartimentación, también indicaron que dichas reacciones pueden ser reguladas a nivel de efector-producto-sustrato-enzima, excepto para los pasos catalizados por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fosfofructoquinasa que son enzimas altamente regulados.

a.4. *Control de la movilización de los lípidos de reserva*

La movilización lipídica y el crecimiento de la plántula parecen ser procesos sincronizados, lo que sugiere una influencia directa del embrión sobre la movilización de las reservas. En este sentido, existen dos hipótesis alternativas para explicar cómo el embrión controla dicha movilización. La primera implica la producción de hormonas por el eje embrionario, capaces de estimular las actividades de los enzimas hidrolíticos en los órganos de reserva (STREET y OPIK, 1984). La segunda implica una continua relación fuente-sumidero, entre el órgano de reserva y el eje embrionario durante el desarrollo de la plántula (DAVIS y SLACK, 1981). Así, el embrión ejercería su efecto promotor utilizando los productos solubles de la movilización (azúcares), al tiempo que la acumulación de

azúcares en los cotiledones podría producir la inhibición de la movilización por producto final. En aparente contradicción con esta segunda hipótesis, recientemente, PAUL y col. (1985) han observado, en cotiledones aislados de calabaza, que el tratamiento exógeno de citoquininas acelera la degradación de los lípidos de reserva y su conversión a carbohidratos.

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que aunque el efecto sumidero parece ser el factor más importante en el control de la movilización de las reservas, sin embargo, se hace necesaria la obtención de nuevos datos que clarifiquen el control de este proceso (TRELEASE y DOMAN, 1984).

a.5. *Lipoxigenasa*

Paralelamente a las vías degradativas que se instauran en cotiledones durante la germinación de semillas oleaginosas, tienen lugar otros procesos lipídicos que provocan la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados por vías oxidativas alternativas. En este contexto, se sitúa el enzima lipoxigenasa (linoleato: oxígeno óxidoreductasa. E.C. 1.13.11.12. - *LOX*-) que cataliza la oxigenación de los ácidos grasos de estructura *cis,cis* 1-4, pentadieno a sus derivados hidroperóxidos, siendo sus principales sustratos los ácidos linoléico y linolénico (ERIKSSON, 1975), (Fig. 5). Además de la formación de hidroperóxidos, las *LOXs* catalizan reacciones de cooxidación ocasionando la pérdida de color de pigmentos (clorofilas, carotenoides, etc.) y la modificación de grupos funcionales de las proteínas (GALLIARD y CHAN, 1980).

A pesar de ser uno de los primeros enzimas cristalizados (THEORELL y col. 1947), su papel fisiológico es aún objeto de especulación. En los últimos años, su estudio ha tomado un gran interés en el campo de la tecnología de alimentos, por su implicación en la producción de sustancias que confieren a éstos características organolépticas indeseables (ESKIN y col. 1977; MATOBA y col. 1985). En este sentido, es fundamental la vía de producción de los diversos compuestos derivados de la descomposición química y/o enzimática de los hidroperóxidos (GALLIARD y CHAN, 1980; VICK y ZIMMERMAN, 1982; MORRISON, 1984; FRANKEL, 1984; MATOBA y col. 1985).

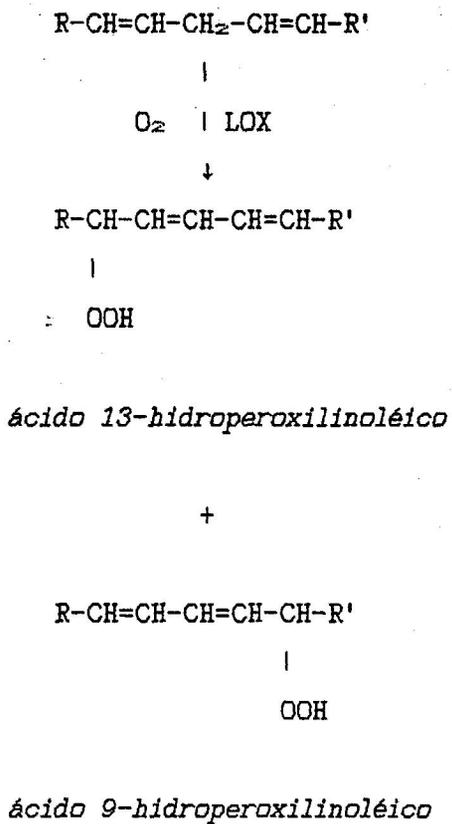


Figura 5.- Formación de hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados en plantas por acción del enzima lipoxigenasa.

Las LOXs son enzimas ampliamente distribuidas en diferentes órganos de plantas superiores (ESKIN y col. 1977; GALLIARD y CHAN, 1980; SEKIYA y col. 1983; LULAI y col. 1981; VERNOOY-GERRITSEN y col. 1983). Sin embargo, son poco precisos los datos acerca de su localización subcelular, habiéndose encontrado actividad LOX en la fracción soluble (GALLIARD, 1978), en microsomas (WARDALE y GALLIARD, 1975), plastidios (DOUILLARD y BERGERON, 1981), mitocondrias (DUPONT, 1981) y en vacuolas (WARDALE, 1980).

El enzima, aislado y caracterizado de numerosas fuentes vegetales, muestra más de una forma isoenzimática diferente en cuanto a la especificidad del sustrato, pH óptimo (entre 5.5 y 8.0), comportamiento cinético, efecto de inhibidores, productos formados y participación en la generación de metabolitos secundarios. (GALLIARD y CHAN, 1980; MATOBA y col. 1985; KLEIN y col. 1985). En semillas de soja se conocen al menos tres isoenzimas (GALLIARD y CHAN, 1980) (Tabla 1), mostrando el tipo 2 una gran similitud, respecto a sus propiedades, con los isoenzimas encontrados en otros orígenes. La mayoría se componen de una cadena polipeptídica simple, con un peso molecular entre 60.000 y 100.000 daltons y con un átomo de hierro no hémico por molécula, esencial para su función catalítica (VLIEGENHARTH y col. 1982).

El pH, temperatura, cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}), ácidos grasos *trans*-insaturados, ácidos grasos α -bromados, alcoholes grasos y los ácidos grasos de corta cadena han mostrado tener capacidad inhibidora de estos enzimas (MITSUDA y col. 1967; DOWNING y col. 1972; ESKIN y col. 1977). Estos agentes parecen actuar, más que directamente sobre el enzima, modificando la concentración micelar crítica del sustrato (GALPIN y ALLEN, 1977; DOUILLARD y BERGERON, 1979). Otros agentes antioxidantes y sequestradores de radicales libres como fenoles (quercetina), ácidos hidroxámicos (SHAM), e incluso la clorofila y pigmentos cooxidados por acción del propio enzima, han sido también descritos como inhibidores, al impedir la formación de radicales libres producidos durante el proceso de lipoxigenación (ESKIN y col. 1977; COHEN y col. 1984; TAKAHAMA, 1985). Agentes quelantes de hierro también inactivan el enzima en presencia de tioles (PISTORIUS y AXELROD, 1984). Recientemente, se ha podido demostrar la existencia de restos de triptófano, esenciales para la actividad catalítica de la LOX-1 de soja (KLEIN y col. 1985).

Tabla 1. Principales propiedades de lipoxigenasas de soja, según GALLIARD y CHAN, (1980).

	LOX-1	LOX-2
Peso molecular	100.000	100.000
pH óptimo	9.0	6.5
Punto isoelectrico	5.5-5.7	5.8-6.2
Razón 9/13 hidroperóxido	5:95	50:50
Contenido de hierro	1 atm/mol	1 atm/mol
Actividad cooxidativa de carotenoides	baja	alta

La actuación inicial de la LOX es específica del grupo metilénico central del sistema *cis,cis,1-4* pentadieno. La separación de un átomo de hidrógeno y posterior oxigenación dá lugar a un radical peroxi, que por la adición de un átomo de hidrógeno, origina el hidroperóxido de ácido graso, como mezcla isomérica de 9 y 13 hidroperoxiderivados (DE GROOT y col. 1975; PISTORIUS y col. 1976). También puede producirse la autooxidación por radicales libres y ataque por oxígeno molecular singlete (FRANKEL, 1984). Durante el proceso catalítico, el enzima pasa por dos estados diferenciados según la forma oxidada del hierro (Fe (II) y Fe (III)): en una, catalíticamente más pobre, el enzima, en el estado Fe (II), activaría el O_2 a $O_2^{\cdot -}$ pasando a la forma Fe (III) (DE GROOT y col. 1975; VLIEGENTHART y VELDINK, 1977; VLIEGENTHART y col.(1982). Esta reacción catalítica es lenta, sin embargo, tan pronto como el hidroperóxido es formado (Fe (II)), parte del enzima pasa el hierro a Fe (III), activándose en este caso el sustrato, lo cual dá lugar a un proceso catalítico mucho más eficiente. La cantidad de enzima en estado Fe (II) y Fe(III) es dependiente de la concentración de sustrato, hidroperóxido formado y del pH (Fig. 6).

Además de esta reacción aeróbica, la LOX cataliza una reacción anaeróbica en la que el propio hidroperóxido puede ser sustrato del enzima. Esta reacción conduce a la producción de especies reactivas (radicales libres), con un fuerte parecido en el mecanismo de reacción al ciclo Fe (III) de la reacción aeróbica (GARSSEN y col. 1971; VERHAGEN y col. 1978).

A pesar del gran esfuerzo investigador dedicado en los últimos años al estudio de este enzima, continua siendo una incógnita su papel fisiológico en la célula. Durante la germinación, las semillas presentan un máximo de actividad LOX, coincidente con la movilización de las reservas y reorganización de las estructuras celulares (VICK y ZIMMERMAN, 1982; VERNOOY-GERRITSEN y col. 1983). Ello podría sugerir un papel fundamental en el proceso germinativo; no obstante, su amplia distribución y actividad en diversos tejidos hacen difícil una generalización del mismo. Así, se ha propuesto que podría estar implicada en la biosíntesis de ácidos grasos oxigenados presentes en los triacilglicerolos de algunas semillas oleaginosas (MORRIS y MARSHALL, 1966), aunque la escasa presencia de dichos ácidos en plantas hace improbable que éste sea su papel fisiológico

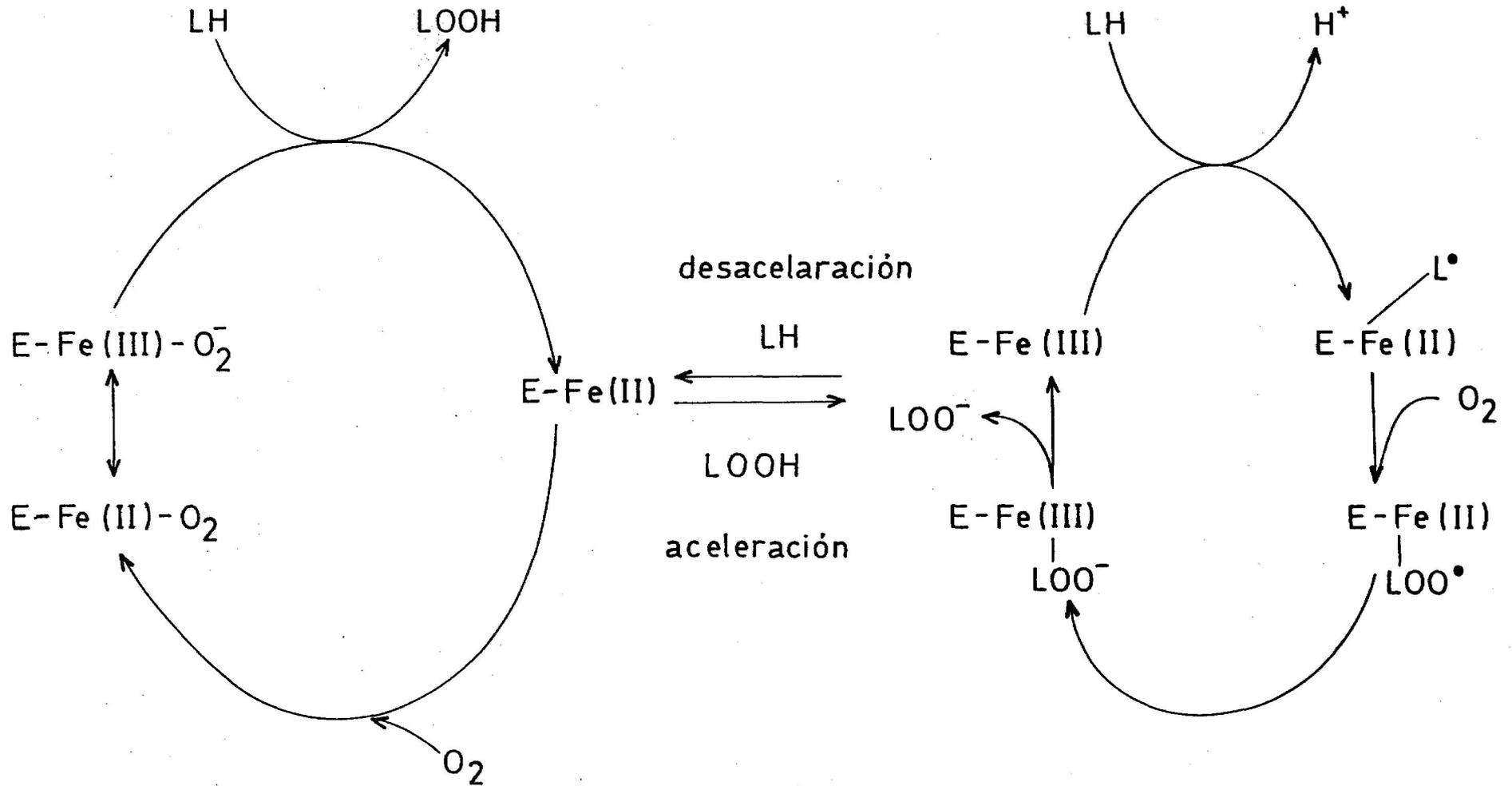


Figura 6. Reacción aeróbica de formación de hidroperóxidos por la LOX a través del ciclo Fe(II) (izquierda) y ciclo Fe(III) (derecha), según VLIAGENTHART y col. (1982).

fundamental. Algunos autores han especulado con la posibilidad de la implicación de la LOX en la respiración alternativa resistente al cianuro (GOLDSTEIN y col. 1980), sin embargo, también ha quedado demostrada la no participación del enzima en este proceso (PETERMAN y SIEDOW, 1983).

Su actividad en la degradación de lípidos de membrana apunta hacia una implicación del enzima en procesos fisiológicos relacionados con las transformaciones de estas estructuras celulares en el desarrollo vegetal. En este sentido, se le ha atribuido un importante papel en la germinación de semillas, maduración de frutos y procesos de stress inducidos por factores ambientales, conectados, todos ellos, con la senescencia de los tejidos. Así, se relaciona con la respuesta fisiológica a la herida (stress mecánico), y con los mecanismos de defensa contra microorganismos, hongos e insectos, en base a su participación en la producción de diversas sustancias con características antibióticas y repelentes (GALLIARD, 1978). La senescencia tanto natural como inducida por diversos tipos de stress ambiental, se caracteriza por la pérdida de la integridad de las membranas (SIMON, 1974), siendo conocido el importante papel promotor que juegan determinadas hormonas vegetales como el etileno (LIEBERMAN, 1979). En este sentido, trabajos recientes indican que la LOX puede participar, directa o indirectamente, en la puesta en marcha del proceso senescente como consecuencia de la peroxidación de las membranas al generarse radicales libres, orgánicos e inorgánicos, que pueden estimular la conversión de ACC a etileno (LEGGE y THOMPSON, 1983; LYNCH y THOMPSON, 1984; KACPERSKA y KUBACKA-ZEBALASKA, 1984; LYNCH y col. 1985), o bien al incrementarse la fase de gel de estas estructuras debido a la peroxidación, lo que conlleva la alteración de la permeabilidad (McKERSIE y THOMPSON, 1979; DHINDSA y col. 1981; PAULS y THOMPSON, 1984).

b. Biosíntesis de lípidos acílicos

Uno de los aspectos más característicos del desarrollo postgerminativo de semillas de plantas oleaginosas es la intensa degradación del material lipídico acumulado en sus órganos de reserva, proceso éste necesario, a su vez, para llevar a cabo, la síntesis de los lípidos, fundamentalmente de membrana, que van a configurar las estructuras celulares de la nueva

planta. Pero al mismo tiempo que en los cotiledones se instauran reacciones lipídicas, en las células radiculares tienen lugar procesos lipídicos centralmente orientados a la formación de membranas: retículo endoplasmático, mitocondrias, etc. De aquí, que los procesos germinativo y postgerminativo se hayan erigido, en gran medida, en sistemas extensamente utilizados en el estudio del metabolismo lipídico en plantas.

En la presente memoria se estudia el contenido lipídico de raíces y cotiledones de plántulas de girasol y, sobre todo, los cambios metabólicos inducidos en dichos constituyentes por el boro.

Numerosos autores han puesto de manifiesto la síntesis de componentes lipídicos durante el crecimiento postgerminativo (HARWOOD y STUMPF, 1970; HARWOOD, 1975; ONISHI y YAMADA, 1980; ICHIHARA y NODA, 1981). Aunque moléculas como sacarosa, glucosa y glicerol han demostrado ser buenos precursores de los lípidos (DENNIS y MIERNYCK, 1982), sin embargo, ha sido el acetato el precursor más extensa y efectivamente utilizado (STUMPF, 1980). Otros compuestos más específicos (colina, etanolamina, etc.) han permitido el estudio de los fosfolípidos, componentes fundamentales de las membranas (MOORE, 1982).

b.1. Biosíntesis de ácidos grasos

Los ácidos grasos, como componentes de fosfolípidos y glucolípidos, conforman la parte central de la barrera hidrofóbica de todas las membranas biológicas. En semillas oleaginosas son constituyentes de los triacilgliceroles, principales formas de almacenamiento de energía.

La síntesis *de novo* de ácidos grasos es un proceso generalizado a todas las células vegetales, estudiado ampliamente en diversos tejidos, particularmente en hojas, semillas en formación y en distintos órganos durante el proceso postgerminativo. Sus mecanismos de biosíntesis son actualmente bien conocidos, gracias a la labor investigadora iniciada en la década de los sesenta por numerosos grupos, entre los que destaca el de STUMPF en California. Según estos autores, la biosíntesis tiene lugar a nivel plastidial (cloroplastos, en tejidos fotosintéticos, y leucoplastos, etioplastos, cromoplastos o simplemente plastidios o proplastidios, en

órganos no fotosintéticos), en los que se sintetiza ácido palmítico y, sobre todo, oléico (DENNIS y MIERNYCK, 1982; STUMPF, 1984; OLHROGGE y KUO, 1984).

De acuerdo con STUMPF (1984), parece claro que la síntesis *de novo* de ácidos grasos en el plastidio resulta de la adición sucesiva de unidades de dos carbonos a una primera unidad de acetil-CoA (previa conversión a acetil-ACP), la cual funciona como grupo cebador, formándose palmitil-ACP, y, posteriormente, estearil-ACP. Todo el conjunto de reacciones es catalizado por un complejo enzimático soluble y dissociable, denominado genéricamente sintetasa de ácidos grasos, el cual requiere como cofactores fundamentales NADH y NADPH (poder reductor) y ACP (proteína portadora de grupos acilos). Posteriormente, la desaturación del estearil-ACP rinde oleil-ACP y oleato, precursor de los ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 2).

En base a que el acetato- ^{14}C ha sido el precursor principalmente utilizado en nuestros experimentos de biosíntesis, en este capítulo de antecedentes, se ha considerado oportuno efectuar un estudio teórico sobre la formación de la molécula de acetil-CoA como primera unidad metabólica en la biosíntesis de ácidos grasos, así como sobre la influencia de la compartimentación celular y del tipo de tejido en dicho proceso.

Las figura 7 y 8 ilustran en sendos esquemas el proceso general de la biosíntesis de ácidos grasos y el origen del poder energético y reductor necesarios para la misma, así como la interrelación subcelular que se establece durante la formación y germinación de la semilla (Fig. 7) y a nivel de la hoja (Fig. 8). En semillas en formación, el acetil-CoA proviene, en último término, de la sacarosa sintetizada en la hoja y transportada por el floema (DENNIS y MIERNYCK, 1982; STUMPF, 1984). La glucosa y fructosa, derivadas de la hidrólisis de la sacarosa por la invertasa, son fosforiladas por la hexoquinasa plastidial a glucosa-6P y fructosa-6P, que posteriormente, son convertidas por los enzimas glucolíticos plastidiales a piruvato, generando ATP y NADH. El NADPH es generado, a su vez, por la ruta de las pentosas fosfato, presente también en el plastidio, siendo convertido el piruvato en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa de este orgánulo (REID y col. 1977).

Durante la germinación, la biosíntesis de ácidos grasos en raíces y cotiledones tiene lugar a partir de la sacarosa generada en el endospermo y

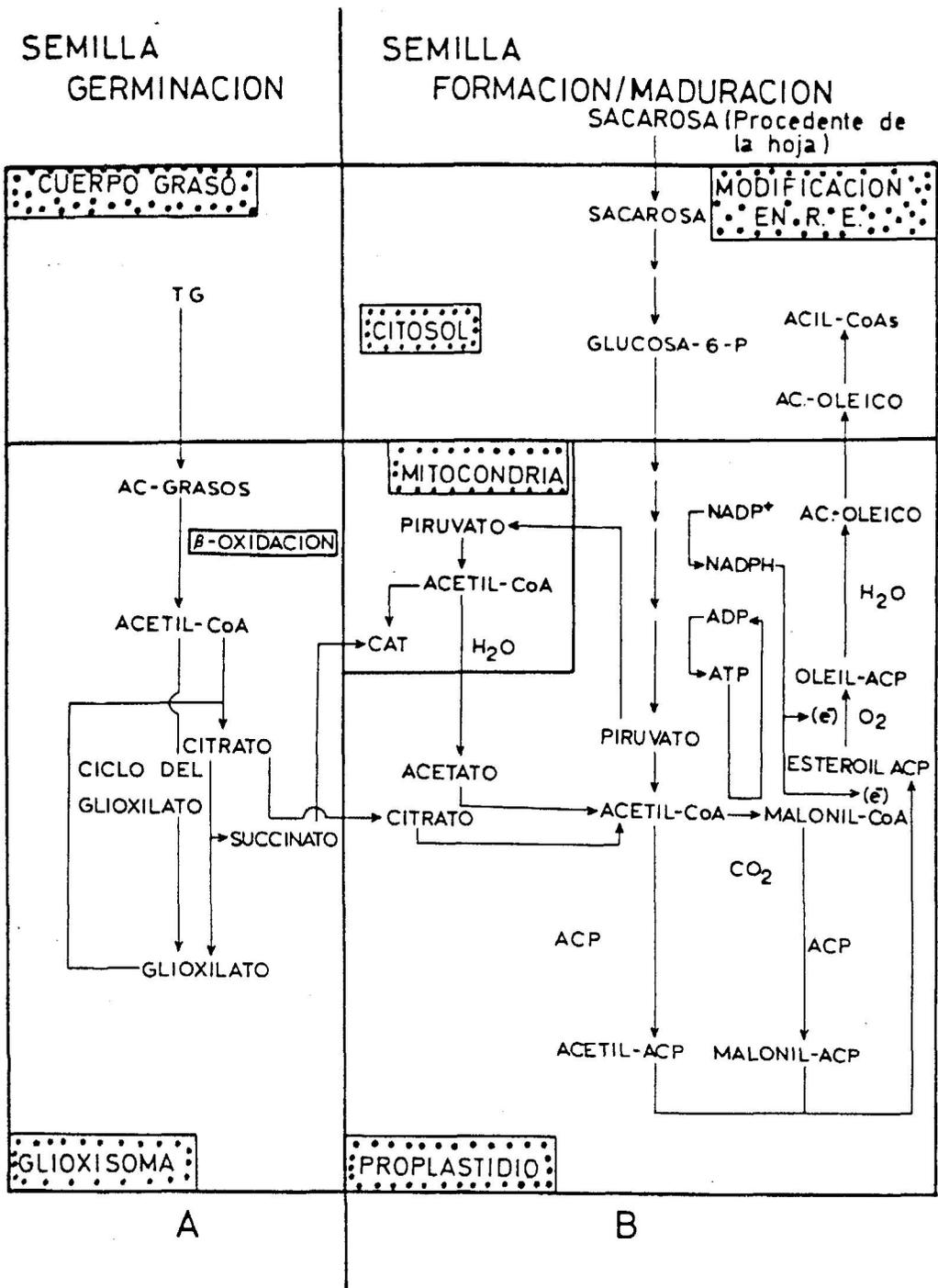


Figura 7. Interrelación de varios compartimentos celulares en la biosíntesis de ácido oléico en semillas, según STUMPF (1984).

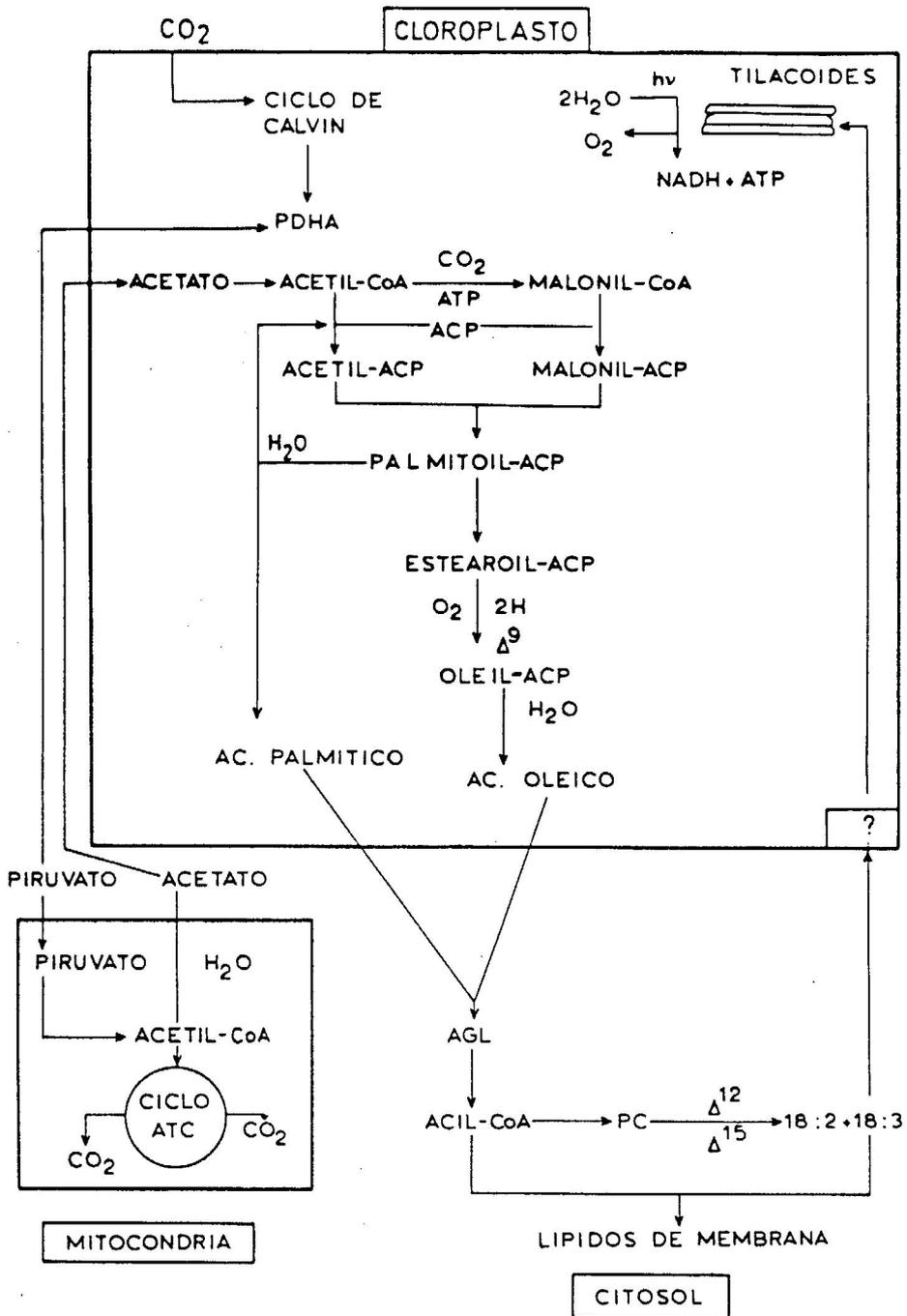


Figura 8. Interrelación de varios compartimentos celulares en la biosíntesis de ácido oléico en hoja, según STUMPF (1984).

Tabla 2. Biosíntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en plantas.

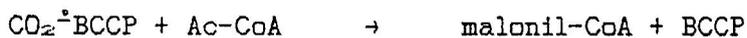
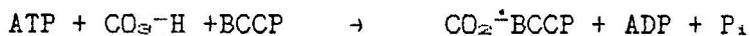
Reacción	Enzima
1, Acetil-CoA + ACP → Acetil-ACP + CoA	Acetil transacilasa
2, Malonil-CoA + ACP → Malonil-ACP + CoA	Malonil transacilasa
3, Acil-ACP _(C2-C14) + Malonil-ACP → β-Cetoacil-ACP _(C4-C16) + CO ₂ + ACP	β-Cetoacil-ACP sintasa I
4, β-Cetoacil-ACP _(C4-C16) + NADPH → β-Hidroxiacil-ACP _(C4-C16) + NADP	β-Cetoacil reductasa
5, β-Hidroxiacil-ACP _(C4-C16) → Trans-enoil-ACP _(C4-C16) + H ₂ O	D-β-Hidroxiacil-ACP-Dehidrasa
6, 2-Enoil-ACP _(C4-C16) + NADH → Acil-ACP _(C4-C16) + NAD ⁺	Enoil-ACP reductasa
7, Palmitil-ACP + Malonil-ACP → β-Cetoestearil-ACP + CO ₂ + ACP	β-Cetoacil-ACP sintetasa II
8, β-Cetoestearil-ACP → Estearil-ACP	Enzimas reacciones 4, 5 y 6
9, Estearil-ACP + NADPH → Oleil-ACP	Estearil-ACP desaturasa
10, Oleil-ACP + H ₂ O → Ac. oléico + ACP	Oleil-ACP hidrolasa
11, Acil-ACP + Glicerol-3-P → 1-Acil-glicerol-3P	Glicerol-3-P aciltransferasa
12, Acil-ACP + 1-Acil-glicerol-3-P → AF	Monoacil-glic-3P transferasa

en los cotiledones (VICK y BEEVERS, 1978), o directamente de la degradación de los triglicéridos de reserva (DONALDSON, 1976; NABORS y col. 1984). Al no poder atravesar la membrana el acetil-CoA, el citrato formado en el ciclo del glioxilato debe ser transportado al plastidio (RAPP y RANDALL, 1980), donde de nuevo se genera acetil-CoA, gracias a la existencia en este orgánulo del enzima ATP-citrato liasa (FRITSCH y BEEVERS, 1979). Recientemente, WOOD y col. 1984, 1986) han mostrado el funcionamiento de un proceso β -oxidativo en mitocondrias de cotiledones de guisante en los primeros días de germinación, lo cual podría suponer la existencia de un sistema generador de acetil-CoA, separado del glioxisoma, y susceptible de ser canalizado hacia el plastidio por medio de una carnitina aciltransferasa mitocondrial (BURGESS y THOMAS, 1986). De esta forma se evitaría la competencia de la ruta gluconeogénica por dicho metabolito. No obstante, es muy poco lo que se conoce acerca de cómo el flujo de carbono es regulado en el contexto del metabolismo celular.

En tejidos fotosintéticos, el piruvato de la mitocondria procedente del CO₂ fijado en el cloroplasto es el inmediato precursor del acetil-CoA (STUMPF y col. 1982). El acetato liberado en la mitocondria por la acetil-CoA hidrolasa es canalizado hacia el cloroplasto a través del citosol (JACOBSON y STUMPF, 1972), donde es convertido en acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa, presente exclusivamente en el estroma cloroplastidial (KUHN y col. 1981).

La acetil-CoA carboxilasa cataliza la carboxilación, dependiente de ATP, de acetil-CoA a malonil-CoA en vegetales (SLABAS y col. 1984):

biotina carboxilasa



Transcarboxilasa

Este paso constituye un importante punto de regulación en la biosíntesis de ácidos grasos, tanto en plastidios como en cloroplastos (STUMPF y col. 1982; SAUER y HEISE, 1983).

La síntesis de ácidos grasos de 18 carbonos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA es totalmente dependiente de la presencia de una proteína (ACP), la cual forma un enlace tioéster con el grupo carboxilo del resto acílico (OLHROGGE y col. 1979; STUMPF, 1980). Esta proteína también participa en la inserción del primer doble enlace en la formación de oleil-ACP (McKEON y STUMPF, 1982), así como en la transferencia de restos acilos al glicerol-3P para formar ácido fosfatídico en el plastidio (FRENTZEN y col. 1983). La mayor parte del oleil-ACP producido en el plastidio es hidrolizado a ácido oléico y ACP, (Tabla 2), siendo el primero exportado y esterificado al coenzima A para constituir los lípidos acílicos en otros compartimentos subcelulares (OLHROGGE y col. 1978).

En tejidos fotosintéticos, el ACP se localiza exclusivamente en cloroplastos, sin embargo, no existe una total unanimidad en cuanto a su localización exclusiva en plastidios, a nivel de tejidos no fotosintéticos (OLHROGGE y KUO, 1984).

Recientemente, OLHROGGE y KUO (1985) han descrito dos isoformas de ACP (I y II), cuya existencia podría venir justificada por su participación diferenciada en las reacciones descritas en la tabla 2, sugiriendo que, debido a su distinto grado de reactividad y al ser codificadas por distintos genes, ello podría suponer un mecanismo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos a nivel de ACP, bien para el caso de un renovamiento de los lípidos de membrana, bien para la formación de lípidos de reserva.

Como resultado de las investigaciones realizadas en los últimos años, ha quedado establecido que, en vegetales, el sistema sintetásico de ácidos grasos está constituido por diferentes proteínas dissociables que, como en células procarióticas, pueden ser separadas por procedimientos convencionales de purificación (SHIKAMATA y STUMPF, 1982; HOJ y MIKKELSEN, 1982; STUMPF y col. 1982).

Se conocen con detalle las características y propiedades de los componentes catalíticos de este complejo enzimático de diferentes orígenes vegetales (SLABAS y col. 1984; STUMPF, 1984) (Tabla 2).

En plantas, la longitud de la cadena de ácidos grasos de los lípidos estructurales es poco variable, fundamentalmente de 16 y 18 átomos de carbono; sin embargo, los triglicéridos de reserva muestran una considerable variación (HARWOOD, 1980). En este sentido, la definición precisa de los mecanismos que determinan la longitud de la cadena del ácido graso es actualmente uno de los objetivos fundamentales que se plantea en el estudio de los lípidos vegetales, pudiendo arrojar luz sobre esta importante cuestión el conocimiento detallado de la estructura y funcionalidad del sistema sintetásico. Así, la regulación de la β -cetoacil-ACP sintetasa II, específica en el sistema de elongación de 16 a 18 carbonos, puede jugar un importante papel en la determinación de las cantidades relativas de ácidos grasos de este número de carbonos (SHIKAMATA y STUMPF, 1982; STUMPF, 1984). Asimismo, la especificidad de la estearil-ACP desaturasa es un factor adicional limitante a nivel de la síntesis de ácidos grasos de 18 carbonos (Tabla 2, reacción 9). Tan pronto como el estearil-ACP se forma, es desaturado a oleil-ACP, el cual es rápidamente hidrolizado por la oleil-ACP hidrolasa (tioesterasa) dando ácido oléico libre (SHINE y col. 1976). Debido a la presencia de estas enzimas en el plastidio, donde el nivel de esteárico se mantiene muy bajo, el ácido oléico es el principal ácido graso formado durante el proceso, el cual es exportado a otros compartimentos celulares en forma de oleil-CoA (Figs. 7 y 8).

En semillas, la formación de ácidos grasos de larga cadena a partir de los ácidos grasos de 18 carbonos es catalizada por un sistema elongante ubicado a nivel del retículo endoplasmático que utiliza malonil-CoA y acil-CoA (POLLARD y STUMPF, 1980; LESSIRE y col. 1985).

Numerosos trabajos han contribuido al conocimiento de la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (SLACK y col. 1976; STYMNE y GLAD, 1981; MOREAU y STUMPF, 1982; ROUGHAN y SLACK, 1982; SANCHEZ y STUMPF, 1984; STYMNE y col. 1984; MURPHY y col. 1984, 1985). Según estos autores, el oleato, esterificado en la posición 2 de la FC, es desaturado a linoleil-FC por el sistema oleil-FC desaturasa ubicado a nivel de membranas microsomales, siendo éste dependiente de NADH y oxígeno molecular (Fig. 9).

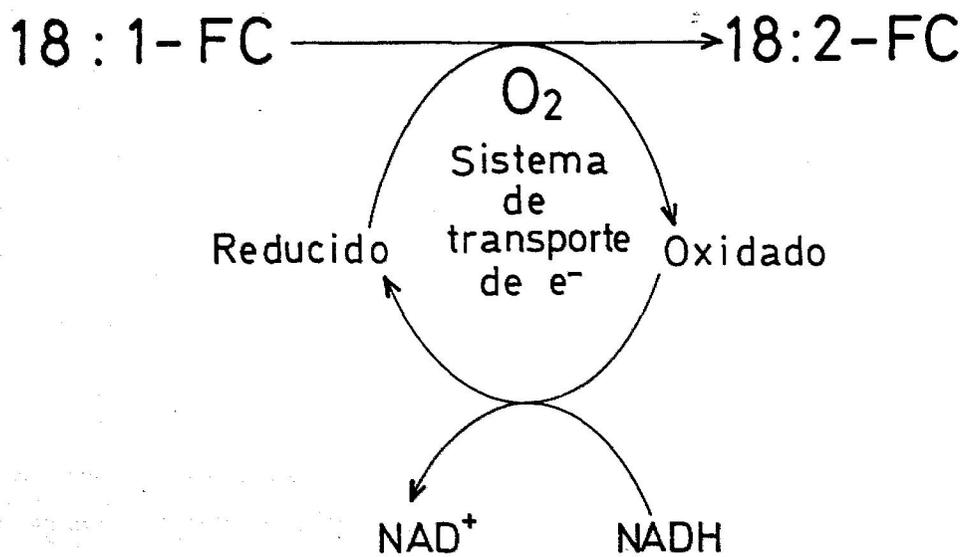


Figura 9. Sistema oleato-FC desaturasa.

Todos los enzimas de membrana implicados en la síntesis del ácido linoléico han sido solubilizados y purificados, excepto la oleil-FC desaturasa que pierde su actividad durante el proceso, quizás por la falta de una adecuada reconstitución del sistema conteniendo los componentes purificados de la cadena de transporte de electrones (MURPHY y col. 1983, 1984). La linoleil-FC formada puede tomar varias direcciones en la célula: ser transportada a otras estructuras membranosas para participar en la formación de diferentes componentes lipídicos, o bien ser desacilada y contribuir el resto acilo, en forma de acil-CoA, como precursor en la formación de otros lípidos (MURPHY y col. 1984; STYMNE y STOBART, 1985). El enzima desaturásico de ácido oléico ha sido implicado en la respuesta de las plantas a factores ambientales. Así, factores tales como luz, temperatura, stress hídrico, contenido de calcio, salinidad, nivel de oxígeno, edad del tejido, etc, dan lugar a cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos del vegetal (QUINN y WILLIAMS, 1978; CITHAREL y col. 1983; HARWOOD, 1984; BONNEROT y MAZLIAK, 1984; KUIPER, 1985).

El ácido linolénico es el ácido graso mayoritario en tejidos fotosintéticos (HARWOOD, 1980), sintetizándose a partir del ácido esteárico via oleato y linoleato (MURPHY y STUMPF, 1979). La introducción del doble enlace en el ácido linoléico para formar linolénico es catalizada por una desaturasa ubicada a nivel plastidial (OHNISHI y YAMADA, 1980; GRECHKIN y col. 1984), siendo el sustrato de la desaturación objeto de controversia. En tejidos no fotosintéticos, se ha implicado al linoleil-FC (ROUGHAN y SLACK, 1982), sin embargo, en tejidos fotosintéticos, el sustrato para la desaturación es el linoleil-MGDG (HEINZ y HARWOOD, 1977; OHNISHI y YAMADA, 1980; MURPHY y col. 1985). La linoleil-FC del retículo endoplasmático es transportada al plastidio donde es convertida en linoleil-MGDG y, posteriormente, desaturada a linolenil-MGDG (OHNISHI y YAMADA, 1982).

Este proceso es influenciado por la luz, como demuestra el dramático incremento en la síntesis de linolénico en cotiledones de pepino durante el enverdecimiento, partiendo de acetato-¹⁴C (MURPHY y STUMPF, 1980). Contrariamente, HAWKE y STUMPF (1980) muestran, tanto en hojas etioladas como verdes de maíz, la secuencia de conversión, oléico → linoléico → linolénico. A este respecto, STUMPF (1984) considera que la actividad oleato

y linoleato desaturasa difieren marcadamente en función del tejido, siendo necesario tener en cuenta el tipo, edad y régimen de condiciones del mismo antes de establecer consideraciones de carácter general

b.2. Biosíntesis de fosfolípidos, glucolípidos y triglicéridos

Los fosfolípidos y glucolípidos influyen profundamente en la actividad celular al regular la permeabilidad a través de su asociación e interacción con las proteínas membranas. Este relevante papel funcional viene determinado estructuralmente por su composición acídica y componentes polares, así como por su distribución asimétrica en el seno de la membrana (MOORE, 1982). La investigación de las rutas de biosíntesis de estos lípidos en vegetales ha tenido un menor desarrollo en relación a la realizada en animales y en microorganismos, siendo actualmente objeto de intensa investigación los enzimas implicados en las mismas. Mucho menos interés ha supuesto el estudio de los lípidos de reserva en plantas. En los últimos años, motivado por la enorme importancia económica que entraña la producción de grasa vegetal como fuente de alimentación humana y animal, se ha hecho un considerable esfuerzo por conocer los mecanismos conducentes a su formación, sobre todo, en plantas oleaginosas, quedando aún por desentrañar los mecanismos reguladores que determinan su formación.

Biosíntesis de Fosfolípidos

Ha sido descrito la composición en fosfolípidos de numerosas especies vegetales (HARWOOD, 1980; MUDD, 1980). Fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son los fosfolípidos mayoritarios, mientras que fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y bifosfatidilglicerol, se encuentran en menor cantidad. Los ácidos grasos más comúnmente asociados a los fosfolípidos son palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico (HARWOOD, 1980; MUDD, 1980).

El estudio de la síntesis de fosfolípidos se ha llevado a cabo en una gran diversidad de orígenes y tejidos vegetales, pero ha sido principalmente en endospermo de ricino durante la germinación y en hoja de espinaca, donde se han definido y caracterizado la mayoría de los enzimas implicados en la

biosíntesis de estos lípidos en plantas (MAZLIAK y col. 1982; MOORE, 1982; MOORE y TROYER, 1983), (Fig. 10).

La síntesis de ácido fosfatídico resulta esencial, al ser esta molécula precursora de todos los fosfolípidos constituyentes de las membranas, y estar asimismo, implicada en la síntesis de galactolípidos y lípidos neutros (MAZLIAK y col. 1982). La acilación progresiva del glicerol-3-P para formar lisofosfatídico y posteriormente ácido fosfatídico (Fig. 10, reacción 2), tiene lugar fundamentalmente en microsomas (SASTRY y KATES, 1966; VICK y BEEVERS, 1977), aunque las mitocondrias de endospermo de ricino (SPARACE y MOORE, 1979) y cloroplastos de espinaca (JOYARD y DOUCE, 1977) han mostrado ser también lugares de síntesis de este fosfolípido (Tabla 3).

La adición de los grupos polares para sintetizar los demás fosfolípidos a partir del ácido fosfatídico ocurre por dos vías distintas: una, que conduce a la formación de CDP-diacilglicerol (Fig. 10, reacción 10), precursor, a su vez, del fosfatidilinositol y fosfatidilglicerol (ANDREWS y MUDD, 1984); y otra, que tiene como intermediario el diacilglicerol (reacción 3), por la que se forman directamente la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (MOORE, 1982). Con la excepción de la formación de fosfatidilserina, este modelo se cumple en todos los tejidos vegetales estudiados. Así, MARSHALL y KATES (1974) muestran en espinaca, que el CDP-diacilglicerol reacciona con la serina para formar la fosfatidilserina (reacción 9), mientras que en endospermo de ricino se intercambia la serina por la etanolamina de la FE (reacción 7) (MOORE, 1984). Otra excepción al modelo general parece ser la formación de fosfatidilcolina a través de las reacciones de metilación de la fosfatidiletanolamina (reacción 5) (HITZ y col. 1981), aunque es poco probable que esta ruta funcione mayoritariamente en plantas (MOORE, 1982).

En cuanto a la compartimentación de la síntesis de estas moléculas, el retículo endoplasmático juega un papel fundamental (Tablas 3, 4 y 5). Esta fracción membranaria contiene todos los enzimas implicados en la adición o conversión de los grupos polares de los fosfolípidos (MOORE, 1984). En mitocondrias, se ha podido detectar la biosíntesis de fosfolípidos, excepto FI y FS, que se sintetizan exclusivamente en retículo endoplasmático. Todas estas reacciones presentes en la mitocondria hacen suponer que este

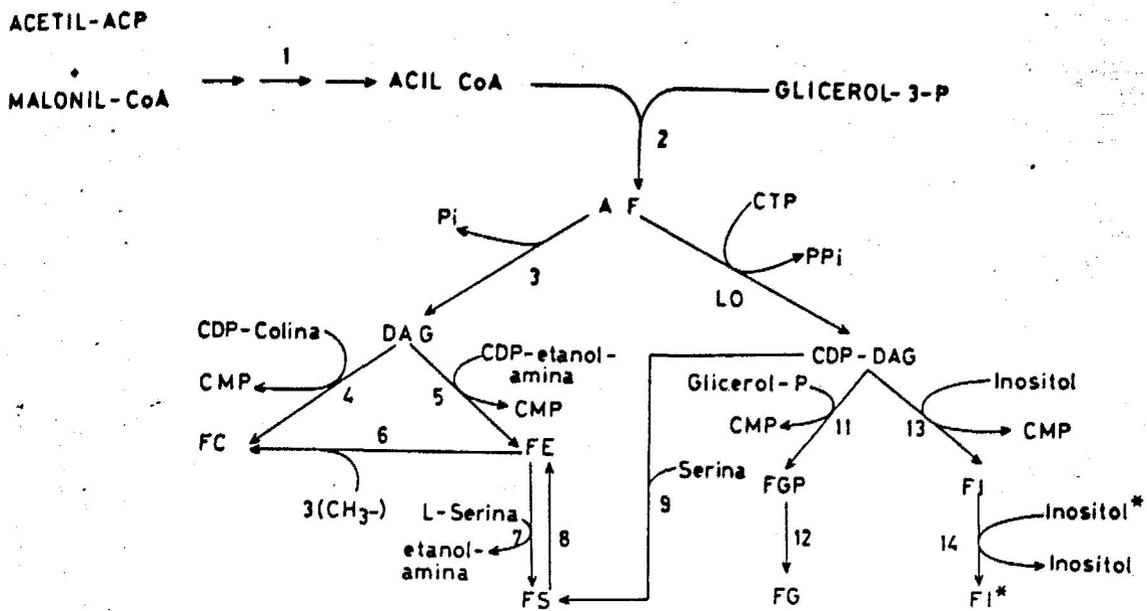


Figura 10. Esquema general de la síntesis de fosfolípidos en plantas, según MOORE (1982). 1. Sintetasa de ácidos grasos. 2. sn-glicerol-3-P aciltransferasa. 3. Fosfatidato fosfatasa. 4. CDP-colina: 1,2, diacilglicerol colina fosfotransferasa. 5. CDP-etanolamina: 1,2, diacilglicerol etanolamina fosfotransferasa. 6. S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa. 7. Fosfatidiletanolamina: L-serina fosfatidiltransferasa. 8. Fosfatidilserina descarboxilasa. 9. CDP-diacilglicerol serina O-fosfatidiltransferasa. 10. CTP-fosfatidato citidiltransferasa. 11. Glicerol-P: CDP-diacilglicerol fosfatidiltransferasa. 12. Fosfatidilglicerol-P fosfohidrolasa. 13. CDP-diacilglicerol mioinositol fosfatidiltransferasa. 14. Fosfatidilinositol: mioinositol fosfatidiltransferasa

Tabla 3. Ubicación intracelular de la síntesis de lípidos acílicos en plantas, según MOORE (1984).

Lípidos acílicos	Fracción de membranas				
	R.E.	Ap. Golgi	Mitocondria		Plastidios
			Mb. Externa	Mb. Interna	Envuelta Tilac.
FOSFOLÍPIDOS					
AF	X		X	X	X
CDP-DAG	X			X	X
FC (transferasa)	X	X	X	X	
FC (metilación)	X			X	
FE	X	X	X	X	
FI	X				
FG	X			X	X
FS	X				
BFG				X	
GALACTOLÍPIDOS					
NGDG					X
DGDG					X
GLICERIDOS NEUTROS					
DAG	X				X
TAG	X				X

Tabla 4. Características de los enzimas de la ruta del CDP-diacilglicerol, en retículo endoplasmático (RE) y en mitocondrias (M) aislados de endospermo de ricino durante la germinación, según MOORE y TROYER (1983),

Actividad	Orgánulo	Cación mM	K _m (aparente)		V _{max} nmol.h ⁻¹ .mg ⁻¹
			Hidrosoluble μM	Liposoluble μM	
AF + CTP + CDP-DAG	RE	Mn ²⁺ (7,5)	17	94	0,017
	M	Mn ²⁺ (1,5)	67	132	0,003
CDP-DAG + G3-P + FGF y FGP + FG	RE	Mn ²⁺ (5,0)	50	3	5
	M	Mn ²⁺ (5,0)	50	2	10
FG + BFG	M	Mn ²⁺			
CDP-DAG + I + FI	RE	Mn ²⁺ (1,5)	300	1350	35
FI + I + FI	RE	Mn ²⁺ (15,0)	26		1,3

Tabla 5. Características de los enzimas de la ruta del diacilglicerol, en retículo endoplasmático (RE) y en mitocondrias (M) aislados de endospermo de ricino durante la germinación, según MOORE y TROYER (1983).

Actividad	Orgánulo	Cación mM	Km (aparente)		Vmax nmol.h ⁻¹ .mg ⁻¹
			Hidrosoluble	Liposoluble	
			μM	μM	
AF + DAG	Sol. RE				
DAG + CDP-col + FC	RE	Mg ²⁺ (3,0)	9,7		20,0
	M	Mg ²⁺ (10,0)	8,0		1,5
DAG + CDP-etan + FE	RE	Mg ²⁺ (3,0)	8,0		35,0
	M				
FE + 3(CH ₃ -) + FC	RE	--	31,0		1,0
	M				
FE + Ser + FS + Etan.	RE	Ca ²⁺ (2,0)	20,0		1,0

orgánulo no es enteramente dependiente del retículo para sus requerimientos fosfolipídicos. El aparato de Golgi es bastante activo en la formación de FC y FE, sin embargo, su papel en esta síntesis está todavía por determinar (MONTAGNE y RAY, 1977). El plastidio sintetiza AF y contiene además los enzimas necesarios para la formación de FG (JOYARD y DOUCE, 1977; ANDREWS y MUDD, 1984). Por el contrario, los microcuerpos (glioxisomas y peroxisomas) y la membrana plasmática no parecen poder sintetizar fosfolípidos (MOORE y col. 1973; DEMANDRE y col. 1978).

La ausencia de la capacidad de síntesis de estos constituyentes lipídicos en algunas de estas fracciones, planteó la cuestión de cómo estas moléculas son transferidas desde sus lugares de síntesis a las diferentes regiones membranarias donde se ubican. Dos mecanismos diferentes han sido propuestos: uno, que requiere el contacto entre membranas, supone la transferencia de fragmentos de membranas desde un compartimento celular a otro (MORRE, 1975). El otro implica un movimiento de moléculas fosfolipídicas por medio de proteínas transportadoras (KADER, 1977). Ambos mecanismos parecen funcionar al mismo tiempo en vegetales (KADER y col. 1984), constituyendo actualmente un importante objeto de estudio.

Las características de los enzimas implicados en la adición y modificación de los grupos polares de los fosfolípidos se indican en las tablas 4 y 5 (MOORE y TROYER, 1983). En general, parece existir una buena correlación entre la K_m aparente, velocidades máximas de los enzimas y las cantidades respectivas de los fosfolípidos componentes de las membranas, lo cual indica que la composición fosfolipídica viene determinada por las actividades absolutas de sus enzimas (MOORE, 1982; MOORE y TROYER, 1983), excepto para el caso de la formación de FI, que parece requerir *in vitro*, altos niveles de sustratos hidrosolubles y liposolubles, no comparables con los bajos niveles intrínsecos de los tejidos (MOORE, 1984) (Tabla 4).

También se pudo demostrar que las dos rutas de síntesis de fosfolípidos muestran distintos requerimientos en cationes. Así, los enzimas de la ruta del CDP-diacilglicerol, conducente a la formación de FI y FG, parecen requerir Mn^{2+} (Tabla 4), y aquellos de la ruta del diacilglicerol, que forman FC, FE y FS, requieren Mg^{2+} o Ca^{2+} , pudiendo el Mg^{2+} y el Mn^{2+} ser sustituidos entre sí (Tabla 5). Este requerimiento diferencial de

cationes divalentes, ofrece una posibilidad importante en cuanto al control de las actividades relativas de estas dos rutas y a una selectiva regulación de sus enzimas.

Biosíntesis de fosfatidilcolina

Los datos concernientes a la composición y contenido en fosfolípidos de las membranas celulares de raíces de plantas superiores, órganos íntimamente relacionados con los procesos de absorción iónica, demuestran claramente un contenido mayoritario de FC y FE, sobre todo, a nivel de mitocondria y microsomas (ROSSIGNOL, 1976; MOORE, 1982). De aquí, que nuestra investigación sobre un posible efecto del boro sobre el metabolismo de los lípidos de membrana, se haya basado en buena medida en los resultados experimentales derivados de la incorporación de diferentes precursores radioactivos a la molécula de FC de microsomas de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas en medios con distintas concentraciones del micronutriente.

Han sido descritas tres vías de síntesis para este fosfolípido (MORRE y col. 1970; MARSHALL y KATES, 1974; MAZLIAK y col. 1982):

- DAG + CDP-colina → FC + CMP
- FE + 3-S-adenosilmetionina → FC + 3-S-adenosilhomocisteína
- Fosfatidil-X + Colina → FC + XOH (Reacción de intercambio de base)

La primera reacción, denominada ruta de la CDP-base, es la principal vía de síntesis de la fosfatidilcolina (MOORE, 1976), habiéndose puesto de manifiesto su síntesis *in vivo* por suministro al tejido de colina ^{14}C (HARWOOD, 1976; PRICE-JONES y col. 1983; WILKINSON y col. 1984), según las siguientes reacciones:

- Colina + ATP → Colina-P + ADP (colina kinasa)
- Colina-P + CTP → CDP-colina + PPi (colina-P citidiltransferasa)
- DAG + CDP-colina → FC + CMP (CDP-colina: 1,2 diglicérido colina fosfotransferasa)

El primer enzima (E.C. 2.7.1.32) fué primeramente purificado y caracterizado por RAMASARMA y WETTER (1957) y sucesivamente estudiado en la fracción soluble de gran variedad de orígenes vegetales (MOORE y col. 1970; WHARFE y HARWOOD, 1979; MUDD, 1980), y la colinafosfato citidiltransferasa (E.C. 2.7.7.15) ha sido medida en la fracción soluble y en microsomas de endospermo de ricino y tallos de cebolla y guisante, y requiere Mg^{2+} para su actividad (MORRE y col. 1970; PRICE-JONES y HARWOOD, 1985).

El enzima CDP-colina: 1,2 diglicérido colinafosfotransferasa (E.C. 2.7.8.2), clave en la síntesis de FC y en el presente trabajo de Tesis Doctoral, ha sido detectada y estudiada en plantas por MORRE y col. (1970) y MUDD (1980). En la tabla 4 se indican algunas de las características de la reacción catalizada por este enzima, en endospermo de ricino (MOORE, 1976) y en hoja de espinaca (DEVOR y MUDD, 1971a), mostrando una K_m aparente para la CDP-colina de 10 μM , un pH óptimo entre 7.5 y 8.0 y requiriendo Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad. JHONSON y KENDE (1971) encuentran una débil estimulación de la actividad enzimática después de adicionar diacilglicerol, no habiéndose podido demostrar una especificidad del enzima por distintas especies de dicho sustrato (DEVOR Y MUDD, 1971b). A este respecto, WILKINSON y col. (1984) han puesto de manifiesto en oleosomas de semillas de maíz en germinación, que la incorporación de metil¹⁴C-colina en FC tiene lugar a partir del diacilglicerol procedente de la degradación de los triglicéridos de reserva. Asimismo, se ha observado en endospermo de ricino y en raíces de haba, que el enzima colina fosfotransferasa es fuertemente inhibido por el calcio (DONAIRE y OURSEL, 1975; LORD, 1976). Por otra parte, la solubilización supone la pérdida de la actividad enzimática, aunque ésta puede ser restaurada por la adición de fosfolípidos de la membrana de partida, hecho que sugirió la necesidad de un adecuado estado físico químico de la membrana para la biogénesis de estas moléculas lipídicas (MAZLIAK y col. 1982).

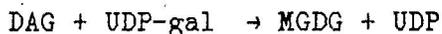
Biosíntesis de glucolípidos

Galactosil- y digalactosildiacylgliceroles son los glucolípidos mayoritarios de las membranas biológicas (HARWOOD, 1980). En tejidos

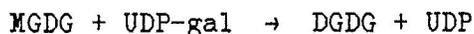
fotosintéticos constituyen del 10 al 50 % de los lípidos totales (principalmente como MGDG), siendo el ácido linolénico su componente ácido mayoritario. Por el contrario, en tejidos no fotosintéticos sólo constituyen del 5 al 20 %, predominando en este caso los DGDG (SASTRY, 1974; ISHIZUKA y YAMAKAWA, 1985)

Los galactolípidos se ubican preferentemente en los plastidios (cloroplastos, etioplastos, leucoplastos, etc.), constituyendo del 70 al 90 % de sus lípidos totales. Otras membranas como el plasmalema, retículo endoplasmático y las mitocondrias, también los contienen en cantidades significativas (HARWOOD, 1980). La composición relativa del tejido en estos lípidos cambia según el estado fisiológico del mismo. Así, durante el enverdecimiento, las hojas y cotiledones incrementan el contenido en estos lípidos, concomitantemente con la formación de las membranas tilacoidales (TEVINI, 1973). Del mismo modo, durante la germinación, etapa de gran desarrollo de las membranas plastidiales, también se observa un fuerte aumento en galactolípidos (KONDO, 1982). Por el contrario, durante la senescencia de la hoja y la maduración del fruto ha sido observado una pérdida de galactolípidos (HARWOOD, 1980).

La síntesis de galactolípidos se ha estudiado principalmente en tejidos fotosintéticos, en cloroplastos aislados (TREMOLIERES, 1970; ROUGHAN y SLACK, 1982) y en semillas en germinación (ICHIHARA y NODA, 1981). Desde los trabajos pioneros de BENSON y col. (1958) y KATES (1960), se han realizado numerosos estudios para comprender el origen y rutas biosintéticas de estos lípidos. Actualmente se sabe que la biosíntesis de galactolípidos tiene lugar a nivel de los plastidios (DOUCE y JOYARD, 1980) (Tabla 3) y que, al menos dos enzimas responsables de la síntesis de MGDG y DGDG, están asociados a la membrana plastidial. La UDP-galactosa: diacilglicerol galactosiltransferasa cataliza la formación de MGDG (HEINZ, 1977):



mientras que el enzima UDP-galactosa: MGDG galactosiltransferasa forma DGDG (HEINZ, 1977):



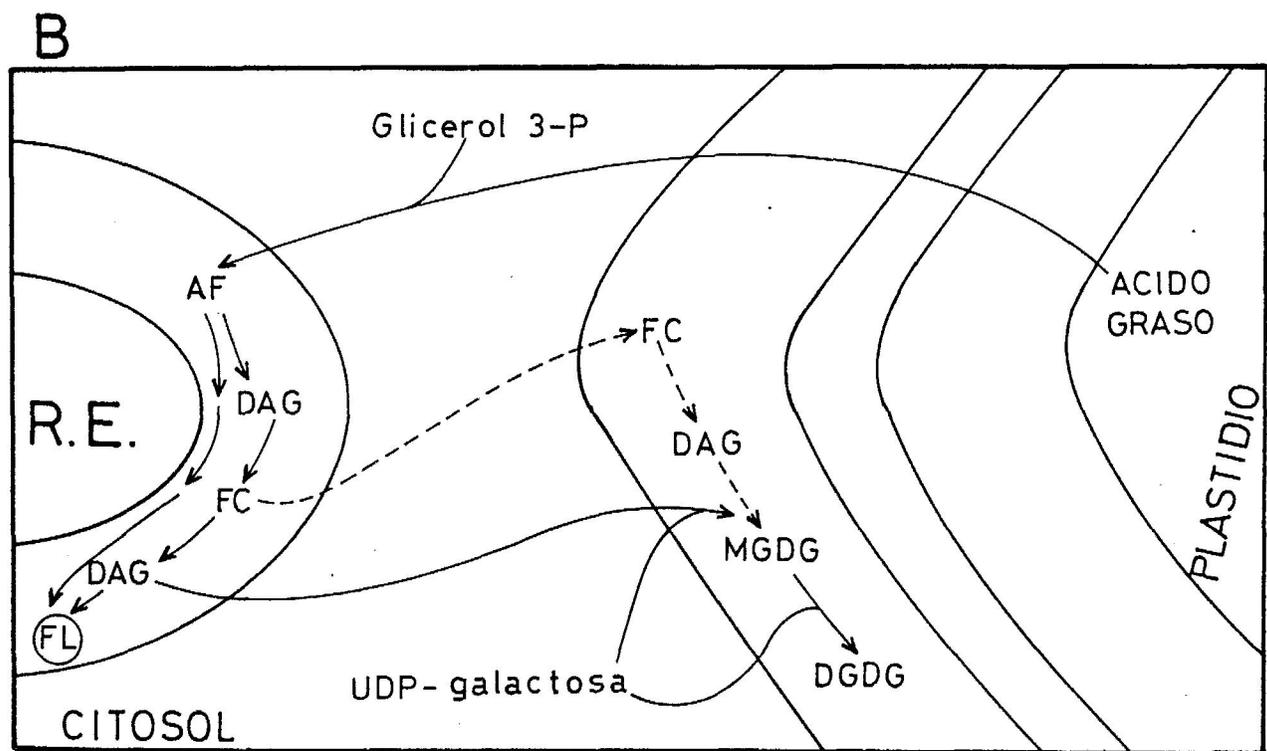
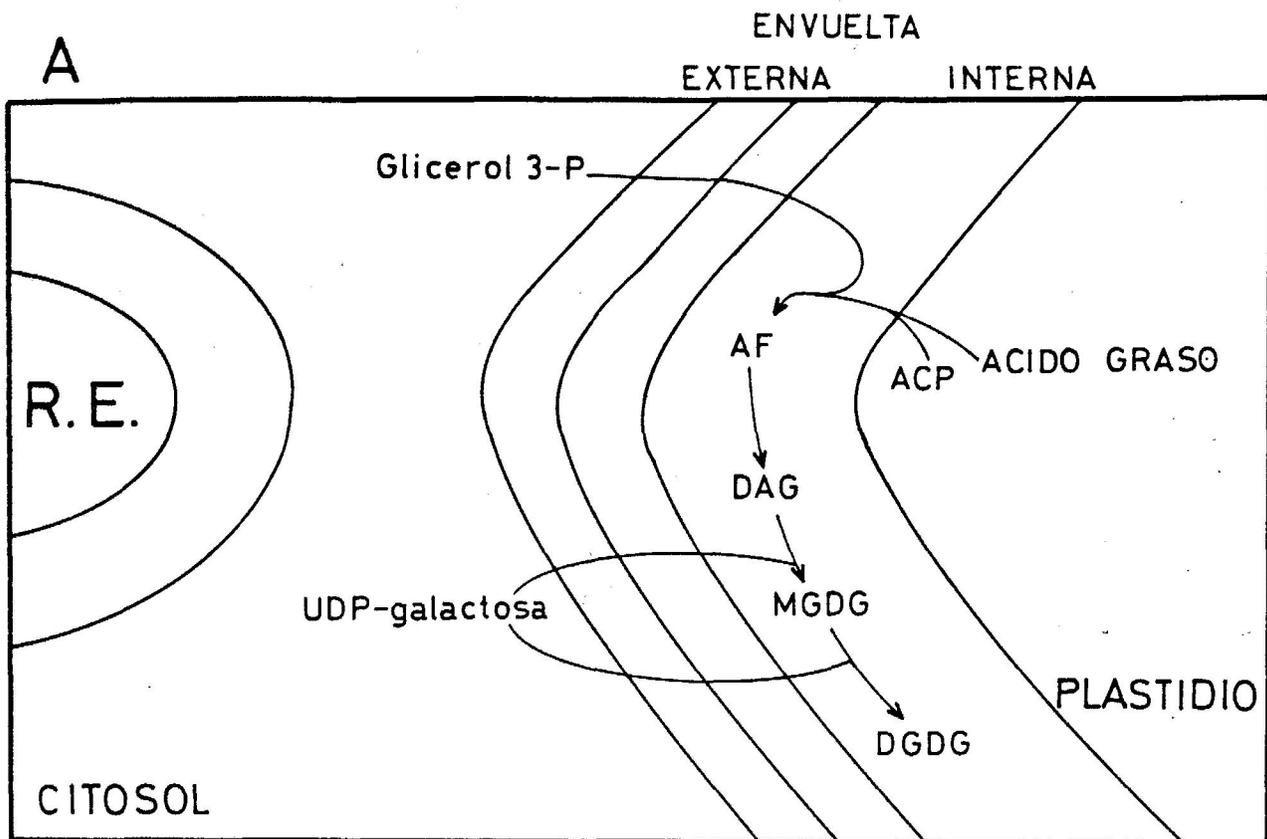
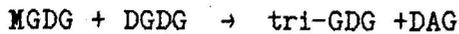


Figura 11. Síntesis de galactolípidos en plantas superiores. Origen del diacilglicerol, precursor de estos lípidos: A) ruta procariótica (16:3); B) ruta eucariótica (18:3). (Línea discontinua: hipótesis alternativa del origen del diacilglicerol). Esquema según MOORE (1984).

También se ha descrito la reacción de intercambio de galactosa por acción de una galactolípido: galactolípido galactosiltransferasa (HEEMSKERK y col. 1982). Este mismo enzima puede inducir la formación de tri y tetragalactosildiácilglicerol (DORNE y col. 1982):



Parecen existir dos vías diferentemente compartimentadas de producción de DAG, que se han venido a denominar ruta procariótica (el ácido predominante en las especies de DAG es el ácido hexadecatrienoico), y ruta eucariótica (el ácido linolénico es el ácido graso predominante) (HEINZ y ROUGHAN, 1982). La primera ruta, ubicada en la envuelta plastidial interna, implica la formación de AF y DAG (JOYARD y DOUCE, 1977) (Fig. 11a). En la ruta eucariótica el DAG es de origen extraplastidial (retículo endoplasmático), lo cual hace posible la formación de galactolípidos con 18:3. Para ROUGHAN y col. (1979), la 18:1-FC es desaturada a 18:2-FC y, posteriormente, convertida en 18:2-DAG en el retículo endoplasmático. De aquí es transferido a la envuelta externa plastidial, donde es transformado en 18:2-MGDG y desaturado a 18:3-MGDG. Sin embargo, para ONISHI y YAMADA (1982), la 18:2-FC formada en el RE es transferida, mediante una proteína transportadora, a la envuelta externa del plastidio, donde es convertida en 18:2-DAG y 18:2-MGDG y, posteriormente, en 18:3-MGDG (Fig. 11b).

Biosíntesis de triácilgliceroles

La síntesis de triácilgliceroles ha sido principalmente estudiada durante la maduración de semillas oleaginosas (GURR, 1980). Estudios realizados en órganos de reserva a lo largo de la germinación han demostrado un predominio en el catabolismo de estas moléculas (HARWOOD, 1976; ICHIHARA y NODA, 1981). Hoy existe la suficiente evidencia de que la síntesis *de novo* de TAG se produce por la denominada ruta de Kennedy (GURR, 1980), en la cual la FC participa como intermediario (SLACK y col. 1983; STOBART y STYMNE, 1985) (Fig. 12).

La implicación de la FC hace posible un mecanismo de regulación de la composición acílica de los triácilgliceroles, en base, por una parte, a la acción del enzima acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferasa, que realiza el intercambio de acilos entre el oleil-CoA y la posición 2 de la FC,

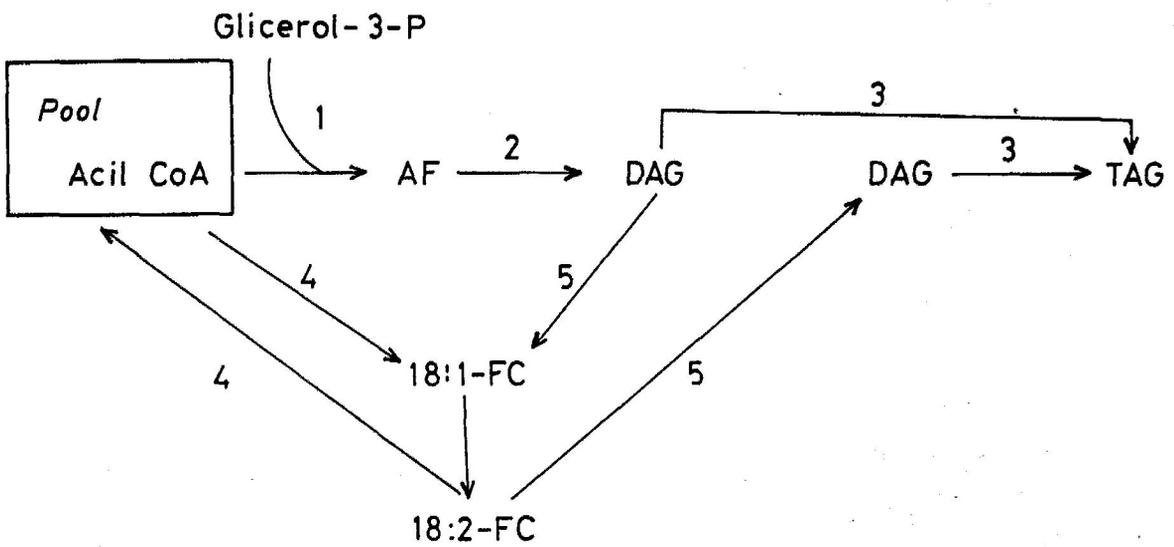


Figura 12. Síntesis de triacilgliceroles en plantas. 1. Glicerol-3-P aciltransferasa; 2. Fosfatidato fosfatasa; 3. DAG aciltransferasa; 4. Acil-CoA lisofosfatidilcolina aciltransferasa; 5. CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa.

sustrato para la desaturación. De esta forma, la composición del *pool* de acil-CoA se verá reflejada en las especies de DAG nuevamente formado (STYMNE y STOBART, 1984). Por otra parte, el DAG existente puede transformarse en FC y hacer posible la desaturación de más oleato a través de la reacción, igualmente reversible, de la CDP-colina: 1,2 diglicérido colinafosfotransferasa (SLACK y col. 1983; STOBART y STYMNE, 1985). En semillas que acumulan lípidos de reserva, una producción similar de ácido linolénico tiene lugar en microsomas, por medio de un sistema desaturante de 18:2-FC (BROWSE y SLACK, 1981). Estos dos mecanismos coordinados favorecen un continuo enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados de las moléculas de TAG, atribuyéndose a estos enzimas un papel importante en la regulación de la calidad acílica de los TAG (STYMNE y STOBART, 1985).

Todas estas secuencias de reacciones tienen lugar a nivel del retículo endoplasmático y de los plastidios (WANNER y col. 1981; STOBART y col. 1983; MURPHY y col. 1984) (Tabla 3). Futuros trabajos en este sentido permitirán una mejor comprensión de la ruta conducente a la formación de TAG y de sus mecanismos de regulación, determinantes de la composición y contenido de estas moléculas.

c. Factores que afectan al metabolismo de los lípidos acílicos

Diferentes factores internos y externos pueden afectar el metabolismo de los lípidos acílicos en plantas. Muy poco se conoce en relación a los cambios producidos en su metabolismo por factores internos o biológicos, aunque parece que el estadio fisiológico de la planta (crecimiento, maduración o senescencia) influye notablemente. En este sentido, las hormonas podrían jugar un papel importante en relación a la base molecular de estos cambios. Así, se sabe que las citoquininas, giberelinas y auxinas estimulan o inhiben el metabolismo de fosfolípidos (JHONSON Y KENDE, 1971; MOORE y col. 1983; PAUL y col. 1985), habiéndose evidenciado su actuación a nivel enzimático (PRICE-JONES y HARWOOD, 1983). Investigaciones futuras sobre los mecanismos de regulación a nivel genético y enzimático permitirán establecer la interacción de algunos de estos factores en el metabolismo lipídico.

Casi todos los factores conocidos de tipo ambiental o externos parecen afectar, directa o indirectamente, al metabolismo de lípidos (HARWOOD, 1984) (Tabla 6). La luz influye enormemente sobre la composición lipídica; durante el enverdecimiento de tejidos etiolados, la luz actúa estimulando la síntesis de galactolípidos y ácidos grasos poliinsaturados del tipo del ácido linolénico, en estrecha asociación con la formación de las estructuras cloroplastidiales (GEMRICH, 1982). Además, parece estimular en cloroplastos la actividad de enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos (acetil-CoA carboxilasa) y de aquellos implicados en la formación de FG (EASTWELL y STUMPF, 1983).

Del mismo modo, la temperatura influye notablemente sobre las proporciones relativas de ácidos grasos insaturados y saturados de las membranas; así, temperaturas bajas incrementan las proporciones de ácidos grasos insaturados (HARWOOD, 1975), habiendo sido normalmente asociados estos cambios a la modificación de las propiedades físico-químicas de aquellas estructuras como respuesta adaptativa a esas temperaturas (RAISON, 1980).

En relación a las transformaciones inducidas por el stress hídrico, este factor provoca alteraciones en la síntesis, contenido y en la composición acílica de los fosfolípidos (STUIVER y col. 1982). Por otra parte, teniendo en cuenta la importancia de los lípidos acílicos en permeabilidad de las membranas (CULLIS y col. 1980), estas moléculas juegan un importante papel en la adaptación del vegetal a los medios salinos. A este respecto, se han descrito casos de disminución generalizada de todos los lípidos acílicos en plantas sometidas a stress salino (HARWOOD, 1983), aunque, a veces, se ha podido comprobar que en determinadas plantas, el contenido de fosfolípidos no parece tener una clara relación con la tolerancia a suelos salinos (KUIPER, 1985). DAVIES y HARWOOD (1984) han encontrado en hojas y raíces de girasol que el cloruro sódico induce una disminución de la insaturación debido a la inhibición de la desaturasa de oleato.

También los estados de deficiencia o toxicidad en nutrientes minerales influyen en el metabolismo de los lípidos vegetales. En este sentido, se han descrito efectos por deficiencia de fosfato (TEVINI, 1977), nitrógeno (DJEMAL y CHERIF, 1984) y boro (SHKOL'NIK y KOPMAN, 1970).

Tabla 6. Factores ambientales que afectan la composición y el metabolismo de lípidos de plantas, según HARWOOD (1984)

Factor	Efecto
LUZ	Calidad - > 700 nm de longitud de onda causan cambios anormales Cantidad - Diferencias entre plantas de sol y sombra
TEMPERATURA	Prolongada - Razón ácidos grasos insaturados/saturados alterada - Alteración de la cantidad de fosfoglicéridos Shock - Plantas resistentes a las heladas son capaces de adaptar sus fosfoglicéridos rápidamente
SEQUIA	- Incremento del contenido de fosfoglicéridos
CALCIO	- Plantas calcícolas reducen el contenido de fosfolípidos en respuesta al calcio, Plantas calcífugas tienen más alto contenido de fosfolípidos que las calcícolas
SALINIDAD	- Efecto variable, A menudo, reducción de la insaturación
METALES	
PESADOS	- Cambios en el metabolismo general de lípidos y ácidos grasos
HERBICIDAS	- Cambios en la síntesis de ácidos grasos

Respecto al calcio, quizás el elemento mejor estudiado en cuanto a su acción sobre el metabolismo lipídico, se sabe que las plantas calcícolas muestran un bajo contenido en ácidos grasos saturados y en lípidos de carácter ácido, al tiempo que el elemento inducía en aquellas la inhibición de la síntesis de fosfolípidos (DONAIRE y OURSEL, 1975; ROSSIGNOL, 1976).

Otros factores ambientales como la acidez del suelo, presión parcial de oxígeno, infecciones patógenas, toxicidad por metales pesados, herbicidas y drogas diversas, también afectan la composición lipídica (MAZLIAK y col. 1977; DIEPENBROK y GEISLER, 1984; VALANDON y KATES, 1984; MURPHY y col. 1985).

Según KUIPER (1985), todos estos cambios inducidos en los lípidos por factores ambientales pueden obedecer, bien a una adaptación de la planta al factor cambiante, bien a cambios bioquímicos sin especial importancia para la fisiología general de la planta, o también a una degradación lipídica inducida por el stress. Sin embargo, resulta difícil la interpretación de los datos experimentales referidos a estos hechos, de aquí que sea imprescindible profundizar en la experimentación genética y en la búsqueda de índices físico-químicos, bioquímicos y fisiológicos que puedan ayudar a comprender el sentido de estos cambios.

1.1.6. *Baro y senescencia*

Senescencia
La senescencia, ^{en plantas} definida como aquellos cambios metabólicos que conducen, antes o después, a la muerte de ^{vegetal} la planta o de algunas ^{tejidos} partes, constituye un ^{estadio del desarrollo} proceso comúnmente asociado en la literatura con el de ^{proceso metabólico} aging o envejecimiento, LEOPOLD (1975) ^{por un conjunto de} define el ~~aging~~ como todas aquellas transformaciones que incrementan la madurez ^{en} en el tiempo, sin especial referencia a la muerte como una consecuencia ^{de} de la vida de la planta. Desde esta perspectiva, la senescencia representa un estadio cuya secuencia de eventos metabólicos, fundamentalmente degradativos, obedece a la puesta en ^{mar} marcha de un ^{proceso} programa genético. Por ello, constituye un proceso altamente ordenado que implica la síntesis o activación de proteínas específicas, capaces de dirigir la degradación más o menos controlada de la organización estructural y metabólica del tejido (SEXTON y WOOLHOUSE, 1984). Además de

Leshem 1981

esta idea de senescencia programada, ~~se~~ había postulado que estos cambios ~~pudieran~~ estar también gobernados, en gran parte, por la acción de especies químicas altamente reactivas -radicales libres- (LESHEM, 1981). De hecho, ambos mecanismos coexisten, puesto que durante la senescencia tiene lugar la producción de radicales libres como resultado, tanto de una acción enzimática como de una disminución de los mecanismos de defensa contra estos radicales (PAULS y THOMPSON, 1984).

En cualquier caso, este proceso, entendido como un estadio del desarrollo, favorece el turnover de la planta o del tejido en particular (senescencia monocárpica, maduración de frutos, senescencia de flores, senescencia de cotiledones, senescencia de hojas, etc.), proporcionando ventajas adaptativas al vegetal en medios sometidos a continuas transformaciones (LEOPOLD, 1980).

Factor
inducido
pueden ser
el mismo
subsecuente

Aunque no se conoce un modelo metabólico específico que defina el proceso senescente, ~~sin embargo~~, si existe abundante información acerca del importante papel que juegan determinados factores ambientales (luz y temperatura) y endógenos (hormonas vegetales, membranas biológicas) en su mecanismo de control, siendo aún objeto de especulación el inductor/es primario que ~~dispara~~ ^{lo desencadena} la senescencia (SEXTON y WOOLHOUSE, 1984). Así, la competición fuente-sumidero durante la redistribución de nutrientes, determinados cambios en el control hormonal o en el estatus energético de la célula, y la implicación de los radicales libres, constituyen algunos de ~~las hipótesis~~ ^{conducir} sobre factores que pueden inducir el proceso (THIMANN, 1980; PAULS y THOMPSON, 1984; LESHEM, 1985).

temporal

De acuerdo con los conceptos apuntados, la senescencia no sólo puede ser inducida y regulada por factores biológicos o internos, sino también por agentes externos (stresses ambientales) entre los que se incluyen: herida, condiciones de sequía, frío, heladas, encharcamiento, irradiaciones, salinidad, agentes patógenos y herbicidas (HOGSETT y col. 1981). Los estados de deficiencia y toxicidad en ^{determinados} nutrientes minerales también constituyen un importante factor en la inducción de la senescencia (NOODEN, 1980). ^{habíase} ~~Así, se había~~ postulado que condiciones de deficiencia, motivadas ^{bien} por la escasa disponibilidad de nutrientes en el medio ^{o bien} por la fuerte influencia de algunos órganos que actúan como sumidero, podrían ser factores causales del proceso. Del mismo modo, la toxicidad en algunos

(stress salino)

nutrientes, derivada de una fuerte concentración en el medio y/o de su escasa movilidad, conduce a manifestaciones de senescencia, similares a las provocadas por el stress salino.

senescencia membranas Durante la senescencia son muchos los procesos ^{celulares} que se ven alterados en su normal funcionamiento, habiendo ^{se} realizados numerosos estudios en frutos, flores, hojas, cotiledones y planta entera para comprender cuáles son claves en el desarrollo de la misma. En este sentido, teniendo en cuenta el plan de trabajo previsto en esta memoria sobre la influencia del boro en una serie de procesos metabólicos relacionados con las membranas celulares (metabolismo lipídico, actividad oxidativa y componentes hormonales del tipo del etileno), asociados, en gran medida, a la senescencia, y cuya investigación ha sido también objeto de estudio en este trabajo, nos pareció muy importante llevar a cabo en este apartado una descripción de los antecedentes científicos que relacionan dichos procesos con la senescencia de los tejidos.

Una característica inherente a la senescencia vegetal es el deterioro de las membranas celulares (McKERSIE y col. 1976), ^{cuñas} Las propiedades físico-químicas ~~de estas~~ (fluidez y estado de fase), que ~~vienen~~ determinadas intrínsecamente por la composición lipídica, condicionan su actividad biológica, en base a la modulación ejercida por el microambiente lipídico en torno a los sistemas enzimáticos membranarios (QUINN y WILLIAMS, 1978).

respecto Así existe una estrecha correspondencia entre los cambios en la actividad de enzimas asociados a las membranas y los cambios en la composición y propiedades de fase de sus lípidos (McKERSIE y col. 1978). Estudios ~~realizados con técnicas~~ de difracción de rayos X ~~de ángulo amplio~~ (McKERSIE y col. 1976, 1978), resonancia de *spin* electrónico (McKERSIE y col. 1978; LEGGE y THOMPSON, 1982) y criofactura y microscopía electrónica (PLATT-ALOIA y THOMSON, 1985), han evidenciado un incremento de la fase de gel, concomitantemente con una pérdida de fluidez en membranas plasmáticas y retículo endoplasmático de cotiledones de soja y pétalos de rosa, conforme avanza la senescencia. Este incremento ^{de la} en fase de gel de los lípidos membranarios conduce a una pérdida de permeabilidad selectiva a los iones, y ~~pequeñas moléculas~~, una liberación de enzimas hidrolíticos y ^{a una} disminución de la actividad de enzimas asociados a las membranas. Ello ocasiona el

deterioro de la membrana y la pérdida de la compartimentación celular, fenómenos, todos ellos, detectados en tejidos senescentes (LEES y THOMPSON, 1980; BARBER y THOMPSON, 1980). Otros autores han obtenido resultados similares al inducir la senescencia por diversos stresses ambientales (ONO y MURATA, 1982; PEARCE, 1985; ~~PLATT~~ PLATT-ALOIA y THOMPSON, (1985), lo que les llevó a postular que la existencia de lípidos de membranas en fase de gel debe jugar un importante papel en la causa o en la expresión de la senescencia.

En estos cambios en las propiedades físico-químicas de las membranas ~~subyace~~ una alteración de la composición lipídica. Así, se ha ^{en tejidos senescentes} demostrado que la pérdida de clorofila durante las primeras etapas de la senescencia ~~en~~ ~~tejidos~~ ~~verdes~~, inducida por condiciones de oscuridad, va acompañada de una disminución, a nivel de ^{las membranas} ~~cloroplastos~~ ^{de los} del contenido en glucolípidos (MGDG y DGDG), fosfolípidos (FG), y ácidos grasos poliinsaturados (18:2 y 18:3), (FERGURSON y SIMON, 1973; STOBART y col. 1982). En este sentido, HUBER y NEWMAN (1976) observaron en cotiledones verdes senescentes de soja un aumento en la incorporación de acetato¹⁴C en lípidos citoplásmicos con respecto a los lípidos plastidiales, hechos que fueron interpretados por STOBART y col. (1982) como un intento de adaptación del tejido a condiciones de *aging*, favorecedoras de un incremento de la síntesis y/o reparación de los constituyentes de membranas. Por otra parte, estos autores asociaron una menor capacidad de síntesis de clorofila en hojas etioladas transferidas a la luz, a una disminución de MGDG.

X
esteres de

Bajo esta misma conceptualidad, lípidos-membranas, la disminución de la fluidez y/o de la permeabilidad selectiva ^{de iones} en membranas de tejidos senescentes, ^{cuando} es el resultado de un incremento de la razón esteroides/fosfolípidos, inducida, principalmente, por una disminución de ^{los} ~~fosfolípidos~~ (BOROCHOV y col. 1982; MAYAK y col. 1983; LURIE y BEN ARIE, 1983; FAREGHER y col. 1984). En 1979, MCKERSIE y THOMPSON ^{ya ampliado} habían ~~mostrado~~ una correlación entre el aumento de ~~los~~ lípidos neutros (pigmentos y ácidos grasos libres) y la formación de fase de gel, en membranas microsomaes de cotiledones de soja; los ésteres de esteroides y otros lípidos neutros no identificados mostraron un claro efecto, ~~no~~ así los esteroides libres, sobre la temperatura de transición de los fosfolípidos de liposomas, obtenidos a partir de extractos lipídicos naturales. A resultados similares llegaron

BARBER y THOMPSON (1983), al mostrar que los lípidos neutros aumentan la rigidez de las cadenas acílicas insaturadas de membranas de tejidos senescentes.

senescencia y peroxidación
En conexión con estos hechos, existe ~~una considerable~~ evidencia de que la alteración de las propiedades de las membranas puede ser atribuida a la peroxidación lipídica provocada por diferentes especies de radicales libres, capaces de inducir la fase de gel. En ~~este sentido~~, se ha ~~mostrado~~ una relación entre la acumulación de ^{peróxidos} lípidos peroxidados, el incremento de la permeabilidad ^{iónica} y un aumento de fase de gel, en membranas de tejidos senescentes, ^{esto} hechos que apoyan la existencia de una correlación ~~temporal~~ entre las propiedades de fase, permeabilidad y actividad enzimática ~~a nivel~~ de dichas estructuras (PAULS y THOMPSON, 1980, 1981; DHINDSA y col. 1981; PAULS y THOMPSON, 1984).

fase celular y radicales libres
Como se ha ~~indicado~~ anteriormente, ^{en el} deterioro de las membranas iniciado por la peroxidación lipídica, parecen jugar un papel primordial las reacciones mediadas por radicales libres, en particular los oxi radicales, especies químicas altamente reactivas por ~~tener un electrón desapareado~~ que les capacita para aceptar o donar electrones de cualquier otra molécula (RABINOWITH y FRIDOWICH, 1983; INOUE, 1984), cuya formación puede ser inducida, endógena o exógenamente, por diversos stresses (CHIA y col. 1981).

Según BORG y col. (1981), en sistemas vegetales los oxi radicales pueden ser de dos tipos (v):

- Inorgánicos, como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo (OH^{\cdot}),
- Orgánicos, como los peroxi (ROO^{\cdot}), alcoxi (RO^{\cdot}) y radicales de ácidos grasos poliinsaturados,

Han sido elucidados los mecanismos de formación de los radicales incluidos en el primer grupo, estrechamente relacionados con el metabolismo del H_2O_2 (ELSTNER, 1982; ROWLEY y HALLIWELL, 1985) (Fig. 13). Los radicales incluidos en el segundo grupo, relacionados con el metabolismo degradativo de los ácidos grasos poliinsaturados y asociados fundamentalmente a la actividad lipoxigenásica, han tomado recientemente un gran interés en sistemas vegetales.

la formación

La actividad celular normal ~~conlleva un~~ control ~~de~~ estos ~~los~~ radicales libres por una serie de mecanismos ~~protectores~~ de naturaleza enzimática (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), y no enzimática (secuestrantes o antioxidantes endógenos del tipo α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, ácido benzóico, y exógenos del tipo del propilgalato y ácidos hidroxámicos), que impiden la iniciación y/o la propagación de la cadena de reacciones mediadas por dichos radicales (FRIDOVICH 1976; HALLIWELL, 1982).

X
X
X
X
X

(En este contexto) ~~es~~ bien conocido que la senescencia natural o inducida en tejidos por diferentes stresses, coincide con un aumento en la producción de H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ y otros radicales derivados de los peróxidos lipídicos, con un incremento en la actividad fosfolipásica y lipoxigenásica, así como con una relajación de los mecanismos protectores (disminución de las actividades SOD y catalasa), ~~hechos todos, conducentes a la peroxidación~~ ^{lo cual} degradación de las membranas biológicas (DEL RIO y col. 1978; GROSAN y LESHEM, 1978; BOROCHOV y col. 1982; MAYAK y col. 1983; PAULS y THOMPSON, 1984; LYNCH y THOMPSON, 1984; MUKHERJEE y CHOUDHURI, 1985). ~~Todo ello es~~ ^{Esto ha sido} corroborado ^{por} el hecho de que diferentes secuestrantes y antioxidantes de radicales libres, ~~así como~~ ^{como} el calcio y ~~factores hormonales~~ ^{hormonas} como las citoquininas, ~~presentan una acción inhibitoria de la senescencia~~ ^{la acción inhibitoria de la senescencia fue presentada} (FERGURSON, 1983; LESHEM, 1981, 1985). ~~Estos resultados~~ ^{Esto} justifican el gran interés que ha tomado la reciente teoría sobre los radicales libres, como mecanismo mediador de la senescencia, en el que el enzima lipoxigenasa ha sido considerada clave al generar $O_2^{\cdot -}$ y radicales de ácidos grasos poliinsaturados (Fig. 13).

Vaquí a continuación

Senescencia y etileno

Los estudios realizados para analizar el efecto de las hormonas sobre la senescencia han mostrado una respuesta variable, en dependencia del tejido utilizado y ^{de} su estadio fisiológico (THIMANN, 1980). Para TREWAVAS (1982), ~~es~~ la diferente sensibilidad del tejido a la ~~acción~~ ^{acción} hormonal en cada momento, más que los niveles endógenos, ^{es} el factor que controla la regulación ^{de cualquier proceso metabólico, por estas moléculas}. En este sentido, el etileno parece jugar un papel fundamental en la iniciación o aceleración de la senescencia, ~~siendo~~ ^{siendo} su acción, dependiente de otras fitohormonas como citoquininas, giberelinas, auxinas y ácido abcísico

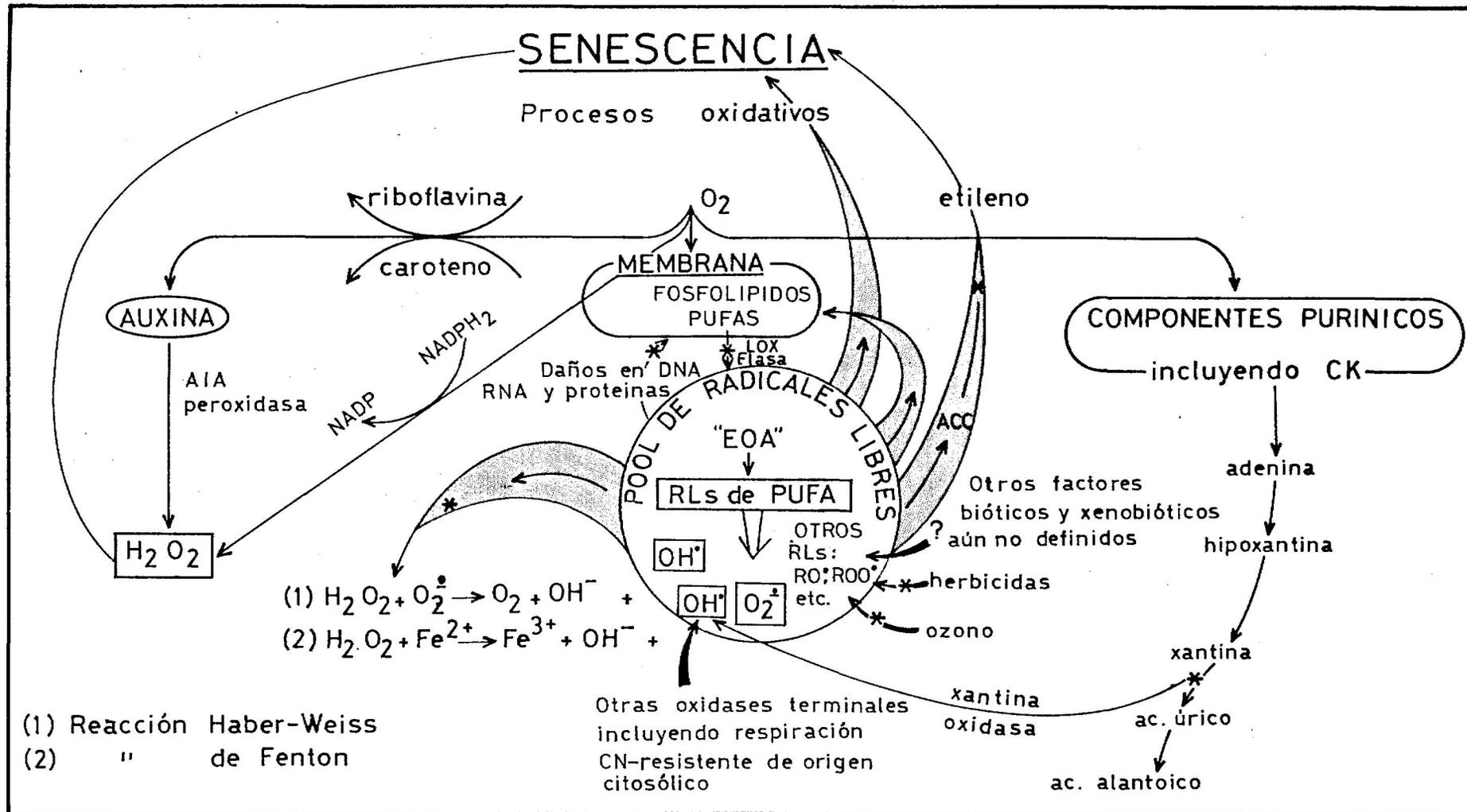


Figura 13. Modelo hipotético de senescencia vegetal, basado en la teoría de los oxi radicales libres, especies activadas de oxígeno (EOA) y su interacción con citoquininas (CK), bien como secuestrante de radicales libres o previniendo su formación. (*) indica el efecto inhibitorio de las citoquininas encontrados sobre parámetros de la senescencia asociados a radicales libres. Esquema según LESHEM (1984).

(LIEBERMAN, 1979), ~~aspecto este que~~ está siendo actualmente objeto de intensa investigación.

~~Lo será~~ objeto de este capítulo la revisión detallada del mecanismo de acción del etileno, en cuanto a sus acciones reguladoras de múltiples procesos celulares; sin embargo, si se describirán algunos aspectos concernientes a su biosíntesis, y su ^{acción reguladora en} ~~ligazón a~~ procesos, ^{como el} ~~metabolismo lipídico y oxidativo;~~ procesos relacionados, según se indicó, ~~con la senescencia.~~

Desde esta perspectiva, se sabe que ^P el etileno es producido por cualquier ~~tejido~~ vegetal (tallos, raíces, hojas, flores, frutos, tubérculos) durante la germinación de las semillas, la maduración de frutos, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de órganos, así como por ^{un} ~~la~~ ^{gran número} ~~amplia~~ variedad de stresses ambientales, previamente mencionados, aceleradores de la senescencia (LIEBERMAN, 1979; YANG y HOFFMAN, 1984). ~~Des~~ hitos históricos han contribuido enormemente a la elucidación de la biosíntesis del etileno en plantas. El primero, surgió de la evidencia experimental de que la hormona deriva de los carbonos 3 y 4 de la metionina (LIEBERMAN y MAPSON, 1964), y el segundo, del descubrimiento del ACC como su precursor directo (ADAMS y YANG, 1979; LURSEN y col. 1979). ~~Así~~ ha quedado perfectamente establecido que la ruta mayoritaria para su síntesis en plantas superiores se realiza a través de la secuencia:
Metionina → SAM → ACC → Etileno.

La formación de ACC catalizada por la ACC sintasa, resulta ser el principal punto de control de la biosíntesis (YANG, 1985), ~~la cual es~~ dependiente de piridoxal fosfato, ~~siendo~~ fuertemente inhibida por AOA y AVG, (YANG y HOFFMAN, 1984) (Fig. 14). Se ha podido comprobar que ~~la síntesis de~~ ACC parece inducirse durante la maduración de frutos y la senescencia de flores, así como ~~por~~ ^{parecen inducir la actividad de ACC} la acción de auxinas y de diversos stresses ambientales (NICHOLS y FROST, 1985; FUHRER y FUHRER-FRIES, 1985). La evidencia de que este paso es el factor limitante de la ruta, está apoyada por el hecho de que la aplicación exógena de ACC a varios órganos vegetales estimula ^{la hormona} notablemente la producción de etileno (CAMERON y col. 1979). Ello sugirió que el enzima formador de etileno a partir de ACC (EFE), ^{se} ~~se~~ encuentra presente en la mayoría de los tejidos. (YANG y ADAMS, 1980). La

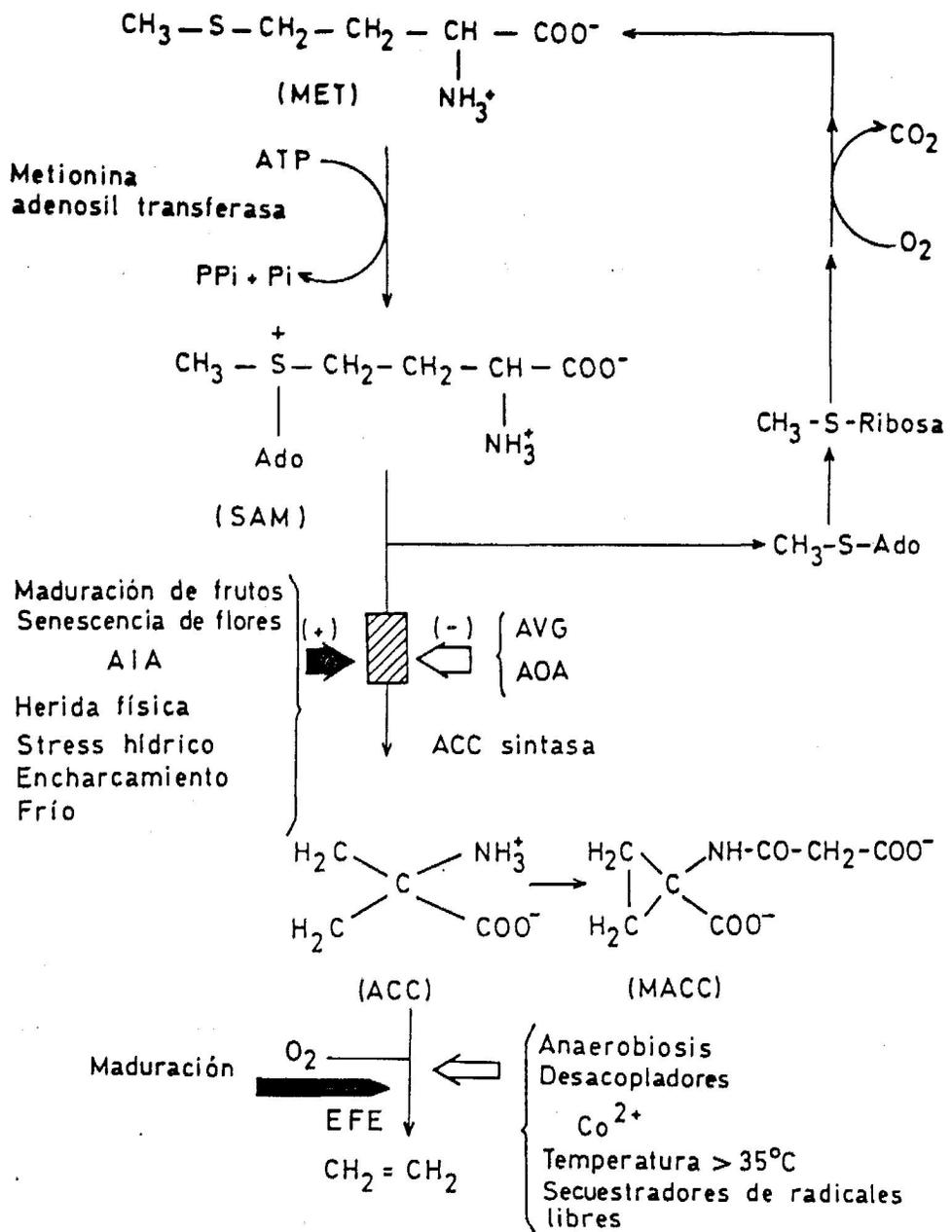


Figura 14. Regulación de la biosíntesis de etileno. (➡) Inducción de la síntesis del enzima. (⏪) Inhibición de la reacción. (Met) Metionina (Ado) adenosina, (Ade) Adenina, (MACC) ácido 1-malonilaminociclopropano-1-carboxílico. Según YANG (1985).

reacción ^{es} parece ser dependiente de oxígeno, ^e siendo inhibida por iones Co^{2+} , temperatura, desacopladores y sequestrantes de radicales libres, (APELBAUM y col. 1981). Esto presupone que la producción de etileno ^{podría estar} esté mediada por los radicales libres, ^{la actividad (queda ser)} y que ~~el~~ EFE ~~sea~~ dependiente de la integridad de la membrana. A este respecto, JOHN (1983) postuló que la formación de etileno ^{podría} ~~podría~~ estar acoplada a un influjo transmembranario de protones ~~hacia el interior de la membrana plasmática~~. Este prerrequisito de la integridad de la membrana para la biosíntesis de etileno en sistemas naturales o intactos, explicaría el hecho de que la homogeneización del tejido o tratamientos con detergentes ~~y otros compuestos~~, ^{que} ~~los~~ ~~cuales~~ modifican la estructura de las membranas, condujera a la pérdida de la capacidad de síntesis (IMASEKI Y WATANABE, 1978).

~~El estudio in vivo de las propiedades del enzima muestra una saturación a concentraciones 1 mM de ACC (Km aparente 61 μM), presentando un alto grado de estereoselectividad para el isómero 1R,2S del ácido 1-amino-2-etil ciclopropanocarboxílico (AEC) (análogo del ACC), determinado por la producción de 1-buteno trans (HOFFMAN y col. 1982; GUY y KENDE, 1984).~~

Además del ^{sistema} EFE con funcionalidad *in vivo*, ^{también} se han descrito otros sistemas ~~con capacidad para convertir in vitro ACC exógeno en etileno~~; ^{que in vitro convierten} ~~obtenidos a partir de extractos~~ ^{de} plántulas de guisante (KONZE y KENDE, 1979), ^{microsomos} ~~microsomos~~ de pétalos de clavel (MAYAK y col. 1981), preparaciones de AIA-oxidasa de hojas de olivo (VIOQUE y col. 1981), mitocondrias y partículas submitocondriales (VINKLER y APELBAUM, 1983, 1984), así como ~~de~~ sistemas capaces de convertir químicamente ACC a etileno a través de reacciones mediadas por radicales libres (LEGGE y col. 1982). ^{Aunque} ~~Todos ellos~~ parecen ser ~~también~~ dependientes de oxígeno, inactivables por el calor e inhibidos por agentes sequestrantes de radicales libres (propilgalato), ~~sin embargo~~ ^{Así} presentan algunas características diferentes al sistema *in vivo*.

^{son} saturables sólo a elevadas concentraciones de ACC (McRAE y col. 1982), poseen una Km aparente para el ACC entre 15 y 400 mM y no muestran estereoespecificidad (McKEON y YANG, 1984). En este sentido, VENIS (1984), en un estudio comparativo de la estereoespecificidad de los isómeros de AEC, sugiere que éste pueda ser un criterio para establecer la diferencia entre la formación de etileno *in vitro* por los sistemas subcelulares y aquella otra que tiene lugar *in vivo*. ^{para} Según GUY y KENDE (1984), ^{a nivel del tejido intacto} las

conversión de ACC a etileno

~~est~~ vacuolas de protoplastos de guisante, parece ser el único sistema subcelular con las mismas propiedades que las del tejido intacto. *Para la V.*

Contrariamente a lo que ocurre *in vivo*, las características de los sistemas ^{productores de etileno} *in vitro* parecen ^{indicar} una reacción fuertemente mediada por radicales libres. ROHWER y MADER (1981) y VIOQUE y col. (1981) habían asociado ^{esta} actividad EFE a la acción de las peroxidasas y AIA-oxidasa,

~~sin embargo~~, es probable que estos sistemas participen en la ^{reacción} producción de etileno únicamente como ^{donadores} proveedores de radicales libres (SHIKAMATA, 1983).

Recientemente, LYNCH y col. (1985) ^{han} ~~mostrado~~ ^{comprobado} en microsomas de clavel que los productos de reacción del ^{la} LOX ($O_2^{\cdot-}$ hidroperóxidos lipídicos y ^{otros radicales}) median la formación de etileno desde ACC exógeno, y que los hidroperóxidos generados por ^{dicha} ~~esta~~ enzima son los principales responsables de la formación no fisiológica del etileno en sistemas *in vitro*, ~~sugiriendo también la participación de otro enzima distinto a la lipoxigenasa, que no puede ser identificado con el sistema EFE nativo, y que muy bien podría corresponderse con la proteína enzimática solubilizada y parcialmente purificada por ADAM y MAYAK (1984) y ADAM y col. (1985).~~

^{participan en} ~~una~~ ^{conduce en} ~~reacción~~ ^{una} ~~propiedad~~ ^{distinta} ~~de~~ ^{esta} ~~propiedad~~ ^{de} ~~los~~ ^{de} ~~frutos~~ ^{de} ~~climatericos~~ ^{de} ~~postulados~~ ^{por} ~~McMURCHIE~~ ^y ~~col.~~ ^{(1972):} uno, implicado en la regulación de los procesos de envejecimiento, el cual es responsable de la baja velocidad de producción de etileno durante el crecimiento, y ^{otro,} ~~un~~ ^{segundo} sistema, implicado en el incremento autocatalítico de etileno que acompaña a la maduración, ~~no presente en~~ ^{de} ~~frutos~~ ^{de} ~~climatericos.~~

~~Este último también estaría implicado en la producción de etileno en tejidos sometidos a diversos stresses. En~~ ^{la formación} KACPERSKA y KUBACKA-ZEBALSKA (1984) ^{proponen} que la producción de etileno inducida por ^{el} stress ^{se} ~~es~~ ^{asocia} ~~iniciada~~ ^{con} por una alteración de la membrana y por una ^{previamente} ~~activación~~ ^{de} del enzima LOX. ~~En relación a estos hechos, GALLIARD y col. (1968) trabajando con extractos de manzana, mostraron la producción de etano y etileno cuando añadían ácido linolénico en presencia de ascorbato y iones Cu^{2+} y Fe^{2+} . Posteriormente, SADMANN y BOGER (1982) observaron~~

~~una producción de etileno y etano inducida por iones Cu^{2+} en membranas fotosintéticas, encontrando una correlación entre la cantidad de estos compuestos volátiles formados y el contenido en ácidos grasos~~

~~una producción de etileno y etano inducida por iones Cu^{2+} en membranas fotosintéticas, encontrando una correlación entre la cantidad de estos compuestos volátiles formados y el contenido en ácidos grasos~~

~~una producción de etileno y etano inducida por iones Cu^{2+} en membranas fotosintéticas, encontrando una correlación entre la cantidad de estos compuestos volátiles formados y el contenido en ácidos grasos~~

~~una producción de etileno y etano inducida por iones Cu^{2+} en membranas fotosintéticas, encontrando una correlación entre la cantidad de estos compuestos volátiles formados y el contenido en ácidos grasos~~

~~una producción de etileno y etano inducida por iones Cu^{2+} en membranas fotosintéticas, encontrando una correlación entre la cantidad de estos compuestos volátiles formados y el contenido en ácidos grasos~~

poliinsaturados ~~de las membranas~~. En este sentido, KONZE y ELSTNER (1976) y KIMMERER y KOZLOWSKI (1982) comprobaron que los hidroperóxidos derivados de la peroxidación de los lípidos de membranas se descomponen, en ausencia de ACC dando lugar, principalmente, a la formación de etano.

↓
para una parte p. 212

En resumen, la imagen actual de la importancia concedida al boro como elemento modulador del desarrollo y diferenciación celular en plantas, descansa, en gran medida, en la hipótesis que relaciona su mecanismo de acción con el funcionamiento de las membranas. La obtención de esta información necesita del conocimiento de aquellas transformaciones metabólicas y morfológicas que toman plaza a nivel de dichas estructuras, así como de las relaciones entre parámetros que muestran, muchas veces, un diferente grado precisión, por lo cual las interpretaciones deben ser observadas con prudencia. En este sentido, los datos sobre la sensibilidad de raíces y cotiledones de plántulas de girasol al boro, han guiado de forma continua las investigaciones descritas en esta memoria. Se refieren éstas al estudio de una serie de cambios bioquímicos y estructurales relacionados con las membranas celulares, las cuales guardan una fuerte concatenación metabólica entre sí: metabolismo lipídico, metabolismo oxidativo y componentes hormonales. A lo largo de este trabajo se hace, asimismo, referencia a conceptos ligados a la noción de senescencia, proceso que constituye una importante base teórica de la interpretación de los resultados presentados en la última parte de este documento.

Las actividades de este tipo se desarrollan en el ámbito de la gestión pública, y se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

En el ámbito de la gestión pública, se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

En el ámbito de la gestión pública, se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

En el ámbito de la gestión pública, se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

En el ámbito de la gestión pública, se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

En el ámbito de la gestión pública, se refieren a la planificación, organización, dirección y control de los recursos humanos, materiales y financieros de la institución. Estas actividades son fundamentales para el logro de los objetivos institucionales y para el desarrollo de la gestión pública.

III. PLAN GENERAL DE TRABAJO

De las consideraciones teóricas expuestas en el capítulo de antecedentes, de los objetivos indicados, y derivado de nuestras propias limitaciones, en la introducción de esta memoria, nos hemos planteado el siguiente esquema de trabajo encaminado a descifrar los efectos del boro sobre una serie de procesos metabólicos relacionados con las membranas biológicas y que posibilitan los cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo postgerminativo en cotiledones y raíces de plántulas de girasol:

1.- Caracterización morfológica del tejido entero (raíces y cotiledones) y de sus microsomas aislados.

2.- Estudio de la composición lipídica y de las capacidades biosintéticas de estas moléculas en raíces y cotiledones.

3.- Determinación de la composición y biosíntesis lipídica así como estudio particular del enzima CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa en microsomas de raíces.

4.- Estudio del enzima lipoxigenasa de cotiledones: aislamiento y parcial purificación.

5.- Determinación de la actividad respiratoria en cotiledones, y de la formación de etileno en estos órganos y a nivel de sus microsomas aislados.

6.- Al objeto de conseguir una mejor interpretación de los resultados derivados de los estudios metabólicos y morfológicos ya indicados, se estudiarán las relaciones que puedan existir entre ellos, en función del boro, haciendo una especial referencia a la senescencia de los cotiledones al ser este proceso regulado por múltiples factores internos y externos, entre los cuales pueden ser muy importantes aquellos que derivan de los estados de deficiencia o de toxicidad en boro.

IV. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Nuestro estudio se ha llevado a cabo en raíces y cotiledones de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L. var. HK), planta que se distingue por su capacidad de acumular lípidos de reserva en las semillas y que manifiesta una especial sensibilidad a los tratamientos de boro.

1.1. CONDICIONES DE CULTIVO

1.1.a. Condiciones de germinación y desarrollo

Las semillas desinfectadas con una solución de Cl_2Hg (1 %) durante 30 min, son imbibidas en agua (6 horas) y, posteriormente, germinadas en agua a la oscuridad, a $26^\circ \text{C} \pm 1$ y bajo aireación continua. Al cabo de tres días (tiempo cero), se seleccionan para los experimentos semillas germinadas de tamaño y apariencia uniforme, las cuales son transferidas a un sistema hidropónico consistente en una cubeta de plástico de 10 litros en la que ajusta un bastidor capaz de mantener tensa una malla de tela de nylon, que permite la penetración de las radículas dentro de la solución acuosa conteniendo, únicamente, SO_4Ca 0.2 mM y diferentes contenidos de boro. Las plántulas, en número de 15 por litro de medio, se desarrollan durante 3 y 7 días en la oscuridad a $26^\circ \text{C} \pm 1$, bajo continua aireación y un rango de humedad relativa variable entre 65-70 %. Todas las soluciones son hechas con agua desionizada, siendo renovadas cada dos días en base a mantener un grado de contaminación bacteriana razonablemente bajo.

Tres y siete días después de haber sido transferidas las semillas germinadas al medio anteriormente indicado sin o con diferentes contenidos de boro, los cotiledones o las raíces se separan de las plántulas, se lavan con agua destilada, se secan con papel de filtro y se pesan, disponiéndose para los distintos experimentos.

1.1.b. Estudios en condiciones de iluminación

Para estimar los efectos de los cambios metabólicos sometidos a estudio en función del boro, las plántulas desarrolladas durante 3 y 7 días en la oscuridad en un medio sin o con distintas concentraciones de boro, fueron expuestas en cámara de cultivo durante 24 h a una luz blanca y continua (lámparas Phillips, 5.0 W.m⁻²), en solución nutritiva sin boro (STEINER, 1961), a 26° C ± 1 y continua aireación.

1.1.c. Medios de cultivo

Para prevenir posibles interferencias entre el boro y otros nutrientes minerales, se ha utilizado como solución mineral un medio acuoso, con o sin boro, conteniendo SO₄Ca 0.2 mM como único nutriente. Sin embargo, teniendo en cuenta que los cloroplastos requieren varios nutrientes para su desarrollo, para estudiar el efecto de la luz sobre los cambios metabólicos inducidos en cotiledones en función del boro del medio, se utilizó específicamente una solución nutritiva libre de boro (STEINER, 1961).

El pH de los medios de cultivo indicados fué aproximadamente de 5.5. La adición de ácido bórico para obtener una determinada concentración en boro y el tiempo de experimentación, no modifican sensiblemente el pH del medio.

2. TECNICAS EXPERIMENTALES

2.1. PREPARACIONES DE LAS FRACCIONES CELULARES

Las fracciones celulares son aisladas y purificadas de raíces y cotiledones de plántulas de girasol. Se describen en un principio las técnicas de obtención de las fracciones brutas y, posteriormente, la metodología de purificación de dichas fracciones sobre gradiente de sacarosa.

2.1.a. Obtención de glioxisomas y mitocondrias de cotiledones

Los cotiledones cortados y pesados son mantenidos 15 minutos a 4° C en un medio tamponado con Tris-ClH (150 mM), pH 7.5, conteniendo sacarosa (15 %), ClK (10 mM), EDTA (1 mM) y Cl₂Mg (1 mM). Los cotiledones son enseguida homogeneizados en mortero, con el medio anteriormente descrito al que se adiciona clorhidrato de cisteina (2 mM). Para 1 g de peso fresco se utilizan 6 ml de medio de homogeneización, efectuándose todas las manipulaciones en cámara fría entre 2 y 4° C.

El homogenado es filtrado por triple capa de tela de seda, lo que permite retirar la mayor parte de los restos celulares, las paredes pectocelulósicas y las células no rotas, homogeneizado con ayuda de un Potter (son suficientes tres subidas y bajadas del émbolo), y sometido a centrifugaciones sucesivas de aceleraciones crecientes, realizadas en centrifuga Sorvall RC2-B y ultracentrífuga Beckman L5-65. La primera centrifugación a 2.000 x g durante 5 minutos, proporciona un sedimento que contiene los restos celulares y grandes orgánulos. La fracción de glioxisomas y mitocondrias brutas es recogida por centrifugación del sobrenadante a 10.000 x g durante 15 minutos. El sedimento es resuspendido en un medio con la misma composición que el de extracción, pero carente de cisteina; una nueva centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos da lugar a un sedimento de glioxisomas y mitocondrias de color marrón más o menos oscuro, en función de la concentración. Los enzimas malato y citrato sintasas son extraídos y solubilizados a partir de estos orgánulos mediante una doble dilución con Tris-ClH (50 mM), pH 7.5, conteniendo ClK (200 mM) y Tritón X-100 (0.5 %), estando presentes en la fracción sobrenadante que queda después de centrifugar el extracto a 40.000 x g durante 30 minutos.

2.1.b. Obtención de membranas microsomales de cotiledones

Para estimar el efecto del boro sobre la formación de etileno a nivel subcelular, se procedió al aislamiento de microsomas de cotiledones de plántulas de girasol, en un intento de comparar la actividad del enzima sintetizante de etileno (EFE), en una preparación libre de células, frente al tejido entero.

Los microsomas brutos utilizados en estos experimentos son preparados a partir de cotiledones (50 g) desarrollados en medios con diferentes contenidos de boro. Los cotiledones son homogeneizados en mortero con 4 volúmenes de tampón Hepes (50 mM), pH 8.5, conteniendo sacarosa (15 %), ClK (10 mM), Cl₂Mn (0.5 mM) y Cl₂Mg (10 mM). El homogenado, filtrado por tres capas de tela de seda, es centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos y el sedimento, lavado con Hepes (50 mM), pH 8.5, conteniendo ClK (10 mM) y Cl₂Mn (0.5 mM), es finalmente resuspendido en Hepes (50 mM), pH 8.5, conteniendo Cl₂Mn (0.5 mM), utilizando, para ello, un Potter-Elvehjem para una mejor homogeneización.

2.1.c. Preparación de microsomas de raíces

Para la investigación del efecto del boro sobre la composición de lípidos y sobre la actividad de enzimas del metabolismo de estas moléculas en raíces de plántulas de girasol, se procedió al aislamiento y purificación de microsomas de estos tejidos, desarrollados en medios con distintos contenidos del micronutriente.

El tampón de homogeneización de las raíces contiene Tris-ClH (100 mM), pH 7.5, sacarosa (400 mM), Cl₂Mg (10 mM), ClK (10 mM), EDTA (1 mM), DTT (2 mM), PVP soluble (1.5 %) y clorhidrato de cisteína (3 mM), efectuándose la homogeneización en mortero (proporción peso fresco:volumen de tampón, 1:2). El resto de las operaciones, incluidas las centrifugaciones, se llevan a cabo de forma similar a la indicada para la preparación de microsomas de cotiledones.

Los sedimentos de microsomas son de una coloración amarilla característica, rodeados de un pequeño halo de color naranja. Estos sedimentos son resuspendidos en un pequeño volumen conocido de medio de homogeneización sin PVP, con la ayuda de un Potter de pequeña capacidad. La fase sobrenadante final, resultante de la centrifugación a 100.000 x g, denominada *sobrenadante citoplasmático*, y representa la fase líquida del citoplasma diluida en el medio de homogeneización.

2.1.d. Purificación de microsomas de raíces

Se preparan soluciones de sacarosa de diferentes densidades, conteniendo cada una de las soluciones los siguientes compuestos: albúmina bovina (1 mg/ml), ClK (1 mM), $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (10 mM) en Tris-ClH (50 mM), pH 7.5. La fracción de membranas microsomales es purificada sobre un gradiente discontinuo de densidad, preparado a partir de una solución madre de densidad 1.30 y constituido por la siguiente secuencia: 1.30, 1.25, 1.20, 1.15, 1.10 y 1.05. En estas condiciones, la fracción situada en la interfase 1.15-1.10 es la más rica en microsomas. Esta zona es separada con la ayuda de una pipeta Pasteur, siendo ajustada la molaridad de dicha banda con 5 ó 6 volúmenes de medio de homogeneización. Después de centrifugar a 100.000 x g durante 1 hora, se obtiene un sedimento que representa la fracción microsomal pura.

2.1.e. Actividad NADPH citocromo c óxidoreductasa asociada a microsomas

Se ha determinado espectrofotométricamente a 550 nm la reducción de citocromo c exógeno por la fracción microsomal (SOTTOCASA y col. 1967). El medio de reacción contiene NADPH (0.1 mM), cianuro sódico (0.14 mM), citocromo oxidado (0.037 mM), tampón fosfato (0.05 M), pH 7.5, y cantidades variables de la fracción microsomal; eventualmente se adicionan 10 µl de una solución etanólica de antimicina A (1 mM). Los resultados son expresados en nmoles de citocromo c reducido por mg de proteínas y por minuto.

2.1.f. Actividad de enzimas asociados a glioxisomas y mitocondrias

Para seguir las actividades oxidativas de mitocondrias y glioxisomas de cotiledones de girasol en función del boro del medio de cultivo, se han determinado espectrofotométricamente dos enzimas: malato y citrato sintasa asociados a dichos orgánulos celulares. La actividad malato sintasa (L-malato glioxilato liasa, E.C. 4.1.3.2.) se ha ensayado básicamente según

DIXON y KORNBERG (1962); sin embargo, el coenzima A libre se determina utilizando ácido 5,5'-ditlobis-2-nitrobenzónico para detectar los grupos sulfhidrilos libres (ELLMAN, 1959). La actividad citrato sintasa (citrato oxalacetato liasa, E.C. 4.1.3.7) fue ensayada por el método de BOGIN y WALLACE (1969). Las actividades enzimáticas de ambos enzimas se expresan en unidades internacionales por mg de proteínas.

2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL EXAMEN A MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA

El material para estudios histológicos y ultraestructurales fue sometido a la preparación convencional de las muestras para microscopia electrónica al objeto de preservar bien las estructuras celulares.

2.2.a. Fijación con glutaraldehido

Preparación del glutaraldehido

El glutaraldehido se prepara a partir de una solución madre al 25 %, diluyéndolo en tampón cacodilato 25 mM, pH 6.8, hasta dejar la solución al 3%.

Fijación

Las raíces o cotiledones fueron cortadas en piezas de 1 a 2 mm de tamaño e introducidas en el fijador a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas, al cabo de las cuales se realizan tres lavados consecutivos de ½ hora cada uno con tampón cacodilato 25 mM.

Postfijación con tetróxido de osmio

Después de la fijación con glutaraldehido, se realiza una postfijación con tetróxido de osmio al 1 % en tampón cacodilato durante una hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, se vuelve a lavar tres veces cada 30 minutos con tampón cacodilato 25 mM.

2.2.b. Deshidratación

Una vez fijado el material hay que extraer el agua del mismo. La deshidratación se realizó pasando las muestras por las siguientes series graduales de alcoholes a temperatura ambiente: etanol al 30 %, 1 h; al 50 %, 1 h; al 70 %, 1 h; al 90 %, 1 h; y al 100 % 3 h.

2.2.c. Inclusión

Se ha utilizado como resina de inclusión el Epon (Epikote 812). Para la preparación de estas resinas se emplean las siguientes mezclas: mezcla A, que contiene Epon (15 ml) y anhídrido dodecenil succínico (DDSA) (25 ml); y mezcla B, que contiene Epon (50 ml) y anhídrido metil nádicico (MNA) (44 ml). Ambas mezclas se agitan por separado durante 30 min. El Epon se compone de: mezcla A (40 ml), mezcla B (60 ml) y DMP-30 (1.8 ml), siendo conservado en congelador en el interior de jeringas.

El proceso de inclusión se realiza de una manera gradual, con un paso intermedio con óxido de propileno para eliminar el etanol que contiene el tejido, ya que el medio de inclusión es insoluble en el alcohol y por lo tanto debe ser reemplazado por un líquido que sea simultáneamente soluble en el alcohol absoluto y en el medio de inclusión que se va a emplear. Los pasos son los siguientes: etanol al 100 % más óxido de propileno (1:1), 5 min; óxido de propileno, 3 cambios de 10 min; óxido de propileno más Epon (1:1), 45 min; Epon, 3 h a 37° C. A continuación cada una de las piezas se introduce en una cápsula adecuada, se orienta y se llena con la resina correspondiente al proceso de inclusión elegido. La polimerización se realiza por introducción de las cápsulas en la estufa a 60° C durante 24 h.

2.2.d. Microtomía

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo Reichert Ultracut Jung. Primero se hicieron cortes semifinos (1 a 2 μ m) para el estudio al microscopio óptico, previa tinción con azul de toluidina al 1 %. Se tomaron

fotografías de estos cortes sobre película *Kodak panatomic* en un fotomicroscopio Reichert. Para el estudio ultraestructural se utilizaron cortes ultrafinos de unos 500 a 700 Å de espesor, recogidos en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro.

2.2.e. Tinción de los cortes

Para incrementar su contraste, los cortes obtenidos se tificaron, primero, con acetato de uranilo y, posteriormente, con citrato de plomo según el método de REYNOLDS (1967).

2.2.f. Observaciones

Se han realizado en un microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 10C.

2.3. UTILIZACION DE PRECURSORES RADIOACTIVOS

En nuestros experimentos hemos utilizado acetato sódico-1-¹⁴C de radioactividad específica 58 mCi/mmol, cloruro de metil-¹⁴C-colina, 58 mCi/mmol y CDP-metil-¹⁴C-colina, 56 mCi/mmol, todos ellos suministrados por *The Radiochemical Centre, Amersham*.

2.3.a. Elección del precursor

La elección del precursor depende de la parte de la molécula lipídica que se quiere investigar (Fig. 15). Nosotros hemos utilizado principalmente acetato sódico-1-¹⁴C como precursor adecuado de los ácidos grasos. Este precursor nos ha permitido seguir la formación de las moléculas de ácidos grasos y de los lípidos complejos.

El marcaje con cloruro de metil-¹⁴C-colina y CDP-metil-¹⁴C-colina ha facilitado el estudio particular de la biosíntesis de fosfatidilcolina.

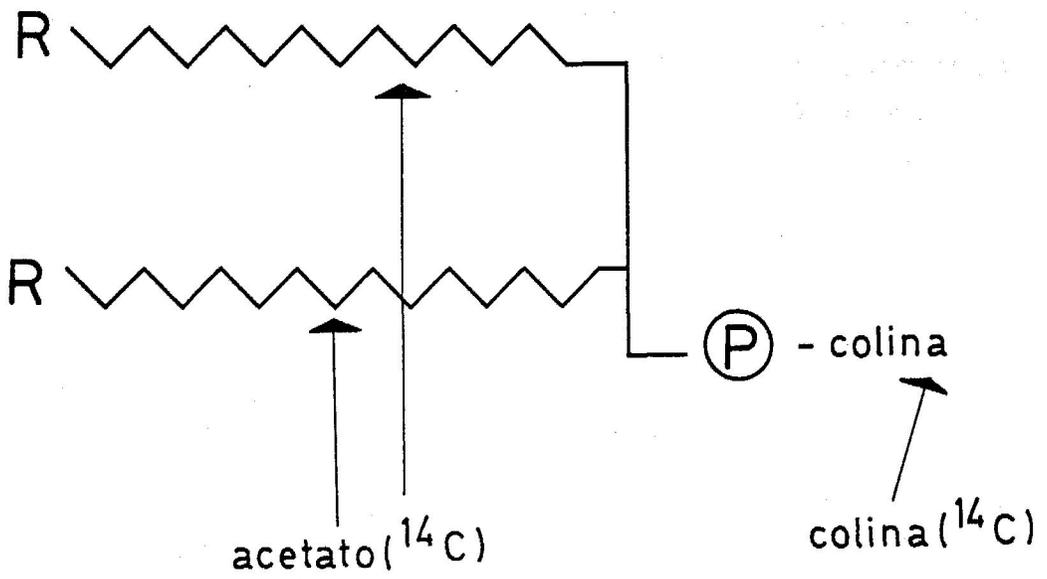


Figura 15. Marcaje específico de una molécula de fosfolípido a partir de dos precursores radioactivos diferentes.

2.3.b. Condiciones de incubación

Dos sistemas han sido utilizados (Fig. 16):

El primero, *in vivo*, ha consistido en poner la plántula entera (cuando se iba a determinar la biosíntesis lipídica en cotiledones) o las raíces, en presencia del precursor. Al final de la incubación las raíces o cotiledones son abundantemente lavados con agua destilada y posteriormente, extraídos sus lípidos (en los estudios de biosíntesis a nivel de la raíz entera o de los cotiledones), o aislados los microsomas de raíces (cuando se ha determinado la biosíntesis lipídica en estas estructuras celulares).

El segundo sistema, *in vitro*, ha consistido en aislar previamente los microsomas, y después ponerlos a incubar en una solución del precursor radioactivo. De esta forma, se ha podido seguir la capacidad de biosíntesis lipídica en dicha fracción celular aislada del resto de la célula.

Tejido entero

Las raíces son colocadas en un erlenmeyer conteniendo la solución radioactiva, siendo importante no introducir un número demasiado grande de órganos para un determinado volumen de líquido, habiéndose utilizado 3 ml de solución por 10 raíces.

En los experimentos de incorporación de ^{14}C a los lípidos del cotiledón, la solución radioactiva es depositada directamente, bajo la forma de pequeñas gotas, sobre la superficie de dicho tejido, manteniendo la plántula entera con las raíces inmersas en agua destilada durante todo el tiempo de incubación. En ambos casos, el erlenmeyer es agitado continuamente en estufa regulada a 26°C y en oscuridad. Finalizado el tiempo de incubación, las raíces o cotiledones son abundantemente lavados con agua destilada procediéndose a la extracción de las fases acuosa y lipídica.

Suspensión de orgánulos celulares

Las incubaciones se han efectuado generalmente en tubos pírex a rosca de 10 ml. Para ello, se introduce en dichos tubos la solución conteniendo el precursor radioactivo y diversos cofactores, la composición de los cuales

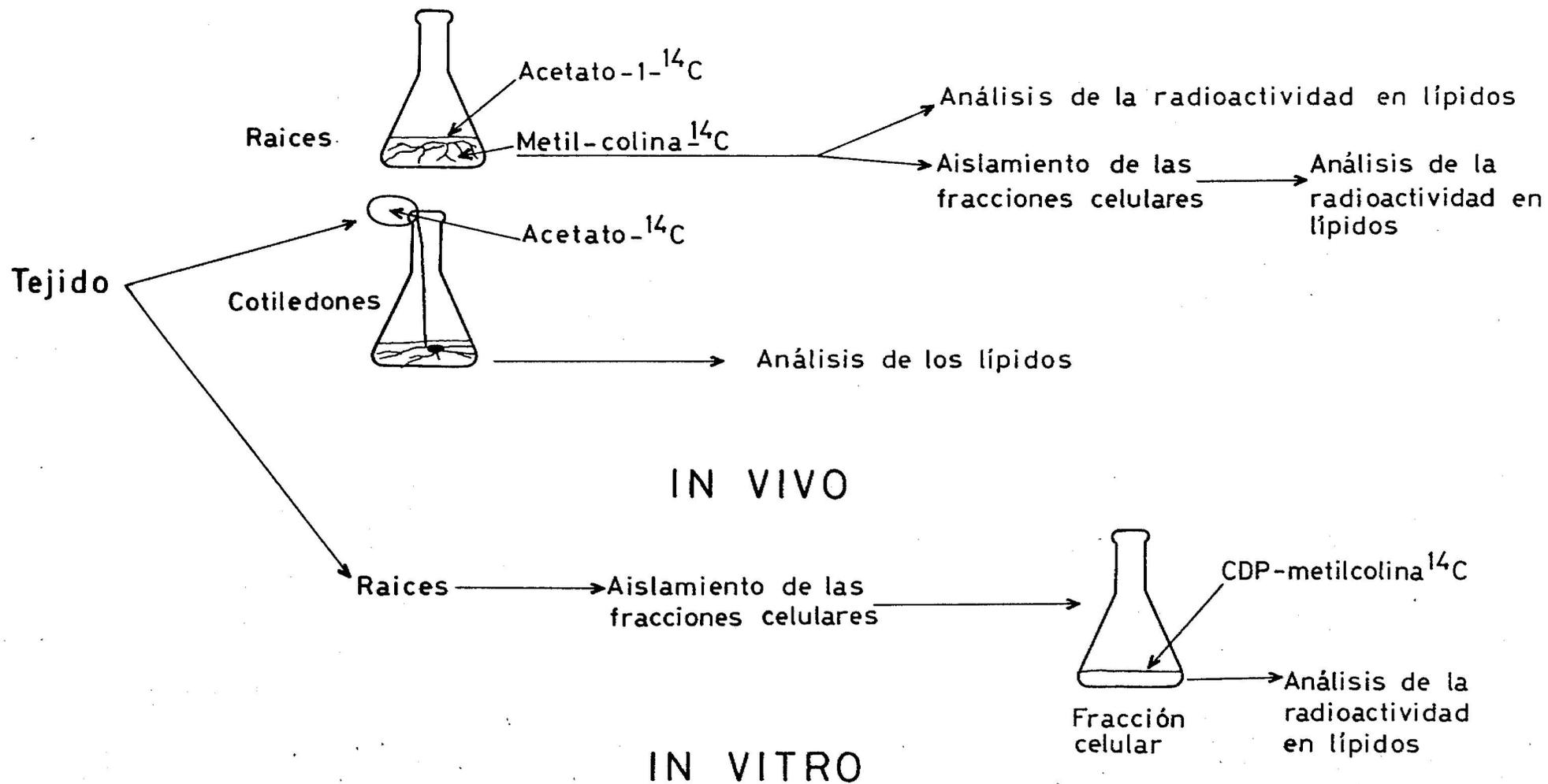


Figura 16. Técnica para el suministro de los precursores radioactivos directamente al tejido entero (cotiledones o raíces) y a las fracciones celulares aisladas de raíces de plántulas de girasol.

varía según los requerimientos, por lo que será indicada específicamente en el texto. El conjunto es previamente agitado durante 10 min en estufa a temperatura constante de 28° C y, posteriormente, se adiciona un volumen exacto de la suspensión de orgánulos y se incuba durante distintos tiempos. Al final de la incubación, la suspensión de orgánulos es adicionada sobre una mezcla de metanol-cloroformo (2:1, v/v), procediéndose a la extracción de los lípidos totales.

2.4. ENZIMAS DEL METABOLISMO LIPIDICO

2.4.a. Estudio de la CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa de microsomas de raices

Preparación del enzima

El aislamiento y purificación de microsomas de raices de plántulas de girasol desarrolladas en medios con distintas concentraciones de boro, se ha indicado en el apartado 2.1.c.

Actividad enzimática

Para seguir la transferencia de fosforilcolina sobre los D-1,2 diacilgliceroles del tejido, se han utilizado como precursores el cloruro de metil-¹⁴C-colina (incorporación a nivel de tejido entero) y la CDP-metil-¹⁴C-colina (formación de fosfatidilcolina a nivel de los microsomas aislados). Es importante puntualizar que las moléculas de diacilglicerol, aceptores de la fosforilcolina, están presentes en los lípidos microsomales. Las condiciones de incubación del precursor radioactivo a nivel del tejido entero o a nivel de los microsomas aislados, se indican en el apartado 2.3.b del presente capítulo de Material y Métodos.

En la determinación de la actividad del enzima en microsomas purificados, el medio de incubación normal contiene en un volumen final de 1.5 ml: 20 µmoles de ditiotreitól, 10 µmoles de Cl₂Mg, 15 µmoles de Tris-ClH, pH 8.0, 10.7 µmoles de CDP-metil-¹⁴C-colina (540.000 cpm) y un volumen

de suspensión microsomal equivalente a una cantidad de proteínas entre 0.1 y 0.5 mg. Previo a la adición de la suspensión de microsomas, la mezcla de reacción es mantenida a 28° C durante 5-10 min. La incubación se efectúa a esta temperatura siendo detenida por la adición rápida de una mezcla de metanol-cloroformo (2:1, v/v) y posterior extracción de los lípidos totales. Paralelamente, se prepara un testigo conteniendo todos los constituyentes de la mezcla de incubación, excepto la fracción microsomal. La actividad fosfotransferásica es determinada, en un tiempo definido, en función de la cantidad de FC-¹⁴C detectada en el extracto de lípidos totales, expresada en nmoles de precursor incorporado por mg de proteínas.

2.4.b. Estudio del enzima lipoxigenasa de cotiledones

Obtención del extracto crudo

La determinación de la actividad lipoxigenásica de cotiledones desarrollados en medios con diferentes concentraciones de boro, se ha llevado a cabo, cada día de germinación, en el extracto crudo obtenido a partir de dicho tejido. Para ello, los cotiledones se homogenizan en proporción 1:20 (peso:volumen) con tampón fosfato potásico (50mM), pH 7,0, conteniendo Tritón X-100 (1%), PVP insoluble (2%) y metabisulfito sódico (10 mM), durante 2 min en Sorvall Omnimixer a la velocidad máxima y a 4° C. El extracto resultante de centrifugar a 27.000 x g durante 30 min el homogenado anterior y posterior filtración del sobrenadante, es utilizado para la determinación de la actividad enzimática.

Purificación parcial del enzima

Para estudiar el efecto del boro sobre la actividad del enzima, se procedió a su aislamiento y purificación parcial para evitar la actuación de posibles inhibidores del tipo de los ácidos acetilénicos, ácidos grasos bromados y ácidos grasos con algún grupo alcohólico (MITSUDA y col. 1967; DOWNING y col. 1972; ESKIN y col. 1977).

Para ello, se parte de cotiledones desarrollados durante 6 días en

medios desprovistos de boro. Los tejidos (20 g) se homogenizan con 4 volúmenes de acetona a -18°C durante 2 min a la velocidad máxima (Sorvall Omnimixer). El precipitado es recogido por centrifugación a $5.000 \times g$ durante 10 min, lavado con acetona desecada con SO_4Na_2 anhidro y desengrasado con éter de petróleo $40-60^{\circ}$. Posteriormente, el enzima es extraído en proporción 1:20 (peso de polvo acétonico:volumen de tampón) con tampón fosfato (50 mM), pH 7.0, conteniendo Tritón X-100 (1%), PVP insoluble (2%) y metabisulfito sódico (10 mM). Después de centrifugar a $27.000 \times g$ durante 30 min, el precipitado es desechado y el sobrenadante (extracto crudo) llevado a 25 % de saturación con sulfato amónico. Esta solución, mantenida 2 horas bajo continua agitación, es centrifugada a $15.000 \times g$ durante 10 min. En el sedimento y sobrenadante se determina la actividad lipoxigenásica. El sobrenadante se ajusta a una saturación en sulfato amónico del 60 %, y se recoge el precipitado resultante por centrifugación a $20.000 \times g$ durante 15 min, que es redisuelto en tampón fosfato potásico (50 mM), pH 7.0, y aplicado a una columna de Sephadex G-50 (2.0 x 25 cm) equilibrada y posteriormente, eluida con el mismo tampón fosfato. El eluido ($27 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$) es recogido en fracciones de 4 ml, y las fracciones activas reunidas y concentradas con polietilenglicol 600, se dializan durante 12 h contra tampón fosfato (50 mM), pH 7.0. El dializado es aplicado a una columna (2.5 x 40 cm) de DEAE- celulosa (Whatman 52) equilibrada con el tampón anterior y el enzima es eluido mediante la aplicación de un gradiente de ClNa (0-0.4 M) en dicho tampón. De las fracciones eluidas (4 ml x 70), se toman aquellas que muestran actividad, se dializan contra tampón fosfato (50 mM), pH 7.0, y se concentran en presencia de polietilenglicol 600, para ser utilizadas en la determinación de algunas propiedades del enzima, así como para los estudios de actividad *in vitro* en función del boro.

Actividad enzimática

La actividad lipoxigenásica se determina por polarografía a 25°C utilizando un electrodo de oxígeno (Hansatech, modelo D.W.). La mezcla de incubación contiene ácido linoléico como sustrato (1 mM) adicionado como

sal amónica, tampón imidazol (100 mM), pH 6.9 y enzima en una cantidad equivalente a 1 mg de proteínas, en un volumen total de 2.5 ml de solución saturada de aire.

2.5. RESPIRACION, ACTIVIDAD PEROXIDASICA Y FORMACION DE ETILENO

Teniendo en cuenta la hipótesis establecida de una posible actuación del boro a nivel de las membranas como regulador de la funcionalidad de estas estructuras celulares, se ha considerado que los estudios de: respiración, actividad de enzimas oxidativos del tipo de la peroxidasa y producción de etileno, pueden constituir factores importantes en la investigación de la acción del boro en plantas. En este apartado del trabajo se determina en que medida los cambios de dichos parámetros en cotiledones pueden ser correlacionados con el contenido de boro en los medios de cultivo de plántulas de girasol desarrolladas en condiciones de luz y oscuridad.

2.5.a. Medidas de respiración y etileno en tejido entero

Para el estudio de la actividad respiratoria de los cotiledones, se han medido las concentraciones de O_2 y CO_2 en el medio de incubación por cromatografía en fase gaseosa. Para ello, entre 7 y 10 cotiledones lavados en agua destilada durante 5 min, se introducen en viales de 10 ml conteniendo 2 ml de una solución a base de tampón fosfato potásico (50 mM), pH 7.0, y distintos compuestos, cuya acción es objeto de estudio, indicándose en el texto la composición de las mezclas de incubación. Los viales se mantienen 2 h en baño de agua a 27° C bajo continua agitación, aireación y oscuridad. Transcurrido este periodo, se decanta el medio, se lavan los cotiledones con tampón fosfato (50 mM), pH 7.0, y se cierran los viales, de forma que el tapón, ajustado con septo de silicona perforable, permite tomar con jeringa determinados volúmenes de los gases desprendidos y/o absorbidos por los tejidos.

El etileno se determina en muestras gaseosas de 1.0 ml, a 30° C en cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5730A equipado con detector de ionización de llama (FID) y columna Poropak N de 1 m. Las cantidades de CO₂ y O₂ se analizan en muestras de 50 µl, el primer gas a 30° C, utilizando una columna Poropak Q, detector de ionización de llama y tubo catalítico de níquel capaz de convertir todo el CO₂ en metano, lo que posibilita la medida de bajas concentraciones con el FID. El oxígeno se determina a 50° C, columna Sieve 5A de 2 m y detector de conductividad térmica. Los gases portadores fueron nitrógeno (para las medidas de etileno y CO₂) y argón (para las medidas de O₂).

2.5.b. Determinación de etileno en microsomas

Obtención de microsomas brutos

Los microsomas brutos han sido aislados según se indica en el apartado 2.1.b del presente capítulo de Material y Métodos.

Solubilización y preparación de membranas a partir de los microsomas brutos

Las membranas microsomales brutas se han solubilizado en presencia de Brij W-1 (detergente no iónico) al 0.1%. Para ello, se incuban a 4° C durante 60 minutos con continua agitación, se centrifuga la mezcla a 105.000 x g durante 30 minutos y se separan el sobrenadante y el sedimento, siendo éste último suspendido en Hepes (50 mM), pH 8.5, conteniendo Cl₂Mn (0.5 mM) e identificadas, a nivel del sobrenadante y del sedimento resuspendido, la actividades de los sistemas sintetizante del etileno (EFE) y lipoxigenasa.

Separación de los enzimas sintetizante de etileno y lipoxigenasa: determinación de actividades

El sobrenadante anterior, resultante del extracto de microsomas brutos con Brij W-1, se concentra mediante diálisis contra polietilenglicol 600. La fracción concentrada se hace pasar a través de una columna (20 x 2

cm) de Sephadex G-50, equilibrada con tampón Hepes (50 mM), pH 8.5, conteniendo Cl_2Mn (0.5 mM). Se recogen fracciones de 3.5 ml, determinándose proteínas en cada tubo, así como la actividad de los enzimas sintetizante de etileno y lipoxigenasa.

Para la medida de etileno en microsomas brutos y en las fracciones de membranas solubilizadas, se incuban éstas en mezcla de reacción conteniendo tampón Hepes (50 mM), pH 8.5, Cl_2Mn 0.5 mM y reactivos cuyos efectos en el proceso se pretende determinar, en un volumen final de 1.0 ml. Los experimentos se inician con la adición de ACC, e inmediatamente se someten a incubación en viales de 10 ml, cerrados herméticamente con tapón de rosca y septo de silicona, permitiéndose la acumulación de gases. Después de incubar en baño de agua a 28° C y 1 h, se mide el etileno por cromatografía en muestra de gases de 1.0 ml, según se indicó en el apartado 2.5.a del presente capítulo. Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, los microsomas brutos fueron inmediatamente incubados a 60° C durante 30 min y, posteriormente, mantenidos en tubo cerrado como se ha indicado anteriormente.

La actividad lipoxigenasa se determina por polarografía de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 2.4.b.

2.5.c. Actividad peroxidásica

La actividad peroxidásica (Donador: hidrógeno peróxido reductasa, E.C. 1.11.1.7) en función de la concentración en boro del medio de cultivo, se ha determinado en el mismo extracto crudo de cotiledones obtenido para estudiar los cambios inducidos en la actividad del enzima lipoxigenasa (apartado 2.4.b). Para ello, se utiliza O-dianisidina como donador de electrones, estando compuesta la mezcla de reacción de tampón fosfato (67 mM), pH 6.0, conteniendo O-dianisina (0.33 mM) y H_2O_2 (1.0 mM), en un volumen de 3.0 ml. La reacción se inicia por adición de 50 μ l del extracto enzimático adecuadamente diluido, determinándose la aparición de O-dianisidina oxidada a 25° C y 460 nm. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima capaz de causar el cambio de una unidad de absorbancia en un minuto.

2.6. EXTRACCION DE LIPIDOS

2.6.a. Extracción de lípidos totales

Se ha llevado a cabo a nivel del tejido entero y a nivel de las suspensiones de orgánulos.

Tejido entero

Entre 8-10 cotiledones y 15-20 raíces han sido utilizadas para cada experimento. Los órganos pesados y lavados con agua destilada son adicionados directamente sobre agua hirviendo, manteniéndose durante 5 minutos para inactivar las fosfolipasas (BENSON y STRICKLAND, 1960; DOUCE, 1964). Se decanta el agua y los tejidos son homogeneizados en mortero con 10 ml de metanol, 10 ml de cloroformo y 5 ml de agua salada (ClNa 1 %), siguiendo a cada adición una enérgica homogeneización durante 1 min (BLIGH y DYER, 1959). El contenido del mortero es transferido cuantitativamente a un tubo de centrifuga y después de centrifugar a 2000 x g durante 10 minutos, se obtiene una capa clorofórmica inferior de un color amarillo vivo que es separada con pipeta Pasteur y transvasada a un tubo con tapón a rosca. El disolvente es eliminado por evaporación a presión reducida en rota-evaporador, adicionándose sobre el residuo un volumen conocido de una mezcla de benceno/etanol (4:1, v/v). La solución lipídica obtenida es conservada a baja temperatura (-20° C) sin alteración importante (VORBECK y MARINETTI, 1965). Todo el proceso se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno.

Suspensión de microsomas

Se utiliza la técnica de BLIGH y DYER (1959). Para ello, un volumen de la suspensión de microsomas o de la mezcla de incubación (en los experimentos de biosíntesis lipídica), se adiciona sobre 10 ml de metanol hirviendo contenidos en un Potter. Sobre el conjunto se adicionan 5 ml de cloroformo y se homogeniza con la ayuda del émbolo; en este estado debe ser visible una sola fase. A continuación se adicionan otros 5 ml de cloroformo (nueva homogeneización); la separación de las fases se asegura por adición de 5 ml de una solución de ClNa en agua (1 %). El conjunto es transferido a

un tubo de centrifuga y centrifugado a 5.000 x g durante 10 min; la capa clorofórmica inferior es tratada como en el apartado anterior. Todo el proceso se realiza en cámara fría a 4° C.

2.6.b. Extracción y metilación de ácidos grasos

Se ha utilizado la técnica de METCALFE y col. (1966) modificada por LECHEVALLIER (1966). Una parte alícuota de la solución de lípidos totales es evaporada en tubo a rosca (pírex) para la saponificación de los lípidos acílicos y se adicionan 5 ml de sosa metanólica (0.5 M), se cierra el tubo y se mantiene 15 min a 65° C; posteriormente, para la metilación de los ácidos grasos se añaden 3 ml de una solución ácida de trifloruro de boro en metanol (14 %), manteniéndose de nuevo en el tubo durante 20 min a 65° C. Se enfría el tubo con agua del grifo y se extraen los ésteres metílicos con 10 ml de pentano (generalmente se adicionan 5 ml de agua destilada antes de adicionar el pentano). Una segunda adición de 5 ml de pentano asegura una buena extracción.

Se separa la fase superior pentánica y se adiciona sobre ella un volumen conocido de una solución metanólica de éster metílico del ácido heptadecanoico, lo cual permite la dosificación de los ácidos grasos de la muestra problema.

2.6.c. Determinación de la radioactividad en las soluciones lipídicas

Una parte alícuota de la solución de lípidos totales o de los ácidos grasos es adicionada sobre 10 ml de mezcla de centelleo preparada a base de PPO (0.5 %) y de dimetil POPOP (0.03 %) en tolueno. La medida de la radioactividad se efectúa por centelleo líquido en contador Pachard Tri-Carb modelo C2425.

2.7. ANALISIS DE LIPIDOS

Para separar, por una parte, las diferentes categorías lipídicas (fosfolípidos, galactolípidos y lípidos neutros) y, por otra, dichas categorías entre sí, han sido utilizadas diferentes técnicas cromatográficas.

2.7.a. Separación de las categorías lipídicas

Las diferentes clases lipídicas se han separado utilizando la técnica de cromatografía en capa fina. Las placas, (0.25 y 0.50 mm de espesor) de gel de sílice (silicagel G, Merck), son activadas durante 30 min a 110° C antes de su utilización. El extracto lipídico problema se deposita rápidamente en el origen de la placa, y bajo una corriente de nitrógeno.

Entre las distintas mezclas de disolventes existentes, nosotros hemos utilizado la preconizada por MANGOLD (1961) (Tabla 7), que permite separar las categorías lipídicas en fosfolípidos (permanecen en el origen), galactolípidos (precariamente separados de los fosfolípidos), monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y triglicéridos; las bandas lipídicas se hacen visibles mediante vapores de Iodo (cuando se va a continuar la determinación cuantitativa de los lípidos) o por pulverización de ácido sulfúrico al 50 %, seguido de un calentamiento a 110° C durante algunos minutos (cuando se trata sólo de una determinación cualitativa)

Del mismo modo, la técnica de GARDNER (1968), modificada por GRENIER y col. (1972), ha permitido una separación satisfactoria de los fosfolípidos y galactolípidos (Tabla 7). Los constituyentes se hacen visibles por una breve exposición a los vapores de Iodo. La pulverización de la placa con una solución alcohólica de α -naftol al 0.5 %, secado, y posterior pulverización con ácido sulfúrico al 50 %, seguido de un calentamiento gradual, hace aparecer los galactolípidos bajo una coloración violeta característica.

2.7.b. Separación de fosfolípidos

La técnica de LEPAGE (1967) permite una buena separación de la casi totalidad de los fosfolípidos existentes en el extracto de lípidos totales del tejido u orgánulo en cuestión.

Los fosfolípidos son detectados por las reacciones coloreadas ya indicadas de vapores de Iodo y ácido sulfúrico, así como con el reactivo fosfomolibdico. Al mismo tiempo, se han utilizado otras reacciones más específicas como por ejemplo la ninhidrina (0.2% en acetona-lutidina 9/1) que revela los fosfolípidos con una función amina libre (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) dando una coloración violeta y el

Tabla 7. Condiciones experimentales de la cromatografía en capa fina realizada para el análisis de lípidos.

Autores	Mezcla de disolventes v/v/v	
MANGOLD (1961)	Eter de petróleo	90
	Eter etílico	10
	Acido acético	1
GADNER (1968)	1) Acetona	100
GRENIER y col. (1972)	Acido acético	2
	Agua	1
	2) Eter de petróleo	90
	Eter etílico	10
	Acido acético	1
LEPAGE (1967)	Cloroformo	85
	Metanol	15
	Acido acético	10
	Agua	3,5

reactivo de Dragendorff que da reacción coloreada positiva con la fosfatidilcolina.

En todos los casos, la identificación de las moléculas lipídicas se ha llevado a cabo mediante el desarrollo cromatográfico frente a patrones.

2.7.c. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, según se ha indicado anteriormente (2.6.b.), son separados, identificados y cuantificados por cromatografía en fase gaseosa, utilizando como patrón interno una cantidad conocida de ácido heptadecanoico no presente en la mezcla problema. Las condiciones experimentales son similares a las descritas por DAZA (1979).

2.7.d. Ácidos grasos de diferentes categorías lipídicas

Para su determinación, la zona de sílice correspondiente a los diferentes lípidos separados por cromatografía en capa fina (MANGOLD, 1961; GADNER, 1968; GRENIER y col. 1972; LEPAGE, 1967), se introducen directamente en tubos de metilación conteniendo 3 ml de trifluoruro de boro en metanol (GRENIER y col. 1972). Después de 30 min a 80° C en tubos cerrados, se enfrían éstos y se adicionan 10 ml de pentano y 5 ml de agua destilada. Se agitan vigorosamente y se dejan decantar. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los distintos lípidos son posteriormente analizados por cromatografía en fase gaseosa.

2.7.e. Dosificación de fosfolípidos, galactolípidos y lípidos neutros

La dosificación de las diferentes moléculas lipídicas presentes en una solución de lípidos totales, y la determinación de las proporciones relativas en peso de los diversos fosfolípidos, galactolípidos o lípidos neutros entre sí, se ha obtenido según la técnica de TREMOLIERES y LEPAGE (1971) y GRENIER y col. (1972) consistente en determinar las proporciones respectivas de estos lípidos en base al contenido en ácidos grasos de cada uno de ellos. Se estima que los ácidos grasos representan, respectivamente,

el 70 %, 65 % y 55 % del peso de los diversos fosfolípidos, galactolípidos y lípidos neutros. (TREMOLIERES, 1970).

2.7.f. Determinación de la actividad CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa de microsomas

La actividad CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa de microsomas se ha determinado según la cantidad de metil-¹⁴C-colina (estudios a nivel del tejido entero) o de CDP-metil-¹⁴C-colina (estudios a nivel de microsomas aislados) incorporada en fosfatidilcolina, en las condiciones indicadas en 2.4.a. de este capítulo. La solución radioactiva de lípidos totales de los microsomas se separa por cromatografía en capa fina según LEPAGE (1967), determinándose la incorporación de la radioactividad a la fosfatidilcolina; para ello, se separan las bandas de sílice correspondientes a las diferentes moléculas lipídicas, se introducen en viales con 10 ml de mezcla de centelleo y se mide la radioactividad de cada uno de ellos.

2.8. DETERMINACION DE PROTEINAS Y CLOROFILAS

Las proteínas han sido dosificadas por el método de LOWRY y col. (1951). En las muestras que contienen suspensiones de membranas y lipoproteínas se ha utilizado el método de MARKWELL y col. (1978), modificación del anterior en el sentido de que incorpora dodecil sulfato sódico al reactivo alcalino e incrementa la cantidad de tartrato sódico, lo que permite la determinación del contenido proteico de dichas estructuras y componentes lipídicos sin previa solubilización o extracción lipídica.

La clorofila es extraída con acetona al 80 % a partir de una alícuota del extracto lipídico total, y cuantificada espectrofotométricamente por el método de BRUINSMA (1961).

2.9. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

La comparación de los resultados obtenidos a partir de los cambios bioquímicos y fisiológicos inducidos en los tejidos estudiados (raíces y

cotiledones de plántulas de girasol), en función de la concentración en boro del medio de cultivo, ha requerido que éstos hayan sido expresados, bien por unidad de órganos (raíz o cotiledón), bien referidos a un determinado peso de tejido fresco o seco (1 g en general). Asimismo, la dosificación de los diferentes ácidos grasos o de las distintas categorías lipídicas han sido expresadas como porcentajes del total, mientras que las actividades enzimáticas se han referido a una cantidad determinada de proteínas (1 mg). Finalmente, las actividades biosintéticas se han expresado en porcentaje de la radioactividad total, o en nmoles ó pmoles de precursor incorporado por mg de proteínas.

1. MORFOLOGIA DE RAICES DE PLANTULAS DE GIRASOL EN FUNCION DEL BORO

La morfología y ultraestructura de raíces de plántulas de girasol se ha investigado al objeto de obtener información adicional en relación a los resultados bioquímicos. Para ello, se han tomado muestras del material vegetal en las condiciones habituales de experimentación, según se ha indicado en Material y Métodos.

1.1. ESTUDIO MACROSCOPICO DE LA RAIZ

En la figura 17 y tabla 9, se presentan los resultados del estudio macroscópico complementados con datos referentes al peso fresco y seco del tejido. Cuando las plantas de girasol fueron cultivadas con 10 ppm de boro, las raíces presentaron un mayor crecimiento que las mantenidas en medios sin, y sobre todo, con 50 ppm del micronutriente. Después de 7 días de cultivo en dichos medios diferenciales, una concentración de 50 ppm de boro reducía significativamente el crecimiento de la raíz.

En función de estos resultados previos, hemos considerado el nivel de 10 ppm de boro en el medio de cultivo, como el óptimo para el crecimiento de las plántulas en nuestras condiciones de experimentación.

1.2. OBSERVACION AL MICROSCOPIO OPTICO

La estructura típica de un corte longitudinal de raíz de girasol derivada de la observación al microscopio de luz es presentada esquemáticamente en la figura 17b. De acuerdo con los resultados de (WAREING y PHILIPS, 1978), se ponen de manifiesto cuatro zonas de características citológicas y funcionales bien diferenciadas:

- Zona de la cofia. Su misión es servir de protección al meristemo y dónde se localiza el sistema receptor de gravedad de la planta.

- Zona de división celular. Formada por el meristemo y compuesta por células poco diferenciadas que originan el tejido radicular por división celular.

- Zona de elongación celular. Constituida por células que experimentan crecimiento en longitud, con una incipiente diferenciación y gran actividad biológica.

- Zona de diferenciación. Formada por células ya diferenciadas.

No se han observado diferencias aparentes en la organización histológica de raíces desarrolladas en medios sin y con 10 ppm (Fig. 18a). Sin embargo, medios con 50 ppm de boro inducen una reducción del crecimiento de la raíz expresado en una inhibición de la elongación celular, favoreciéndose, al mismo tiempo, la aparición de zonas diferenciadas muy cerca del ápice (tejido vascular y formación de raíces secundarias), (Figs. 17b, 18b, Tabla 8).

1.3. OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

En las figuras 19 y 20 se muestran las características ultraestructurales de los componentes celulares correspondientes a las distintas zonas de la raíz durante la formación de la plántula de girasol, en función del boro del medio de cultivo.

En raíces cultivadas en medios sin y con 10 ppm de boro, la zona de la cofia está constituida por células diferenciadas, muy vacuolizadas, con aparato de Golgi desarrollado, retículo endoplasmático rugoso (R.E.R.) muy aparente, y cuya característica esencial es la presencia de ariloplastos, donde se localiza el almidón estatolítico al que se le ha atribuido la función de percepción de la gravedad (AUDUS, 1962), (Fig. 19a).

En estas condiciones de boro, el meristemo de la raíz aparece formado por células indiferenciadas de elevada actividad nuclear (núcleos en interfase y grandes nucleolos), y citoplasma con elevada densidad ribosómica, estando bien representado el sistema de membranas por un activo aparato de Golgi, observándose secreción de vesículas en las inmediaciones de los dictiosomas apilados en número de 4 ó 5 cisternas, así como pequeñas vacuolas con inclusiones de elevada densidad. También se observan mitocondrias y plastidios, presentando éstos últimos distintos tipos de inclusiones: unas, de aspecto parecido a lípidos (elaioplastos), y otras más densas, posiblemente de carácter protéico (proteinoplastos); esporádicamente se encuentran cuerpos grises de naturaleza lipídica. Como corresponde a su

función, es frecuente observar en esta zona células en división (Fig. 19bcd).

En la zona de elongación, encontramos células más alargadas con signos de incipiente diferenciación, caracterizadas por un sistema vacuolar muy desarrollado, con acúmulos densos o en forma fibrilar de carácter proteináceo. Las cisternas del R.E. aumentan en tamaño y número, observándose mitocondrias y plastidios de idénticas características a los ya descritos en la zona de división. Se detecta la presencia de cuerpos multivesiculares, junto con las denominadas figuras de mielina, a las que se ha relacionado con la degradación de componentes citoplásmicos, fundamentalmente de tipo membranoso (MESQUITA, 1972), (Fig. 20abc).

La zona de diferenciación muestra el aspecto típico de células envejecidas muy alargadas, de paredes gruesas y con una gran vacuola que ocupa la mayor parte del espacio celular, relegando el citoplasma a la periferia. La vacuola presenta inclusiones de tipo proteináceo, así como un incremento de cuerpos lipídicos, respecto a zonas anteriormente descritas, localizadas en el interior de la vacuola o en sus cercanías. También se detectan plastidios, aunque sus inclusiones son de mayor tamaño, llegando, a veces, a ocupar casi todo el volumen organular (Fig. 20de).

En contraste con estas imágenes, la figura 21 ilustra las características citológicas de raíces desarrolladas en medios con 50 ppm de boro. En la zona de la cofia, las células pierden la característica polarización de sus orgánulos, típica de raíces que crecen en condiciones con 10 ppm o sin boro, distribuyéndose los amiloplastos al azar. Por otra parte, es frecuente la presencia de figuras de mielina y otros desechos de membrana en las vacuolas (Fig. 21ab).

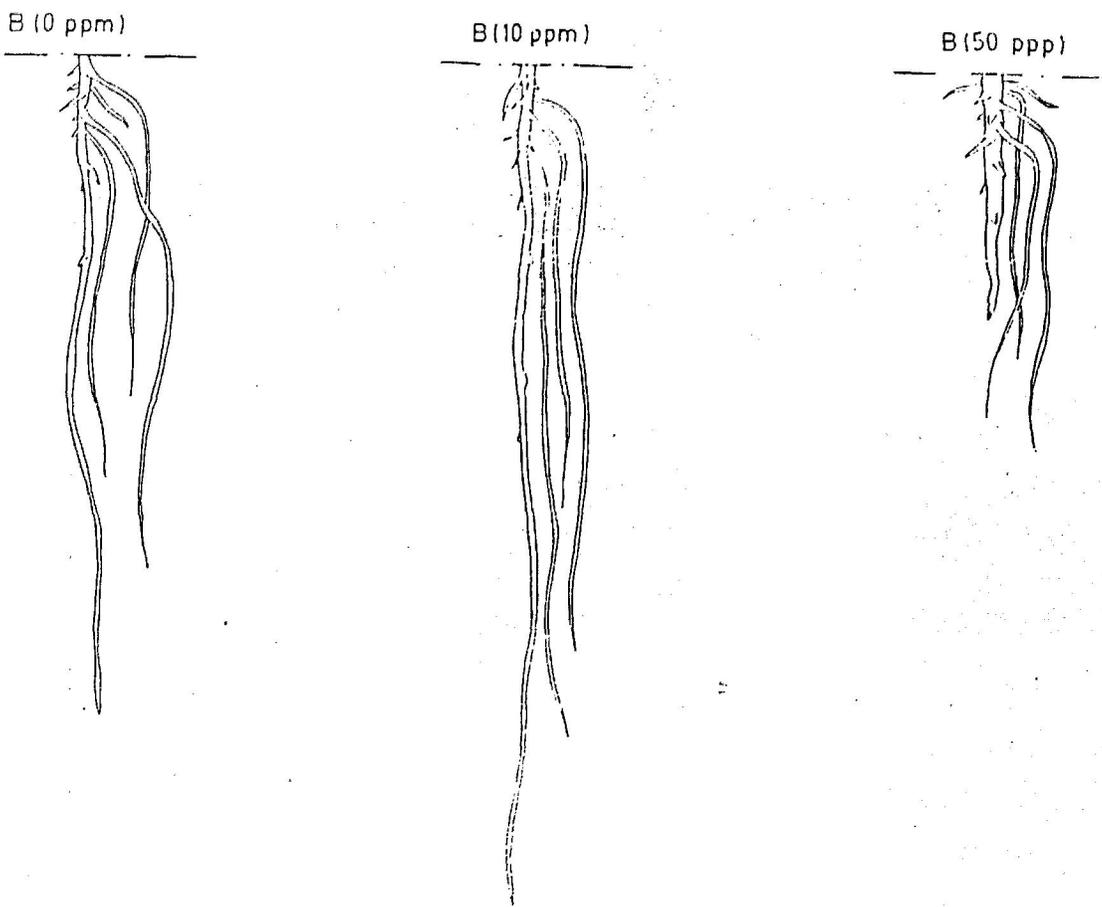
La zona meristemática es muy reducida siendo difícil encontrar células en división. Contigua a esta zona, las células presentan profusión de pequeñas vacuolas con inclusiones densas a los electrones y estructuras membranosas. Asimismo, las paredes se hacen más gruesas, y los núcleos son irregulares mostrando invaginaciones o ramificaciones características de las células envejecidas. También se observa un gran número de cuerpos grises de carácter lipídico localizados en el citoplasma y en el interior de las vacuolas, junto a las inclusiones de tipo proteináceo. Los plastidios

Tabla 8. Distancia entre el ápice radicular y las primeras formaciones de raíces secundarias de plántulas de girasol cultivadas durante 7 días en medios con diferentes contenidos de boro. Los resultados expresados en mm, son media (\pm DS) de cuatro experimentos independientes efectuados con 20 plántulas por tratamiento.

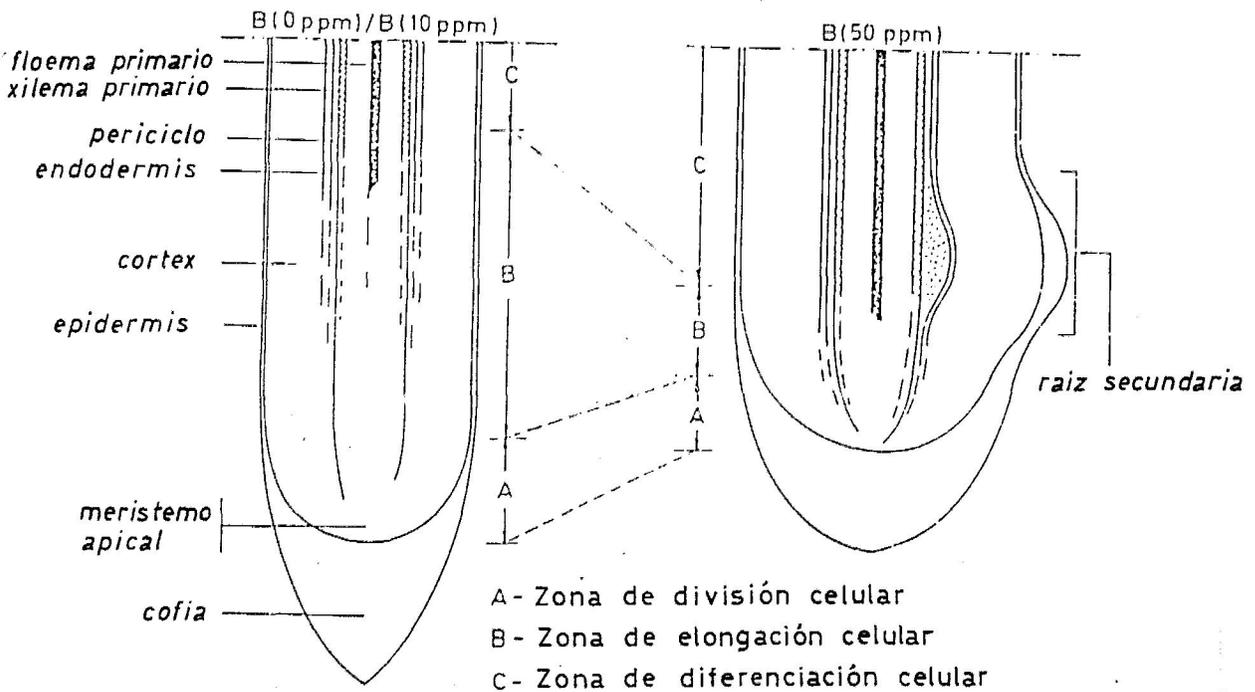
Concentración de boro		
0	10	50
32 \pm 7	41 \pm 16	13 \pm 10

Tabla 9. Variación del peso fresco y seco de raíces de plántulas de girasol, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados, expresados en mg por 10 órganos y en % de humedad, son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Tiempo de germinación	Concentración de boro	Peso Fresco	Peso Seco	% de Humedad
3 días	50 ppm	132 \pm 12	6,9 \pm 0,6	94,8
	10 "	166 \pm 13	8,8 \pm 0,7	94,7
	0 "	134 \pm 11	7,2 \pm 0,7	94,6
7 días	50 ppm	212 \pm 19	10,4 \pm 0,8	95,1
	10 "	639 \pm 51	28,8 \pm 2,3	95,5
	0 "	543 \pm 49	25,0 \pm 2,0	95,4



A



B

Figura 17. Esquema de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios diferenciales de boro. A) Aspecto macroscópico. B) Corte longitudinal del ápice de la raíz principal .



Figura 18. Corte longitudinal semifino del ápice de la raíz de plántulas de girasol durante 7 días en medios diferenciales de boro: a) 10 ppm de boro; b) y c) 50 ppm de boro.



2

100 μm

q



100 μm

a

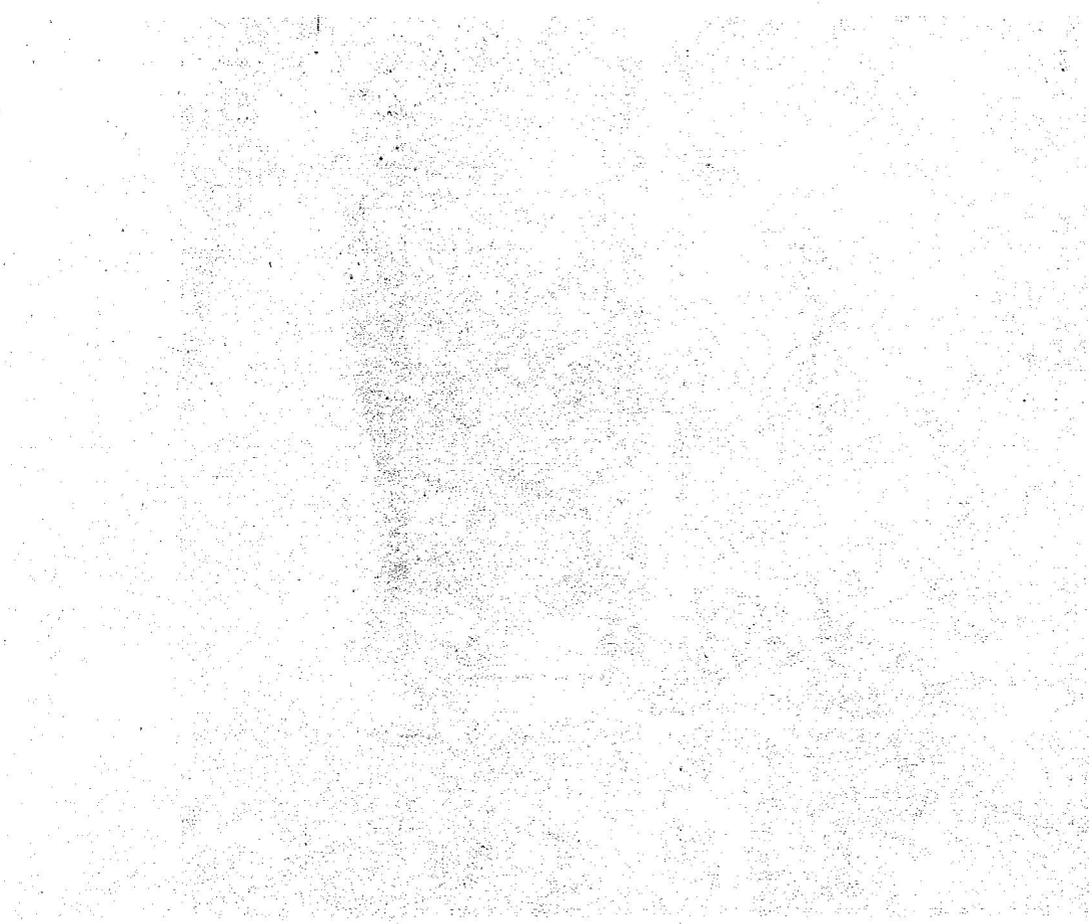


Figura 19. Cortes ultrafinos de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios con 0 y 10 ppm de boro: a) y b) zona de la cofia; c) y d) zona de división.





Figura 20. Cortes ultrafinos de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios con 0 y 10 ppm de boro: a), b) y c) zona de elongación; d) y e) zona de diferenciación.

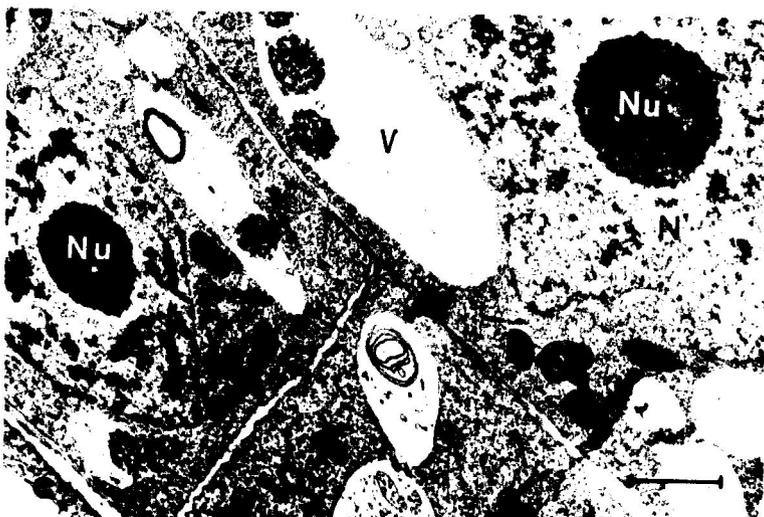
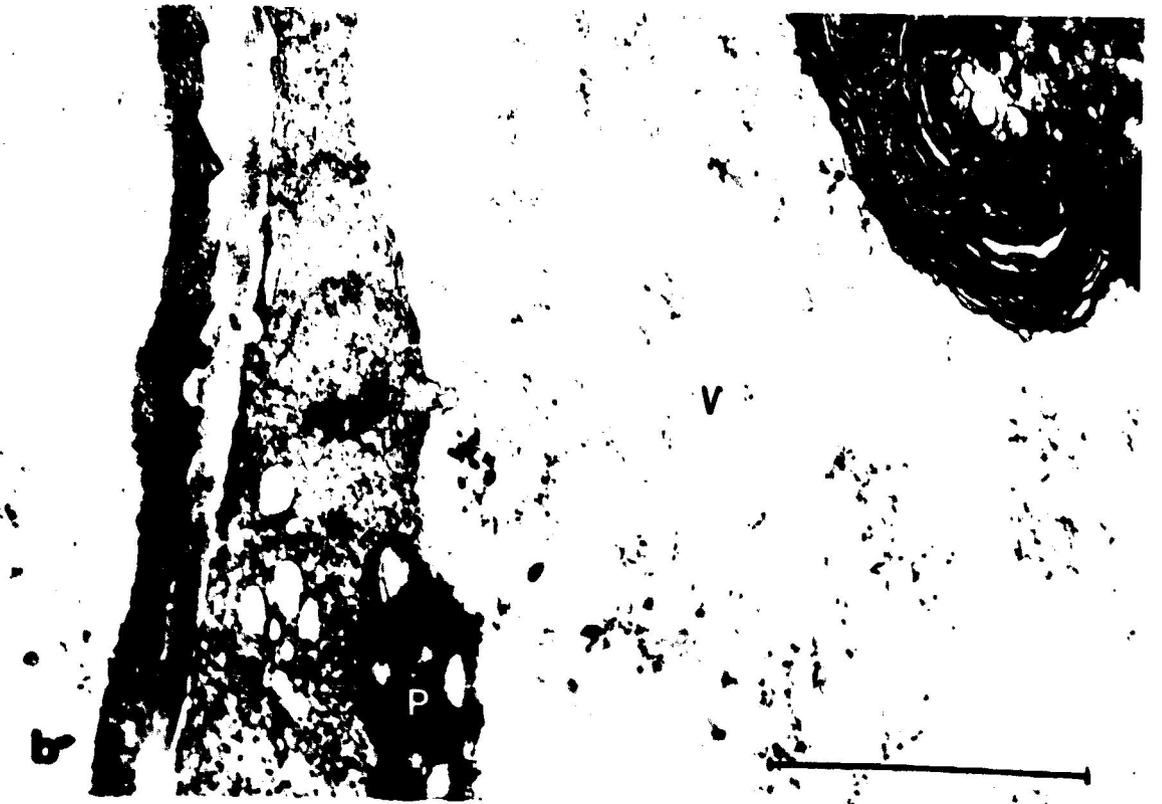
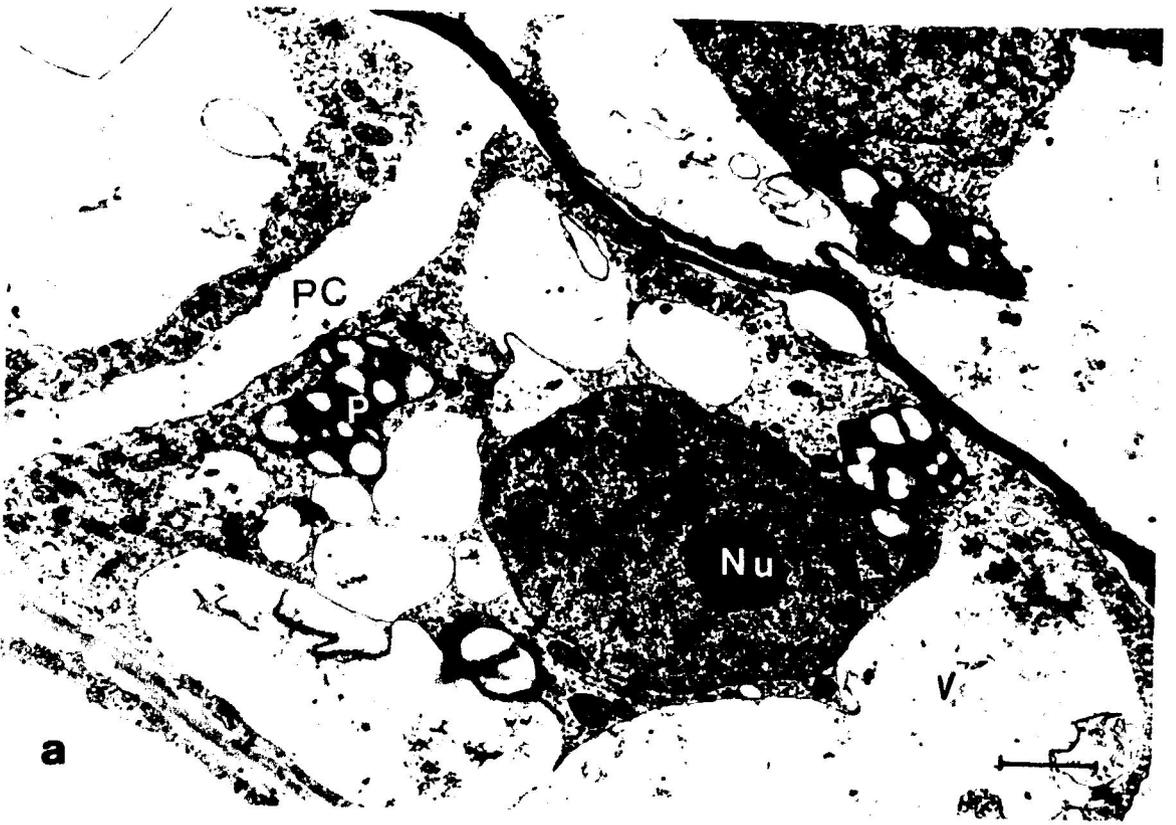




Figura 21. Cortes ultrafinos de la zona de la cofia de raices de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios con 50 ppm de boro.



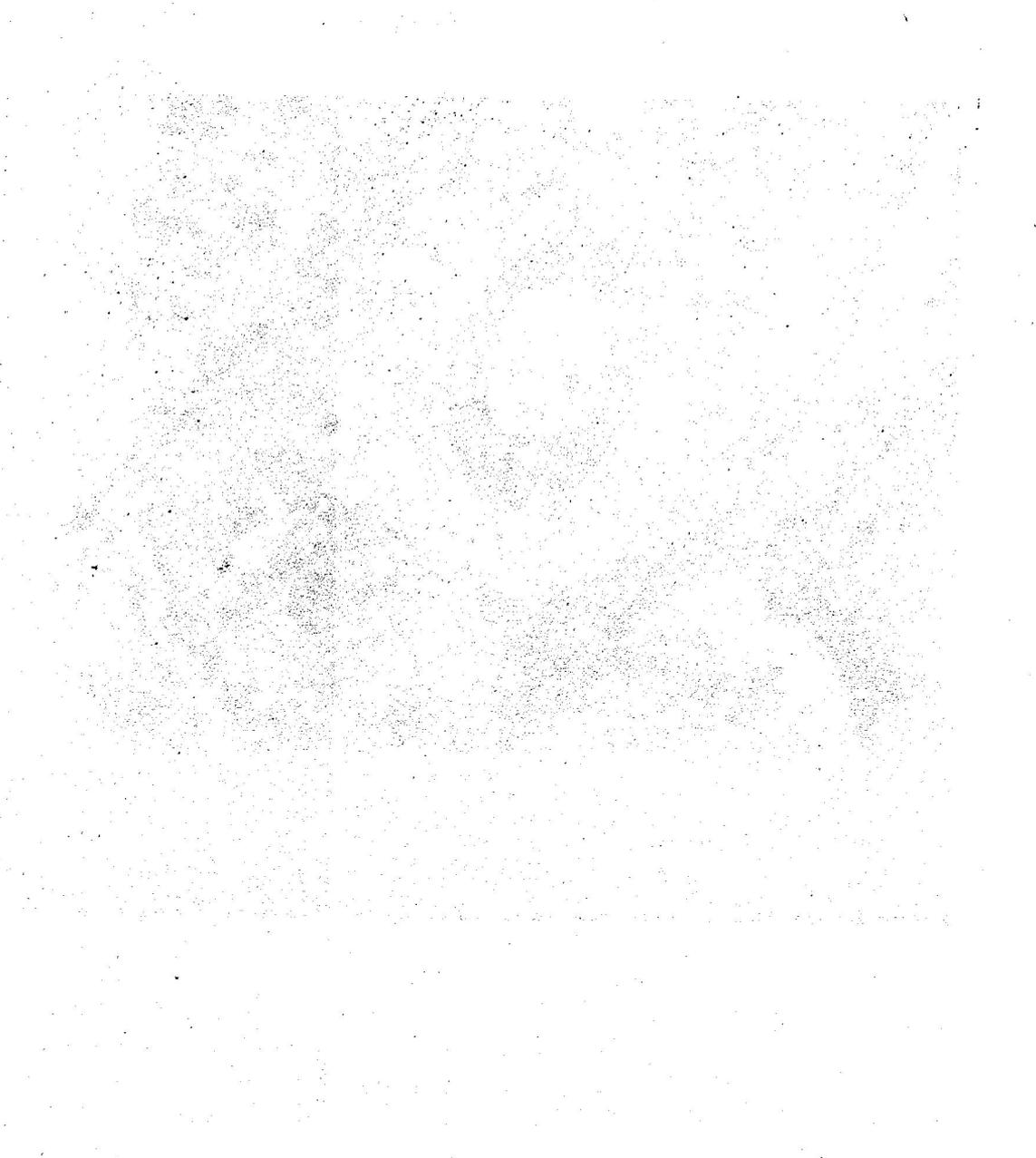


Figura 22. Cortes ultrafinos de la zona de división de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios con 50 ppm de boro.

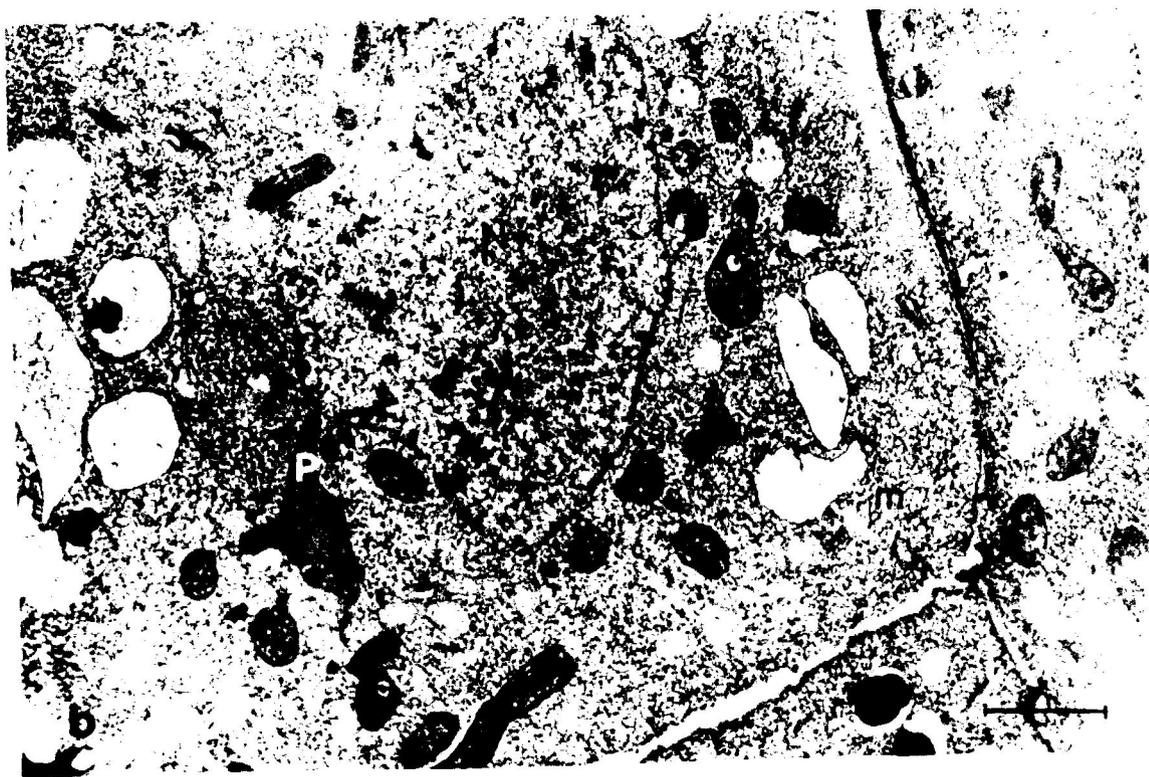
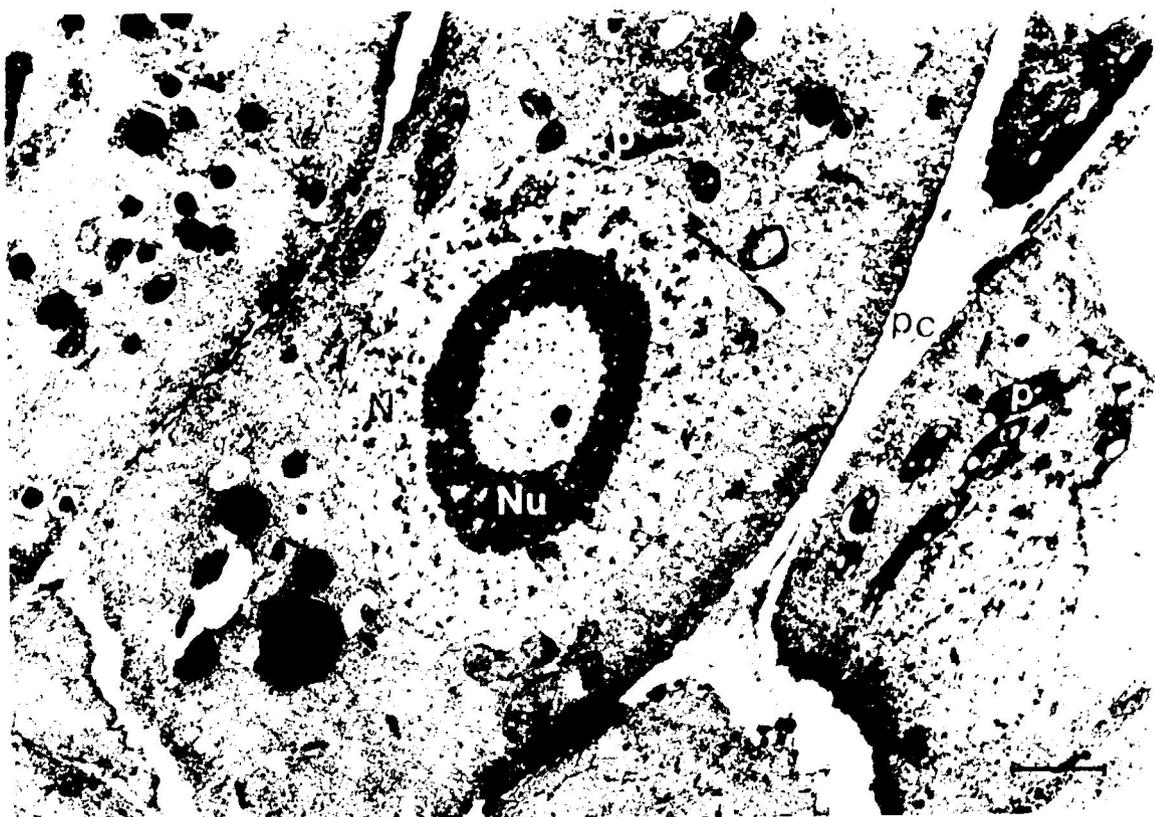
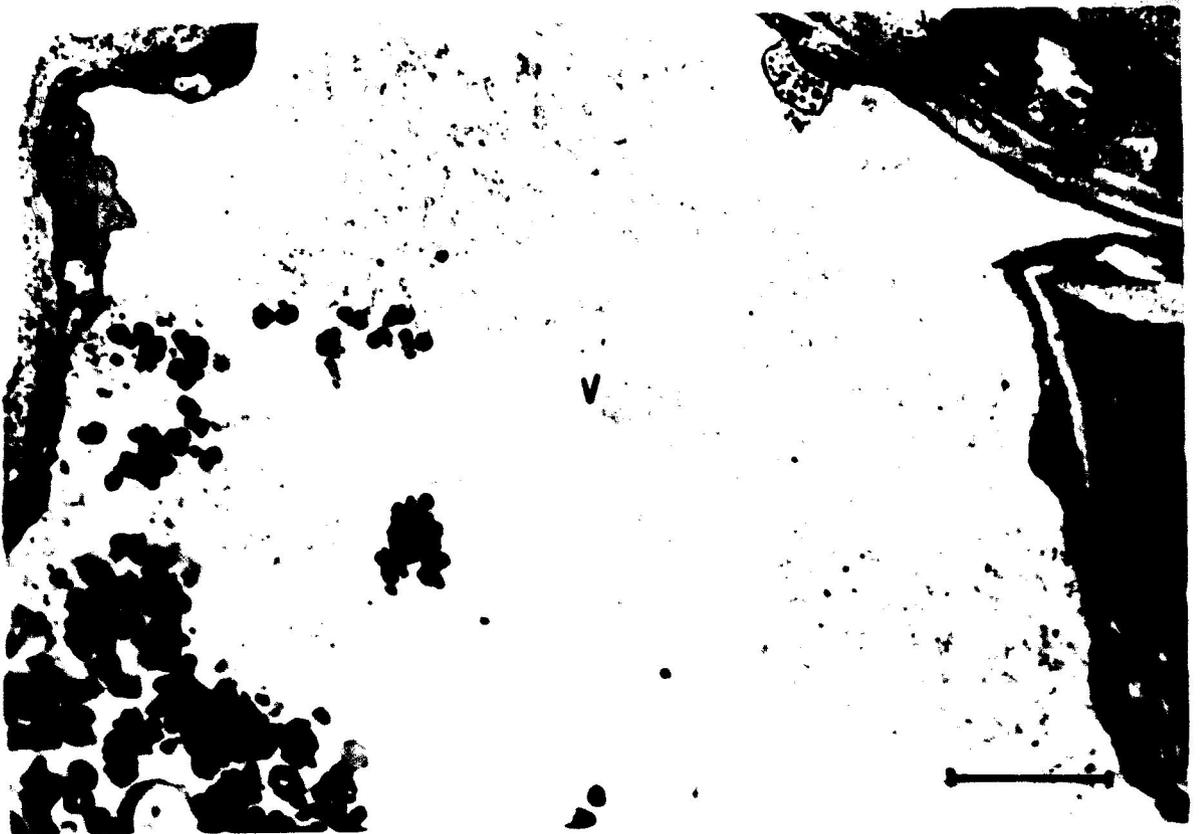




Figura 23. Cortes ultrafinos de la zona de elongación-diferenciación de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en medios con 50 ppm de boro.



observados en las células de esta zona de la raíz son de tipo elaioplastos, al igual que encontramos en raíces desarrolladas en medios con 10 ppm y sin boro (Figs. 22ab, 23ab).

2. EL BORO Y LOS LIPIDOS DE LA RAIZ

Numerosos autores atribuyen a los lípidos membrenarios un papel determinante en el transporte y absorción de los iones minerales por las células de la raíz (ROSSIGNOL y col. 1982). En una primera fase de nuestro trabajo, se ha investigado la composición y el contenido lipídico de raíces de plántulas de girasol, así como el efecto del boro sobre dichos componentes. Además, teniendo en cuenta que la naturaleza de los lípidos ejerce una profunda influencia sobre las propiedades de las membranas celulares, nos pareció muy interesante conocer, en una segunda etapa del trabajo, si el contenido de boro en el medio inducía modificaciones en la composición y/o en la biosíntesis lipídica a dichos niveles.

2.1. CONCENTRACION EN LIPIDOS DE LA RAIZ

La raíz de plántulas de girasol es pobre en lípidos, siendo su concentración en materia grasa de, aproximadamente, un 3.6 % del peso de materia seca ó un 0.18 % del peso de materia fresca, lo cual representa 1.8 mg de lípidos totales por 1 g de tejido fresco. Dicha concentración en lípidos es muy baja en relación a tejidos típicamente oleaginosos como el cotiledón de girasol, que contiene alrededor de 300 mg de lípidos por g de materia fresca. Sin embargo, aunque este hecho no constituye un problema, en base a las técnicas finas de análisis que el bioquímico tiene hoy a su disposición, siempre es más fácil estudiar los componentes lipídicos esenciales para la vida de la célula, en un tejido pobre en lípidos, donde no interfieren los lípidos de reserva. Por ello, en el presente trabajo la investigación del efecto del boro sobre la biosíntesis lipídica, se ha llevado a cabo, fundamentalmente, a nivel de la raíz.

2.1.a. Clases de moléculas lipídicas

Las tablas 10, 11, 12, 13, 14 y 15, presentan la composición y el contenido en lípidos de raíces enteras después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintos contenidos de boro. Como puede observarse, los mismos constituyentes son detectados en los tejidos desarrollados en medios con o sin boro: los lípidos polares y los lípidos neutros conforman las categorías lipídicas más abundantes. Los fosfolípidos representan de un 37 a un 65 % del total de lípidos, estando los galactolípidos presentes en muy baja cantidad. Medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro inducen modificaciones en la composición lipídica de las raíces: el porcentaje de fosfolípidos disminuye, mientras que aumenta el de lípidos neutros.

En el curso del crecimiento, el contenido en lípidos evaluados por dosificación de sus ácidos grasos constitutivos, muestra que la cantidad de fosfolípidos, referido a gramo de peso fresco, disminuye de forma general. Por el contrario, los triglicéridos experimentan un fuerte aumento, sobre todo, en raíces desarrolladas entre 3 y 7 días en medios con 50 ppm de boro (Tabla 11). Cuando se expresan los resultados en microgramos por 10 raíces, el estudio de la variación del contenido de los diferentes lípidos radiculares, en función del tiempo y de la concentración en boro del medio de cultivo, muestra una diferencia importante de comportamiento (Tabla 12). Así, una concentración de 10 ppm de boro provoca, ya en 3 días, un incremento del contenido en fosfolípidos, respecto de los tratamientos sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro. Aunque dicho efecto es muy superior a tiempo 7 días, debe significarse, sin embargo, que en estas condiciones, las raíces muestran una sustancial diferencia de peso (Tabla 9), de forma que un cambio tal en el crecimiento enmascara una posible acción del boro sobre los componentes lipídicos. En este sentido, las razones entre los contenidos en fosfolípidos de las raíces, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con 10 ppm de boro en relación a raíces de plántulas mantenidas en medios sin boro o con 50 ppm de boro, muestran, en general, valores superiores a 1. Destaca el fuerte aumento que experimenta esta razón (de 1.27 a 4.01), en tejidos desarrollados en medios con 10 y 50 ppm de boro, cuando se expresan los resultados por número de órganos (Tabla 13). Al mismo tiempo, también se observa un aumento de la razón

fosfolípidos/lípidos neutros en raíces cultivadas en presencia de 10 ppm de boro y, sobre todo, en 50 ppm de boro (Tabla 14). En la tabla 15, se constata la evolución de los porcentajes de las diferentes moléculas de fosfolípidos y lípidos neutros, en función del boro del medio y del tiempo de desarrollo. Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y triacilgliceroles son los lípidos mayoritarios; los tratamientos con 50 ppm de boro, favorecen un aumento en los porcentajes de triacilgliceroles y una disminución de los distintos fosfolípidos.

2.1.b. Composición y contenido en ácidos grasos

Se han identificado los principales ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes moléculas lipídicas de raíces de plántulas de girasol, en función del boro del medio de cultivo y del tiempo de desarrollo. Los lípidos totales muestran una composición en ácidos grasos cuyos porcentajes representan valores medios de los correspondientes a las diferentes moléculas lipídicas analizadas, siendo el ácido linoléico el ácido graso mayoritario. Los tratamientos con boro, no parecen inducir cambios importantes en los porcentajes relativos de ácidos grasos de lípidos totales (Tabla 16). El estudio de la composición acíclica de fosfolípidos y triglicéridos, define, en general, un menor grado de insaturación en FC, FE y AF que en triacilgliceroles, observándose un claro incremento en el porcentaje de ácido linoléico en estos últimos lípidos, cuando las raíces se desarrollan en medios con 50 ppm de boro (Tabla 17). De aquí, que en una etapa ulterior, se hayan estudiado, a nivel subcelular, las posibles modificaciones inducidas por el micronutriente sobre los componentes lipídicos.

2.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL BORO A NIVEL DE MICROSOMAS

Las observaciones citológicas llevadas a cabo en la raíz entera, pusieron de manifiesto la existencia de importantes cambios producidos por el boro a nivel subcelular. Ello, nos indujo a estudiar el efecto del boro sobre los componentes lipídicos a este nivel, lo cual implicaba, en un principio, el aislamiento de las fracciones celulares y, posteriormente, el análisis y dosificación de sus constituyentes. Se han determinado los

Tabla 11. Variación en el contenido de diferentes moléculas lipídicas de raíces enteras de plántulas de girasol, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados, expresados en μg por grano de peso fresco, son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Lípidos	3 días			7 días		
	50 ppm	10 ppm	0 ppm	50 ppm	10 ppm	0 ppm
FI	123 \pm 14	108 \pm 13	120 \pm 17	103 \pm 16	124 \pm 18	109 \pm 14
FC	440 \pm 36	445 \pm 32	322 \pm 26	265 \pm 24	339 \pm 37	294 \pm 27
FE	170 \pm 18	226 \pm 25	188 \pm 23	161 \pm 16	232 \pm 30	176 \pm 19
AF	125 \pm 16	91 \pm 12	130 \pm 18	80 \pm 12	115 \pm 16	124 \pm 16
MG + DG + AGL	109 \pm 16	77 \pm 10	79 \pm 11	128 \pm 18	162 \pm 24	157 \pm 20
TG	377 \pm 45	300 \pm 43	385 \pm 54	722 \pm 87	482 \pm 68	450 \pm 59
Otros	123 \pm 19	93 \pm 13	69 \pm 10	162 \pm 23	137 \pm 18	146 \pm 19
Total	1467	1340	1293	1621	1591	1456

Tabla 12. Variación en el contenido de diferentes moléculas lipídicas de raíces enteras de plántulas de girasol, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados, expresados en μg por 10 raíces, son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Lípidos	3 días			7 días		
	50 ppm	10 ppm	0 ppm	50 ppm	10 ppm	0 ppm
FI	16,2 \pm 2,3	17,8 \pm 2,3	16,1 \pm 1,9	21,7 \pm 2,8	79,3 \pm 11,1	59,3 \pm 7,7
FC	58,1 \pm 6,5	73,7 \pm 8,8	43,1 \pm 4,7	56,3 \pm 6,2	216,6 \pm 22,6	159,8 \pm 17,6
FE	22,4 \pm 2,7	37,3 \pm 4,1	25,2 \pm 2,5	34,1 \pm 3,3	148,3 \pm 13,3	95,7 \pm 7,7
AF	16,5 \pm 1,8	15,1 \pm 1,9	17,4 \pm 2,0	17,0 \pm 2,4	73,2 \pm 9,5	67,2 \pm 9,4
MG+DG+AGL	14,4 \pm 1,6	12,7 \pm 1,7	10,6 \pm 1,3	27,1 \pm 3,5	103,6 \pm 12,4	85,4 \pm 9,4
TG	49,8 \pm 4,6	49,7 \pm 3,9	51,6 \pm 4,5	152,9 \pm 12,2	307,9 \pm 27,7	244,4 \pm 19,6
Otros	16,2 \pm 2,3	15,8 \pm 1,9	9,2 \pm 1,1	34,2 \pm 4,5	87,4 \pm 12,2	79,1 \pm 10,3
Total	193,6	222,1	173,2	343,3	1016,3	790,9

Tabla 13. Variación de las razones entre los contenidos en fosfolípidos y entre los contenidos en lípidos neutros, de raíces de plántulas de girasol después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con 10, 50 ppm ó sin boro. Las razones se han establecido a partir de los valores correspondientes a los contenidos lipídicos del tejido, expresándolas por raíces (a) o por gr de peso fresco (b).

Tiempo de germinación	$\frac{FL_{10}}{FL_0}$		$\frac{FL_{50}}{FL_0}$		$\frac{LN_{10}}{LN_0}$		$\frac{LN_{50}}{LN_0}$	
	a	b	a	b	a	b	a	b
3 días	1,41	1,14	1,27	1,01	1,00	0,79	0,97	0,77
7 días	1,35	1,15	4,01	1,33	1,24	1,05	2,29	0,75

FL₁₀ y LN₁₀ = Fosfolípidos y lípidos neutros de raíces crecidas en medios con 10 ppm de boro

FL₅₀ y LN₅₀ = " " " " 50 ppm "

FL₀ y LN₀ = " " " " 0 ppm "

Tabla 14. Variación de la razón fosfolípidos/lípidos neutros en raíces cultivadas durante 3 y 7 días en medios con 10 ppm de boro, en relación a tejidos mantenidos en medios sin boro o con 50 ppm de boro.

Tiempo de germinación	Concentración de boro	$\frac{\text{Fosfolípidos}}{\text{Lípidos neutros}}$
3 días	50 ppm	1,76
	10 "	2,31
	0 "	1,71
7 días	50 ppm	0,72
	10 "	1,26
	0 "	1,16

Tabla 15. Porcentajes de diferentes moléculas lipídicas presentes en raíces enteras de plántulas de girasol, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintas concentraciones de boro. Resultados obtenidos a partir de los valores medios de la masa de los distintos lípidos y referidos al contenido total.

Tiempo de germinación	Concentración de boro	FI	FC	FE	AF	MG + DG + AGL	TG	Otros Lípidos
3 días	50 ppm	8,4	30,0	11,6	8,5	7,4	25,7	8,4
	10 "	8,0	33,2	16,8	6,8	5,7	22,4	7,1
	0 "	9,3	24,9	14,5	10,1	6,1	29,8	5,3
7 días	50 ppm	6,4	16,3	9,9	4,9	7,9	44,5	10,0
	10 "	7,8	21,3	14,6	7,2	10,2	30,3	8,6
	0 "	7,5	20,2	12,1	8,5	10,8	30,9	10,0

Tabla 16. Composición en ácidos grasos de lípidos totales de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con diferentes contenidos de boro. Los resultados, expresados en porcentajes de ácidos grasos totales, son la media de 4 experimentos independientes (\pm DS).

Tiempo de germinación	Concentración de boro	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
3 días	50 ppm	24,3 \pm 1,7	6,1 \pm 0,6	13,2 \pm 1,1	51,9 \pm 4,7	2,5 \pm 0,3
	10 "	26,5 \pm 1,8	5,4 \pm 0,3	12,3 \pm 1,3	49,8 \pm 3,8	6,0 \pm 0,3
	0 "	25,5 \pm 1,4	4,2 \pm 0,3	9,8 \pm 0,8	53,6 \pm 5,1	6,9 \pm 0,5
7 días	50 ppm	24,9 \pm 2,0	6,7 \pm 0,5	20,2 \pm 2,5	45,7 \pm 4,7	2,8 \pm 0,2
	10 "	30,4 \pm 1,9	5,3 \pm 0,3	19,6 \pm 1,7	40,0 \pm 3,6	4,7 \pm 0,3
	0 "	27,9 \pm 2,1	5,5 \pm 0,7	18,9 \pm 2,1	41,7 \pm 4,8	6,1 \pm 0,4

Tabla 17. Acción del boro sobre la composición en ácidos grasos de diferentes lípidos de raíces desarrolladas durante 3 y 7 días en medios diferenciales del micronutriente (50, 10 ppm y sin boro). Los resultados expresados en porcentajes de ácidos grasos totales, son la media de tres experimentos independientes y no difieren en más de un 10 % de dicho valor.

	Acidos Grasos	Acil Lípidos											
		FC			FE			AF			TG		
		50	10	0	50	10	0	50	10	0	50	10	0
3 días	16:0	30,9	26,9	27,0	32,0	37,8	33,1	31,1	34,9	32,7	16,1	21,4	22,1
	18:0	3,6	2,8	4,9	2,0	4,0	3,8	7,8	7,9	6,3	6,1	8,2	9,1
	18:1	3,2	7,6	10,6	17,9	8,2	10,0	12,9	15,0	14,6	13,7	20,6	18,8
	18:2	55,0	55,1	48,3	43,1	46,9	47,6	42,5	37,4	41,1	61,2	43,6	44,4
	18:3	7,3	7,6	9,2	5,0	3,1	5,5	5,7	4,7	6,0	2,8	6,2	5,6
7 días	16:0	29,0	35,4	36,8	34,1	42,7	41,9	30,2	32,1	26,9	19,0	24,1	23,7
	18:0	5,8	2,8	4,7	7,4	3,3	7,6	8,1	6,2	8,2	7,8	9,6	8,8
	18:1	10,0	6,2	8,5	10,2	6,4	14,5	13,6	11,7	16,3	21,3	23,5	21,9
	18:2	48,9	47,1	43,6	44,6	42,4	34,1	45,2	43,8	45,8	48,7	36,6	40,5
	18:3	6,3	8,5	6,4	3,7	5,2	1,9	2,9	6,3	2,7	3,2	6,2	5,1

cambios en la morfología y en la composición lipídica de microsomas de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios diferenciales de boro, habiéndose investigado dichos cambios en microsomas, en razón de la importancia del retículo endoplasmático en la biosíntesis de proteínas y por la localización a dicho nivel de gran parte de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo lipídico. En relación a la determinación de la actividad del enzima NADH-citocromo c reductasa insensible a la antinomicina A, asociada a las membranas microsomales, los microsomas purificados a partir de 10 g de raíces presentan una actividad enzimática entre 45 (tratamientos con 50 ppm de boro) y 68 (tratamientos con 10 ppm de boro) nmoles de citocromo c reducido $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteínas. La adición de antinomicina A provoca una inhibición muy escasa de la actividad (Tabla 18, Fig. 24).

2.2.a. Estudio comparativo de los lípidos de microsomas purificados a partir de raíces desarrolladas en medios diferenciales de boro

Los resultados derivados del análisis lipídico de los microsomas purificados de raíces de plántulas de girasol, en función del boro del medio de cultivo, se muestran en las tablas 19 y 20. Como en el tejido entero, los fosfolípidos son los constituyentes lipídicos más importantes de la fracción microsomal; otros lípidos presentes en los microsomas son los lípidos neutros y los galactolípidos. Los tratamientos con 50 ppm de boro provocan modificaciones a nivel de triglicéridos (Tabla 20), siendo el contenido en lípidos superior en microsomas aislados de raíces cultivadas en medios con 10 ppm de boro (Tabla 19). Este aumento en el contenido de lípidos sugiere una más activa formación de membranas microsomales en raíces cultivadas en estas condiciones de boro.

2.2.b. Composición en ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes moléculas lipídicas

La riqueza en ácidos grasos poliinsaturados de los tejidos de la raíz entera, se refleja también en sus membranas microsomales, siendo detectados los mismos ácidos grasos y, en particular, un alto porcentaje de ácido linoléico (Tablas 21 y 22). Es manifiesta la diferencia de composición

acídica entre las moléculas lipídicas, haciéndose notar variaciones específicas en sus porcentajes relativos: la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y, sobre todo, el ácido fosfatídico son ligeramente más ricos en ácido linoléico y menos en ácido oléico, que los triglicéridos (Tabla 22).

La concentración de boro no provoca cambios notables en la proporción de ácidos grasos de los lípidos totales, manteniéndose el ácido linoléico como el más abundante (Tabla 21). Sin embargo, a nivel de fosfolípidos y de lípidos neutros, 50 ppm de boro en el medio induce un incremento en el porcentaje de ácido linoléico (Tabla 22).

El aumento del contenido en lípidos observado en el sedimento de microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios con 10 ppm de boro es, de alguna forma, la imagen bioquímica de una mayor biosíntesis de membranas. Asimismo, el hecho de que la composición en ácidos grasos de los lípidos microsomales cambie en función de los tratamientos de boro, es también un dato importante. Ello demuestra que las membranas que se forman en el curso del desarrollo de la raíz en medios con 50, 10 ppm o sin boro, tienen características bioquímicas distintas.

Cualquiera que sea la interpretación fisiológica y funcional que pueda derivarse de estos datos, es importante determinar cómo afecta el boro a la síntesis de los lípidos de membrana. El objetivo del siguiente capítulo es, precisamente, responder a esta pregunta.

2.3. BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS

Los análisis bioquímicos han demostrado que una concentración de 10 ppm de boro en el medio de cultivo, produce un incremento del contenido en lípidos, tanto a nivel de la raíz entera como a nivel de las membranas microsomales. De acuerdo con estos datos, parecía interesante estudiar a dichos niveles, las variaciones de las actividades enzimáticas de lípidos en respuesta a la concentración del micronutriente, estudio que nos iba a permitir examinar, bajo una forma más dinámica, la influencia del boro sobre el metabolismo de estos compuestos.

Tabla 18. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a la antimicina A asociada a los microsomas purificados de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 días en medios con 10, 50 ppm o sin boro. Resultados expresados en nmoles de citocromo c transformados por min y por mg de proteínas. Entre paréntesis se indican los porcentajes de inhibición por antimicina A.

Tratamientos	Actividad enzimática
50 ppm boro	45 (9)
10 " "	68 (7)
0 " "	66 (6)

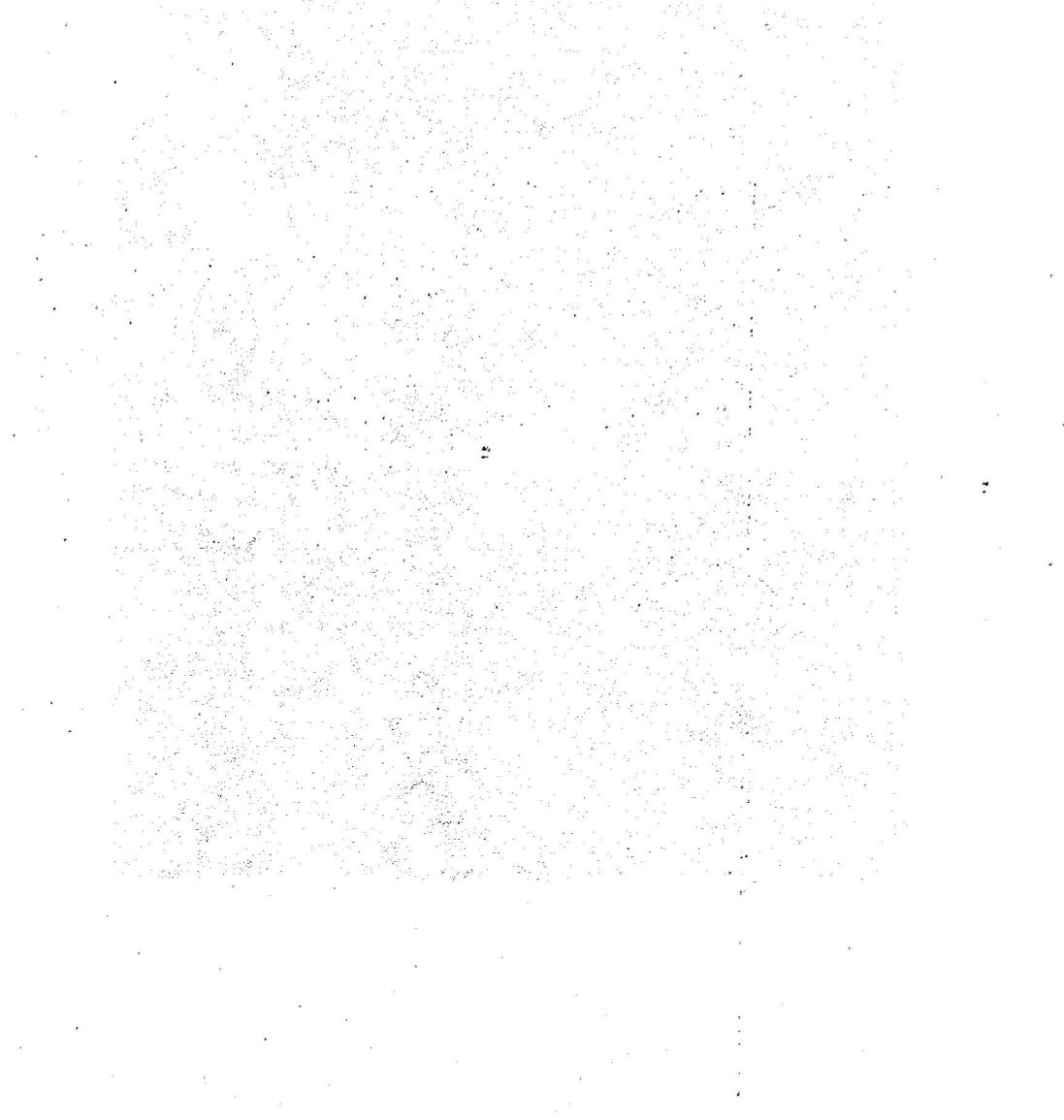


Figura 24. Fracciones microsomales aisladas de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios diferenciales de boro: a) sin boro; b) 10 ppm; c) 50 ppm.

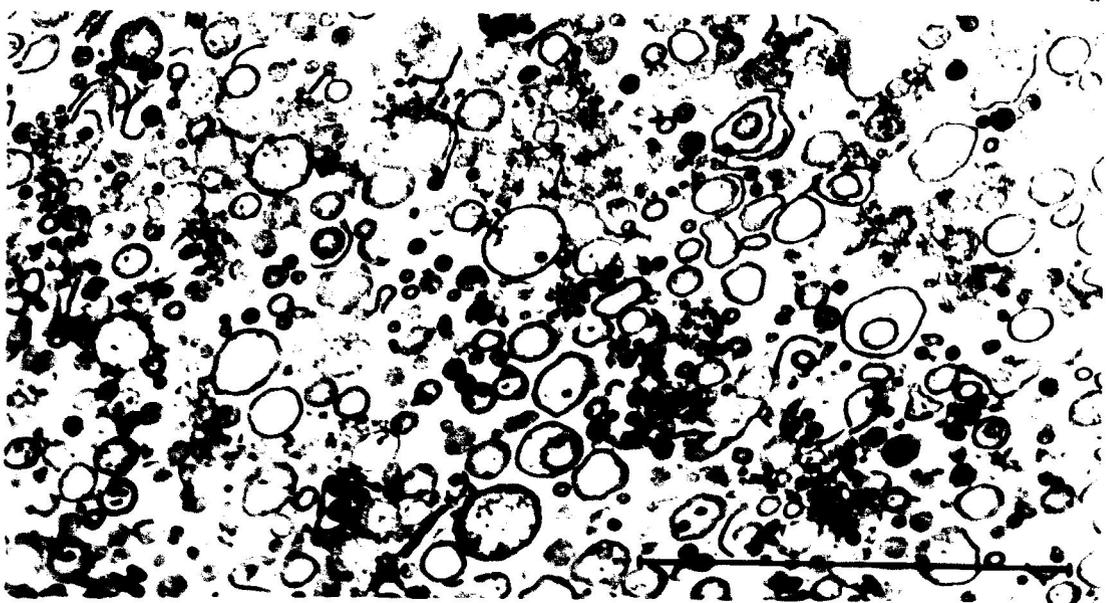


Tabla 19. Variación en los contenidos de diferentes lípidos y proteínas totales de microsomas aislados a partir de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 días en medios con 10, 50 o sin boro. Los resultados en $\mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ proteínas (lípidos) y en $\text{mg} \times \text{g}^{-1}$ peso fresco de raíz (proteínas), son la media de 3 experimentos independientes ($\pm \text{DS}$).

Tratamientos	FL	LN	GL	Proteínas
50 ppm boro	123 \pm 19	34 \pm 5	5 \pm 1	0.52 \pm 0.07
10 " "	279 \pm 36	80 \pm 11	16 \pm 2	0.61 \pm 0.09
0 " "	207 \pm 33	56 \pm 10	17 \pm 3	0.50 \pm 0.07

Tabla 20. Evolución de los porcentajes de diferentes moléculas lipídicas de microsomas purificados a partir de raíces de plántulas de girasol, después de 3 días de desarrollo en medios con 10, 50 ppm o sin boro. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	FI	FC	FE	AF	AGL + MG + DG	TG	GL
50 ppm boro	8,2 \pm 1,0	29,2 \pm 4,3	26,2 \pm 2,9	8,5 \pm 0,8	8,9 \pm 1,1	17,2 \pm 1,3	2,0 \pm 0,4
10 " "	9,6 \pm 0,8	33,5 \pm 3,8	25,5 \pm 2,1	6,8 \pm 1,0	7,6 \pm 1,3	10,8 \pm 1,8	6,2 \pm 0,6
0 " "	9,7 \pm 1,1	35,7 \pm 5,0	23,2 \pm 3,2	6,5 \pm 0,7	8,6 \pm 0,5	10,4 \pm 1,7	5,9 \pm 0,9

Tabla 21. Composición en ácidos grasos de lípidos totales de microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 días en medios con 50, 10 ppm o sin boro. Resultados en porcentajes de ácidos grasos totales, son media de tres experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
50 ppm boro	1,1 \pm 0,2	25,6 \pm 3,6	3,5 \pm 0,4	4,8 \pm 0,6	57,5 \pm 7,0	7,5 \pm 0,9
10 " "	4,0 \pm 0,6	29,1 \pm 3,8	4,0 \pm 0,7	7,5 \pm 1,2	48,0 \pm 5,8	7,4 \pm 1,3
0 " "	2,1 \pm 0,3	29,2 \pm 4,4	2,9 \pm 0,3	5,4 \pm 0,9	50,9 \pm 7,4	9,5 \pm 1,4

Tabla 22. Análisis de ácidos grasos de diferentes lípidos de microsomas de raíces de plántulas de girasol, después de 3 días de desarrollo en medios con 50 (a), 10 ppm (b) y sin boro (c). Los resultados, en porcentajes de ácidos grasos totales, son media de tres experimentos independientes y no difieren en más de un 10 % de dicho valor.

Acidos grasos	Acil lípidos											
	FC			FE			AF			TG		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
14:0	t	t	t	t	t	t	t	t	t	4,8	10,8	10,2
16:0	26,1	36,2	32,6	35,1	39,7	38,3	26,0	35,1	31,2	24,8	26,9	26,6
18:0	1,7	2,7	2,5	1,4	2,5	2,5	1,7	4,4	8,4	4,3	7,5	5,6
18:1	4,8	7,1	5,5	2,4	3,4	2,4	4,9	7,8	10,6	11,8	13,1	12,1
18:2	59,2	45,8	49,3	56,6	48,9	51,4	61,6	46,2	43,3	47,5	36,1	39,3
18:3	8,1	8,2	10,0	4,4	5,5	5,4	5,7	6,5	6,5	6,8	5,6	6,2

t= valor inferior al 1 %.

2.3.a. Biosíntesis a nivel del tejido entero

Se ha utilizado acetato- ^{14}C , por ser éste un precursor susceptible de incorporarse a todas las moléculas lipídicas.

Intensidad de la síntesis lipídica

Tras incubar durante tres horas con acetato- ^{14}C , raíces previamente desarrolladas por espacio de 3 y 7 días en medios con distintos contenidos de boro, la incorporación del ^{14}C , por unidad de tiempo y por el mismo peso de materia fresca o número de raíces, es mayor en los lípidos totales de tejidos mantenidos durante 3 días en medios con 10 ppm de boro (tabla 23). Raíces desarrolladas durante 7 días, muestran cambios importantes en cuanto a la capacidad de incorporación del acetato- ^{14}C a los lípidos, al expresar ésta en $\text{cpm} \times \text{g}^{-1}$ peso fresco, frente a $\text{cpm} \times \text{número de órganos}^{-1}$. Como ya se indicó al describir los resultados sobre los efectos del tiempo de desarrollo y de la concentración de boro sobre el contenido lipídico de las raíces, este hecho se puede explicar al tener en cuenta la fuerte inhibición del crecimiento que ejerce una concentración 50 ppm de boro después de 7 días de desarrollo (Tabla 9). De aquí, que el efecto inhibitor sobre la biosíntesis de lípidos provocado por una dosis de 50 ppm de boro a tiempos altos de postgerminación, debe ser consecuencia mas bien de una acción sobre el crecimiento que de un efecto directo sobre el metabolismo lipídico. Por el contrario, la estimulación de la incorporación de acetato- ^{14}C en raíces cultivadas durante tres días en 10 ppm del microelemento, periodo en el cual el peso fresco del tejido no experimenta cambios sustanciales respecto de los tratamientos sin o con 50 ppm de boro, debe corresponder a una verdadera estimulación de la síntesis lipídica.

Naturaleza de los lípidos sintetizados

En un principio, se ha pretendido comprobar si el aumento de lípidos neutros en relación a los fosfolípidos, detectado a nivel de la raíz entera cultivada en medios con 50 ppm de boro (Tabla 15), era debido a una biosíntesis preferencial de dichos constituyentes. En este sentido, los resultados mostrados en la tabla 24 sobre la incorporación de acetato- ^{14}C

a las diferentes categorías lipídicas de raíces, indican que la radioactividad incorporada a fosfolípidos y lípidos neutros, en tejidos desarrollados durante 3 y 7 días, reproduce, en alguna medida, los resultados derivados del análisis: se manifiesta una biosíntesis superior de lípidos neutros e inferior de fosfolípidos, en raíces previamente cultivadas en medios con 50 ppm de boro.

En la tabla 25 se indican los lípidos radiculares más activamente sintetizados en función del boro del medio. Los resultados demuestran que la radioactividad se incorpora, principalmente, a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácidos grasos libres y triglicéridos. Altas concentraciones de boro (50 ppm), estimulan la biosíntesis de triglicéridos y disminuyen la incorporación a fosfatidilcolina. De acuerdo con estos resultados, es posible concluir que es a nivel de los fosfolípidos nitrogenados, componentes fundamentales de las membranas, y de los triglicéridos, principales lípidos de reserva, donde la concentración de boro ejerce una mayor influencia.

2.3.b. Biosíntesis de FC a nivel de microsomas

Los resultados expuestos, utilizando acetato-1-¹⁴C como precursor, indican un efecto del boro sobre la capacidad de biosíntesis lipídica a nivel de la raíz entera de plántulas de girasol, habiéndose observado cambios en el metabolismo de los fosfolípidos. Por otra parte, entre las funciones del boro en plantas, se han descrito una serie de interacciones del micronutriente con el transporte iónico, proceso, como es bien conocido, íntimamente relacionado con las membranas celulares. De ahí, que en el presente capítulo se haya estudiado el posible efecto del boro sobre algún enzima implicado en el metabolismo de los lípidos de membranas. A este respecto, las membranas del retículo endoplasmático, fracción celular habitualmente recogida por centrifugación en el sedimento de microsomas, incluyen una gran parte de los enzimas del metabolismo lipídico. Entre ellas, la CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa (E.C. 2.7.8.2) que cataliza la formación de fosfatidilcolina, fosfolípido mayoritario de las membranas microsomales de las raíces de plántulas de girasol (Tabla 12), habiéndose utilizado esta fracción celular para llevar a cabo, en función

Tabla 23, Incorporación de acetato- ^{14}C a lípidos totales de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	Radioactividad total en el medio de incubación de las raíces	Absorción del precursor en 10 raíces, en % de la radioactividad total	Incorporación a lípidos totales			
			En % del precursor suministrado	En % del precursor absorbido	cpm x g $^{-1}$ (10^5)	cpm x 10 raíces $^{-1}$ (10^4)
50 ppm boro	$4,1 \times 10^6$	$5,16 \pm 1,23$	$2,05 \pm 0,33$	$39,41 \pm 8,21$	6,4	8,4
3 d 10 " "	"	$6,91 \pm 0,86$	$5,05 \pm 0,71$	$73,52 \pm 4,03$	12,5	20,7
0 " "	"	$7,02 \pm 0,93$	$3,42 \pm 0,51$	$49,14 \pm 7,41$	10,5	14,0
50 " "	"	$16,60 \pm 4,54$	$3,63 \pm 0,62$	$21,90 \pm 6,86$	7,0	14,9
7 d 10 " "	"	$30,54 \pm 5,36$	$6,39 \pm 0,96$	$20,91 \pm 3,91$	4,1	26,2
0 " "	"	$28,46 \pm 6,74$	$5,36 \pm 0,70$	$19,18 \pm 6,43$	4,1	22,0

Tabla 24. Porcentaje de la radioactividad total de lípidos incorporada a diferentes clases de lipídicas de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con distintos contenidos de boro. Se utilizó acetato- ^{14}C como precursor y el tiempo de incubación fue de 3 horas. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos		% de la radioactividad total		
		FL	LN	GL
	50 ppm boro	56,67 \pm 2,09	38,43 \pm 2,20	4,90 \pm 0,92
3 días	10 " "	61,92 \pm 2,15	33,77 \pm 1,16	4,31 \pm 0,65
	0 " "	62,57 \pm 3,36	31,51 \pm 1,03	5,92 \pm 0,93
	50 ppm boro	40,66 \pm 3,56	56,24 \pm 2,85	3,10 \pm 0,55
7 días	10 " "	50,38 \pm 3,87	45,52 \pm 2,80	4,10 \pm 1,05
	0 " "	45,87 \pm 3,44	48,53 \pm 3,40	5,60 \pm 0,67
	50 ppm boro	40,66 \pm 3,56	56,24 \pm 2,85	3,10 \pm 0,55

Tabla 25. Porcentaje de la radioactividad total de lípidos incorporada a diferentes moléculas lipídicas de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con distintos contenidos de boro. Precursor, acetato- ^{14}C y tiempo de incubación 4 horas. Los resultados, en % de incorporación a lípidos totales, son la media de 2 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	% de la radioactividad total							
	TG	MG + DG	AGL	FI	FC	FE	AF	GL
50 ppm boro	16,8 \pm 2,0	2,6 \pm 0,4	19,0 \pm 3,0	6,1 \pm 0,9	25,5 \pm 2,8	20,2 \pm 2,4	4,9 \pm 0,6	4,9 \pm 0,9
3 d 10 " "	11,3 \pm 1,5	2,1 \pm 0,4	20,4 \pm 5,1	5,1 \pm 0,7	34,5 \pm 3,5	18,0 \pm 2,5	4,2 \pm 0,5	4,3 \pm 0,6
0 " "	9,0 \pm 1,5	3,1 \pm 0,6	19,4 \pm 2,7	5,7 \pm 0,7	30,8 \pm 4,0	20,3 \pm 2,4	5,8 \pm 0,9	5,9 \pm 0,9
50 " "	34,4 \pm 4,5	7,9 \pm 1,1	13,9 \pm 2,2	5,3 \pm 0,6	14,8 \pm 2,0	16,1 \pm 2,3	4,3 \pm 0,6	3,1 \pm 0,6
7 d 10 " "	22,1 \pm 3,2	6,8 \pm 1,1	16,6 \pm 2,3	4,2 \pm 0,6	22,9 \pm 0,3	16,8 \pm 2,6	6,5 \pm 0,9	4,1 \pm 0,8
0 " "	26,6 \pm 4,0	7,0 \pm 1,2	14,8 \pm 2,2	4,1 \pm 0,5	20,4 \pm 2,2	15,6 \pm 1,7	5,7 \pm 0,9	5,6 \pm 0,7

del boro, experimentos *in vivo* e *in vitro* en relación a la actividad y a la determinación de algunas propiedades del enzima.

Estudio in vivo

Para estudiar el efecto de la concentración de boro en el medio de cultivo sobre la capacidad de formación de fosfatidilcolina en microsomas de raíces, se ha seguido, por una parte, la incorporación del precursor metil-¹⁴C-colina (incubado *in vivo*) a los lípidos de dichas membranas. Para ello, raíces desarrolladas durante 3 días en medios diferenciales de boro se incubaron durante 3 horas en una solución de dicho precursor. Posteriormente, se aislaron los microsomas y se determinó la radioactividad incorporada a sus lípidos totales y diferentes moléculas lipídicas (Tabla 26). En los tratamientos utilizados (0, 10 y 50 ppm de boro), el precursor se incorpora, como era de esperar, prácticamente en su totalidad, a fosfatidilcolina. Sin embargo, es importante indicar que una concentración de 10 ppm de boro induce un incremento significativo en la biosíntesis de este fosfolípido.

Estudio in vitro

De una parte, los resultados derivados de los experimentos *in vivo* efectuados con acetato-¹⁴C para determinar la biosíntesis lipídica a nivel de la raíz entera, donde se demostró la existencia de una incorporación importante de la radioactividad a fosfatidilcolina, y por otra parte, la incorporación *in vivo* de metil-¹⁴C-colina a los lípidos de microsomas, indican que estas membranas están capacitadas para la síntesis de dicho fosfolípido. Todo ello nos ha llevado a estudiar *in vitro* la capacidad de biosíntesis de fosfatidilcolina a partir de CDP-colina-¹⁴C, en microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios con 10 ó 50 ppm de boro.

Siguiendo el protocolo experimental detallado en el capítulo de Material y Métodos, resultados previos obtenidos a partir de microsomas aislados de 10 g de tejido (10 y 50 ppm de boro) muestran que la radioactividad incorporada en fosfatidilcolina, después de 15 min de

incubación con 0.30 mg de proteínas y 10.7 nmoles de CDP-metil-¹⁴C-colina, representa entre el 2 % (50 ppm boro) y el 15 % (10 ppm boro) del ¹⁴C suministrado. Asimismo, es importante señalar que la molécula de FC contiene prácticamente el 100 % de la radioactividad incorporada a los lípidos totales (Tabla 27). Estos resultados preliminares permitieron un estudio ulterior del enzima fosfotransferásico de microsomas. A continuación se describen algunas propiedades bioquímicas del mismo, así como la influencia *in vivo* e *in vitro* del boro sobre la actividad enzimática.

Propiedades del enzima

En la figura 25 se muestra la evolución de la cinética enzimática en microsomas aislados de raíces cultivadas en medios con 50 ó 10 ppm de boro, en función del tiempo de incubación. Los resultados demuestran que la actividad fosfotransferásica es, en gran medida, lineal durante 1 h de incubación en microsomas purificados de tejidos desarrollados en 10 ppm de boro; sin embargo, en membranas microsomales de raíces mantenidas en medios con 50 ppm de boro se observa una fuerte inhibición desde los primeros minutos de incubación.

Influencia de la cantidad de proteínas

La actividad fosfotransferásica de microsomas, en función de la cantidad de proteínas y de la concentración en boro del medio de cultivo de las raíces, se indica en la figura 26. Los microsomas aislados de raíces cultivadas en medios con 10 ppm de boro muestran una actividad enzimática muy alta, incluso a concentraciones comparativamente bajas de proteínas. Sin embargo, en microsomas de raíces cultivadas en medios con 50 ppm de boro, se alcanza una meseta en la actividad, a concentraciones muy bajas de proteínas. Este comportamiento se podría explicar, bien por la existencia en estas condiciones de un inhibidor del enzima, o bien por una saturación del sustrato. De aquí, que en nuestros experimentos ulteriores se hayan utilizado concentraciones de proteínas del orden de 300 µg/ml.

Influencia de la concentración de CDP-metil-¹⁴C-colina

Como muestran las gráficas de las figuras 27 y 28, para una misma cantidad de proteínas microsomales puestas en incubación y aumentando progresivamente la cantidad de sustrato, la velocidad de reacción y la representación de LINEWEAVER-BURK, en nmoles de fosfatidilcolina formados por 15 min y por mg de proteínas, indican, para el enzima de microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios con 10 ppm de boro, una velocidad, en gran medida, constante hasta concentraciones de CDP-metil¹⁴C-colina entre 7 y 10 μM , aumentando regularmente la cantidad de fosfatidilcolina sintetizada en función de la cantidad de sustrato suministrado. Contrariamente, en microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios con 50 ppm de boro, la velocidad de reacción alcanza rápidamente una meseta, a partir de concentraciones de sustrato de 2 a 3 μM . Por otra parte, los valores de la K_m aparente del sistema enzimático, en función del boro del medio de cultivo, son de 7.8 μM , en el caso de microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios con 10 ppm de boro, y de 6.8 μM para 50 ppm de boro.

Efecto del boro in vitro sobre la actividad fosfotransferasica de microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios sin boro

En los experimentos precedentes, al ser suministrado el boro *in vivo* a las plántulas durante su crecimiento, los medios de incubación donde posteriormente se determinaba la incorporación del sustrato a fosfatidilcolina, no contenían dicho micronutriente. En los experimentos ulteriores, para verificar el posible efecto inhibitorio directo del ión borato sobre los enzimas de la lipogénesis, las plántulas fueron cultivadas durante 3 días a la oscuridad en medios desprovistos de boro, para impedir, de esta forma, que las membranas celulares pudieran fijar una cantidad óptima o anormalmente elevada del micronutriente. Los microsomas preparados a partir de las raíces de dichas plántulas fueron incubados en medios conteniendo 50 ó 500 ppm de boro. La Tabla 28 muestra como concentraciones de 50 ppm provocan una inhibición que representa casi el 50 % de la actividad enzimática. Una concentración 10 veces mayor de boro (500 ppm) no aumenta, en gran medida, la inhibición.

Tabla 26. Incorporación *in vivo* de metil-¹⁴C-colina a los lípidos totales y fosfatidilcolina de microsomas de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 días en medios con distintos contenidos de boro. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes y no difieren en más de un 9 % del valor medio.

Tratamientos	Radioactividad total en el medio de incubación (cpm)	% de radioactividad absorbido por las raíces	¹⁴ C, expresado en cpm, incorporado a los lípidos totales de microsomas aislados de 10 g de raíces x h ⁻¹ x mg ⁻¹ proteínas	¹⁴ C expresado en cpm, incorporado a FC de microsomas aislados de 10 g de raíces x h ⁻¹ x mg ⁻¹ de proteínas
50 ppm boro	3,30 x 10 ⁵	61,0	7270	7125
10 " "	"	66,0	10530	10320

Tabla 27. Incorporación *in vitro* de CDP-metil-¹⁴C-colina en fosfatidilcolina por microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol desarrolladas en medios con 10 ó 50 ppm de boro. Las condiciones de incubación se indican en el texto. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes y no difieren en más de un 11 % de dicho valor.

Tratamientos	nmoles CDP-metil- ¹⁴ C incorporados en FC x 15 min ⁻¹ x 0.30 mg ⁻¹ prot. 30	% de radioactividad incorporada a FC respecto de la radioactividad total	% de radioactividad incorporada a FC respecto de la radioactividad incorporada a lípidos
50 ppm boro	0.26 2.50	2.4	2.5
10 " "	1.57 3.14	14.7	14.9

Tabla 28. Efecto del boro *in vitro* sobre la actividad del enzima CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa aislado de microsomas de raices de plántulas de girasol desarrolladas en medios desprovistos de boro.

Tratamientos	nmoles de CDP-metil- ¹⁴ C incorporados a FC x h ⁻¹ x mg ⁻¹ proteínas
Testigo sin boro	2,18 ± 0,17
+ 50 ppm boro	1,13 ± 0,09
+ 500 " "	0,88 ± 0,06

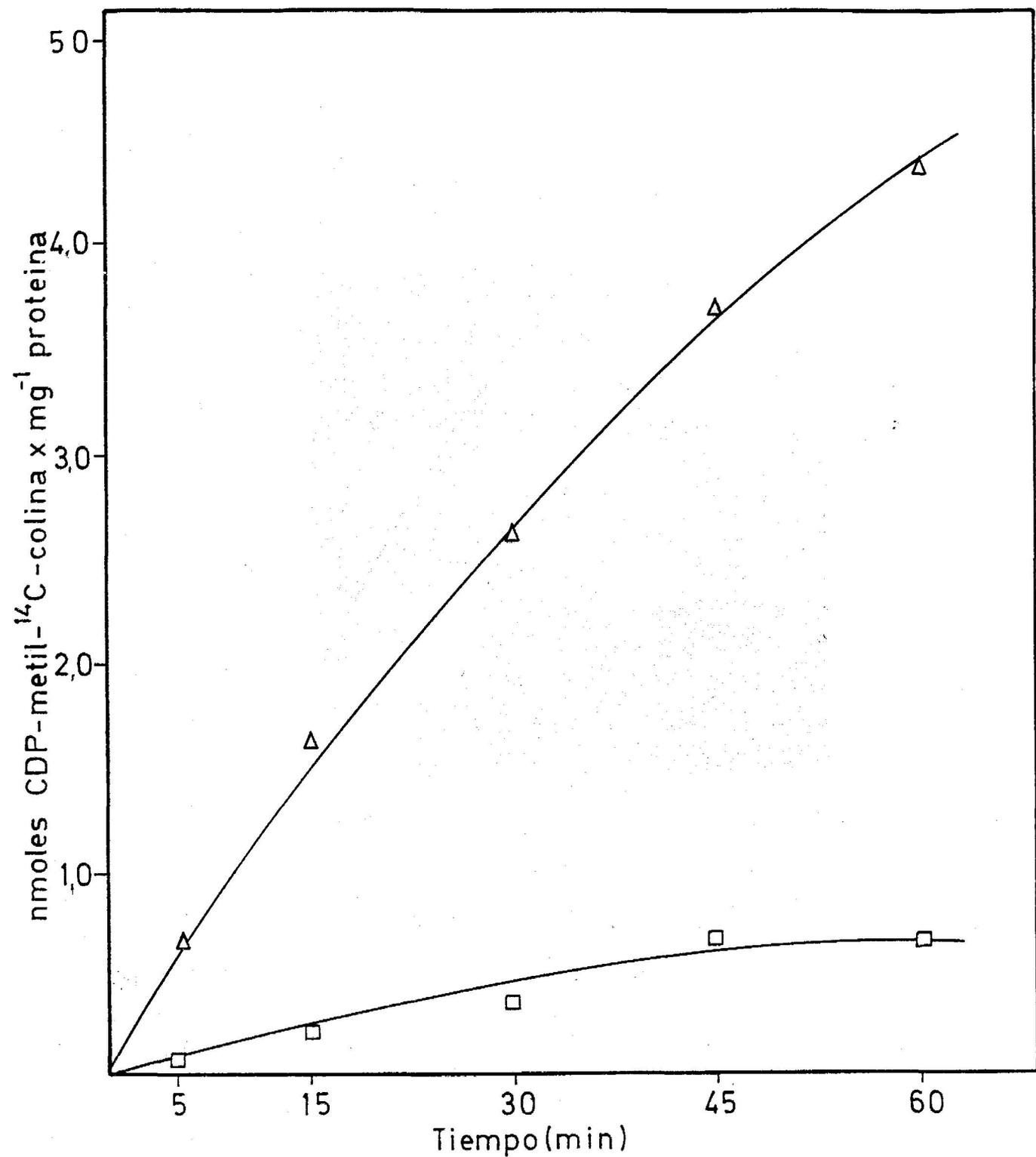


Figura 25. Efecto del tiempo de incubación sobre la capacidad de incorporación de CDP-metil-¹⁴C-colina a fosfatidilcolina en microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios con 50 (□) ó 10 ppm (Δ) de boro.

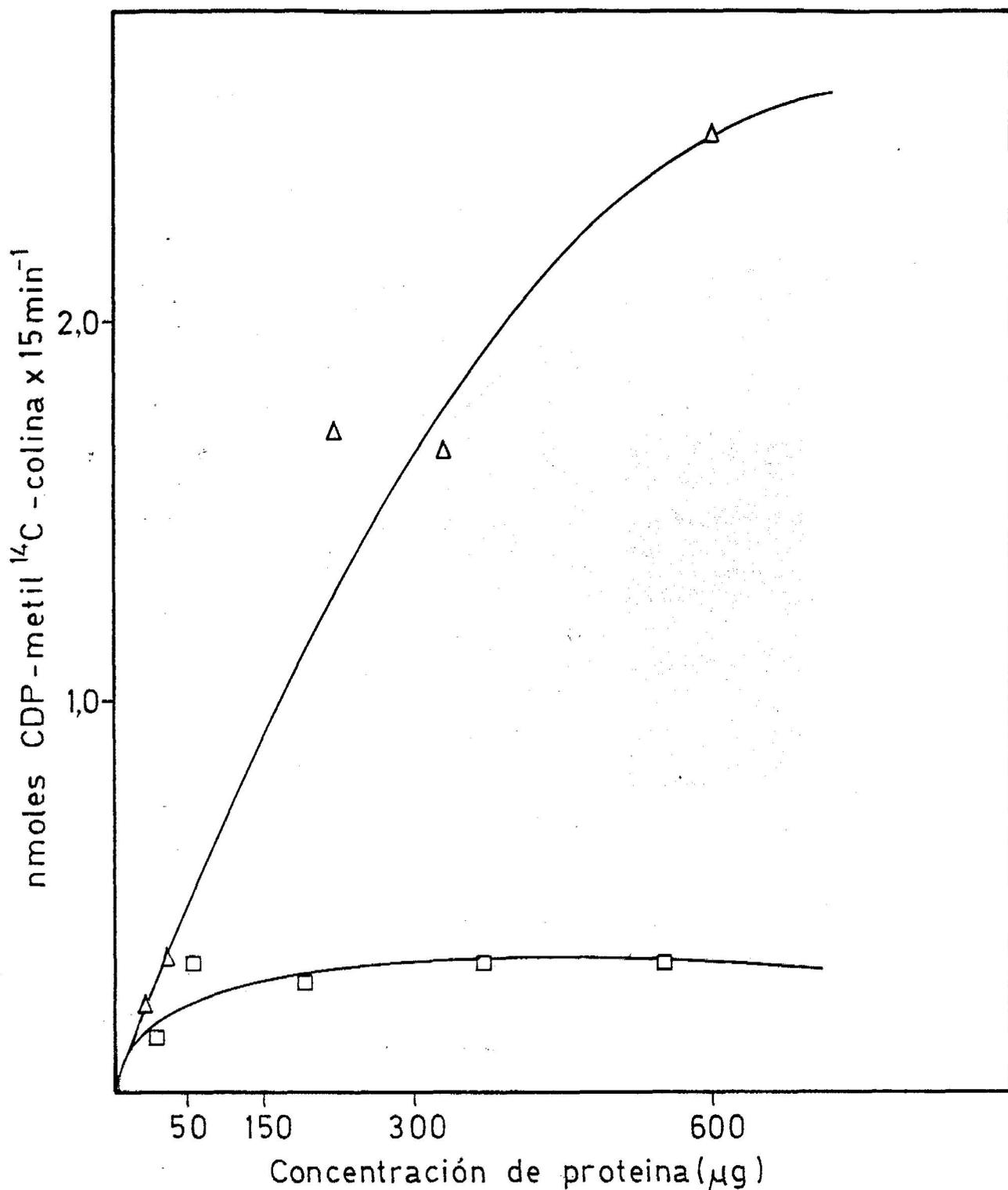


Figura 26. Efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad de incorporación de CDP-metil- ^{14}C -colina a fosfatidilcolina de microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios con 50 (\square) ó 10 ppm (Δ) de boro.

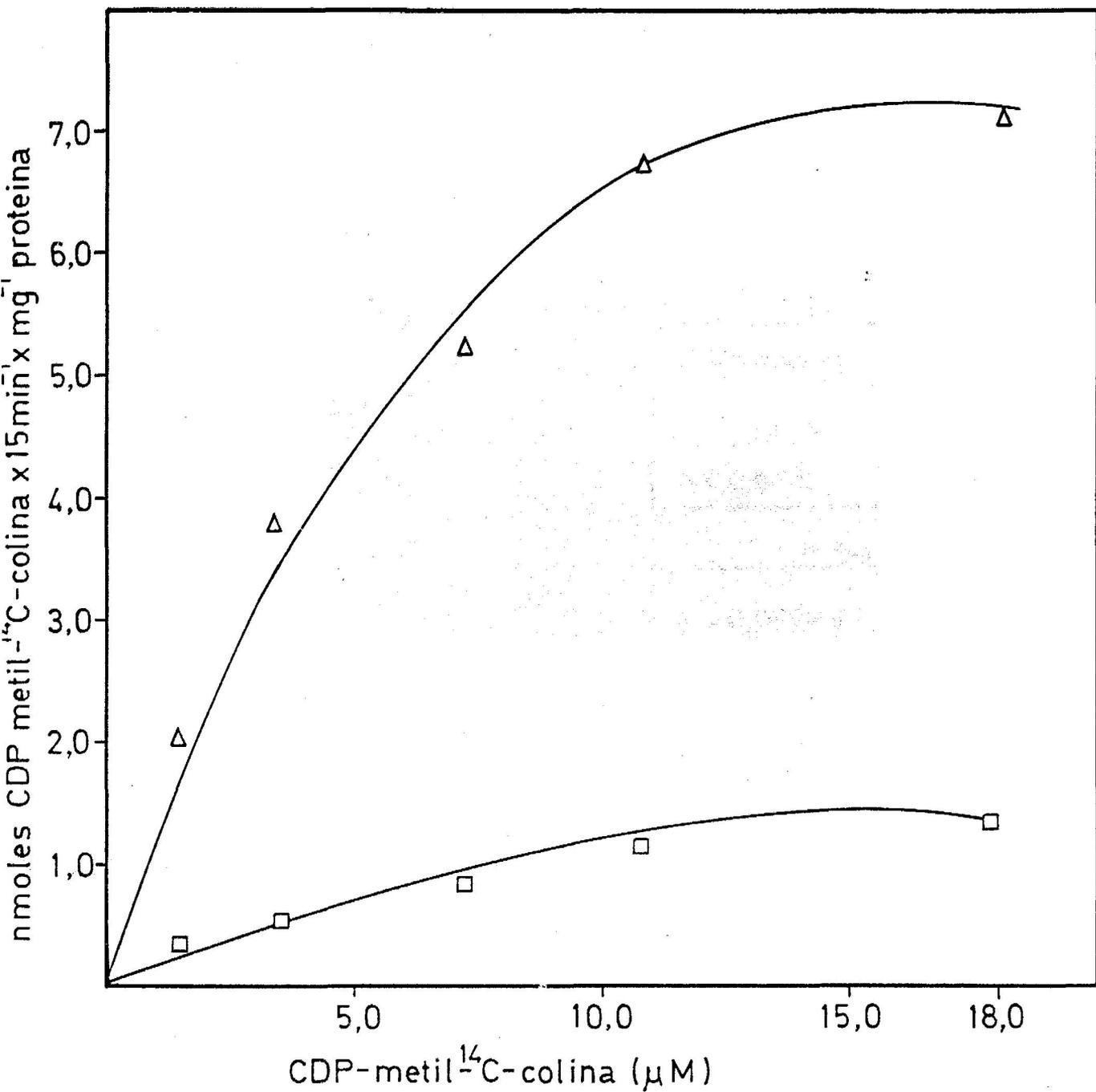


Figura 27. Incorporación de CDP-metil-¹⁴C-colina a fosfatidilcolina por microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios con 50 (□) y 10 ppm (Δ) de boro.

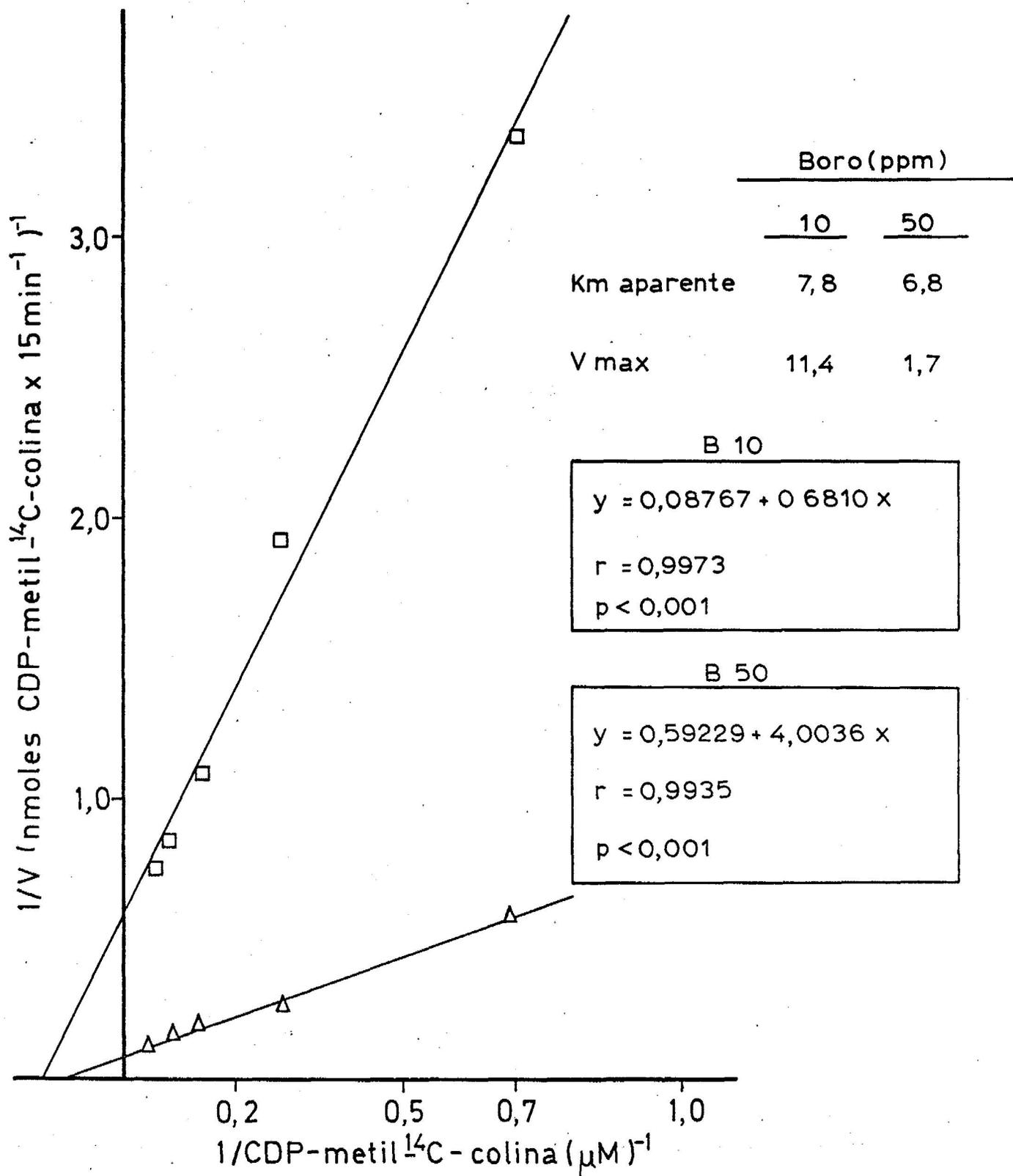


Figura 28. Valores de Km aparente y velocidad máxima del enzima fosfotransferásico de microsomas de raíces de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en medios con 50 (□) y 10 ppm (Δ) de boro.

3. MORFOLOGIA DE COTILEDONES DE PLANTULAS DE GIRASOL EN FUNCION DEL BORO

Como complemento a los datos bioquímicos, se han investigado posibles cambios en la ultraestructura de cotiledones de girasol en función del boro, durante el proceso germinativo, habiéndose utilizado como índice del desarrollo cotiledonar los datos de peso fresco y seco del tejido (Tabla 29). Unicamente, los cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm presentan un ligero incremento en el peso fresco.

3.1. OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Observaciones previas, cuyos resultados no se muestran, han indicado un diferente modelo de degradación y reorganización de la estructura cotiledonar, según la zona muestreada. Las limitaciones impuestas por la envergadura del trabajo realizado y, teniendo en cuenta los objetivos marcados en el mismo, no ha sido posible realizar un estudio exhaustivo de las distintas partes del tejido, por lo cual se ha tomado como zona de muestreo para todos los tratamientos, aquella localizada en la región intermedia del cotiledón.

Estudio en oscuridad

En las figuras 29, 30 y 31, se presentan los detalles ultraestructurales de las células de cotiledones desarrollados a la oscuridad durante 3, 5 y 7 días en medios sin boro, o con 10 y 50 ppm de boro, respectivamente. Al tercer día de desarrollo, las células cotiledonares se caracterizan, en todos los tratamientos, por la presencia de grandes cuerpos lipídicos, densamente y empaquetados ocupando la mayor parte del citoplasma, así como de algunos cuerpos proteicos de gran tamaño. Los glioxisomas son bien visibles en este estadio al no estar totalmente enmascarados por las reservas lipídicas, ya en curso de degradación (Figs. 29a, 30a, 31a). Después de 5 días, las células aparecen parcialmente vacuoladas, con su contenido a veces fibrilar o con inclusiones densas, disminuyendo la cantidad de cuerpos grasos, al tiempo que se hacen visibles

un mayor número de glioxisomas. También se observan plastidios del tipo etioplasto, con sus cuerpos prolamelares perfectamente organizados, a veces, con gránulos de almidón en su interior, y un aumento del área citoplasmática con elevada densidad ribosómica. No se aprecian diferencias estructurales importantes en función del boro (Figs 29b, 30b-c, 31b).

Siete días de desarrollo provocan en los cotiledones mantenidos en medios con 10 ppm o sin boro un menor contenido de cuerpos lipídicos, relegados a la periferia celular por la existencia de una gran vacuola central que ocupa gran parte del espacio celular (Figs. 29c, 30d). En medios con 10 ppm de boro, se observan cuerpos lipídicos parcialmente degradados, sustituidos por pequeñas vacuolas, que aparentemente fusionan con la gran vacuola central, así como gran número de etioplastos (Figs. 30d-e). Medios sin boro provocan un cuadro similar, caracterizado por la presencia de plastidios cóncavos, que engloban áreas de citoplasma, y rodeados de retículo endoplasmático (Figs. 29c-d).

En los cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm de boro, destaca la gran cantidad de cuerpos lipídicos aún repartidos por todo el espacio celular, así como el escaso desarrollo citoplásmico, especialmente de la vacuola central. Este panorama es de gran similitud al detectado en estadios previos.

Estudio a la luz

Las figuras 32 y 33 muestran las características ultraestructurales de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en oscuridad durante 3 y 7 días en medios diferenciales de boro y mantenidos, posteriormente, 24 horas a la luz. Después de tres días de oscuridad y 24 h de iluminación, las células presentan un mayor grado de organización que las mantenidas exclusivamente en oscuridad. Los cuerpos grasos presentan un menor grado de osmiofilia y el citoplasma aparece más desarrollado con gran cantidad de ribosomas, agupados a veces en polirribosomas. También se observa la presencia de una vacuola central con material fibrilar e inclusiones densas de carácter proteináceo. El sistema plastidial está bien representado y desarrollado, tomando ya la estructura típica de un cloroplasto, sobre todo, en los tratamientos con 10 ppm de boro (Fig. 32b). Los plastidios, en

cotiledones desarrollados en 50 ppm de boro, aparecen menos diferenciados, detectándose todavía cuerpos prolamelares en fase de organización (Fig. 32c).

La figura 33 muestra el aspecto celular de los cotiledones mantenidos 24 h a la luz, después de 7 días de desarrollo en oscuridad. Las células presentan ya un gran parecido con la estructura típica de una hoja verde: células de gran tamaño con una gran vacuola central de contenido fibrilar, que relega el citoplasma a la periferia. Los cuerpos grasos aparecen ya en menor número, destacando, sobre todo en cotiledones mantenidos en 10 ppm de boro, el gran desarrollo del aparato fotosintético con un sistema laminar bien constituido y con la presencia de plastoglóbulos. Sin embargo, en cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm de boro, se observan formas plastidiales de gran tamaño, con un sistema de membranas internas poco desarrollado, caracterizadas por la existencia de pequeñas vesículas en la periferia (que forma el retículo periplastidial), y por todo el orgánulo.

4. EL BORO Y LOS LÍPIDOS DEL COTILEDON

4.1. CONCENTRACION EN LÍPIDOS

La concentración en lípidos de los cotiledones de la semilla de partida es de alrededor de un 30 %, referido a materia fresca, o de un 75 %, en función del peso seco. Durante la germinación, el porcentaje cambia de acuerdo con las transformaciones metabólicas que tienen lugar en el tejido (Tabla 30). Al contrario de los resultados descritos a nivel de la raíz, la concentración de boro en el medio no entraña cambios importantes en el peso de los cotiledones; únicamente, en el caso del desarrollo en medios con 50 ppm de boro, se observa un leve incremento del peso fresco (Tabla 29). La alta concentración en lípidos de reserva de los cotiledones, representa básicamente un problema para el estudio de las capacidades de renovación de los lípidos esenciales para la vida de la planta. De aquí, que en este capítulo se haya considerado muy someramente el estudio del metabolismo lipídico, habiéndose profundizado exclusivamente en el análisis de enzimas relacionados con aquellos procesos oxidativos que constituyen una importante razón de ser de los cotiledones de plantas oleaginosas: el enzima

Tabla 29. Variación del peso fresco y seco de cotiledones de plántulas de girasol, después de 3 y 7 días de desarrollo en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados expresados en mg por l órgano y en % de humedad, son la media de 3 experimentos independientes (\pm DS).

Tiempo de germinación	Concentración de boro	Peso Fresco	Peso Seco	% Humedad
3 días	50 ppm	105,2 \pm 5,4	40,3 \pm 2,4	61,7
	10 "	102,2 \pm 6,2	40,4 \pm 2,2	60,5
	0 "	100,1 \pm 5,0	37,3 \pm 2,0	62,3
7 días	50 ppm	146,8 \pm 8,6	28,5 \pm 1,7	80,6
	10 "	129,7 \pm 5,7	31,1 \pm 1,9	76,0
	0 "	132,0 \pm 4,6	28,1 \pm 2,1	78,7

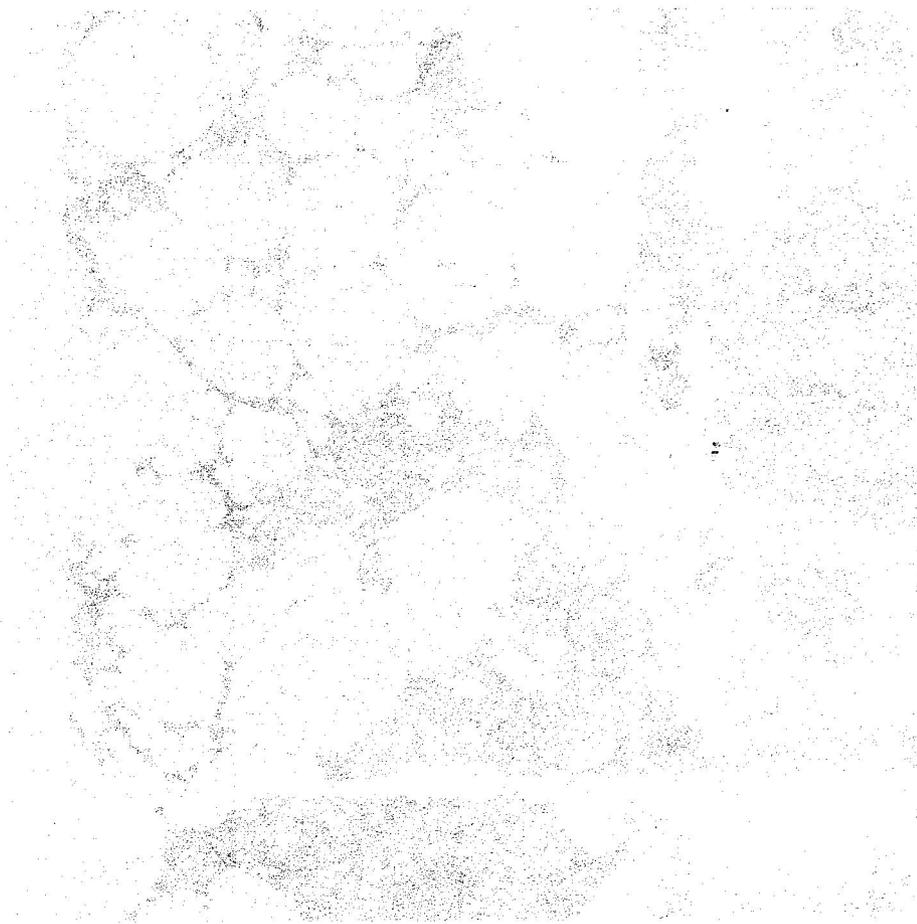
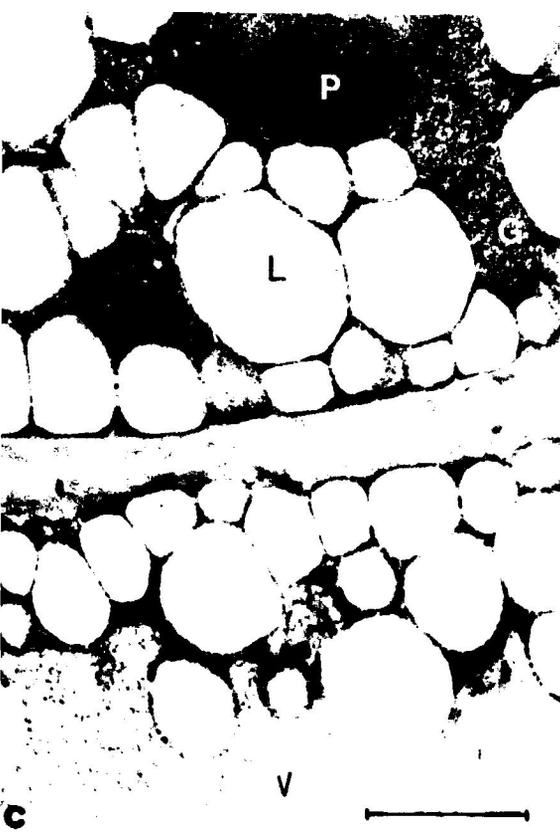
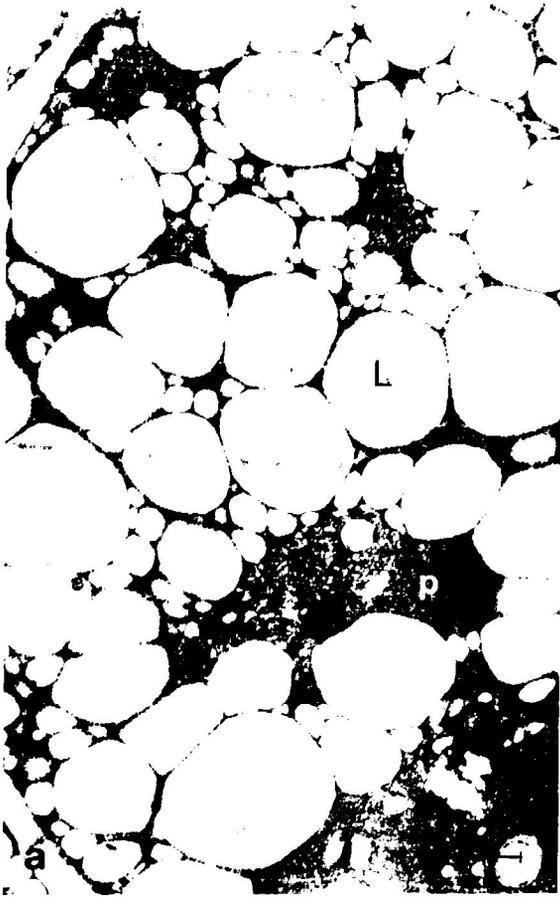


Figura 29. Cortes ultrafinos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en la oscuridad en medios sin boro durante: a) 3 días; b) 5 días c) 7 días.



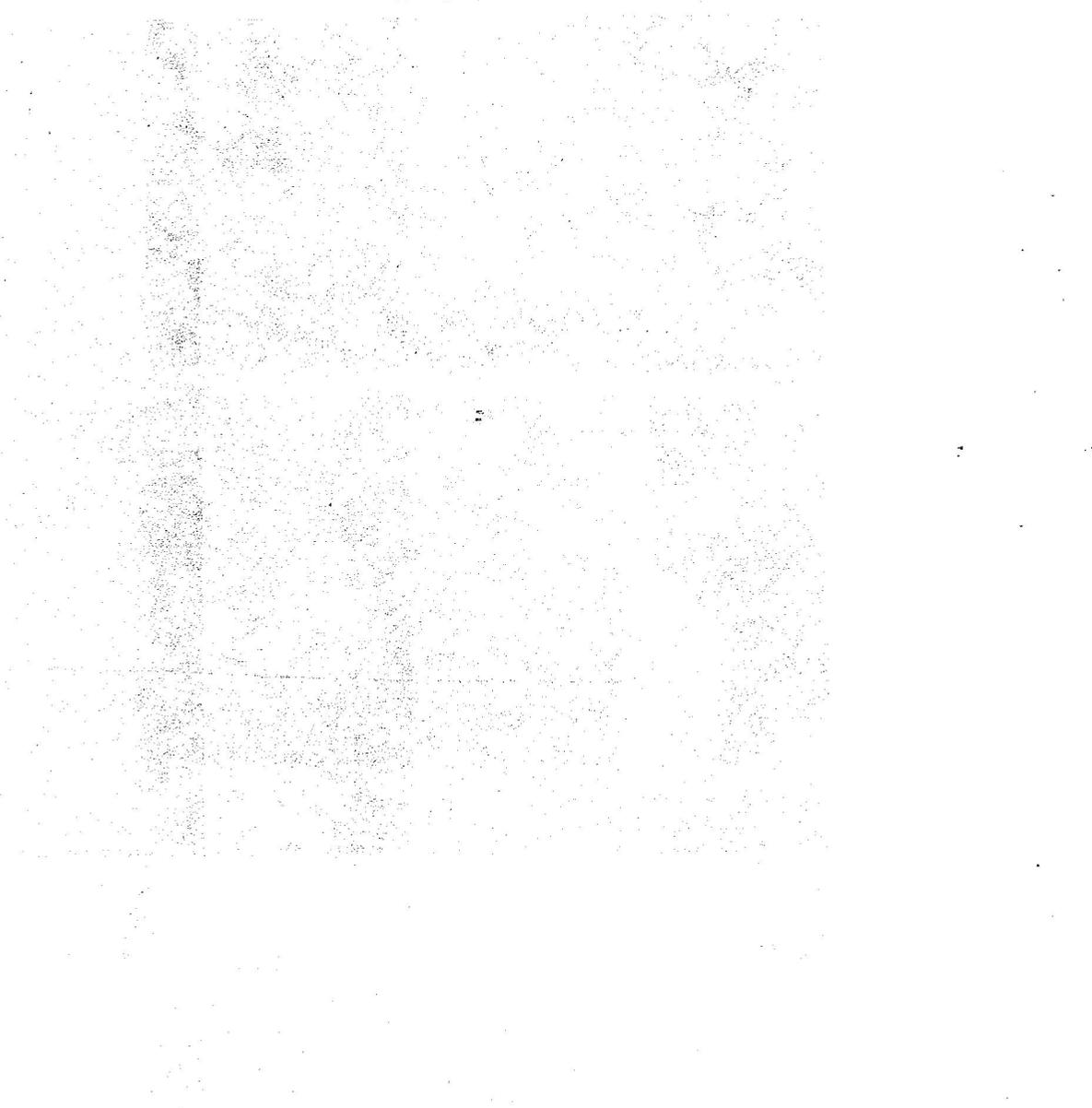


Figura 30. Cortes ultrafinos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en la oscuridad en medios con 10 ppm de boro, durante: a) 3 días; b) 5 días c) 7 días.

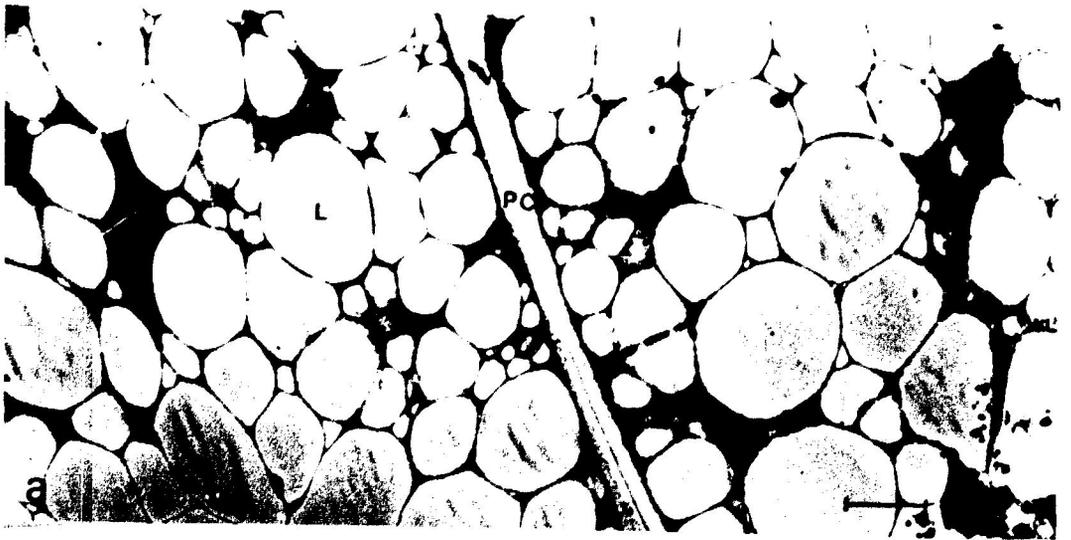




Figura 31. Cortes ultrafinos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en la oscuridad en medios con 50 ppm de boro, durante: a) 3 días; b) 5 días c) 7 días.

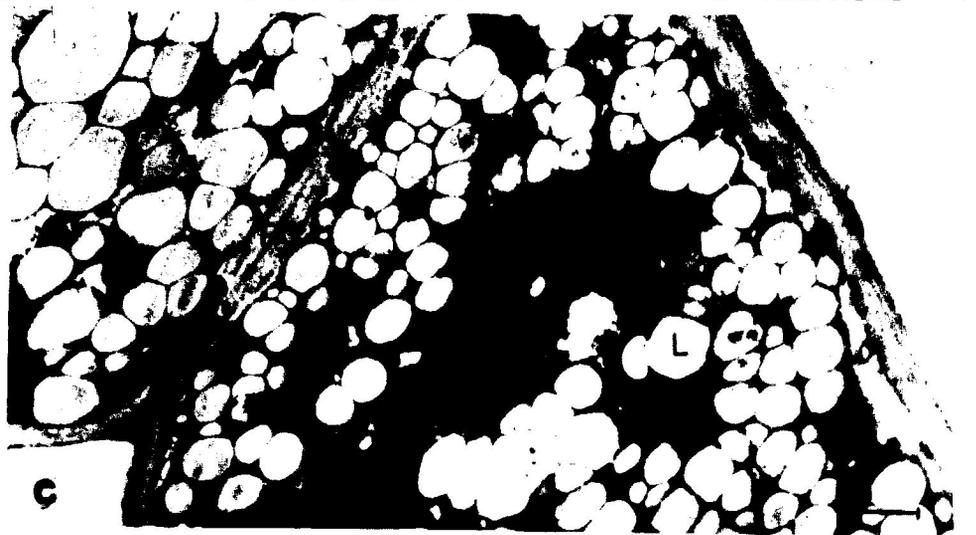
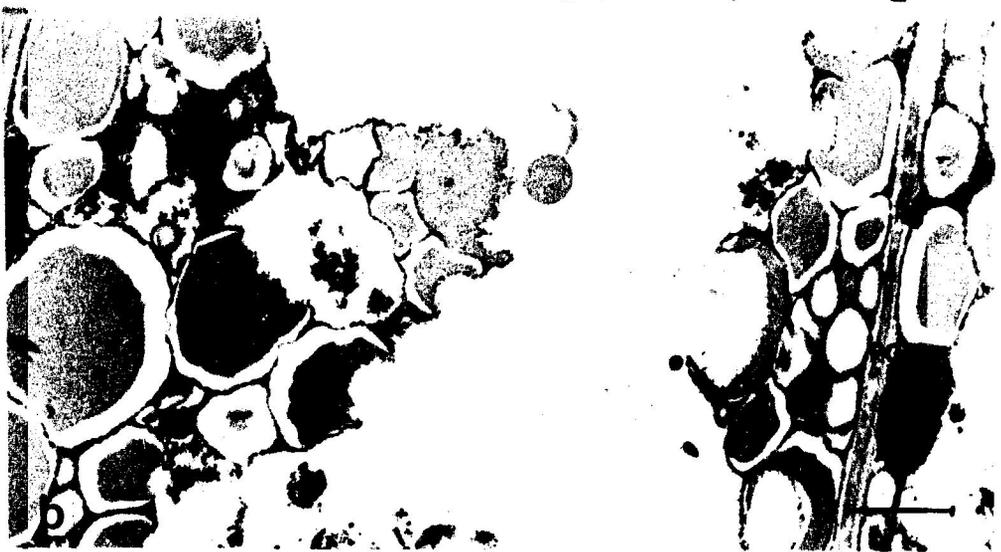
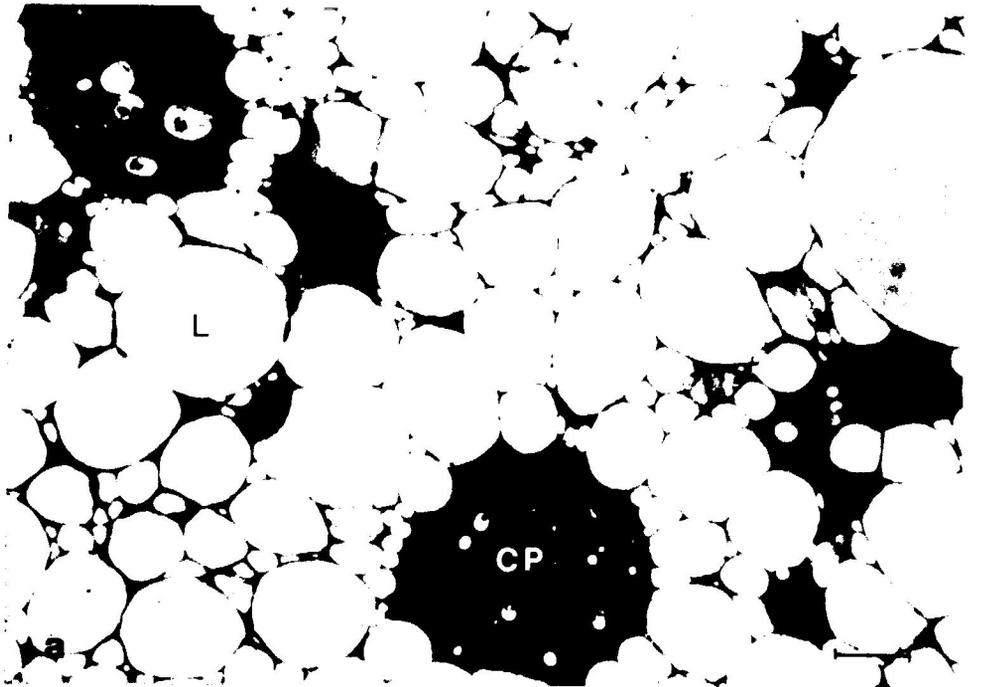
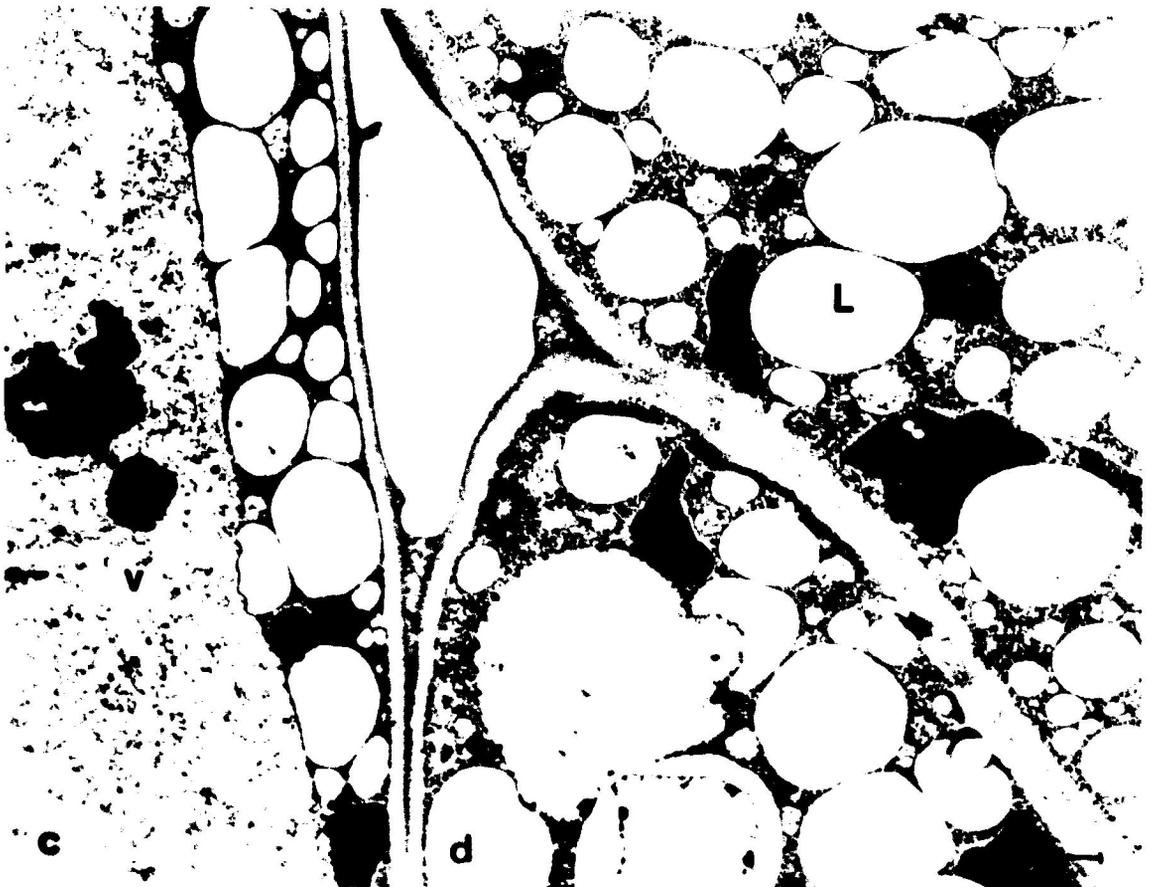




Figura 32. Cortes ultrafinos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 días en la oscuridad y, posteriormente, mantenidas 24 horas a la luz, en medios diferenciales de boro: a) sin boro; b) 10 ppm; c) 50 ppm.



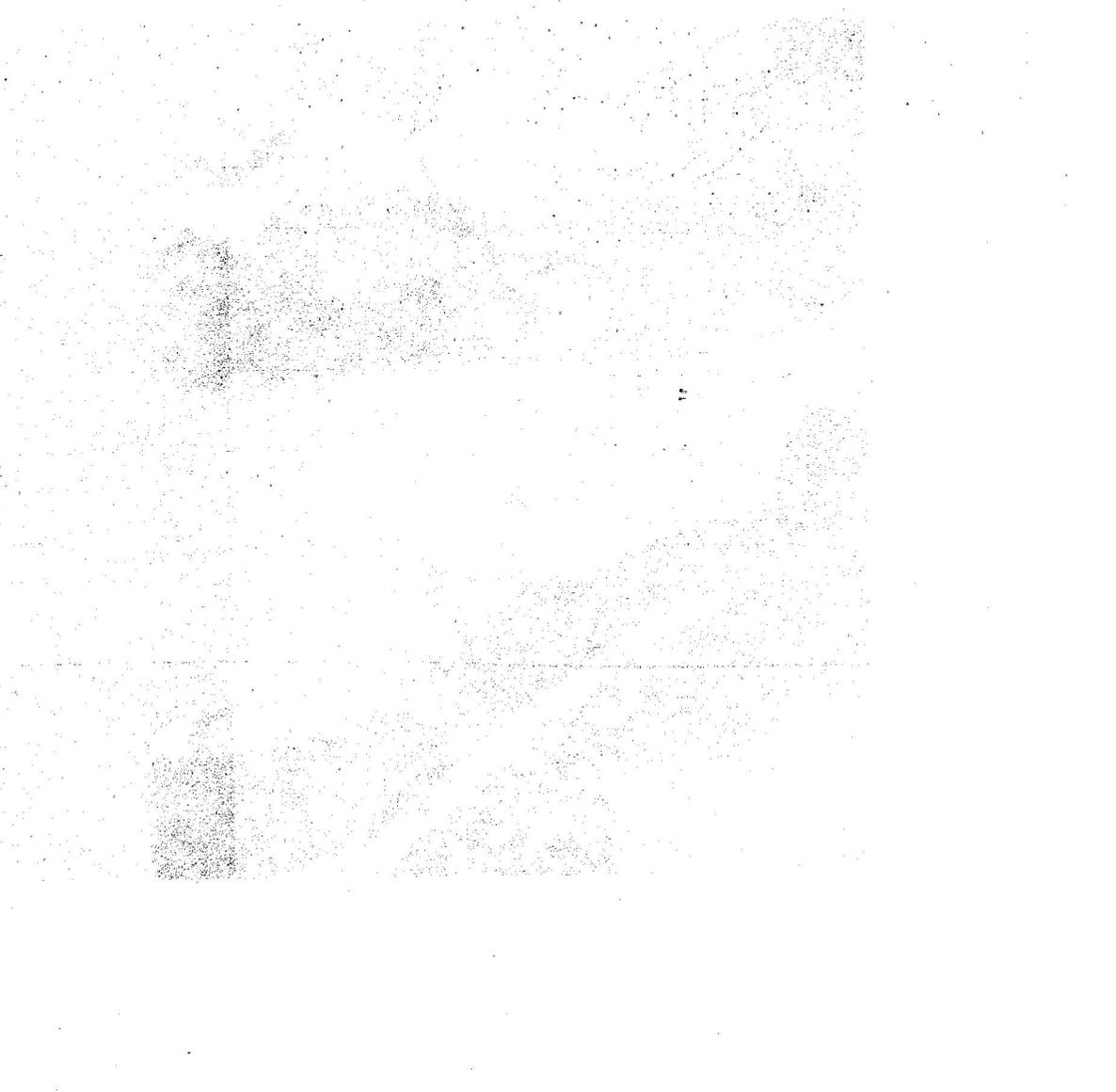


Figura 33. Cortes ultrafinos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas durante 7 días en la oscuridad y, posteriormente, mantenidas 24 horas a la luz, en medios diferenciales de boro: a) sin boro; b) 10 ppm; c) 50 ppm.



lipoxigenasa, implicada en la degradación oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados y, por ello, regulador del desarrollo cotiledonar.

4.1.a. Clases de moléculas lipídicas

Las indicaciones que acabamos de hacer se reafirman cuando se examinan las principales clases de lípidos presentes en los cotiledones: los lípidos neutros, que constituyen la clase lipídica más importante, o los fosfolípidos, componentes esenciales de las membranas (Tablas 31 y 32).

4.1.b. Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes categorías lipídicas

Todos los análisis han mostrado que los lípidos totales, así como los fosfolípidos, triacilgliceroles y la fracción de ácidos grasos libres, son particularmente ricos en ácido linoléico (Tablas 30, 31, 32 y 33); estos resultados, los cuales se obtienen después de la separación de dichas fracciones por cromatografía en capa fina, también indican un contenido importante de ácidos palmítico y oléico, y una menor proporción de ácido esteárico, representando los ácidos grasos insaturados casi un 85 % del total de ácidos grasos.

Por otra parte, el consumo del material lipídico es gradual durante la germinación, disminuyendo proporcionalmente el contenido de ácidos grasos desde la cantidad de partida. La concentración en boro del medio no entraña cambios notables en la proporción de ácidos grasos; sin embargo, tratamientos con 50 ppm de boro provocan una estabilidad en el contenido de estas moléculas durante los primeros días de desarrollo, disminuyendo, posteriormente, aunque más lentamente que en las plántulas tratadas con 10 ppm o sin boro. Asimismo, altas concentraciones de boro inducen un incremento en el contenido de ácidos grasos libres de cotiledones.

Tabla 30. Cambios en el contenido y en los porcentajes relativos de ácidos grasos de lípidos totales de cotiledones de girasol cultivados en medios con 10 ppm (a), 50 ppm (b) o sin boro (c). Resultados en mg de ácidos grasos por g de peso fresco de tejido (entre paréntesis) y en porcentaje de ácidos grasos. Cada dato es la media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 9 % del valor medio.

Ácidos grasos	Germinación (días)						
	1	2	3	4	5	6	7
16:0 a	11,4 (28,0)	6,8 (8,8)	10,3 (10,7)	13,2 (8,8)	12,3 (5,5)	11,9 (4,4)	8,6 (2,6)
16:0 b	8,1 (18,1)	7,5 (17,0)	10,2 (16,4)	9,1 (11,0)	8,2 (7,2)	8,6 (5,5)	9,0 (3,7)
16:0 c	7,9 (23,2)	7,8 (9,6)	8,6 (10,0)	9,6 (8,1)	9,5 (4,9)	9,7 (4,2)	9,8 (3,4)
18:0 a	6,9 (17,0)	6,0 (7,8)	5,2 (5,4)	7,1 (5,1)	3,6 (1,6)	5,6 (2,0)	3,8 (1,1)
18:0 b	4,8 (11,1)	4,9 (11,2)	4,9 (7,9)	5,6 (6,8)	4,0 (3,3)	4,5 (2,7)	4,9 (2,0)
18:0 c	6,2 (18,2)	5,8 (7,2)	4,4 (5,0)	5,3 (4,5)	5,2 (2,7)	4,7 (2,1)	4,2 (1,4)
18:1 a	17,9 (44,0)	25,1 (32,6)	18,2 (19,0)	14,9 (10,7)	20,3 (9,3)	20,9 (7,7)	22,0 (6,9)
18:1 b	18,0 (41,8)	24,6 (55,7)	20,8 (33,4)	17,8 (21,4)	23,0 (19,3)	23,6 (14,6)	24,1 (9,9)
18:1 c	20,6 (60,9)	24,8 (30,6)	16,2 (18,5)	16,1 (13,6)	21,7 (11,1)	21,0 (9,1)	20,2 (7,0)
18:2 a	63,8 (157,0)	62,1 (80,6)	66,3 (69,0)	64,8 (46,5)	62,3 (28,2)	59,1 (21,6)	62,6 (19,4)
18:2 b	69,2 (160,8)	63,0 (149,2)	64,1 (103,1)	67,5 (81,4)	65,2 (54,4)	61,8 (39,4)	59,3 (24,3)
18:2 c	65,3 (192,7)	61,6 (75,5)	70,6 (80,8)	69,0 (58,2)	63,5 (32,5)	63,0 (27,1)	62,5 (21,6)
18:3 a	t	t	t	t	1,5 (0,7)	2,5 (0,9)	3,0 (1,0)
18:3 b	t	t	t	t	t	1,5 (0,5)	2,8 (1,1)
18:3 c	t	t	t	t	t	2,0 (0,5)	3,3 (1,1)
Σ a	(246,0)	(129,8)	(104,1)	(71,8)	(44,5)	(35,8)	(30,0)
Σ b	(231,8)	(233,1)	(160,8)	(120,6)	(84,2)	(62,7)	(41,0)
Σ c	(295,2)	(122,6)	(114,3)	(84,4)	(51,2)	(43,0)	(34,5)

Tabla 31. Cambios en el contenido y en los porcentajes relativos de ácidos grasos de fosfolípidos de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con 10 ppm (a), 50 ppm (b) o sin boro (c). Los resultados, en mg de ácidos grasos por g de peso fresco (entre paréntesis) y en porcentajes de ácidos grasos, son la media de 3 experimentos independientes, que no difieren en más del 15 % del valor medio.

Acidos grasos	Germinación (días)				
	1	3	5	7	
16:0	a	19,4 (1,7)	19,2 (1,2)	20,1 (1,0)	22,0 (1,0)
	b	19,9 (2,0)	16,7 (1,1)	15,6 (1,0)	16,6 (0,7)
	c	20,4 (0,8)	20,2 (1,2)	18,1 (0,6)	15,3 (1,0)
18:0	a	3,9 (0,3)	5,1 (0,3)	3,3 (0,2)	4,1 (0,2)
	b	5,0 (0,5)	5,5 (0,4)	2,4 (0,2)	3,2 (0,1)
	c	4,6 (0,2)	3,6 (0,2)	4,9 (0,2)	3,4 (0,2)
18:1	a	20,1 (1,8)	15,0 (0,9)	12,1 (0,6)	10,9 (0,5)
	b	18,9 (1,9)	10,2 (0,7)	11,9 (0,8)	11,7 (0,5)
	c	19,7 (0,8)	7,3 (0,4)	9,3 (0,3)	15,1 (1,0)
18:2	a	55,0 (4,8)	58,6 (3,5)	61,3 (3,1)	57,4 (2,4)
	b	53,9 (5,4)	65,7 (4,3)	64,4 (4,3)	58,8 (2,5)
	c	54,4 (2,1)	62,1 (3,7)	63,7 (2,1)	57,5 (3,9)
18:3	a	1,6 (0,1)	2,1 (0,1)	3,2 (0,2)	5,6 (0,3)
	b	2,3 (0,2)	1,9 (0,1)	5,7 (0,4)	10,7 (0,4)
	c	t	6,8 (0,4)	4,0 (0,1)	8,7 (0,6)
I	a	(8,8)	(6,0)	(5,1)	(4,4)
	b	(10,0)	(6,6)	(6,7)	(4,2)
	c	(3,9)	(5,9)	(3,3)	(6,7)

t = detectado en cantidad traza

Tabla 32. Cambios en el contenido y en los porcentajes relativos de ácidos grasos de triacilgliceroles de cotiledones de plántulas de girasol desarrollados durante 3 y 7 días en medios con 10 ppm (a), 50 ppm (b) o sin boro (c). Los resultados, en mg de ácidos grasos por g de peso fresco (entre paréntesis) y en porcentajes de ácidos grasos, son la media de 3 experimentos independientes, que no difieren en más de 11 % del valor medio.

Acidos grasos		Germinación (días)			
		1	3	5	7
16:0	a	9,5 (17,1)	8,9 (8,1)	13,0 (3,8)	14,3 (1,6)
	b	7,1 (14,6)	7,0 (13,7)	10,5 (5,8)	12,0 (2,4)
	c	9,7 (12,8)	9,7 (8,3)	9,9 (3,0)	12,9 (1,5)
18:0	a	5,6 (7,4)	6,0 (5,5)	5,0 (1,5)	5,3 (0,6)
	b	6,5 (12,6)	5,5 (10,7)	5,2 (2,9)	4,4 (0,9)
	c	7,3 (9,6)	5,7 (4,9)	6,0 (1,8)	6,4 (0,8)
18:1	a	27,0 (48,5)	26,8 (24,5)	25,9 (7,5)	29,4 (3,2)
	b	26,2 (50,6)	29,5 (57,6)	29,0 (16,0)	30,8 (6,2)
	c	25,0 (33,1)	22,8 (19,5)	27,1 (8,2)	29,4 (3,5)
18:2	a	57,9 (104,0)	58,3 (53,4)	56,1 (16,3)	51,0 (5,6)
	b	60,2 (116,2)	59,0 (115,3)	55,3 (30,5)	52,8 (10,6)
	c	58,1 (76,9)	61,5 (52,5)	57,0 (17,3)	51,4 (6,1)
18:3	a	n,d.	n,d.	n,d.	n,d.
	b	n,d.	t.	n,d.	t.
	c	n,d.	t.	n,d.	t.
I	a	(179,6)	(91,5)	(29,1)	(11,0)
	b	(194,0)	(197,3)	(55,2)	(20,1)
	c	(132,4)	(85,2)	(30,3)	(11,9)

n,d. = no detectado; t.= cantidad traza

Tabla 33. Cambios en el contenido y en los porcentajes relativos de ácidos grasos libres de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en medios con 10 ppm (a), 50 ppm (b) o sin boro (c). Los resultados, en mg de ácidos grasos por g de peso fresco (entre paréntesis) y en porcentajes de ácidos grasos, son la media de 3 experimentos independientes, que no difieren en más del 16 % del valor medio.

Acidos grasos		Germinación (días)			
		1	3	5	7
16:0	a	17,3 (0,7)	13,5 (0,8)	16,5 (0,2)	15,2 (<0,1)
	b	12,8 (0,9)	10,0 (4,4)	12,6 (0,3)	14,5 (0,2)
	c	16,4 (0,5)	11,4 (0,8)	16,5 (0,2)	17,6 (0,1)
18:0	a	6,1 (0,3)	4,3 (0,3)	5,7 (<0,1)	6,3 (<0,1)
	b	2,1 (0,1)	4,9 (2,1)	6,1 (0,1)	7,2 (0,1)
	c	9,0 (0,3)	3,6 (0,2)	5,8 (0,1)	7,0 (0,1)
18:1	a	22,9 (1,0)	18,1 (1,1)	21,8 (0,2)	24,0 (0,2)
	b	23,6 (1,7)	13,0 (5,7)	22,1 (0,5)	23,9 (0,3)
	c	21,9 (0,7)	17,0 (1,1)	20,8 (0,3)	21,8 (0,2)
18:2	a	53,7 (2,3)	64,1 (3,8)	56,0 (0,5)	54,5 (0,3)
	b	61,4 (4,3)	71,7 (31,5)	59,2 (1,2)	61,1 (0,7)
	c	52,7 (1,6)	68,0 (4,5)	56,9 (0,7)	53,1 (0,4)
18:3	a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	c	n.d.	t.	t.	n.d.
I	a	(4,2)	(5,9)	(0,9)	(0,6)
	b	(7,0)	(43,7)	(2,1)	(1,3)
	c	(3,1)	(6,6)	(1,3)	(0,8)

n.d. = no detectado ; t. = detectado en cantidad traza

4.1.c. Efecto de la luz sobre el metabolismo de cotiledones en función del boro

La tabla 34 muestra los resultados del efecto de la luz sobre el contenido en galactolípidos y clorofilas. Se observa un mayor contenido de monogalactosildiglicéridos en cotiledones desarrollados durante 3 y 7 días en oscuridad en medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro. Cuando las plántulas crecidas en oscuridad fueron mantenidas 24 h a la luz en un medio sin boro, dichos galactolípidos aumentan en cotiledones desarrollados en medios con 10 ppm de boro. Por el contrario, en tejidos previamente crecidos en medios sin o con 50 ppm de boro, fue detectada una disminución de estos lípidos. Del mismo modo, la luz induce un aumento en el contenido de clorofila, sobre todo, en cotiledones previamente desarrollados en medios con 10 ppm del micronutriente.

El efecto de la luz sobre la composición en ácidos grasos de monogalactosildiglicéridos de cotiledones, en función del boro del medio, se indica en la tabla 35. En general, tiene lugar un aumento de ácido α -linolénico y una disminución de oléico y linoléico; sin embargo, el porcentaje de ácido α -linolénico aumenta, principalmente, en cotiledones previamente desarrollados en medios con 10 ppm de boro.

4.2. BIOSINTESIS DE LIPIDOS

Al incubar lotes idénticos de cotiledones desarrollados en medios con diferentes concentraciones de boro con una solución de acetato-1- 14 C, los escasos cambios detectados en la radioactividad incorporada a los lípidos del tejido, parecen más bien depender de la capacidad de absorción del precursor por el tejido en los distintos medios diferenciales, que de una estimulación real de la biosíntesis. Esto puede aplicarse tanto a los incrementos de radioactividad observados en medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm, a tiempo 3 días, y después de 7 días, en condiciones de 10 ppm de boro (Tabla 36).

Tabla 34, Efecto de la luz sobre el contenido en monogalactosildiglicéridos y clorofilas de cotiledones. La luz fué aplicada durante 24 horas a las plántulas previamente desarrolladas durante 3 ó 7 días en la oscuridad en un medio con 50, 10 ppm o sin boro, según se indica en Material y Métodos. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos		Monogalactosildiglicéridos (mg x g ⁻¹ peso fresco)		Clorofilas (μ g x g ⁻¹ peso fresco)	
		3 d	7 d	3 d	7 d
50 ppm boro	oscuridad	0,81 \pm 0,09	0,67 \pm 0,08	16,19 \pm 2,01	10,18 \pm 1,33
	luz	0,35 \pm 0,04	0,45 \pm 0,06	42,06 \pm 4,72	34,96 \pm 4,06
10 ppm boro	oscuridad	0,43 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04	17,11 \pm 2,16	14,12 \pm 2,71
	luz	0,62 \pm 0,07	0,45 \pm 0,05	83,14 \pm 6,81	139,22 \pm 11,78
0 ppm boro	oscuridad	0,74 \pm 0,09	0,49 \pm 0,06	11,20 \pm 1,62	9,26 \pm 1,36
	luz	0,57 \pm 0,07	0,32 \pm 0,05	49,10 \pm 6,36	39,92 \pm 4,20

Tabla 35. Efecto de la luz sobre la composición de ácidos grasos de monogalactosildiglicéridos de cotiledones de girasol desarrollados en la oscuridad durante 3 y 7 días en medios diferenciales de boro. La luz fué, posteriormente, aplicada a las plántulas durante 24 horas. Los resultados, en porcentajes del total de ácidos grasos, son la media de dos experimentos independientes (\pm DS).

Acidos Grasos	Tratamientos						
	sin boro		10 ppm		50 ppm		
	oscuridad	luz	oscuridad	luz	oscuridad	luz	
16:0	3 d	15,6 \pm 2,1	12,6 \pm 1,3	12,7 \pm 1,6	9,7 \pm 1,1	11,6 \pm 1,2	12,3 \pm 1,4
	7 d	10,7 \pm 1,2	16,2 \pm 1,7	12,1 \pm 0,8	17,8 \pm 1,6	11,8 \pm 1,0	17,9 \pm 1,7
18:0	3 d	4,9 \pm 0,6	6,5 \pm 0,7	6,5 \pm 0,6	3,9 \pm 0,5	5,8 \pm 0,7	4,4 \pm 0,3
	7 d	4,1 \pm 0,5	4,8 \pm 0,6	7,4 \pm 0,6	5,7 \pm 0,7	4,3 \pm 0,5	5,4 \pm 0,4
18:1	3 d	22,1 \pm 1,9	17,7 \pm 2,2	23,2 \pm 2,4	14,2 \pm 0,9	24,6 \pm 3,0	17,5 \pm 1,9
	7 d	10,7 \pm 1,3	8,6 \pm 0,9	11,5 \pm 1,3	6,5 \pm 0,8	18,0 \pm 2,0	10,4 \pm 0,8
18:2	3 d	43,9 \pm 3,8	33,4 \pm 3,5	42,0 \pm 5,1	28,7 \pm 2,4	45,7 \pm 4,8	35,6 \pm 2,9
	7 d	50,7 \pm 6,1	34,9 \pm 4,2	47,7 \pm 5,2	26,0 \pm 2,5	51,0 \pm 6,1	38,1 \pm 4,0
18:3	3 d	11,5 \pm 1,2	27,8 \pm 3,1	15,6 \pm 1,1	43,5 \pm 4,5	12,5 \pm 1,5	30,0 \pm 3,2
	7 d	23,8 \pm 2,4	35,5 \pm 2,9	21,3 \pm 2,6	44,0 \pm 5,2	14,9 \pm 1,8	28,2 \pm 3,1

4.2.a. Naturaleza de los lípidos sintetizados

Utilizando las técnicas de separación cromatográfica en capa fina y el conteo de la radioactividad por centelleo líquido, se ha podido determinar la categorías lipídicas más activamente sintetizadas en función del boro. En la tabla 37, se observa como la síntesis se centra en lípidos neutros y, sobre todo, en lípidos polares; en efecto, después del marcaje de los cotiledones con acetato-1-¹⁴C, entre el 60 y el 80 % del total de la radioactividad se incorpora a estas últimas categorías lipídicas. Estos resultados muestran que, en cotiledones de girasol en el curso de la postgerminación, la síntesis de lípidos interesa, en gran medida, a los componentes fundamentales de las membranas.

5. EFECTO DEL BORO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS OXIDATIVOS, RESPIRACION Y FORMACION DE ETILENO

Parámetros tales como la respiración, actividad de enzimas oxidativos y producción de etileno, pueden constituir factores importantes en el estudio de la acción del boro en plantas, como mecanismos celulares de respuesta a tratamientos tóxicos y deficientes del elemento.

5.1. BORO Y ACTIVIDAD LIPOXIGENASICA

5.1.a. Estudio *in vivo*

En las tablas 38 y 39 se muestran los valores de la actividad del enzima lipoxigenasa de cotiledones desarrollados en presencia y ausencia de luz y de boro. En todos los tratamientos, las semillas muestran una actividad inferior al inicio de la germinación; dicha actividad aumenta rápidamente con el tiempo de desarrollo, alcanzando niveles máximos hacia el 6º ó 7º día del proceso postgerminativo. A partir del 4º día, sobre todo los tratamientos con 50 ppm de boro, inducen un claro efecto inhibitor (Tabla 38).

En general, la adición de SHAM (1.25 mM) al medio de reacción provocaba una fuerte inhibición de la actividad enzimática, la cual no era

Tabla 36. Incorporación de acetato-1-¹⁴C a lípidos totales de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con distintas concentraciones de boro. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	Radioactividad total en el medio de incubación de los cotiledones (cpm)	Absorción del pre-precursor en 10 cotiledones, en % de la radioac. total	Incorporación a lípidos totales		
			En % del precursor suministrado	En % del precursor absorbido	cpm $\times 10^6 \times g^{-1}$
50 ppm	$2,7 \times 10^6$	$14,40 \pm 1,20$	$11,30 \pm 0,99$	$78,87 \pm 9,00$	7,65
3 d 10 "	"	$12,20 \pm 1,12$	$8,20 \pm 0,80$	$66,95 \pm 7,10$	5,53
0 "	"	$13,67 \pm 1,11$	$9,80 \pm 1,01$	$71,80 \pm 8,21$	6,62
50 ppm	"	$7,89 \pm 0,81$	$3,50 \pm 0,05$	$52,70 \pm 6,12$	1,87
7 d 10 "	"	$9,30 \pm 0,79$	$5,00 \pm 0,04$	$53,70 \pm 7,01$	2,59
0 "	"	$7,20 \pm 0,84$	$4,20 \pm 0,03$	$48,30 \pm 4,92$	1,80

Tabla 37. Incorporación de acetato-1-¹⁴C en lípidos neutros y lípidos polares de cotiledones de plántulas de girasol, desarrolladas durante 3 y 7 días en medios con 50, 10 ppm o sin boro. Los resultados, en porcentaje de radioactividad incorporada, son la media de 2 experimentos independientes. En todos los casos el error experimental fue inferior al 6 %.

Tratamientos		% de radioactividad incorporada	
		Lípidos neutros	Lípidos polares
3 días	50 ppm boro	25,82	74,17
	10 " "	32,52	67,48
	0 " "	18,43	81,57
7 días	50 ppm boro	32,96	67,04
	10 " "	39,46	60,54
	0 " "	39,44	60,56

afectada por el cianuro (0.25 mM). No se han observado cambios importantes entre la actividad lipoxigenásica de extractos de cotiledones crecidos en la oscuridad, y de aquellos otros mantenidos posteriormente a la luz durante 24 horas (Tabla 39).

5.1.b. Estudio *in vitro*

Aislamiento y purificación del enzima

La tabla 40 muestra el proceso de purificación seguido, así como las actividades total y específica del enzima, aislado de cotiledones desarrollados durante 5 días en medios sin boro. El tratamiento con sulfato amónico ha mostrado que la mayor parte de la actividad precipita entre el 25 y el 60 % de saturación. La fracción activa fue posteriormente, refraccionada a través de Sephadex G-50; en este proceso, el total de la actividad se separaba en las primeras fracciones. Las fracciones activas individuales fueron concentradas y pasadas a través de DEAE-celulosa, obteniéndose una fracción activa con un buen grado de purificación. Las proteínas catiónicas y aquellas de débil carácter aniónico, se eluyeron con el tampón de estabilización; posteriormente, mediante la aplicación de un gradiente de ClNa (0-0.4 M), se separaron de la columna varios picos de proteínas, de los cuales, el que contenía mayor cantidad de proteína coincidía con la actividad lipoxigenásica (Fig. 34).

Propiedades del enzima

El efecto del metabisulfito sódico sobre la estabilidad del enzima purificado se indica en la tabla 41. Cuando esta sal se adicionó al medio, la actividad enzimática permanecía prácticamente inalterada; sin embargo, cuando se omitió la sal, la pérdida de actividad en 72 horas representó casi el 80 %. La figura 35 muestra el efecto del pH sobre el enzima. Una disminución de la actividad se observa a pH inferior a 5.5, alcanzándose un máximo entre pH 7.0-8.0. También es importante significar que la disminución de la actividad es más gradual a pH alcalino que a pH ácido.

Tabla 38. Efecto *in vivo* del boro sobre la actividad lipoxigenásica de cotiledones. Los resultados en $\mu\text{moles de O}_2 \text{ consumidos} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ peso fresco, son los valores medios de 2 experimentos independientes (\pm DS).

Germinación (días)	Tratamientos		
	sin boro	10 ppm boro	50 ppm boro
1	82 \pm 7	66 \pm 9	70 \pm 10
2	101 \pm 13	109 \pm 11	98 \pm 12
3	142 \pm 24	156 \pm 30	132 \pm 21
4	196 \pm 20	169 \pm 13	146 \pm 16
5	261 \pm 28	230 \pm 18	181 \pm 26
6	409 \pm 36	314 \pm 41	223 \pm 30
7	398 \pm 64	317 \pm 63	220 \pm 29

Los cotiledones fueron desarrollados en medios de cultivo con 10, 50 ppm o sin boro.

Tabla 39. Efecto de la luz, del ácido salicilhidroxámico y del cianuro sobre la actividad lipoxigenasa de cotiledones. La luz fué aplicada durante 24 horas a plántulas previamente desarrolladas 3 y 7 días a la oscuridad en medios con 50, 10 ppm o sin boro, según se indica en el capítulo de Material y Métodos. Los resultados son la media de dos experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos		Lipoxigenasa ($\mu\text{moles O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ peso fresco)			
		3 d	7 d	3 d + L	7 d + L
Control	50 ppm boro	132 \pm 21	220 \pm 29	124 \pm 13	243 \pm 25
	10 " "	156 \pm 30	317 \pm 63	129 \pm 15	306 \pm 29
	0 " "	142 \pm 24	398 \pm 64	138 \pm 12	371 \pm 36
+ 1,25 mM SHAM	50 ppm boro	53 \pm 9	90 \pm 8	n.d.	n.d.
	10 " "	78 \pm 14	124 \pm 12	n.d.	n.d.
	0 " "	66 \pm 11	179 \pm 20	n.d.	n.d.
+ 0,25 mM CNK	50 ppm boro	126 \pm 24	218 \pm 17	n.d.	n.d.
	10 " "	143 \pm 22	310 \pm 28	n.d.	n.d.
	0 " "	140 \pm 20	390 \pm 26	n.d.	n.d.

n.d. = no determinado

Tabla 40, Purificación de una lipoxigenasa soluble de cotiledones de plántulas de girasol después de 6 días de germinación.

Purificación	Proteínas (mg)	Actividad enzimática ($\mu\text{moles O}_2 \times \text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{moles O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)
Precipitado acetónico	3429	-----	-----
Extracto crudo	679	2200	3,24
Fraccionamiento con sulfato amónico	236	1385	5,87
Filtración por Sephadex	162	1361	8,40
DEAE-celulosa	28	873	31,16

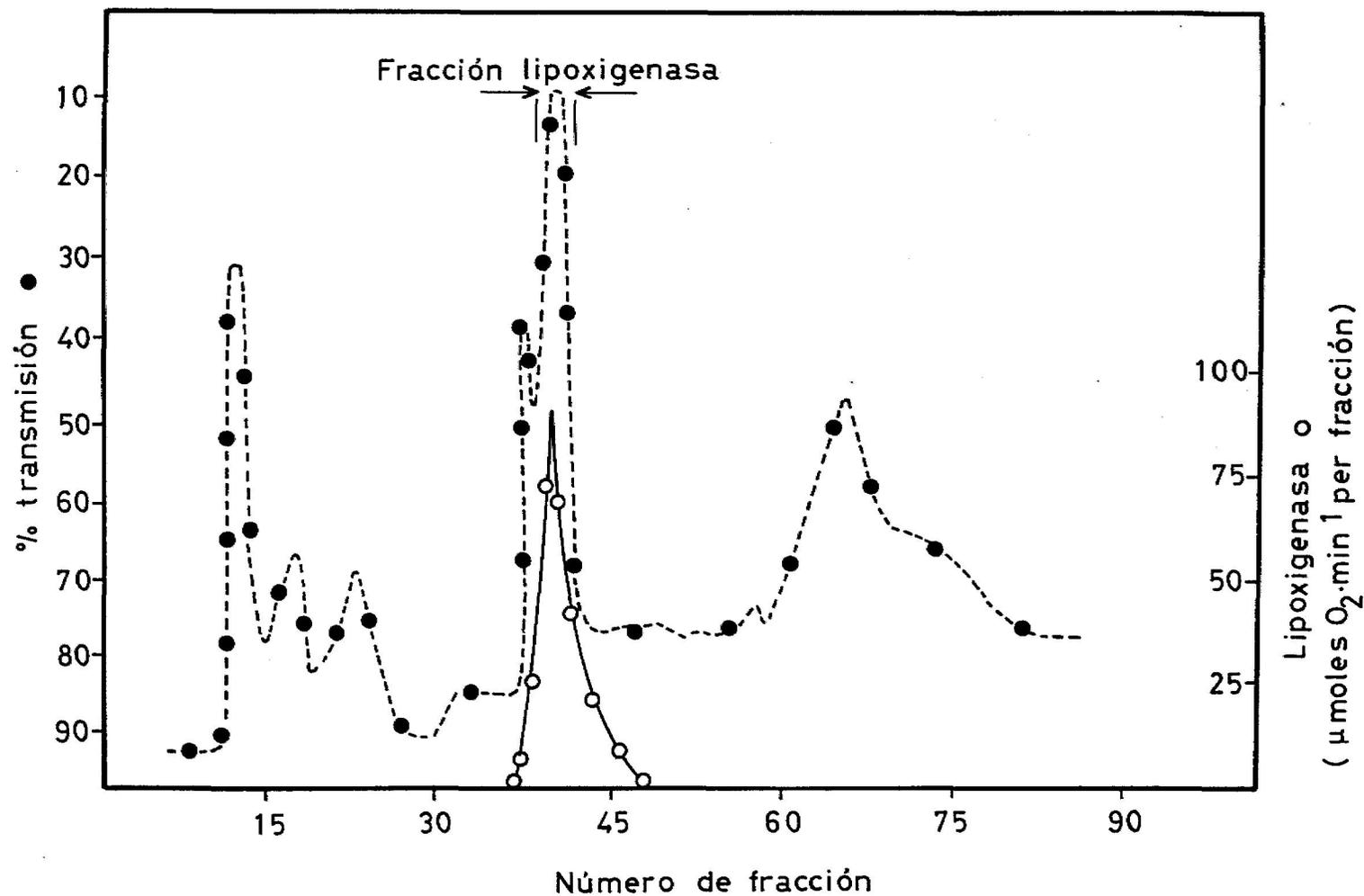


Figura 34. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa de un extracto parcialmente purificado por filtración sobre Sephadex G-50 de lipoxigenasa de cotiledones mantenidos durante 6 días en medios desprovistos de boro. Fracciones de 4 ml fueron recogidas, iniciándose en la fracción número 30 un gradiente lineal de ClNa entre 0 y 0.4 M en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7.0.

Tabla 41. Efecto del metabisulfito sódico sobre la estabilidad de la lipoxigenasa purificada de cotiledones de girasol. Dos lotes iguales de enzima fueron incubados (0,30 mg de proteína) en tampón fosfato 0.05 M, pH 7.0, uno, conteniendo 10^{-4} M de metabisulfito, y el otro que actúa como control. La actividad enzimática, en $\mu\text{moles O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteínas, fué determinada a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 5 % del valor medio.

Tiempo de incubación (h)	Actividad enzimática	
	Con metabisulfito	Sin metabisulfito
0	31,16	31,10
6	30,56	20,50
24	30,50	13,62
48	30,01	9,26
72	29,90	6,66

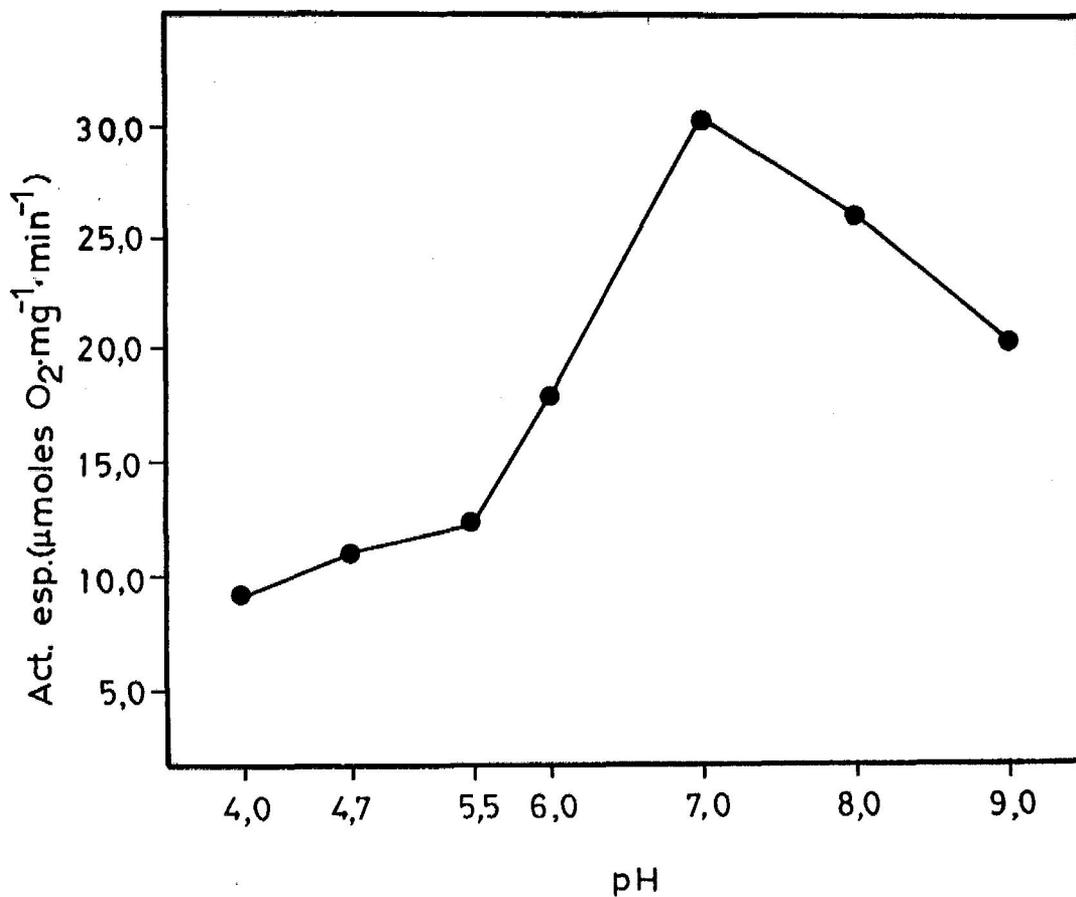


Figura 35. Efecto del pH sobre la actividad del enzima lipoxigenasa purificado de cotiledones de plántulas de girasol al sexto día de germinación en medios sin boro. La concentración en proteínas fue de 0.3 mg en un volumen final de 3.5 ml y 60 min de incubación. Para las incubaciones a pH iguales o inferiores a 6.0, se utilizó tampón acetato; tampón fosfato para pH entre 6 y 8 dietilbarbiturato sódico para pH 8.0 o superiores. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 5 % de la media.

Tabla 42, Efecto *in vitro* del boro sobre la lipoxigenasa purificada de cotiledones de girasol desarrollados en medios sin boro. Los medios de incubación contenían tampón fosfato 0,05 M, pH 7,0, 0,30 mg de proteína enzimática y diferentes cantidades de ácido bórico, en un volumen final de 3,5 ml. La mezcla fué agitada durante 1 h a 25° C y la actividad enzimática determinada. Los resultados son la media de 4 experimentos independientes, que no difieren en más de un 8 % del valor medio.

Medio control
desprovisto de boro

Medios con diferentes concentraciones de boro
(μM)

	1	4	8	40	160
29,68	29,13	21,49	20,77	20,10	20,00

5.1.c. Efecto *in vitro* del boro sobre el enzima purificado de cotiledones

Para estudiar la acción del boro sobre la actividad del enzima purificado, se ha determinado el efecto de diferentes concentraciones de boro en el medio de incubación, sobre el enzima aislado de cotiledones mantenidos en medios sin boro. Como puede observarse en la tabla 42, 1 μM de boro no afecta la actividad enzimática, mientras que a concentraciones superiores (entre 4 y 160 μM) producen una inhibición del orden del 30 %.

5.2. BORO Y ACTIVIDADES PEROXIDASA, MALATO Y CITRATO SINTASAS

Contrariamente a los valores detectados para el enzima lipoxigenasa, la actividad peroxidásica es inferior en extractos de cotiledones desarrollados en medios con altas concentraciones de boro. Sin embargo, como en el caso de la lipoxigenasa, no se observan diferencias importantes entre las actividades de este enzima en cotiledones crecidos en la oscuridad y en aquellos otros mantenidos a la luz durante 24 horas. Una similar actividad malato sintasa se detecta en la fracción de glioxisomas y mitocondrias en cotiledones desarrollados durante 3 y 7 días en presencia o ausencia de boro; sin embargo, en el caso del enzima citrato sintasa, la actividad al 3º día fue superior en dichas fracciones aisladas de tejidos mantenidos en medios sin boro, y al 7º día de tejidos mantenidos en medios con 10 ppm de boro (Tabla 43).

5.3. BORO Y RESPIRACION

Escasa variación en la producción de CO_2 y en el consumo de O_2 fue detectada entre cotiledones después de 3 días de desarrollo en la oscuridad en medios con 50, 10 ppm o sin boro. Por el contrario, después de 7 días se observó un claro aumento en el consumo de O_2 y en la formación de CO_2 , como respuesta a tratamientos con 50 ppm de boro (Tabla 44). En cotiledones desarrollados durante 7 días en medios con 10 ppm de boro y, particularmente, sin boro, la adición de CNK provocaba una inhibición de la respiración, mientras que el SHAM inhibía fuertemente este proceso en tejidos mantenidos principalmente en medios con 50 ppm de boro. Una disminución en la evolución del CO_2 , se inducía en cotiledones cuando las

Tabla 43. Actividad de enzimas oxidativos en extractos de cotiledones (peroxidasa) y en la fracción de mitocondrias y glioxisomas (malato y citrato sintasas), después de desarrollar las plántulas 3 y 7 días en la oscuridad en medios con 50, 10 ppm o sin boro. En el caso de la actividad peroxidásica, la luz fué posteriormente aplicada a las plántulas durante 24 horas. Los resultados son la media de tres experimentos independientes (\pm DS) (peroxidasa, malato y citrato sintasa) o de dos experimentos independientes (\pm DS) (actividad peroxidásica a la luz).

Tratamientos	Peroxidasa (Unidades \times mg ⁻¹ proteína)				Citrato sintasa (Unidades \times mg ⁻¹ prot.)		Malato sintasa (Unidades \times mg ⁻¹ prot.)	
	3 d	7 d	3 d + L	7 d + L	3 d	7 d	3 d	7 d
50 ppm boro	389 \pm 78	707 \pm 156	371 \pm 32	673 \pm 71	9,1 \pm 1,1	5,8 \pm 0,4	70,4 \pm 11,6	39,3 \pm 6,4
10 " "	354 \pm 99	463 \pm 107	293 \pm 30	388 \pm 40	5,1 \pm 0,1	15,6 \pm 0,9	64,2 \pm 10,1	46,6 \pm 6,9
0 " "	279 \pm 64	385 \pm 81	340 \pm 29	392 \pm 36	22,5 \pm 2,2	4,6 \pm 0,5	62,7 \pm 9,4	30,6 \pm 4,9

Tabla 44. Efecto del ácido salicilhidroxámico, del cianuro y de la luz sobre la respiración de cotiledones de plántulas de girasol desarrolladas en la oscuridad durante 3 y 7 días en medios diferenciales de boro. La luz fué posteriormente aplicada a las plántulas durante 24 h horas. Los resultados son la media de tres experimentos independientes (\pm DS) (valores de SHAM, CNK, y de CO₂ y O₂ a la oscuridad) y de dos experimentos independientes (\pm DS) (valores de CO₂ a la luz).

Tratamientos	CO ₂ (μ l x g ⁻¹ peso fresco)				O ₂ (μ l x g ⁻¹ peso fresco)		CR	
	3 d	7 d	3 d + L	7 d + L	3 d	7 d	3 d	7 d
<i>Control</i>								
50 ppm boro	75 \pm 12	152 \pm 24	32 \pm 6	141 \pm 16	131 \pm 21	196 \pm 39	0,57	0,78
10 " "	71 \pm 9	94 \pm 14	36 \pm 5	87 \pm 10	126 \pm 23	119 \pm 18	0,56	0,79
0 " "	69 \pm 11	90 \pm 13	34 \pm 7	82 \pm 8	128 \pm 20	120 \pm 19	0,54	0,75
<i>+ 0,25 mM SHAM</i>								
50 ppm boro	76 \pm 11	96 \pm 17	n.d.	n.d.	122 \pm 26	128 \pm 31	0,62	0,75
10 " "	51 \pm 7	54 \pm 6	n.d.	n.d.	102 \pm 14	79 \pm 16	0,50	0,68
0 " "	54 \pm 8	77 \pm 12	n.d.	n.d.	101 \pm 21	105 \pm 23	0,55	0,73
<i>+ 1,0 mM CNK</i>								
50 ppm boro	70 \pm 12	149 \pm 27	n.d.	n.d.	127 \pm 19	188 \pm 32	0,55	0,79
10 " "	56 \pm 11	84 \pm 13	n.d.	n.d.	106 \pm 14	102 \pm 15	0,53	0,82
0 " "	48 \pm 6	68 \pm 11	n.d.	n.d.	101 \pm 16	74 \pm 14	0,48	0,92
<i>+ 2,5 mM SHAM</i> <i>+ 1,0 mM CNK</i>								
50 ppm boro	55 \pm 5	101 \pm 11	n.d.	n.d.	97 \pm 12	116 \pm 13	0,57	0,87
10 " "	51 \pm 7	52 \pm 9	n.d.	n.d.	104 \pm 10	98 \pm 10	0,49	0,53
0 " "	46 \pm 5	63 \pm 8	n.d.	n.d.	93 \pm 8	81 \pm 7	0,50	0,78

CR= coeficiente respiratorio

n.d.= no determinado

plántulas, previamente desarrolladas durante 3 días en la oscuridad en medios diferenciales de boro, fueron mantenidas 24 horas a la luz en una solución libre de boro. Por el contrario, en cotiledones previamente desarrollados durante 7 días, en oscuridad, la luz no inducía cambios significativos en la producción de CO₂, respecto a los tejidos crecidos en la oscuridad.

La tabla 44, también muestra los valores del cociente respiratorio de los cotiledones, así como los efectos del CNK y del SHAM sobre el mismo. Se observa un aumento de dicho cociente respiratorio al pasar de 3 a 7 días de crecimiento. Altas concentraciones de boro provocan un incremento en la producción de CO₂ y en el consumo de O₂, mientras que los niveles del CR son similares en medios con 10 ppm o sin boro.

5.4. BORO Y ETILENO

5.4.a. Estudio *in vivo* a nivel del tejido entero

La incubación de cotiledones en tampón fosfato 0.05 M, pH 7.0, después de 3 días de crecimiento en medios con 10 ppm, producía una menor cantidad de etileno, respecto a tejidos desarrollados en medios sin boro o con 50 ppm de boro (Tabla 45). Después de 7 días de desarrollo, la formación de etileno era muy superior en cotiledones mantenidos en medios con 50 ppm de boro. La adición de SHAM inhibía significativamente la producción de la hormona en tejidos crecidos durante 3 días en medios con 50 ppm de boro. Sin embargo, SHAM mostraba escaso efecto inhibitor sobre la producción de etileno cuando los cotiledones se desarrollaban previamente en un medio con 10 ppm de boro. Después de 7 días, SHAM provocaba una inhibición y el CNK un incremento de la formación de etileno, sobre todo, en cotiledones crecidos en un medio con 50 ppm de boro.

No se han observado cambios en la producción de etileno cuando los cotiledones, previamente desarrollados durante 3 días en oscuridad en medios diferenciales de boro, fueron mantenidos 24 h a la luz en medios libres de boro. Por el contrario, en cotiledones previamente desarrollados durante 7 días en oscuridad, la luz producía una disminución en la formación de etileno, en relación a los tejidos crecidos en oscuridad.

Tabla 45. Efecto del ácido salicilhidroxámico y del cianuro sobre la formación de etileno en cotiledones desarrollados en oscuridad durante 3 y 7 días en medios diferenciales de boro. La luz fué, posteriormente, aplicada a la plántula durante 24 horas. Los resultados son la media de tres experimentos independientes (\pm DS).

Tratamientos	Etileno ($\mu\text{l} \times \text{g}^{-1}$ peso fresco)			
	3 d	7 d	3 d + L	7 d + L
<i>Control</i>				
50 ppm boro	0,88 \pm 0,14	4,55 \pm 0,68	0,76 \pm 0,08	2,98 \pm 0,40
10 " "	0,56 \pm 0,07	0,85 \pm 0,12	0,60 \pm 0,07	0,45 \pm 0,05
0 " "	0,81 \pm 0,09	0,69 \pm 0,10	0,79 \pm 1,01	0,63 \pm 0,07
<i>+ 2,5 mM SHAM</i>				
50 ppm boro	0,57 \pm 0,07	1,36 \pm 0,20	n.d.	n.d.
10 " "	0,45 \pm 0,08	0,46 \pm 0,06	n.d.	n.d.
0 " "	0,49 \pm 0,10	0,48 \pm 0,09	n.d.	n.d.
<i>+ 1,0 mM CNK</i>				
50 ppm boro	0,91 \pm 0,18	7,34 \pm 1,61	n.d.	n.d.
10 " "	0,50 \pm 0,08	1,50 \pm 0,30	n.d.	n.d.
0 " "	0,69 \pm 0,12	0,65 \pm 0,12	n.d.	n.d.
<i>+ 2,5 mM SHAM</i> <i>+ 1,0 mM CNK</i>				
50 ppm boro	0,43 \pm 0,04	1,21 \pm 0,11	n.d.	n.d.
10 " "	0,58 \pm 0,06	0,70 \pm 0,05	n.d.	n.d.
0 " "	0,59 \pm 0,07	0,51 \pm 0,05	n.d.	n.d.

n.d. = no determinado

5.4.b. Estudio *in vitro* a nivel de microsomas.

En este apartado se describen los resultados sobre la conversión de ACC en etileno por microsomas aislados de cotiledones desarrollados a la oscuridad en medios con diferentes contenidos de boro. Dicha fracción microsomal convierte ACC en etileno a una elevada velocidad y el sistema no mostraba una saturación con el ACC a concentraciones 8.0 mM (Fig. 36). Estos resultados también demuestran que la adición de ACC al medio de incubación, estimula en menor grado la producción de etileno en microsomas preparados a partir de cotiledones desarrollados en medios con 10 ppm o sin boro que en 50 ppm de boro. En la tabla 46, se puede comprobar como la formación de etileno por los microsomas aislados se afecta por la temperatura. Así, tratamientos a 60° C durante 30 min, inhiben en un 90 % el enzima sintetizante de etileno. En esta misma tabla también se indica la inhibición del enzima por el ATP, así como por la inclusión en el medio de reacción de SHAM, BHT y SOD, sobre todo, cuando los cotiledones fueron mantenidos en medios con 50 ppm de boro.

La influencia del pH y de la fuerza iónica del medio de incubación de los microsomas sobre la conversión de ACC en etileno, es mostrada en la tabla 47. En general, el pH óptimo para la actividad del enzima sintetizante de etileno fue de 8.5. Una diferente capacidad de biosíntesis se obtiene también en función de la fuerza iónica; así, a pH 8.5, una máxima actividad se obtiene a una concentración de 50 mM en tampón fosfato.

Un fuerte incremento en la formación de etileno tiene lugar al incubar los microsomas brutos con ácido α -linolénico (Tabla 48). Al hilo de estos resultados, en la tabla 48 y figura 37 se muestran los datos relativos a las actividades de los enzimas formador de etileno y lipoxigenasa de microsomas brutos, previa solubilización con Brij W-1 y fraccionamiento por Sephadex G-50. La pérdida de la integridad de la membrana, como consecuencia de la solubilización por Brij W-1, no tiene efectos importantes sobre la formación de etileno. Después de la filtración por Sephadex, la actividad lipoxigenasa corresponde a las proteínas del primer pico, de peso molecular más elevado, mientras que la proteína del segundo pico, de menor peso molecular, incluye el enzima sintetizante de etileno (Fig. 37). También se puede observar que para la formación de etileno, la fracción

correspondiente al primer pico requiere la adición de ácido α -linolénico, no así la fracción correspondiente al segundo pico, lo cual indica una separación de ambas actividades enzimáticas al paso por Sephadex de los microsomas brutos solubilizados.

Tabla 46. Formación de etileno en microsomas brutos aislados de cotiledones desarrollados durante 6 días a la oscuridad en medios diferenciales de boro. El medio *standard* de reacción con los reactivos y condiciones de incubación indicados en Material y Métodos, contiene 2 mM de ACC, y la concentración en proteínas se ajustó a 2,0 mg x ml⁻¹. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 8 % del valor medio.

Tratamientos	Etileno (nl x h ⁻¹ x mg ⁻¹ proteínas)			Inhibición (%)		
	sin boro	10 ppm	50 ppm	sin boro	10 ppm	50 ppm
Medio Standar	9,3	7,8	16,3	---	---	---
- ACC	0,9	0,9	1,1	90,2	89,0	93,4
+ 2 mM ATP	2,2	3,4	6,2	65,0	69,3	61,0
+ 1,3 mM SHAM	2,5	1,7	0,4	72,7	78,7	93,6
+ 0,02 % BHT	1,6	1,6	1,4	82,5	79,0	91,4
+ 50 U.I. SOD	2,2	3,6	2,5	76,1	54,5	84,9
+ 60° C / 30 min	0,7	0,8	0,3	92,4	89,9	97,7

Tabla 47. Efecto del pH y fuerza iónica sobre la conversión de ACC a etileno en microsomas brutos preparados de cotiledones de girasol desarrollados en medios con 10 ppm, 50 ppm o sin boro. La mezcla de incubación contiene ACC, 2,0 mM y Cl_2Mn , 0,5 mM, en Hepes 50 mM a diferentes valores de pH (para estudiar el efecto del pH), y tampón Hepes, pH 8,5, a diferentes valores de fuerza iónica (para el estudio del efecto de la fuerza iónica). La concentración de proteínas es ajustada a $2,0 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más del 10 % del valor medio.

Tratamientos	Etileno ($\text{nl} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína)		
	sin boro	10 ppm	50 ppm
<i>Fuerza iónica (mM)</i>			
10	5,19	3,89	7,45
50 (reacción <i>standard</i>)	9,30	7,81	16,31
100	7,60	9,90	14,38
200	7,23	3,18	12,21
<i>Valores de pH</i>			
6,5	1,02	0,82	3,01
7,5	3,24	2,07	1,93
8,5 (reacción <i>standard</i>)	9,30	7,81	16,31

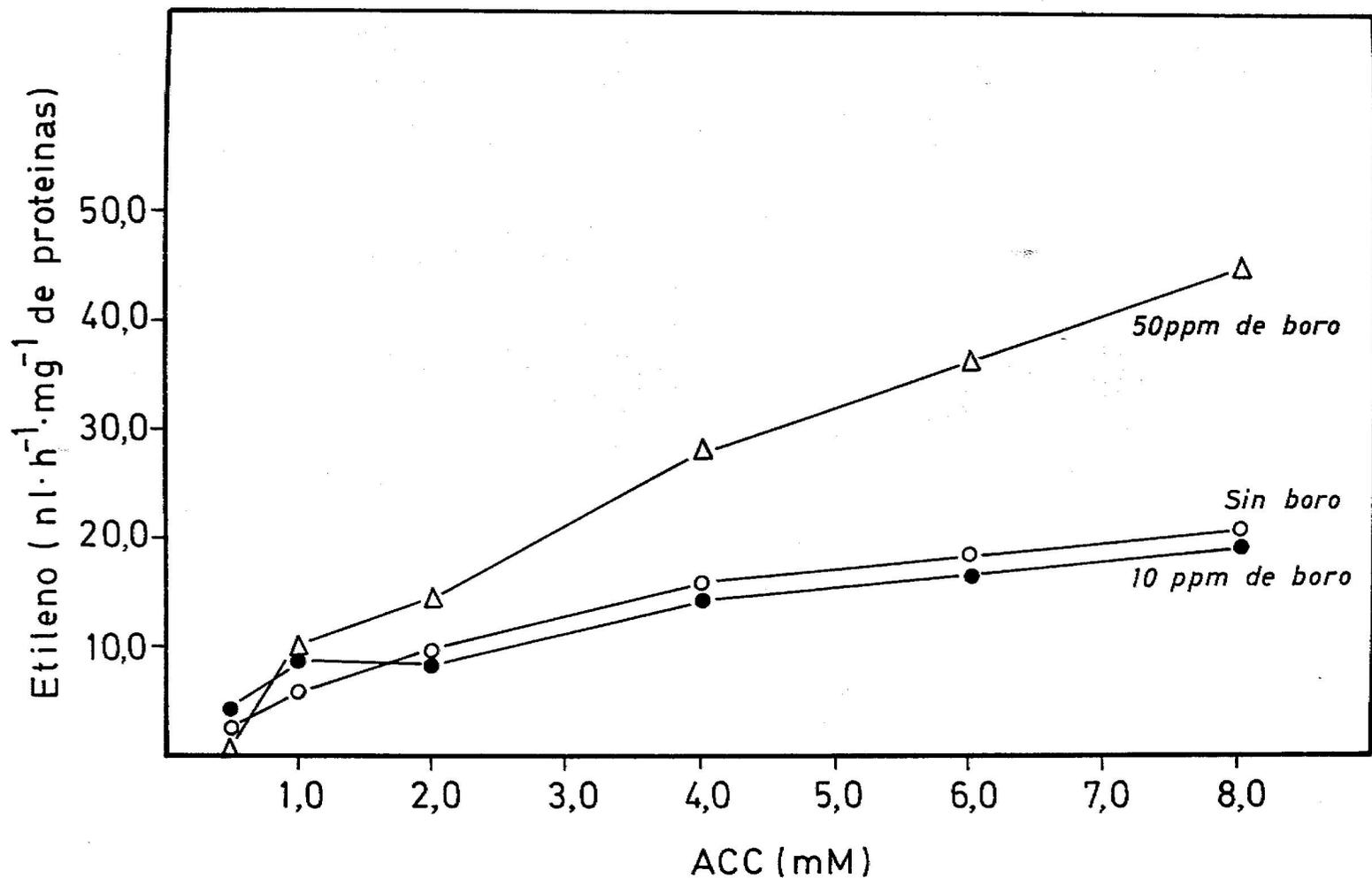


Figura 36. Efecto de la concentración de ACC sobre la producción de etileno por microsomas brutos aislados de cotiledones desarrollados durante 6 días en medios diferenciales de boro. La concentración de proteínas ajustada en 2 mg/ml. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 12 % del valor medio.

Tabla 48. Actividades de los enzimas formador de etileno y lipoxigenasa en microsomas brutos y solubilizados en presencia de Brij W-1, así como después de separar dichos enzimas por Sephadex G-50. Los cotiledones fueron previamente mantenidos durante 6 días en medios diferenciales de boro. Para las fracciones solubilizadas fraccionadas por Sephadex, la concentración en proteínas se ajustó entre 0,2 y 0,4 mg x ml⁻¹. Los resultados son la media de dos experimentos independientes, que no difieren en más de un 6 % (etileno) o en más de un 10 % (lipoxigenasa) del valor medio.

Tratamientos	Etileno (nl x h ⁻¹ x mg ⁻¹ prot.)						Lipoxigenasa (µmoles O ₂ x min ⁻¹ x mg ⁻¹ prot.)		
	sin boro		10 ppm		50 ppm		sin boro	10 ppm	50 ppm
	+18;3	-18;3	+18;3	-18;3	+18;3	-18;3			
Microsomas brutos	168,2	9,3	153,6	7,8	189,0	16,3	0,51	0,48	0,41
Membranas solubilizadas	141,4	8,9	136,8	6,1	152,8	13,6	0,82	0,96	0,84
Fractionamiento por Sephadex G-50:									
Fracción A	121,2	2,7	114,3	2,9	109,9	3,1	2,14	2,67	2,07
Fracción B	12,2	11,8	16,0	15,7	15,9	14,6	n.d.	n.d.	n.d.
Fracción A + B	151,0	11,0	140,1	13,5	143,7	13,3	1,02	0,96	0,71

n.d. = no detectado

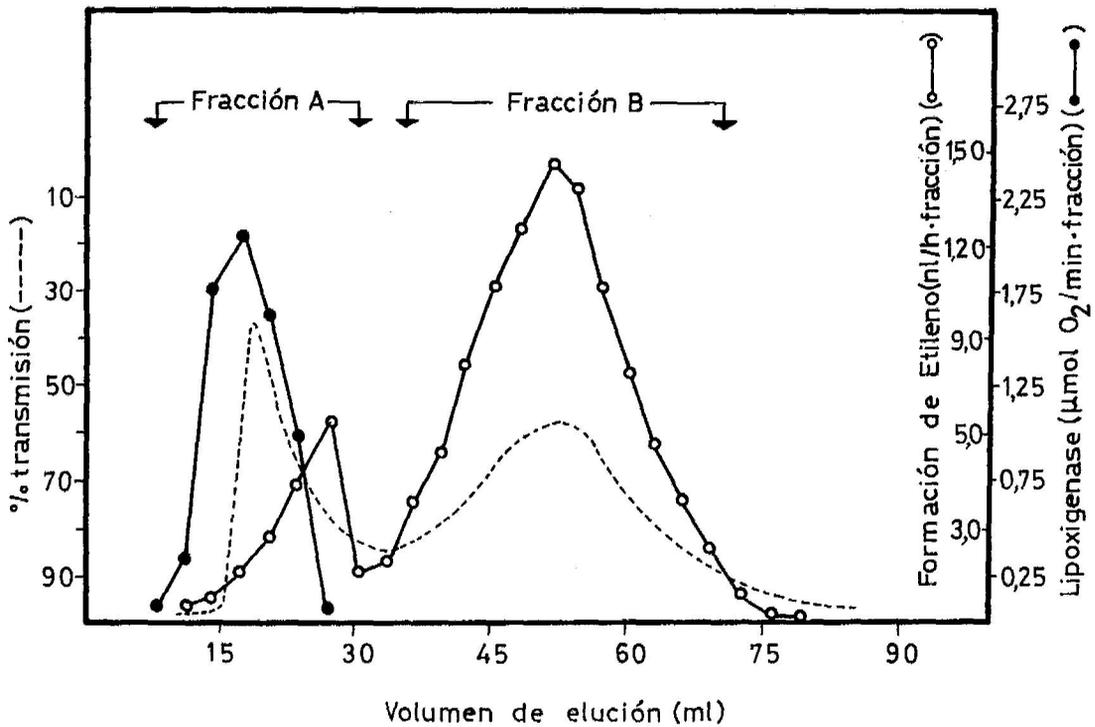


Figura 37. Fraccionamiento por Sephadex G-50 de microsomas brutos solubilizados en presencia de 0.1 % de Brij W-1. Los cotiledones se mantuvieron previamente durante 6 días en medios con 10 ppm de boro. Un modelo similar de separación se obtuvo a partir de microsomas aislados de cotiledones mantenidos en medios sin boro o con 50 ppm de boro (resultados no mostrados).

VI. DISCUSSION

El capítulo correspondiente a la discusión de los resultados se ha dividido en tres apartados: en el primero y en el segundo se estudian, respectivamente, las respuestas metabólicas y morfológicas obtenidas en raíces y cotiledones, en función del boro del medio; en un tercer apartado, se relacionan dichos resultados con la senescencia de los tejidos.

La incorporación de la nueva metodología fisiológica, así como de los conceptos bioquímicos al campo de la nutrición, ha permitido estudiar con una mayor profundidad las funciones atribuidas al boro en plantas. Aunque se han descrito múltiples formas de actuación ^{del boro} en el metabolismo vegetal, los principales procesos en los que se ha determinado una intervención del elemento han sido principalmente: como regulador del metabolismo de ácidos nucleicos (DAVE y KANNAN, 1980), de carbohidratos (DUGGER, 1973), de componentes hormonales (JARVIS y col. 1983) y de sustancias fenólicas (LEE y ARONOFF, 1967).

~~La recopilación de~~ ^{número} ~~un~~ ~~Yabanico~~ tan amplio de formas de actuación, sugirió a PARR y LOUGHMAN (1983) que éstas son consecuencia más bien de efectos secundarios que la demostración de una acción directa y primaria, ~~concluyendo~~ ~~estos~~ ~~autores~~ que, aceptando la necesidad de un requerimiento de boro, ~~sus~~ ~~mecanismos~~ de acción estaban aún lejos de ser establecidos. Estos ~~autores~~ ~~autores~~, basándose en trabajos de TANADA (1978, 1982), ROBERTSON y LOUGHMAN (1974), POLLARD y col. (1977), HIRSCH y TORREY (1980) y SMYTH y DUGGER (1980, 1981), propusieron una actuación a nivel de las membranas que pudiera explicar todos los tipos de respuestas metabólicas indicadas, al regular la absorción y el transporte de los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo vegetal.

Este comportamiento de las plantas frente al boro ha sido un factor determinante en ^{una serie de} ~~nuestros~~ ~~trabajos~~ ^{llevarlos a cabo en nuestra laboratorios, habiéndose} ~~de aquí que se haya profundizado en la~~ ^{algunos} ~~investigación de su acción primaria. En este sentido, se han estudiado una~~ ^{cambios} ~~serie de procesos~~ ^{de plántula, de la raíz} ~~metabólicos y cambios~~ morfológicos que se establecen en raíces y cotiledones ^{utilizando se de} en los primeros días de germinación, en función de la concentración en boro del medio.

~~Desde el punto de vista anatómico y ultraestructural, han sido descritas numerosas alteraciones en tejidos de diversos orígenes vegetales desarrollados en condiciones deficientes y tóxicas de boro. Sin embargo, hay pocos datos en relación a los cambios inducidos bajo condiciones tóxicas de este micronutriente. HUDAK (1974, 1976a, 1977a, 1977b), HUDAK y HERTICH (1976) y este respecto, estos autores describen efectos similares para los tejidos crecidos tanto en deficiencia como en toxicidad de boro. A juzgar por la gran variabilidad de resultados obtenidos, éstos parecen depender de las condiciones de experimentación, del origen vegetal y del tejido estudiado.~~

Así, ~~En nuestro estudio~~, el examen morfológico de la zona apical de las raíces ^{de girasol} pone de manifiesto una inhibición del crecimiento cuando se cultivan en medios con 50 ppm de boro, respecto a tejidos desarrollados en 10 ppm. En este sentido, los trabajos ~~previamente~~ ^{este} realizados en girasol y en otros orígenes, muestran (como síntoma más característico, asociado tanto a la deficiencia como a la toxicidad) una disminución del crecimiento radicular, justificable por una inhibición ^{de boro} de la elongación celular (KOUCHI y KUMAZAWA, 1975a; BOHNSACK y ALBERT, 1977; HIRSCH y TORREY, 1980), ~~bien por el cese de la división celular~~ (WHITTINGTON, 1959; COHEN y ALBERT, 1974), o como ~~una consecuencia de ambas~~ (KOUCHI y KUMAZAWA, 1975b). La escasa diferencia existente en el crecimiento y la aparente similitud ultraestructural de las raíces desarrolladas en medios sin boro, respecto a las cultivadas en 10 ppm de boro, hacen pensar que nuestras condiciones de experimentación inducen estados mínimos de deficiencia. El haber efectuado la mayor parte de los experimentos en ausencia de luz, importante factor que hace incrementar los requerimientos de boro (TANAKA, 1966), y el conocimiento de que la concentración de este elemento en la semilla de partida era ya de 15 a 20 ppm, quizás suficiente para los requerimientos del tejido durante los primeros días del desarrollo de la plántula, pueden explicar estos hechos.

Por otra parte, la inhibición observada en la elongación radicular, tanto en condiciones de toxicidad como de boro-deficiencia, tiene una estrecha relación con el engrosamiento de las paredes celulares. Así, KOUCHI y KUMAZAWA (1975b), trabajando con ápices de raíces de girasol, consideraron la posibilidad de que tal inhibición por acción del boro podría estar relacionada con algún cambio en el metabolismo de la pared celular.

En general, los estudios morfológicos efectuados en raíces de plantas boro-deficientes han revelado, entre otros, los siguientes síntomas: aparición de primordios laterales y células prematuramente diferenciadas cercanas al ápice (KOUCHI y KUMAZAWA, 1975b); existencia de una intensa vacuolización con acúmulos electrodensos amorfos y fibrilares de carácter proteináceo y lipídico (HIRSCH y TORREY, 1980; KOUCHI y KUMAZAWA, 1976); gran profusión de estructuras de tipo membranoso, tales como figuras de mielina, incluidas en pequeñas vesículas y en grandes vacuolas (LEE y ARONOFF, 1966).

Los resultados morfológicos obtenidos en raíces de plántulas de girasol mantenidas en medios con elevadas concentraciones de boro (50 ppm), muestran importantes cambios estructurales que son similares, por otra parte, a los previamente descritos por diferentes autores en éste y en otros orígenes vegetales. Ello parece configurar, en función del crecimiento en medios tóxicos de boro un panorama celular asociado a tejidos envejecidos o senescentes, aspecto éste que es considerado más adelante en el apartado dedicado al boro y metabolismo cotiledonar.

En cuanto a los resultados derivados del efecto del elemento sobre la composición, contenido y biosíntesis lipídica, tanto a nivel de la raíz entera como a nivel de sus microsomas aislados, la constatación de los datos de la literatura en relación a la composición lipídica de las raíces, demuestra que éstos son relativamente poco abundantes, en comparación con aquellos otros disponibles para órganos fotosintéticos. La mayor parte de los estudios se refieren a especies de interés agrícola: avena (KUIPER y col. 1974), maíz (MITCHELL y col. 1974), vid (KUIPER, 1968), zanahoria (HEINZ-DETLEF, 1977), haba y altramuza (OURSSEL y col. 1973; ROSSIGNOL, 1976). De la comparación de nuestros datos con estos otros, emergen algunos aspectos, los cuales pueden ser considerados, en general, como característicos de la composición lipídica de las raíces de diversas especies cultivadas. Así, en raíces de plántulas de girasol, los componentes lipídicos más abundantes son los lípidos neutros y, sobre todo, los fosfolípidos, estando estos últimos constituidos mayoritariamente por fosfolípidos neutros y, en muy escasa proporción, por fosfolípidos ácidos. Por otra parte, los ácidos grasos mayoritarios son los ácidos grasos de larga cadena (palmítico, oléico, linoléico y linolénico). El ácido linolénico,

característico de los órganos fotosintéticos (HARWOOD, 1980), y uno de los ácidos grasos mayoritarios en raíces de numerosas especies de leguminosas y, en menor medida, de gramíneas y rosáceas, muestra una concentración muy baja en la raíz de girasol.

Respecto a la relación existente entre la composición lipídica de la raíz y el contenido en boro del medio de cultivo, los mismos constituyentes lipídicos se detectan en el tejido en condiciones de 0, 10 ó 50 ppm de boro, al tercer día de desarrollo: fosfolípidos y lípidos neutros, como categorías lipídicas más importantes, y proporciones similares de los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Por el contrario, después de 7 días, estos fosfolípidos son menos importantes, al tiempo que aumentan los lípidos neutros, principalmente los triacilgliceroles, sobre todo en raíces mantenidas en medios con 50 ppm de boro. El hecho de que las condiciones diferenciales de boro induzcan una diferencia significativa en el peso fresco de las raíces a tiempos de desarrollo de 7 días, hace difícil la interpretación de estos resultados, en cuanto a una acción directa del boro sobre los componentes lipídicos. Sin embargo, a tiempo 3 días, tiempo en el que los crecimientos de las raíces son similares, es ya observable un claro aumento de la razón fosfolípidos/lípidos neutros en tejidos mantenidos en 10 ppm, respecto a 50 ppm de boro, y ello debido tanto a un incremento de fosfolípidos como a una disminución de lípidos neutros. En cualquier caso, la composición en fosfolípidos y en lípidos neutros de las raíces de plántulas de girasol, se aproximan a los determinados por HEINZ-DETLEF (1977), en raíces de zanahorias, y por OURSEL y col. (1973) y ROSSIGNOL (1976), en raíces de haba y altramuza.

La concentración de boro no parece inducir cambios significativamente importantes en los porcentajes relativos de ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes moléculas lipídicas a nivel de la raíz entera, detectándose únicamente un leve aumento de ácido linoléico (ácido graso mayoritario), sobre todo a nivel de los triacilgliceroles de tejidos desarrollados en 50 ppm de boro. En cualquier caso, el análisis comparativo de estos resultados, no proporcionan suficiente información capaz de explicar, categóricamente, un comportamiento muy distinto en función de la concentración de boro.

Los cambios bioquímicos y estructurales inducidos por el boro a nivel de la raíz entera, aconsejaron un estudio ulterior sobre las posibles modificaciones provocadas por el micronutriente a nivel de los lípidos de microsomas, membranas bien representativas de las células radiculares, y donde se ubican la mayor parte de los enzimas implicados en la biosíntesis lipídica (MOORE, 1984). Se entiende como tal, la fracción subcelular que sedimenta después de centrifugar a 105.000 x g durante una hora, un homogenado del tejido del que previamente han sido separados los núcleos, plastidios, microcuerpos y mitocondrias, comprendiendo dicha fracción de microsomas una serie de vesículas que resultan principalmente de la fragmentación del retículo endoplasmático (DONAIRE y OURSEL, 1975). A pesar de no haberse observado modificaciones importantes, al comparar los sedimentos microsomales obtenidos a partir de raíces desarrolladas en medios diferenciales de boro, sin embargo, sí es posible indicar que dichos sedimentos, constituidos por vesículas de tamaños muy diversos, están exentos de contaminación, lo que sugiere un grado de pureza satisfactorio. Por otra parte, la medida de la actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a la antimicina A, asociada a los microsomas (HACKETT y col. 1960), proporciona valores comprendidos entre los obtenidos por DAZA y col. (1980) y por MARTIN y MORTON (1956) en microsomas de hoja de olivo y de raíces de trigo, respectivamente. Estos datos apoyan la existencia de una buena actividad fisiológica en las membranas purificadas a partir de raíces de plántulas de girasol.

Los resultados derivados del análisis lipídico de microsomas de raíces mantenidas durante 3 días en medios con 0, 10 ó 50 ppm de boro, reflejan, en buena medida, la composición del tejido de partida. El mayor contenido de lípidos neutros y, sobre todo, de fosfolípidos en membranas microsomales aisladas de raíces desarrolladas en 10 ppm de boro, sugiere una formación más activa de estas estructuras subcelulares en estas condiciones de boro. En cuanto a la composición en ácidos grasos, los lípidos de microsomas son también fiel reflejo del tejido de procedencia, destacando, fundamentalmente, los altos porcentajes de ácido palmítico, oléico y, sobre todo, linoléico, a nivel de todos sus lípidos. Las diferencias observadas, en función del boro, en cuanto al porcentaje de ácido linoléico en los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros, apuntan hacia un efecto del elemento sobre el grado de

insaturación de dichos lípidos. A este respecto, MAZLIAK (1968) y GRENIER y col. (1973) pusieron en evidencia importantes cambios en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en plantas con marcada sensibilidad al frío. Otros estudios han indicado una estrecha relación entre la composición lipídica de distintas plantas cultivadas y las concentraciones iónicas del medio de cultivo. Por ejemplo, cambios en la composición lipídica de raíces de trigo y avena en presencia de concentraciones variables de Ca^{2+} y Mg^{2+} (KUIPER, 1974), y un aumento de la insaturación acílica de los lípidos de raíces crecidas en condiciones de alta salinidad (KUIPER y KUIPER, 1978). Para estos autores, la naturaleza de los lípidos de las membranas influye sobre el grado de permeabilidad iónica, propiedad que aparece disminuida cuando existe una mayor concentración de lípidos neutros y esteroides. En esta misma dirección, trabajos sobre las propiedades biológicas de los fosfolípidos han demostrado que la composición acílica puede controlar la fluidez y la actividad de las membranas biológicas (QUINN y WILLIAMS, 1978).

De los resultados obtenidos en relación a los efectos del boro sobre la composición y contenido lipídico de microsomas y de raíces enteras de plántulas de girasol, surgió el planteamiento de una actuación del elemento como regulador, directa o indirectamente, de la actividad de enzimas implicados en la biosíntesis de lípidos. En este sentido, los datos de la incorporación *in vivo* de acetato- ^{14}C a los lípidos de la raíz, demuestran como los ácidos grasos libres, triglicéridos, fosfatidiletanolamina y, sobre todo, fosfatidilcolina, son los lípidos acílicos mayoritariamente sintetizados, mientras que, como era de esperar, se produce un escaso marcaje de glucolípidos. La comprobación de que medios sin boro y, sobre todo, con una concentración elevada de boro (50 ppm), desvían la biosíntesis de los fosfolípidos en beneficio de los lípidos neutros, se puede interpretar como el resultado de una actuación del elemento a nivel del metabolismo de estas moléculas. Ello permite sugerir que estados de deficiencia o de toxicidad en boro pueden producir cambios en la permeabilidad de las membranas celulares. A este respecto, estudios ultraestructurales habían ya demostrado que una nutrición anormal de boro conducía rápidamente a una pérdida de la integridad de las membranas (HIRSCH y TORREY, 1980), y que estados de deficiencia provocaban, en

meristemas de plantas de tomate, una disminución del contenido en fosfolípidos (SKOL'NIK y KOPMAN, 1970).

A fin de verificar directamente la hipótesis de una perturbación de la biosíntesis de fosfolípidos por el boro, se hizo necesario realizar experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, a nivel de fracciones celulares de raíces desarrolladas en medios diferenciales del elemento. A pesar de que los resultados previamente indicados, mostraban la posibilidad de que más de un sistema enzimático del metabolismo lipídico pudiera resultar afectado por el boro, en nuestro estudio se optó por investigar la actividad y algunas propiedades del enzima CDP-colina: 1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa, implicado en la síntesis de fosfatidilcolina, principal fosfolípido de los microsomas y de raíces enteras de girasol, el cual se asocia, en plantas y en animales, principalmente con el retículo endoplasmático (MOORE, 1982). Además, teniendo en cuenta que desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, los medios sin boro no inducían cambios importantes en la composición lipídica de los microsomas, en este estudio posterior, sólo pareció interesante considerar las propiedades de la fosfotransferasa de microsomas de raíces de plántulas de girasol desarrolladas en condiciones de 10 y 50 ppm de boro.

A pesar de que los resultados derivados de la adición de dosis crecientes de boro a los medios de incubación de microsomas aislados de raíces desarrolladas en medios sin boro, apuntaban hacia una inhibición directa de la capacidad de transferencia enzimática de la colina (desde el sustrato CDP-colina) a fosfatidilcolina, sin embargo, de los datos obtenidos en función del efecto *in vivo* del boro sobre el enzima, se constata que la afinidad del enzima por el sustrato no cambia sustancialmente en función de que las membranas provengan de raíces cultivadas en cualquiera de las condiciones de boro estudiadas. Los valores obtenidos de Km son del mismo orden a los determinados por diferentes autores para el mismo enzima de microsomas y mitocondrias de distintos orígenes vegetales (DEVOR y MUDD, 1971a; DONAIRE y OURSEL, 1975; SPARACE y MOORE, 1981). Por otra parte, en cuanto a la inhibición del enzima, únicamente ha sido detectada una inhibición por grupos sulfhidrilos en el enzima de hojas de espinaca

(DEVOR y MUDD, 1971b) y por el Ca^{2+} en el de microsomas de raíces de haba (DONAIRE y OURSEL, 1975).

Los valores de Km para el enzima de microsomas aislados de raíces de girasol crecidas en medios con 10 y 50 ppm de boro, al tiempo que la constatación de una inferior velocidad de reacción, cuando se mantenían las membranas en medios con 50 ppm de boro, impiden poder establecer la hipótesis de un efecto inhibitorio directo del micronutriente sobre el enzima, apuntando, por el contrario, la posibilidad de una inhibición de tipo no competitivo, sin influencia, por tanto, en la unión del sustrato al centro activo.

En cualquier caso, el conjunto de resultados obtenidos en este apartado contribuye a explicar los cambios en la composición lipídica de las raíces y microsomas de plántulas de girasol, en función de la concentración de boro en el medio. De esta forma, el control por el boro de la composición y contenido de lípidos neutros y fosfolípidos puede facilitar a la planta una mejor adaptación, que le permita poder llevar a cabo los complejos procesos metabólicos ligados a las membranas, los cuales están íntimamente relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular.

La observación al microscopio electrónico del tejido cotiledonar durante el proceso postgerminativo, muestra un panorama celular típico de la evolución de la estructura celular de cualquier semilla oleaginosa. De forma similar a como describen TCHANG y col. (1980) y MAZLIAK y TCHANG, (1983) en el mismo tejido, las células, fuertemente cargadas de lípidos en los primeros estadios del proceso, pasan en estadios posteriores, una vez movilizadas la mayoría de las reservas, a configurar una visión típica de células maduras: una gran vacuola central, y un citoplasma y su desarrollado aparato organular relegados a la periferia.

Concentraciones de 10 ppm en el medio de cultivo provocan una mayor velocidad de degradación y reorganización celular, manifestada por una disminución del número de cuerpos grasos y por un aparente mayor desarrollo organular. Por el contrario, 50 ppm de boro parece ralentizar el proceso de movilización y reorganización celular, observación coincidente con los datos encontrados por JIMENEZ y col. (1978), en semillas de girasol

pretratadas con altas concentraciones de boro, donde se observa una inhibición de la degradación de las reservas lipídicas y una disminución del porcentaje de germinación.

Los estudios ultraestructurales llevados a cabo en cotiledones desarrollados en oscuridad en medios sin boro o con 10 ppm de boro y, posteriormente, mantenidos 24 horas a la luz, muestran una transición de células etioladas a verdes, definida fundamentalmente por la evolución del etioplasto a cloroplasto, con un sistema tilacoidal bien desarrollado y con presencia de plastoglóbulos. Sin embargo, en los tejidos desarrollados en 50 ppm se observa un sistema de membranas plastidiales poco diferenciado, destacando, principalmente al séptimo día, la presencia de pequeñas vesículas en la periferia (retículo periplastidial), y por todo el orgánulo. A este respecto, no hemos encontrado en la literatura información concerniente al efecto del boro sobre la estructura plastidial durante el enverdecimiento de cotiledones etiolados. No obstante, estudios realizados en hojas de plantas de girasol, mostraron una degeneración del sistema lamelar y lugares cloróticos en la matriz cloroplastidial, en condiciones de deficiencia de boro, mientras que dosis tóxicas inducían deformaciones en dicho sistema, con fragmentación y vacuolización de sus membranas, así como la destrucción de la matriz tilacoidal y deformaciones de los grana (HUDAK, 1976; HUDAK y HERICH, 1976).

La acción del boro sobre la degradación lipídica a nivel de cotiledones de plántulas de girasol, se ha estudiado desde dos perspectivas diferentes: por una parte, determinando el efecto *in vivo* del micronutriente sobre los constituyentes lipídicos y sobre la actividad de enzimas relacionados con dicho proceso, como la lipoxigenasa, y, por otra, analizando la acción *in vitro* del boro sobre el enzima parcialmente purificado, para impedir la acción inhibidora que en la célula ejercen sobre el enzima, moléculas como los ácidos acetilénicos (DOWNING y col. 1972), ácidos grasos α -bromados (ESKIN y col. 1977) y alcoholes ácidos (MITSUDA y col. 1967).

La elevada poliinsaturación de los fosfolípidos concuerda con los resultados previamente obtenidos en el mismo tejido y origen vegetal por TCHANG y col. (1980). Aunque una concentración elevada de boro en el medio, no induce

cambios importantes en los porcentajes de ácidos grasos, sin embargo, el aumento provocado en el contenido de ácidos grasos libres y en fosfolípidos, al tiempo que la ralentización en la degradación de triglicéridos y la inhibición de la actividad lipoxigenasa, sugieren la posibilidad de que condiciones de deficiencia y, sobre todo, de toxicidad en este elemento, puedan regular, directa o indirectamente, la actividad de enzimas implicados en el metabolismo degradativo de estas moléculas. En este sentido, el proceso de β -oxidación de ácidos grasos había sido ya ampliamente investigado en semillas oleaginosas como principal vía a través de la cual los lípidos de reserva son transformados en sacarosa, así como los mecanismos por los cuales se rige la hidrólisis de triglicéridos (MUTO y BEEVERS, 1974; GALLIARD, 1980). Del mismo modo, también se había reconocido la existencia de procesos capaces de provocar la degradación de ácidos grasos a través de reacciones alternativas de hidroperoxidación, en los cuales intervienen diferentes tipos de lipoxigenasas. Aunque estos enzimas han sido estudiados en un gran número de plantas en cuanto a su aislamiento, caracterización y mecanismo de acción (GALLIARD y CHAN, 1980), se desconocía la existencia de estudios sobre este enzima en semillas de girasol.

Los resultados obtenidos por gran número de investigadores indican la gran sensibilidad del girasol a condiciones deficientes y tóxicas de boro. Derivado del presente trabajo, se demuestra el efecto inhibitorio de este elemento sobre los componentes lipídicos de raíces y cotiledones de esta planta. A este respecto, PARR y LOUGHMAN (1983) sugirieron la posibilidad de formación de complejos entre componentes lipídicos o proteicos de las membranas y el boro, de forma que pudiera alterarse la integridad, y por tanto, las propiedades funcionales de dichas estructuras.

De las investigaciones previas llevadas a cabo en esta memoria, el estudio sobre el aislamiento y caracterización de una lipoxigenasa soluble de cotiledones, así como el efecto del boro sobre el enzima, aparecía, en un principio, como objetivo importante. La estabilidad de la actividad mostrada cuando se hacía incubar el enzima con metabisulfito sódico, había sido ya verificada por FEYS y col. (1980), quienes comprobaron que la adición de esta sal al medio de extracción de la lipoxigenasa de soja, provocaba, además de una estabilización de la actividad, un incremento en la

eficiencia de la extracción, al prevenir la acción de los compuestos fenólicos. En este sentido, lipoxigenasas de diferentes orígenes poseen un distinto grado de estabilidad: GALPIN y col. (1976) verificaron una elevada estabilidad en la lipoxigenasa de soja; por el contrario, BEAUX y col. (1973) comprobaron una gran inestabilidad para el enzima purificado de semillas de haba. En cuanto a la curva de actividad en función del pH del medio de reacción, un pH óptimo entre 7.0 y 8.0, obtenido para el enzima de cotiledones de girasol, difiere, en gran medida, de los resultados descritos para otras lipoxigenasas, los cuales oscilan entre valores de pH de 5.5 y 7.0. Únicamente, la lipoxigenasa-2 de soja y la de guisante, muestran un caracter anómalo, al poseer pH óptimos alrededor de 9.0, siendo importante indicar que estos dos enzimas, constituyen las únicas lipoxigenasas de plantas capaces de producir hidroperóxidos con configuración R (VLIEGENTHART y col. 1982). Trabajos posteriores permitirán revelar si esta propiedad se puede hacer también extensible al enzima de cotiledones de girasol. Todo ello coadyuvará a determinar, como sugirieron HURT y AXELROD (1977), si la diferencia indicada en cuanto al pH óptimo de actuación, tiene alguna influencia en la función fisiológica de la lipoxigenasa.

Aunque la inhibición *in vivo* de la actividad enzimática provocada por el boro, se puede relacionar con la ralentización observada del proceso germinativo y postgerminativo cuando las semillas se desarrollan en medios con altas concentraciones del elemento, era evidente que importantes cuestiones quedaban por contestar en relación a la significación fisiológica de dicha inhibición y en cuanto al efecto del boro sobre la actividad lipoxigenásica. Así:

¿Actúa directamente el boro sobre el enzima?

¿Forma el boro complejos con los sustratos del enzima (ácidos grasos poliinsaturados)?

Como respuesta asimilable a la segunda pregunta, LEE y ARONOFF (1967) comprobaron que la inhibición por el boro del enzima 6-P-gluconato deshidrogenasa tenía lugar a través de la formación de un complejo 6-P-gluconato-boro, el cual impedía la reacción de descarboxilación. En cuanto a una actuación del boro sobre la lipoxigenasa de girasol, los incrementados niveles de triacilgliceroles, fosfolípidos y ácidos grasos libres observados

en cotiledones durante la germinación de la semilla en presencia de 50 ppm de boro, se corresponden con una inhibición de la lipoxigenasa y, por lo tanto, de la vía catabólica de ácidos grasos en que interviene dicho enzima. Al hilo de estos resultados y, teniendo en cuenta que las hipótesis más recientes sobre los efectos del boro en plantas apuntaban hacia una acción del elemento a nivel de las membranas (POLLARD y col. 1977; PARR y LOUGHMAN, 1983), parámetros como la respiración, actividades de enzimas oxidativos, cambios en los lípidos de membranas y producción de etileno, se presentaban como factores importantes en el estudio de su mecanismo de acción. Así, la peroxidación lipídica podría constituir una respuesta a tratamientos deficientes y tóxicos de boro, cuyas bases bioquímicas no habían sido investigadas.

Debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, los cotiledones de girasol constituían un tejido claramente propenso a la peroxidación lipídica, reacción capaz de provocar importantes daños en las membranas biológicas (DHINDSA y col. 1981; SANDMANN y BÖGER, 1982). Por otra parte, TANAKA (1966) y PULICH (1978) habían demostrado que el requerimiento en boro por las plantas superiores, se veía afectado por la intensidad luminosa, idea que inmediatamente fue asimilada por nosotros en este trabajo, en el sentido de investigar los cambios experimentados en los contenidos de ácido α -linolénico y de monogalactosildiglicéridos de membranas cloroplastidiales de cotiledones desarrollados a la luz, en función del boro en medio de cultivo.

Los resultados obtenidos al respecto, permiten afirmar que una concentración de boro en el medio de 10 ppm (considerada óptima), inhibe la formación de etileno, respiración y actividad peroxidásica, al tiempo que muestra un efecto estimulante sobre la degradación lipídica y sobre la acumulación de clorofila en los cotiledones. Todo ello, unido a las elevadas actividades malato y, sobre todo, citrato sintasas, detectadas en extractos de dicho tejido después de 7 días de desarrollo en medio con la concentración de boro antes indicada (lo cual hace evidente un ciclo del glioxilato más operativo en la conversión de grasas en azúcares, como se puede comprobar por el menor contenido de lípidos neutros en cotiledones desarrollados en medios con 10 ppm de boro), coadyuvan a una mejor

regulación del crecimiento de la plántula durante la germinación, influenciada por el boro.

De especial significación ha sido la inhibición inducida ^{por el SHAM} sobre la evolución de anhídrido carbónico y la absorción de oxígeno, por la adición de SHAM, un inhibidor de la respiración resistente al cianuro (SCHONBAUM y col. 1971), al medio de incubación de los cotiledones. La reducción de la respiración por el SHAM y CNK adicionados juntos, sobre todo en tejidos después de 3 días de desarrollo en medios con 50 ppm de boro, los cuales mostraban muy poca sensibilidad a dichos agentes adicionados por separado, sugiere que en cotiledones crecidos en medios con o sin boro, son operativas tanto la vía citocrómica como la vía oxidativa alternativa al cianuro. Al mismo tiempo, la fuerte inhibición inducida por el SHAM sobre el enzima lipoxigenasa, la cual no se afecta por el cianuro, podría también indicar la participación de este enzima en la respiración cianuro-resistente. Estos resultados están de acuerdo con los aportados por GOLDSTEIN y col. (1980) en diversos tejidos vegetales, los cuales implican a la lipoxigenasa adherida a, o presente en, la mitocondria, en la vía resistente al cianuro. Sin embargo, parece descartada esta relación por el uso de inhibidores que afectan a la ruta alternativa y no así, a la actividad lipoxigenasa (MILLER y OBENDORF, 1981; PETERMAN y SIEDOW, 1983). En este mismo contexto, THEOLOGIS y LATIES (1976) habían ya indicado, trabajando con rodajas de patata, que la integridad de los lípidos de membrana es un prerequisite indispensable para la operatividad de la respiración cianuro-resistente. Contrariamente, MAESHIMA y col. (1984) propusieron que una deficiencia en fosfolípidos a nivel de la membrana interna mitocondrial de raíces de batata, facilita el proceso de transporte de electrones en la vía insensible al cianuro, de manera que a un menor contenido en fosfolípidos corresponde una respiración más resistente al cianuro.

Valores del orden de 0.50 para el cociente respiratorio en cotiledones desarrollados durante 3 días en medios con 50, 10 ppm o sin boro, reflejan un tipo de metabolismo identificable con la hidrólisis y posterior degradación de la reserva lipídica. En este sentido, durante el desarrollo postgerminativo de las semillas oleaginosas, los lípidos de reserva son convertidos en sacarosa por la vía gluconeogénica (BEEVERS, 1969). En

cotiledones cultivados durante 7 días en las condiciones indicadas de boro, la existencia de cocientes respiratorios más elevados podría deberse a que, en esas condiciones, puedan ser utilizados los azúcares como sustrato respiratorio, además de los lípidos. Resulta difícil explicar, desde un punto de vista fisiológico, los cambios observados en el cociente respiratorio cuando los cotiledones eran incubados con SHAM, CNK o con ambos agentes al mismo tiempo; así, el cociente respiratorio pudo dar poca información acerca del sustrato utilizado cuando la respiración mitocondrial fue inhibida por SHAM o por el CNK. Este hecho podría ser explicado teniendo en cuenta que el cociente respiratorio no es un valor determinado por un simple proceso, sino el resultado de un conjunto de reacciones biológicas que envuelven al O_2 y al CO_2 .

En cuanto al efecto del boro sobre el aparato fotosintético, los inferiores contenidos de MGDG y de ácido α -linolénico en cotiledones de plántulas de girasol, previamente desarrolladas durante 3 y 7 días en la oscuridad en medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro, las cuales se mantuvieron, posteriormente, 24 horas a la luz, podrían sugerir que esas aparentes condiciones de deficiencia y de toxicidad en boro, dieran lugar a tejidos cuyas membranas celulares fueran más susceptibles al ataque peroxidativo. A este respecto, McKERSIE y col. (1978) mostraron importantes cambios en las actividades de enzimas ligados a las membranas, acompañados por concomitantes cambios en la composición y propiedades físico-químicas de los componentes lipídicos de dichas estructuras, durante la senescencia de diferentes tejidos vegetales. Por otra parte, la disminución en el contenido de ácido α -linolénico, principal ácido graso de los tejidos fotosintéticos, en cotiledones desarrollados en las anteriores condiciones de luz y en medios con elevada concentración en boro, también podría deberse a una acción inhibitoria del micronutriente sobre el enzima desaturásico que transforma el linoleato en linolenato.

La consideración de una posible regulación por el boro de un mecanismo de defensa capaz de contrarrestar en la célula vegetal los ataques inducidos por diversos agentes externos, nos ponía en situación de relacionar estos hechos con aquellos otros que toman plaza en un proceso fisiológico de tanta transcendencia para la vida de la planta, cual es la senescencia.

En relación con este proceso, la integridad de las membranas constituye un importante factor en la determinación de la susceptibilidad celular a los daños ocasionados por la peroxidación lipídica, reacción en la cual los radicales libres derivados de dichas moléculas determinan gran parte de los cambios degradativos asociados a la senescencia (LESHEM, 1984). Entre las moléculas implicadas en la regulación de este fenómeno fisiológico, el etileno ha demostrado tener una gran importancia (LIEBERMAN, 1979), en cuya biosíntesis también han sido envueltos los radicales libres (KONZE y KENDE, 1979), siendo, asimismo, detectados en tejidos senescentes, incrementos significativos de las actividades lipoxigenasa y peroxidasa (GROSSMAN y LESHEM, 1978; PAULS y THOMPSON, 1984).

La evidencia experimental mostrada hasta este momento por los resultados de este trabajo, sugirió que ^{causado en la act. por contenido de ácidos} ~~la formación de hidroperóxidos en~~ ^{para obtenerlos, prueba de etileno a través de donit múlt. de} ~~ácidos grasos poliinsaturados, podría guardar alguna relación con la~~ ^{pucleran} ~~senescencia de este tejido.~~ Aunque la disminución de los niveles de actividad enzimática en cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm de boro, hace difícil el establecimiento de una relación entre dicha actividad y la senescencia, sin embargo, a pesar de esta aparente contradicción, sí es posible sugerir, en base a los resultados obtenidos, que una concentración de 10 ppm de boro en el medio, puede desarrollar un sistema protector contra las reacciones de peroxidación. De aquí, que las investigaciones se dirigieran precisamente a profundizar en esta dirección.

Para ello, se tuvo muy en cuenta la implicación de la peroxidación lipídica en las reacciones de conversión de ACC en etileno a nivel de las membranas (MAYAK y col. 1981; LYNCH y col. 1985). En este sentido, había sido sugerido que este paso es mediado por un enzima ligado a las membranas (IMASEKI y WATANABE, 1978), y que la fracción de microsomas constituía un buen sistema modelo para el estudio de dicho mecanismo de conversión (KONZE y KENDE, 1979; McRAE y col. 1982). En contraposición a este supuesto experimental, diferentes investigadores comprobaron en un gran número de sistemas, los cuales incluían fracciones subcelulares aisladas y sistemas químicos, que la reacción de conversión de ACC en etileno no es fisiológica, de forma que, probablemente, no se puede

relacionar con el sistema sintetizante de etileno que funciona en tejidos intactos (GUY y KENDE, 1984; McKEON y YANG, 1984; VENIS, 1984).

Era evidente la existencia de este controvertido punto de vista sobre la formación de la hormona a nivel del tejido entero y a nivel de fracciones subcelulares aisladas. Los estudios llevados a cabo por nosotros en cotiledones de girasol, demuestran que una concentración de 10 ppm de boro en el medio de cultivo, provoca un efecto inhibitor sobre la formación de etileno en este tejido, al tiempo que una aceleración de la degradación de los lípidos de reserva y una inhibición de la respiración, respecto a cotiledones crecidos en medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro. Ello nos urgió a estudiar posteriormente la formación de etileno a nivel de microsomas aislados de cotiledones desarrollados en medios diferenciales de boro.

La elevada velocidad a la cual los microsomas de cotiledones de plántulas de girasol convierten ACC en etileno y la no saturabilidad del sistema por el ACC, incluso a concentraciones 8.0 mM, son resultados que concuerdan con los obtenidos por MAYAK y col. (1981) en microsomas de flores de clavel senescentes, quienes comprobaron que el EFE mostraba elevados valores de K_m frente al ACC (15 mM). El hecho de que en microsomas de cotiledones de girasol se inhiba fuertemente la actividad del EFE en función de la temperatura de incubación, confirma, asimismo, la inestabilidad térmica de dicho sistema enzimático; a este respecto, LYNCH y col. (1985) han comprobado que una temperatura elevada inhibe el EFE. Del mismo modo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por BOROCHOV y ADAM (1984) y ADAM y MAYAK (1984) en pétalos de clavel, en relación al efecto inhibitor del ATP sobre la formación de etileno. Como indicaron estos autores, la fuerte inhibición inducida por el ATP podría invalidar el modelo propuesto por JOHN (1983), según el cual el mecanismo de formación de esta molécula a partir de ACC se acoplaría a un flujo electrogénico de protones.

Estos datos, al tiempo que la superior inhibición de etileno provocada por el SHAM (inhibidor del enzima lipoxigenasa), por el BHT (antioxidante) y por el enzima superóxido dismutasa (secuestrante del radical superóxido), en microsomas de cotiledones crecidos en medios con 50 ppm de boro, respecto a microsomas aislados a partir de cotiledones desarrollados en medios sin boro o con 10 ppm de boro, sugieren que un aumento tal en la

formación de etileno en medios con altas concentraciones de boro, puede ser debido a la potenciación de los mecanismos de autooxidación o a una peroxidación lipídica de tipo enzimático. El mayor contenido de ácidos grasos libres, observado en cotiledones desarrollados en 50 ppm de boro, podría favorecer la formación de etileno por una vía en la cual estuvieran implicados los hidroperóxidos formados por acción de una lipoxigenasa sobre los ácidos grasos poliinsaturados (LESHEM y col. 1984). A este respecto, recientemente LYNCH y col. (1985) han atribuido la conversión de ACC en etileno en microsomas de flores de clavel a los hidroperóxidos generados por una lipoxigenasa asociada a membranas.

Como un paso más en nuestro estudio, ~~Para distinguir entre la actividad biosintética de etileno a nivel de los microsomas aislados y a nivel del tejido entero, nos pareció importante establecer la posible diferencia existente entre la respuesta derivada de la acción del EFE (actuación *in vivo*), de las reacciones que envuelven a los hidroperóxidos y a los radicales libres producidos, como respuesta a un determinado tipo de stress, ~~la solubilización de las membranas~~ a partir de los microsomas brutos, y la posterior separación por Sephadex G-50, diferenciaba claramente ambas actividades. Así, ~~la fracción de mayor peso molecular correspondiente al enzima lipoxigenásico, únicamente formaba etileno en presencia de ácido α -linolénico, lo cual es atribuible a la generación de hidroperóxidos y radicales libres por acción del enzima.~~ ~~La similar capacidad formadora de etileno que se observa al incubar las fracción con actividad EFE, purificada a partir de microsomas brutos aislados de cotiledones desarrollados con 10, 50 ppm o sin boro, permite sugerir que el aumento en la formación de etileno, detectada tanto a nivel de las microsomas brutos como a nivel del tejido intacto desarrollado en medios con 50 ppm del micronutriente, se puede deber a la formación de radicales libres derivados de los hidroperóxidos. De aquí, que sea posible concluir que dosis consideradas óptimas de boro (10 ppm) pueden desempeñar un importante papel en el crecimiento de las plántulas de girasol, al regular el metabolismo lipídico y oxidativo de la células cotiledonares, así como la vía oxidativa de formación de etileno derivada de la peroxidación lipídica.~~~~

formación de etileno en medios con altas concentraciones de boro, puede ser debido a la potenciación de los mecanismos de autooxidación o con una peroxidación lipídica de tipo enzimático. El mayor contenido de ácidos grasos libres, observado en cotiledones desarrollados en 50 ppm de boro, podría favorecer la formación de etileno por una vía en la cual estuvieran implicados los hidroperóxidos formados por acción de una lipoxigenasa sobre los ácidos grasos poliinsaturados (LESHEM y col. 1984). A este respecto, recientemente LYNCH y col. (1985) han atribuido la conversión de ACC en etileno en microsomas de flores de clavel a los hidroperóxidos generados por una lipoxigenasa asociada a membranas.

Como un paso más en nuestro estudio, para distinguir entre la actividad biosintética de etileno a nivel de los microsomas aislados y a nivel del tejido entero, nos pareció importante establecer la posible diferencia existente entre la respuesta derivada de la acción del EFE (actuación *in vivo*), de las reacciones que envuelven a los hidroperóxidos y a los radicales libres producidos como respuesta a un determinado tipo de stress. La solubilización de las membranas a partir de los microsomas brutos y la posterior separación por Sephadex G-50, diferenciaba claramente ambas actividades. Así, la fracción de mayor peso molecular correspondiente al enzima lipoxigenásico, únicamente formaba etileno en presencia de ácido α -linolénico, lo cual es atribuible a la generación de hidroperóxidos y radicales libres por acción del enzima. La similar capacidad formadora de etileno que se observa al incubar la fracción con actividad EFE, purificada a partir de microsomas brutos aislados de cotiledones desarrollados con 10, 50 ppm o sin boro, permite sugerir que el aumento en la formación de etileno, detectada tanto a nivel de los microsomas brutos como a nivel del tejido intacto desarrollado en medios con 50 ppm del micronutriente, se puede deber a la formación de radicales libres derivados de los hidroperóxidos. De aquí, que sea posible concluir que dosis consideradas óptimas de boro (10 ppm) pueden desempeñar un importante papel en el crecimiento de las plántulas de girasol, al regular el metabolismo lipídico y oxidativo de la células cotiledonares, así como la vía oxidativa de formación de etileno derivada de la peroxidación lipídica.

Los resultados derivados del examen citológico, del análisis bioquímico y de los estudios metabólicos *in vivo* e *in vitro*, establecen la posibilidad de una relación entre las condiciones nutritivas de boro y la regulación de un proceso de tanta importancia en el desarrollo vegetal como la senescencia. A este respecto, nos ha parecido oportuno reagrupar en la figura 38 los principales acontecimientos metabólicos observados en los tejidos analizados, en función del boro, en el sentido de establecer una hipótesis que pueda interpretar su relación con dicho proceso.

~~Como ya se indicó en el capítulo de antecedentes, cualquiera que sea el~~ ^{el} órgano o planta donde se manifieste la senescencia, su propia naturaleza determina que la nutrición mineral pueda constituir un factor capaz de dirigirlo y transformarlo, siendo, por ello, apto para poder obtener conclusiones relativas a los mecanismos de acción de los elementos minerales en plantas. Nuestros resultados muestran cómo en cotiledones tienen lugar, en función de la concentración de boro del medio, cambios importantes en la respiración, degradación y biosíntesis lipídica, formación de etileno y actividad oxidativa, relacionados, todos ellos, con el ensamblaje de gran número de constituyentes y fenómenos celulares implicados en la senescencia de los tejidos. Los cambios apuntados requieren para su regulación una estricta producción de hormonas, entre las cuales el etileno representa un factor determinante para que cada espacio intracelular del tejido cotiledonar alcance una adecuada cooperación y sincronización, tanto para el desarrollo de la nueva planta como para la puesta en marcha de la senescencia.

Consideramos que la puesta en evidencia de una relación del tipo indicado, constituye un nuevo punto de apoyo para entender el mecanismo de acción del boro en plantas, de acuerdo con el esquema de la figura 38, es posible suponer que condiciones deficientes y tóxicas puedan inducir la potenciación de procesos de peroxidación lipídica a nivel de las membranas, mediados por la acción de radicales libres asociados a la actuación de enzimas oxidativos. En este sentido, el hecho contrastado de la relación

existente entre la degradación de las membranas y el proceso senescente, permite distinguir entre alguno de los factores que intervienen en su regulación:

- La alteración de los mecanismos de acción de proteínas y ácidos nucleicos por los radicales libres y/o hidroperóxidos lipídicos (FRANKEL, 1984);

- Los cambios en la integridad funcional de las membranas capaces de provocar la pérdida de la capacidad sintetizante de etileno fisiológico (Sistema 1) (LIEBERMAN, 1979), al tiempo que un aumento en la formación de etileno ^{de stress} en presencia de ACC (MAYAK y col. 1981), o de etano, en ausencia de ACC, proveniente de la peroxidación lipídica (SANDMAN y BÖGER, 1982).

- La necesidad de contrarrestar las alteraciones inducidas por el stress, favorecedoras de la inducción de la respiración cianuro resistente y de la síntesis de lípidos y proteínas (ROMANI, 1984), ^{etc.} procesos que se ven superados en condiciones persistentes de stress, dando lugar a la pérdida de la homeostasia celular.

- ~~Por otra parte, a pesar de no haber sido objeto de estudio en este trabajo, es bien conocido que las condiciones de boro deficiencia y, posiblemente, también de boro toxicidad, favorecen la acumulación intracelular de auxinas, hormonas íntimamente relacionadas con la formación de etileno y con la respiración, cuya acumulación temporal se acentúa en condiciones de aging, dando lugar a la formación de etileno fisiológico, inductor de la homeostasia del tejido, mientras que, ^{con el aumento de boro, toxicidad de boro} ~~un~~ aging prolongado (senescencia), ^{en ausencia de boro} pueda mantener la acumulación de auxinas durante un mayor espacio de tiempo, ^{por lo} lo cual, en lugar de conducir a la formación de etileno fisiológico, ^{de stress} ~~lleve~~, posiblemente, a la acumulación de etileno ^{de stress} ~~del~~ stress ^{promoviendo} ~~de~~ la senescencia.~~

En resumen, condiciones óptimas de boro parecen contribuir a una estabilización de las membranas que posibilite una mejor regulación del metabolismo celular y una ralentización de aquellos procesos relacionados con la senescencia de los tejidos.

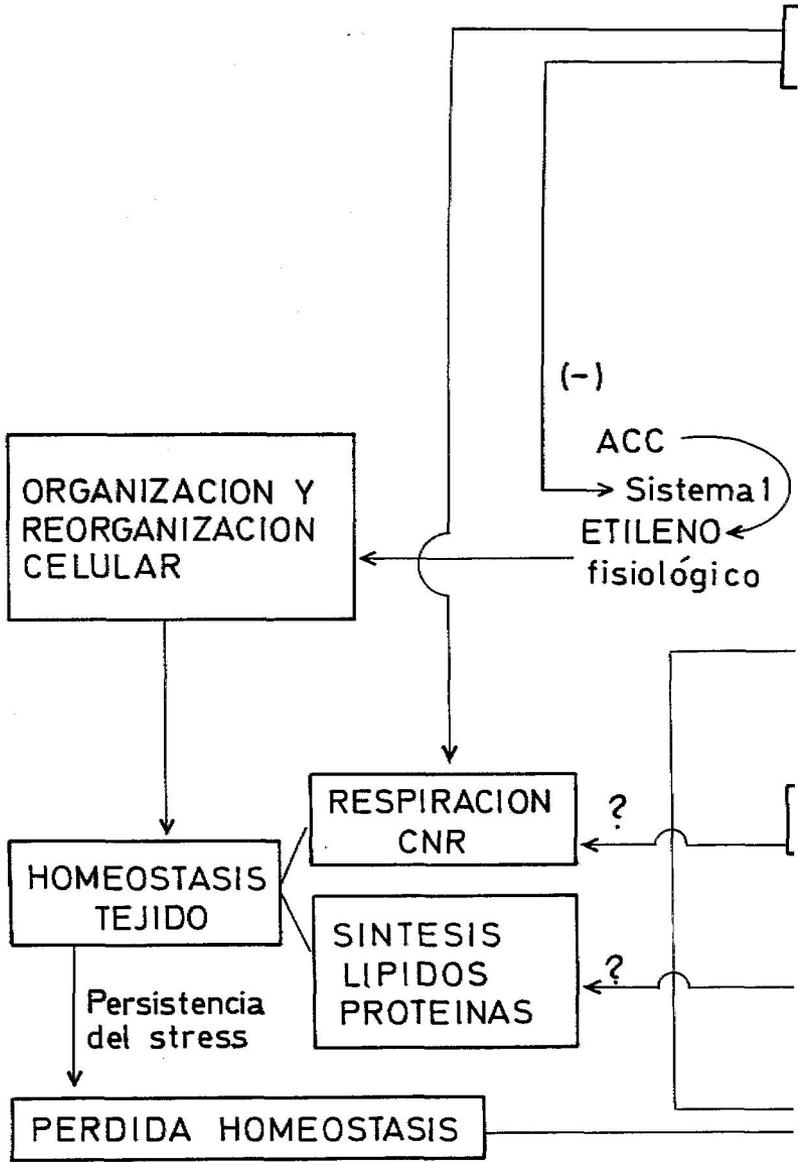
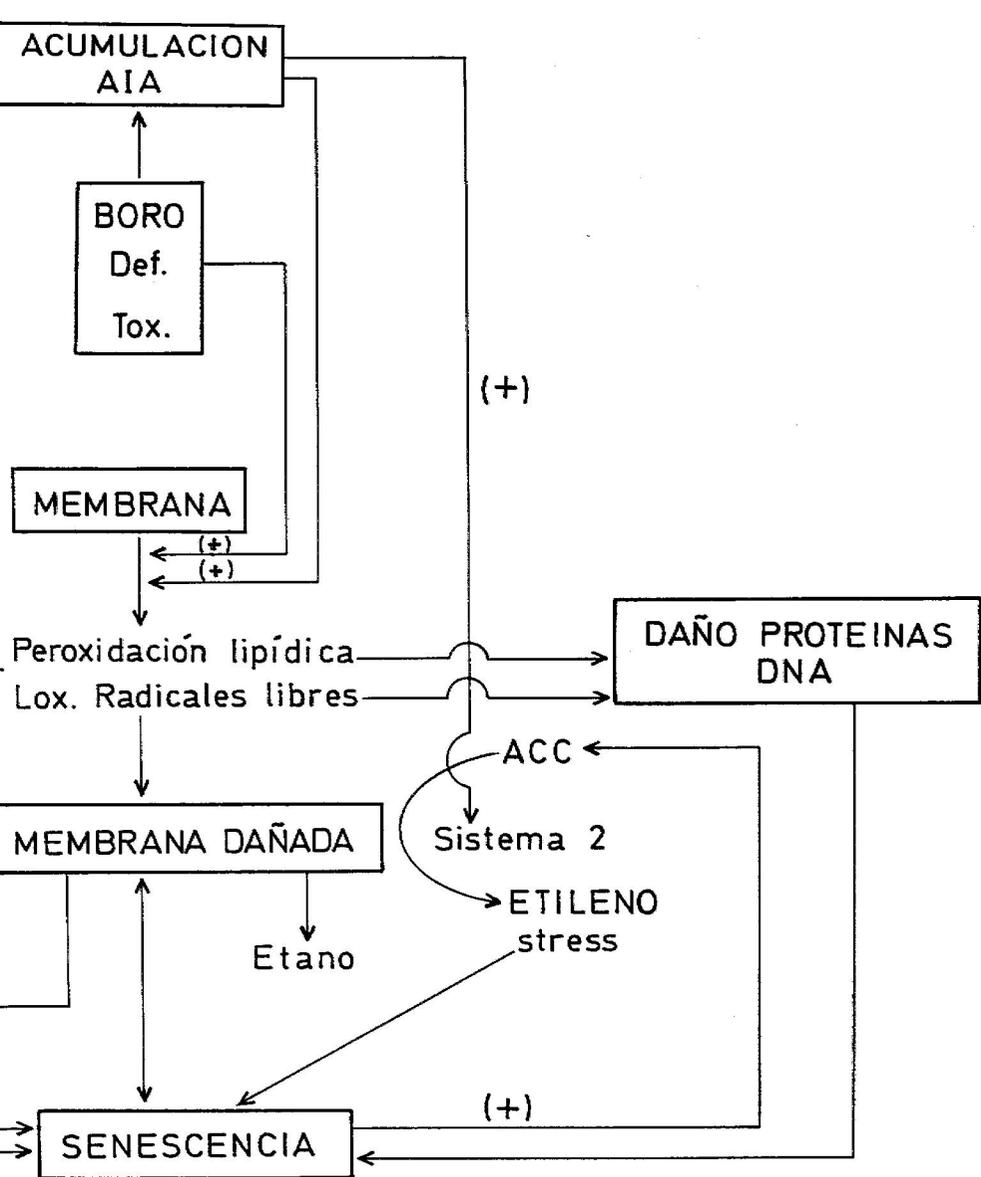


Figura 38. Interpretaciones propuestas a los



procesos metabólicos estudiados en este trabajo, en función del boro.

[The text in this section is extremely faint and illegible, appearing as a series of light gray speckles and noise across the page.]

VII. CONCLUSIONES

1ª. El haber efectuado la mayor parte de los experimentos en ausencia de luz, importante factor que hace incrementar los requerimientos de boro, y el conocimiento de que la concentración de este elemento en la semilla de girasol era ya de 15 a 20 ppm, quizás suficiente para las necesidades de la plántula en los primeros días de desarrollo, podría explicar la escasa diferencia existente en el crecimiento y ultraestructura entre las raíces desarrolladas en medios sin boro y con 10 ppm. Sin embargo, 50 ppm de boro provoca importantes cambios en dichos aspectos, configurando un panorama celular que se asocia a tejidos envejecidos o senescentes.

2ª. Una concentración de 10 ppm de boro en el medio de cultivo de las plántulas, induce en las raíces un incremento en el contenido de fosfolípidos y una disminución de lípidos neutros, así como un claro descenso en el porcentaje de ácido linoléico, en relación a tejidos desarrollados en medios sin boro y, sobre todo, con 50 ppm de boro.

3ª. La biosíntesis lipídica a partir de acetato- $1^{14}C$ reproduce, en buena medida, los resultados derivados del análisis bioquímico, manifestándose una síntesis superior de fosfolípidos e inferior de lípidos neutros, en raíces previamente cultivadas en medios con 10 ppm de boro.

4ª. Los valores similares de K_m determinados para el enzima CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa de microsomas de raíces desarrolladas en medios con 10 ó con 50 ppm de boro, al tiempo que la constatación de una muy inferior velocidad de reacción enzimática en medios con 50 ppm de boro, impiden poder establecer la hipótesis de un efecto inhibitorio directo de este elemento sobre el enzima, apuntando la posibilidad de una inhibición de tipo no competitivo.

5^a. El menor contenido en el número de cuerpos grasos y el mayor desarrollo organular observados en el curso del proceso postgerminativo, en cotiledones de plántulas desarrolladas en medios con 10 ppm de boro, se corresponde con una aceleración en la degradación de triglicéridos, con una disminución en el contenido de ácidos grasos libres y con un incremento de la actividad lipoxigenasa.

6^a. Cotiledones desarrollados durante 3 y 7 días en medios con 10 ppm de boro y, posteriormente, mantenidos 24 horas a la luz, muestran una clara evolución de etioplastos a cloroplastos con un sistema tilacoidal bien desarrollado y con la presencia de plastoglobulos. Por el contrario, en tejidos desarrollados en medios sin boro y, sobre todo con 50 ppm de boro, el sistema de membranas plastidiales aparece poco diferenciado, lo cual unido a los inferiores contenidos de monogalactosildiglicéridos, de ácido α -linolénico y de clorofila, indican un menor desarrollo del aparato fotosintético, en condiciones deficientes y tóxicas de boro.

7^a. El enzima lipoxigenasa parcialmente purificado de cotiledones al sexto día de postgerminación, muestra un pH óptimo entre 7.0 y 8.0, una elevada estabilidad en medios con metabisulfito sódico y una inhibición por el boro del orden de un 30 %.

8^a. La inhibición inducida por el SHAM y por el cianuro sobre el desprendimiento de CO₂ y absorción de O₂, en cotiledones desarrollados en medios diferenciales de boro, sugiere la operatividad en este tejido tanto de la vía citocrómica como de la vía oxidativa resistente al cianuro, destacando, sin embargo, la mayor actividad de esta última ruta en cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm de boro.

9^a. La mayor inhibición en la formación de etileno inducida por el SHAM, BHT y SOD, en microsomas de cotiledones desarrollados en medios con 50 ppm de boro, sugiere una potenciación de los mecanismos de peroxidación lipídica derivada de la formación de radicales libres. En este sentido, la similar capacidad formadora de etileno detectada al incubar con ACC la fracción con actividad EFE purificada a partir de microsomas aislados de cotiledones desarrollados en medios diferenciales de boro, permite sugerir

que el aumento en la producción de esta hormona, a nivel de los microsomas brutos y a nivel del tejido intacto desarrollados en 50 ppm de boro, podría deberse a la formación de radicales libres derivada de la peroxidación lipídica por acción del enzima lipoxigenasa.

10^a. Los resultados mostrados permiten indicar que concentraciones de boro consideradas óptimas, desarrollan, en cotiledones de girasol, un sistema protector contra las reacciones de peroxidación lipídica. Además, teniendo en cuenta los efectos observados en el metabolismo de raíces y cotiledones, en condiciones de deficiencia y, sobre todo, de toxicidad, también es posible sugerir una actuación de este elemento a nivel de la senescencia.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ADAM, Z. y MAYAK, S. 1984. Solubilization and partial purification of an enzyme converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in plants. *FEBS lett.* 172, 1, 47-50.
- ADAM, Z., ITZHAKI, H., BOROCHOV, A. y MAYAK, S. 1985. Substrate stimulation of an enzyme converting 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Sci.* 42, 89-93.
- ADAMS, D. O. y YANG, S. F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 170-174.
- AGARWALA, S.C., SHARMA, P.N., CHATTERJEE, C. y SHARMA, C.P. 1981. Development and enzymic changes during pollen development in boron deficient maize plants. *J. Plant Nutr.* 3, 329-336.
- AGULHOM, H. 1910. Recherches sur la presence et le role du bore chez les vegetaux. Ph. D. Tesis. University of Paris. France.
- ALBERT, L. S. 1968. Induction and antagonism of boron-like deficiency syntoms of tomato plants by select nitrogenous. *Plant Physiology*, 43-51.
- AL'SHEVSKII, N. G., VERZHBITSKII, V. I. y KORCHEVA, L. 1975. Effect of magnesium and calcium on physiological-biochemical indexes, yield and quality of crops in the polesie. *Nank Pr-Ukr., sil's Kogospod Akad*, 171, 136-143.
- ALVAREZ-TINAUT, M.C. y DONAIRE, J.P. 1978. Efecto del boro sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en homogenados de hoja de girasol. *Reunión Nac. Soc. Esp. Fisiol. Veg. Granada.*
- ANDREWS, J. y MUDD, J.B. 1984. Characterization of CDP-DG and PG synthesis in pea chloroplast envelope membranes. In *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp. 131-135. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- APELBAUM, A., WANG, S., BURGOON, A.C., BAKER, J. y LIEBERMAN, M. 1981. Inhibition of the conversion of ACC to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation and free radical scavengers. *Plant Physiol.* 67, 74-79.

- AUDUS, L.F. 1962. The mechanism of the perception of gravity by plants. Symp. Soc. Exp. Biol. 16, 197-226.
- AUGSTEN, H. y EICHHORN, B. 1976. Biochemistry and physiology of the effect of boron in plants. Biol. Rumsch. 14, 268-285.
- (17) BARBER, R.F. y THOMPSON, J.E. 1983. Neutral lipids rigidify unsaturated acyl chains in senescing membranes. J. Exp. Bot. 34, 268-276.
- BEAUX, Y., DRAPON, R., NICOLAS, J. y CAILLAT, J.M. 1973. La lipoxigenase de la fève (*Vicia faba* L.). Isolement. Biochimie 55, 253-262.
- BEEVERS, H. 1969. Glyoxysomes of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 168, 313-24.
- BEEVERS, H. 1979. Microbodies in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 159-93.
- BEEVERS, H. 1980. The role of the glyoxylate cycle. In The Biochemistry of Plants. Vol. 4, pp. 117-130. P.K. Stumpf ed. Academic Press, New York.
- BEEVERS, H. 1982. Fat metabolism in seeds: role of organelles. In Biochemistry and Metabolism of Plant lipids. pp. 223-235. J.F.G.M. Wintermans and P.J.C. Kuiper eds. Elsevier Biomedical Press. B.V.
- BENEDICT, C.R. y BEEVERS, H. 1961. Formation of sucrose from malate in germinating castor beans. I. Conversion of malate to phosphoenolpyruvate. Plant Physiol. 36, 540-44.
- BENSON, A.A., WISER, R., FERRARI, R.A. y MILLER, J.A. 1958. Photosynthesis of galactolipides. J. Am. Chem. Soc. 80, 4740-4747.
- BENSON, A.A. y STRICKLAND, E.H. 1960. Plant phospholipids. III. Identification of diphosphatidylglycerol. Biochim. Biophys. Acta. 41, 328-333.
- BIALE, J.B. 1960. Respiration of fruits. Role of ethylene and plant emanation in fruit respiration. Z. Pflanzenphysiol. 12, 536-92.
- BIRNBAUM, E.H., DUGGER, W.M. y BEASLEY, C.A. 1977. Interaction of boron with components of nucleic and metabolism in cotton ovules cultured *in vitro*. Plant Physiol. 59, 1034-38.

BOGIN, E. y WALLACE, A. 1969. Citrate synthase from lemon fruit. *In: Methods in Enzymology*, J.M. Lowenstein ed, XIII, 19-20. Academic Press, New York and London.

BOHNSACK, C.W. y ALBERT, L.S. 1977. Early effects of boron deficiency on indoleacetic acid oxidase levels of squash root tips. *Plant Physiol.* 59, 1047-1050.

BONNEROT, C. y MAZLIAK, P. 1984. Induction of the oleoyl-phosphatidylcholine desaturase activity during the storage of plant organs. A comparison between potato and jerusalem artichoke tubers. *Plant Sci. lett.* 35, 5-10.

28 BOROCHOV, A., HALEVY, A.H. y SHINITZKY, M. 1982. Senescence and the fluidity of rose petal membranes. Relationship to phospholipid metabolism. *Plant Physiol.* 69, 296-299.

BOROCHOV, A. y ADAM, Z. 1984. On the role of membrane integrity in the conversion of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid to ethylene in carnations petals. *FEBS Lett.* 173, 1, 139-141.

23 BORS, W., MICHEL, C. y SARAN, M. 1981. Organic oxygen radicals in biology: generation and reaction. *In Oxygen and Oxy Radicals in Chemistry and Biology*. M.A.J. Rodgers and E.L. Powers eds. Academic Press. New York, 75-81.

BREIDENBACH, R.W. y BEEVERS, H. 1967. Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27, 162-169.

BREIDENBACH, R.W., KAHN, A. y BEEVERS, H. 1968. Characterization of glyoxysomes from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 43, 705-713.

BROWSE, J.A. y SLACK, C.R. 1981. Catalase stimulates linoleate desaturation in microsomes preparations from developing linseed cotyledons. *FEBS lett.* 131, 111-114.

BRUINSMA, J. 1961. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 576-578.

BLIGH, E.G. y DYER, W.S.. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* 37, 911-917.

BURGUESS, N. y THOMAS, D.R. 1986. Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria. *Planta*, 167, 58-65.

J CAMERON, A.C., FENTON, C.A.L., YU, Y.B., ADAMS, D.O. y YANG, S.F. 1979. Increased production of ethylene by plants tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *HortScience*, 14, 2, 178-180.

CITHAREL, B., OURSEL, A. y MAZLIAK, P. 1983. Desaturation of oleoyl and linoleoyl residues linked to phospholipids in growing roots of yellow lupin. *FEBS Lett.* 161, 2, 251-256.

COHEN, M.S. y ALBERT, L.S. 1974. Autoradiographic examination of meristems of intact boron-deficient squash roots treated with tritiated thymidine. *Plant Physiol.* 54, 766-768.

COHEN, B., GROSSMAN, S., PINSKY, A. y KLEIN, B.D. 1984. Chlorophyll inhibition of lipoxygenase in growing pea plants. *J. Agric. Food Chem.* 32, 519-523.

COKE, L. y WHITTINGTON, W.J. 1968. The role of boron in plant growth. IV. Interrelationship between boron and indol-3yl acetic acid in the metabolism of bean radicles. *J. Exp. Bot.* 19, 295-308.

COOPER, T.G. y BEEVERS, H. 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* 244, 3507-3513.

CULLIS, P.R., DE KRUIJFF, B., HOPE, M.J., NAYAR, R. y SCHMID, S.L. 1980. Phospholipids and membrane transport. *Can. J. Biochem.* 58, 1091-1100.

20 CHIA, L.S., THOMPSON, J.E. y DUMBROF, E.F. 1981. Simulation of the effects of leaf senescence on membranes by treatment with paraquat. *Plant Physiol.* 67, 415-420.

CHOINSKI, J.S. y TRELEASE, R.N. 1978. Control of enzymes activities in cotton cotyledons during maturation and germination. II. Glyoxysomal enzymes development in embryos. *Plant Physiol.* 62, 141-45.

DAVE, I.C. y KANNAN, S. 1980. Boron deficiency and its associated enhancement of RNase activity in bean plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 88, 41-51.

- DAVIES, H.R. y SLACK, P.T. 1981. The control of mobilization in seeds of dicotyledonous plants. *New Phytol.* 88, 41-51.
- DAVIES, H., JORDAN, B.R. y HARWOOD, J.L. 1984. Adaptation of chloroplast to incident light. In *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp. 393-397. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- DAY, D.A., ARRON, G.P. y LATIES, G.G. 1980. Nature and control of respiratory pathways in plants: the interaction of cyanide-resistant respiration with the cyanide-sensitive pathway. In *The Biochemistry of Plants. vol. 2*. 198-241. P.K. Stumpf y E.E Conn eds. Academic Press, New York.
- DAZA, L.M. 1979. Biosíntesis de lípidos en olivo (*Olea europaea* L.) a nivel subcelular. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- DAZA, L.M., LOPEZ-GORGE, J. y DONAIRE, J.P. 1980. Isolation and characterization of subcellular organelles from young and mature leaves of olive tree. *Rev. Esp. Fisiol.* 36, 7-12.
- DE GROOT, J.J.M.C., GARSSSEN, G.J., VELDINK, G.A.J., VLIEGENTHART, J.F.G., BOLDINGH, J. y EGMOND, M.R. 1975. Interaction of soybean lipooxygenase-1 and 13-L-hydroperoxylinoleic acid involving yellow and purple colored enzyme species. *FEBS Lett.* 56, 50-54.
- DEL RIO, L.A. SEVILLA, F., GOMEZ, M., YANEZ, J. y LOPEZ, J. 1978. Superoxide dismutase: an enzyme system for the study of micronutrient interactions in plants. *Planta*, 140, 221-225.
- DEMANDRE, C., DOUADY, D., KADER, J.C. y MAZLIAK, P. 1978. What is the origin of the lipids of potato tuber plasmalemma ?. *Plant Sci. Lett.* 11, 275-83.
- DENNIS, D.T. y MIERNYK, J.A. 1982. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 27-50.
- DEVOR, K.A. y MUDD, J.B. 1971a. Biosynthesis of phosphatidylcholine by enzyme preparations from spinach leaves. *J. Lipid. Res.* 12, 403-11.
- DEVOR, K.A. y MUDD, J.B. 1971b. Control of fatty acid distribution in phosphatidylcholine of spinach leaves. *J. Lipid. Res.* 12, 412-19.

19
DHINDSA, R.S., PLUMB-DHINDSA, P.L. y RBID, D.M. 1981. Senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32, 93-101.

DIEPENBROK, W. y GEISLER, G. 1984. Einfluß von Ca^{2+} und pH auf deas Fettsäuremuster von Phospholipiden der Rapswurzel (*Brassica napus* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 147, 255-63.

DIXON, G.H. y KORNBERG, H.L. 1962. Malate synthase from baker's yeast. *In* *Methods in Enzymology*, S.P. Colowick y N.O. Kaplan eds. *Vol. V*, pp. 633-634. Academic Press, New York.

DONAIRE, J.P. y OURSEL, A. 1975. Influence du calcium sur la biosynthese de la phosphatidylcholine par les microsomes isolés de racines de féverole (*Vicia faba* var. minor). *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 281-284.

DONALDSON, R.P. 1976. Membrane lipid metabolism in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 57, 510-15.

DORNE, A.J., BLOCK, M.A., JOYARD, J. y DOUCE R. 1982. Studies on the localization of enzymes involved in galactolipid metabolism in chloroplast envelope membranes. *In* *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 153-164. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

DOUCE, R. 1964. Identification et dosage de quelques glycerophosphatides dans les sonches normales et tumorales *Scorsonore* cultivées *in vitro*. *C.R. Acad. Paris*, 259, 3066-68.

DOUCE, R. y JOYARD, J. 1980. Plant galactolipids. *In* *The Biochemistry of Plants*, *Vol. 4* pp. 321-362. P.K. Stumpf ed. Academic Press, New York.

DOUILLARD, R. y BERGERON, E. 1979. Quelques caracteristiques fonctionelles des activites lipoygenasiques foliaire soluble ou lamellaire. *Phisiol. Veg.* 17, 749-768.

- DOUILLARD, R y BERGERON, E. 1981. Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in young leaves. *Plant Sci. Lett.* 22, 263-268.
- DOWNING, D.T., BARVE, J.A., GUNSTONE, F.D., JACOSBERG, F.R. y JIE, M.L. 1972. Structural requirements of acetylenic fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 343-347.
- ⊗ DUGGER, W.M. 1973. Functional aspect of boron in plants. *In Trace Elements in the Environment*, E. Kothny ed. *Advances in Chemistry Series. Vol. 123*, pp. 112-129.
- DUGGER, W.M. y PALMER, R.L. 1980. Effect of boron on incorporation of glucose from UDP-glucose into cotton fibers growth *in vitro*. *Plant Physiol.* 65, 266-273.
- DUGGER, W.M. 1983. Boron in plant metabolism. *In Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology*, A. Läuchli y R.L. Bielecki eds. *Vol. 15 B*, pp. 626-650, Springer-Verlag, Heidelberg.
- DUPONT, J. 1981. Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 52, 225-232.
- ⊗ DUTTA, J.J. y McILRATH, W.J. 1964. Effects of boron on growth and lignification in sunflower tissue and organ cultures. *Bot. Gaz.* 125, 89-96.
- EASTWELL, K.C. y STUMPF, P.K. 1983. The presence of s'-nucleotidase in swiss chard chloroplasts. *Plant Physiol.* 72, 50-55.
- ELLMAN, G.L. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Biochim. Biophys.* 82, 70-77.
- 24 ⊗ ELSTNER, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33, 73-96.
- ERIKSSON, C.F. 1975. Aroma compounds derived from oxidized lipids: biochemical and analytical aspects. *J. Agric. Food Chem* 23, 126-128.
- ESKIN, N.A.M., GROSSMAN, S. y PINSKY, A. 1977. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 9, 1-40.
- FARAGHER, J.D., BOROCHOV, A., KEREN-PAZ, V., ADAM, Z. y HALEVY, A.H. 1984. Changes in parameters of cell senescence in carnation flowers after cold storage. *Sci. Horticult.* 22, 3, 201-205.

FERGURSON, C.H.R. y SIMON, E.W. 1973. Membrane lipids in senescing green tissues. *J. Exp. Bot.* 24, 307-316.

32 FERGURSON, I.B., WATKINS, C.B. y HARMAN, J.E. 1983. Inhibition by calcium of senescence of detached *Cucumber* cotyledons. Effect on ethylene and hydroperoxide production. *Plant. Physiol.* 71, 182-186.

FEYS, M., NAESESENS, W., TOBBACK, P. y MAES, E. 1980. Lipoxygenase activity in apples in relation to storage and physiological disorders. *Phytochemistry* 19, 1009-1011.

FRANKEL, E.N. 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *JAOCS*, 61, 12, 1908-1917.

FRIDOVICH, I. 1976. Oxygen radicals hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *In Free Radicals in Biology. Vol. 1.* J.W. Pryor, ed. pp 239-277. Academic Press. New York

FRITSCH, H. and BEEVERS, H. 1979. ATP citrate lyase from germinating castor bean endosperm. Localization and some properties. *Plant Physiol.* 63, 687-691.

FRENKEL, C. 1984. Factor regulating the respiratory upsurge in developing storage tissues. *In The Physiology and Biochemistry of Plant Respiration.* J. M. Palmer ed. 18-32. Cambridge University Press.

FRENTZEN, M., HEINZ, E., McKEON, T.A. y STUMPF, P.K. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 129, 629-636.

40 FUHRER, J. y FUHRER-FRIES, C.B. 1985. Formation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in pea plants. *Phytochemistry.* 24, 1, 19-22.

FUSSEDER, A. and THEIMER, R.R. 1984. Lipolytic and glyoxysomal enzyme activities in cotyledons of ripening and germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* 114, 403-411.

- GADNER, H.W. 1968. Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin layer chromatography. *J. Lipid Res.* 9, 139-141.
- GALPIN, J.R., TIELENS, L.G.M., VELDINK, G.A., Vliegenthart, J.F.G. y BOLDINGH, J. 1976. On the interaction of some catechol derivatives with the iron atom of soybean lipoxygenase. *FEBS Lett.* 69, 179-182.
- GALPIN, J.R. y ALLEN, J.C. 1977. The influence of micelle formation on lipoxygenase kinetics. *Biochem. Biophys. Acta.* 488, 392-401.
- GALLIARD, T., HULME, A.C., RHODES, M.J. y WOOLTORTON, L.S.C. 1968. Enzymatic conversion of linolenic acid to ethylene by extracts of apple fruit. *FEBS Lett.* 1283-86.
- GALLIARD, T. 1978. Lipolytic and lipoxygenase enzymes in plants and their action in wounded tissues. *In Biochemistry of Wounded Plant Tissues.* G. Khal eds. pp. 155-201. Walter de Gruyter, Bern.
- GALLIARD, T. y CHAN, H. W-S. 1980. Lipoxygenases. *In The Biochemistry of Plants.* P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. Vol. 4, pp. 132-161. Academic Press. New York.
- GALLIARD, T. 1980. Degradation of acyl lipids hydrolytic and oxidative enzymes. *In The Biochemistry of Plants.* P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. Vol. 4 85-116. Academic Press, New York.
- GARSSEN, G.J., ULIEGENTHART, J.F.G. y BOLDINGH, J. 1971. An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.* 122, 327-332.
- (X) GAUCH, H.G. y DUGGER, W.M. 1954. The physiological action of boron in higher plants: a review and interpretation. *Univ. of Maryland Agr. Exp. Stat. Bulletin # A-80 (Technical)*, 1-43.
- GEMMICH, A.R. 1982. Effect of light on lipid metabolism of tissue cultures. *In Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids* J.F.G.M. Wintermans and P.J.C. Kuiper ed. pp. 213-216. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- GERLOFF, G.C. 1968. The comparative boron nutrition of several green and blue-green algae. *Physiol. Plant.* 27, 369-377.

- GERHARDT, B. 1978. Microbodies/Peroxisomen Pflanzlicher zellen. Cell biology monographs. Vol. 5. Springer, Wien, New York.
- GERHARDT, B. 1981. Enzyme activities of the β -oxidation pathway in spinach leaf peroxisomes. FEBS Lett. 126, 71-73.
- GERHARDT, B. 1983. Localization of β -oxidation enzymes in peroxisomes isolated from nonfatty plant tissues. Planta. 159, 238-246.
- GIETL, C. y HOCK, B. 1986. Import of glyoxysomal malate dehydrogenase precursor into glyoxysomes: A heterologous *in vitro* system. Planta 167, 87-93.
- GLASS, A.D.M. 1973. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. Plant Physiol. 51, 1037-41.
- ⑧ GOLDBACH, H. 1985. Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ^{32}P and ^{14}C -glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. J. Plant Physiol. 118, 431-438.
- GOLDSTEIN, A.H., ANDERSON, J.E. y McDANIEL, R.G. 1980. Cyanide-insensitive and cyanide-sensitive O_2 uptake in wheat. I. Gradient purified mitochondria. Plant Physiol. 66, 488-93.
- GOMEZ-RODRIGUEZ, M.V., LUNA DEL CASTILLO, J. y ALVAREZ-TINAUT, M.C. 1984. Phenylalanine-ammonia lyase activity and O-diphenolics content in sunflower leaves grown with different boron levels. 4th Congress Fed. Europ. Soc. Plant Physiol. Strasbourg, pp. 357-8.
- GOMEZ-RODRIGUEZ, M.V. 1984. Estudio de la evolución en el tiempo de algunos parámetros bioquímicos en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) cultivadas con distintos niveles de boro. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- GOPAL, N.H. 1970. antagonistic action of boron on copper in groundnut plants. Curr. Sci. 39, 44-45.
- GRECHKIN, A.N., GAFAROVA, T.E. y TARCHEVSKY, J.A. 1984. Linoleate Δ^15 -desaturase activity of pea leaf chloroplast is localized in thylakoids. In Structure, Function and Plant Lipids. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. 51-54. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

GRENIER, G. TREMOLIERES, A., THERRIEN, M.P. y WILLEMOT, C. 1973. Influence de froid sur la synthese des acides gras dans les racines de deux varietés de luzerne, l'une très resistente et l'autre moins resistente au froid. *Physiol. Veg.* 11, 253-265.

27 GROSSMAN, S. y LESHEM, Y. 1978. Lowering of endogenous lipoxygenase activity in *Fisum sativus* foliage by cytokinin as related to senescence. *Physiol. Plant* 43, 359-362.

GUPTA, U.C. 1979. Boron nutrition of crops. *Advances in Agronomy Vol. 1*, 273-307.

GURR, M.I. 1980. The biosynthesis of triacylglycerols. In *Biochemistry of Plants*. P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. *vol.4*, 205-48. Academic Press, New York.

6 GUY, M. y KBNDE, H. 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethilene by isolates vacuoles of *Fisum sativus* L. *Planta* 160, 281-287.

HACKETT, D.P., HAAS, D.W., GRIFFITHS, S.K. y NIEDERPRUEM, D.T. 1960. Studies on the development of cyanide resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* 37, 8-19.

26 HALLIWELL, B. 1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In *Superoxide dismutase. Vol. 1*, pp. 89-123. L. Oberly ed. CRC Press, Boca Raton. FL.

HARMAN, D. 1981. The aging process. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78, 7124-28.

HARWOOD, J.L. y STUMPF, P.K. 1970. Biosynthesis of lipids in higher plants. XL. Synthesis of fatty acids in the initial stage of seed germination. *Plant Physiol.* 46, 500-8.

HARWOOD, J.L. 1975. Fatty acid biosynthesis. In *Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipid*. pp. 247-83. T. Galliard y E.J. Mercer. London Academic.

HARWOOD, J.L. 1976. Synthesis of molecular species of phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine by germinating soya bean. *Phytochemistry*, 15, 1459-63.

HARWOOD, J.L. 1980. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. In *The Biochemistry of Plant*, Vol. 4, pp. 1-55. P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. Academic Press. New York.

HARWOOD, J.L. 1983. Adaptative changes in the lipids of higher plant membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 343-6.

HARWOOD, J.L. 1984. Effects of the environment on the acyl lipids of the algae and higher plants. In *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp. 543-551. Elsevier Publisher B.V. Amsterdam.

HAWKE, J.L., STUMPF, P.K. 1980. The incorporation of oleic and linoleic acids and their desaturation products into the glycerolipids of maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 296-306.

HEEMSKERK, J.W.M., BÖGEMANN, G. y WINTERMANS, J.F.G.M. 1982. Some observations on the biosynthesis of galactolipids by intact chloroplasts. In *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 197-200. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

HEINZ, E. 1977. Enzymatic reaction in galactolipid biosynthesis. In *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. M. Tevini y H.K. Lichtenthaler eds. pp. 102-20. Berlin Springer.

HEINZ, E. y HARWOOD, J.L. 1977. Incorporation of carbon dioxide, acetate and sulphate into the glycerolipids of *Vicia faba* leaves. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 358, 897-908.

HEINZ, E. y ROUGHAN, P.G. 1982. *De novo* synthesis, desaturation and adquisition of monogalactosyl diacylglycerol by chloroplast from 16:3 and 18:3 plants. In *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 168-82. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

HEINZ-DETLEF, G. 1977. Lipid composition of *Daucus carota* roots. *Phytochemistry* 16, 953-5.

- HENRY, M.H. y NYNS, E.J. 1975. Cyanide-insensitive respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* 35, 8-19.
- HERICH, R. y HUDAK, J. 1977. Differentiation of atypical mitochondria induced by boron application. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 28, 351-3.
- (X) HEWITT, E.J. 1963. The essential nutrient elements: requirements and interactions in plants. In *Plant Physiol. Vol. III*. F.C. Steward ed. Academic Press. London.
- HIRSCH, A.M. y TORREY, J.G. 1980. Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can. J. Bot.* 58, 856-66.
- HIRSCH, A.M., PENGELLY, W.L. y TORREY, J.G. 1982. Endogenous IAA levels in boron deficient and control root tips of sunflower. *Bot. Gaz.* 143, 15-19.
- HITZ, W.D., RHODES, D. y HANSON, A.D. 1981. Radiotracer evidence implicating phosphoryl and phosphatidyl bases as intermediates in betaine synthesis by water-stressed leaves. *Plant Physiol.* 68, 814-22.
- (M) HOGSETT, W.E., RABA, R.M. y TINGEY, D.T. 1981. Biosynthesis of stress ethylene in soybean seedlings: similarities to endogenous ethylene biosynthesis. *Physiol. Plant* 53, 307-314.
- HOFFMAN, N.E., YANG, S.F., ICHIHARA, A. y SAKAMURA, S. 1982. Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by plants tissues. conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane carboxylic acid to 1-butene. *Plant Physiol.* 70, 195-99.
- HQJ, P.B. y MIKKELSEN, J.D. 1982. Partial purification and characterization of fatty acid synthetase from barley chloroplasts. In *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 17-20. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- HUANG, A.H.C. y MOREAU, R.A. 1978. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. *Planta* 141, 111-116.
- HUBER, D.J. y NEWMAN, D.W. 1976. Relations between lipid changes and plastid ultrastructural changes in senescing and regreening soybean cotyledons. *J. Exp. Bot.* 27, 98, 490-511.

HUDAK, J. 1974. Morphological changes in *Helianthus annuus* cv. slovenka siva, under the influence of exogenously added boron. *Physiol. Plant.* 9, 21-29.

HUDAK, J. 1976. Effect of boron on the submicroscopic structure of chloroplast. *Acta Slovaca* 1, 451-462.

HUDAK, J. y HERICH, R. 1976. Effect of boron on the ultrastructure of sunflower chloroplast. *Photosynthetica* 10, 4, 463-465.

HUDAK, J. 1977a. Study of the influence of boron on the submicroscopic structure of the stem tips of *Vicia faba* L. *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comeninae. Physiol. Plant.* 13, 23-28.

HUDAK, J. 1977b. Influence of boron on the submicroscopic structure of the endoplasmic reticulum. *Physiol. Plant.* 13, 15-22.

HURT, G.B. y AXELROD, B. 1977. Characterization of two isoenzymes of lipoxygenase from bush beans. *Plant Physiol.* 59, 695-700.

ICHIHARA, K. y NODA, M. 1981. Lipid synthesis in germinating safflower seeds and protoplasts. *Phytochemistry* 20, 5. 1023-1030.

① IMASEKI, A. y WATANABE, A. 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* 19, 345-48.

② INOUE, S. 1984. Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Lett.* 172, 2, 231-234.

ISHIZUKA, I. y YAMAKAWA, T. 1985. Glycoglycerolipids. *In Glycolipids.* Wiegandt ed. pp. 101-196. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

JACKSON, J.F. y CHAPMAN, K.S.R. 1975. The role of boron in plants. *In Trace Elements in Soil-Plant-Animal System.* D.D.J. Nicholas y A.R. Egan eds. Academic Press. London.

JACOBSON, B.S. y STUMPF, P.K. 1972. Fat metabolism in higher plants. LV. Acetate uptake and accumulation by class I and II chloroplasts from *Spinacia oleracea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 2, 656-663.

- JAMES, T.W. y SPENCER, M.S. 1979. Cyanide-insensitive respiration in pea cotyledons. *Plant Physiol.* 64, 431-34.
- JARVIS, B.C., ALI, A.H.N. y SHAHEED, A.I. 1983. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mungbean cuttings. ^{The}*New Phytol.* 95, 509-518.
- JIMENEZ, F., DONAIRE, J.P. y AGUILAR, A. 1978. Influencia del boro y del ácido giberélico sobre la transformación de lípidos en glúcidos durante la germinación de semillas de girasol. *Rev. Esp. Fisiol.* 34, 269-272.
- JOHN, P. 1983. The coupling of ethylene biosynthesis to a transmembrane electrogenic proton flux. *FEBS Lett.* 152, 141-43.
- JOHNSON, K.D. y KENDE, H. 1971. Hormonal control of lecithin synthesis in barley aleurone cells: regulation of the CDP-choline pathway by gibberellin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2674-77.
- JOYARD, J. y DOUCE, R. 1976. L'enveloppe des chloroplastes est-elle capable de synthetiser la phosphatidylcholine ?. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* 282, 1915-18.
- JOYARD, J. y DOUCE, R. 1977. Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 486, 273-85.
- KADER, J.C. 1977. Exchange of phospholipids between membranes. *In Dynamics Aspects of Cell Surface Organization.* G. Poste y G.L. Nicholson, ed. pp. 127-204. Elsevier North Holland. Amsterdam.
- KADER, J.C., DOUADY, D., GROSBOIS, M., GUERBETTE, F. y VERGNOLLE, C. 1984. The role of intracellular lipid movements in membrane biogenesis. *In Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids.* P.A. Siegenthaler y W. Einchenberger eds. pp. 283-291. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- KATBS, M. 1960. Chromatographic and radioisotopic investigations of the lipid components of rummer bean leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 41, 315-328.
- KIMMERER, T.W. y KOZLOWSKI, T.T. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol.* 69, 840-47.
- KINDL, H. y LAZAROW, P.B. 1982. Peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 289, 1325-1328.

KLEIN, B.P., COHEN, B., GROSSMAN, S., KING, D., MALOVANY, H. y PINSKY, A. 1985. Effect of modification of soybean lipoxygenase-1 with N-bromosuccinimide on linoleate oxidation, pigment bleaching and carbonyl production. *Phytochemistry* 24, 9, 1903-1906.

KOBR, M.J. y BEEVERS, H. 1968. Distribution of gluconeogenic enzymes in the castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 43, 517.

KONRBERG, H.L. y BEEVERS, H. 1957. The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor bean. *Biochem. Biophys. Acta* 26, 531-537.

KONRBERG, H.L. y KREBS, H.A. 1957. Synthesis of cell constituents from C_2 -units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* 179, 988-91.

KONZE, J.R. y ELSTNER, E.F. 1976. Ethylene and ethane formation in leaf disks, plastids and mitochondria. *Ber. Deutsche Bot. Ges.* 89, 547-553.

KONZE, J.R. y KENDE, H. 1979. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of pea seedlings. *Planta* 146, 293-301.

KUNCE, C.M., TRELEASE, R.N. y DOMAN, D.C. 1984. Ontogeny of glyoxysomes in maturing and germinated cotton seeds a morphometric analysis. *Planta* 161, 156-164.

KOUCHI, H. y KUMAZAWA, K. 1975a. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. I. Effects of boron deficiency on elongation of root tips and their morphological characteristics. *Soil Sci. Plant Nutr.* 21, 137-150.

KOUCHI, H. y KUMAZAWA, K. 1975b. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. II. Effect of boron deficiency on the cellular growth and development in root tips. *Soil Sci. Plant Nutr.* 21, 137-150.

KOUCHI, H. y KUMAZAWA, K. 1976. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. III. Effect of boron deficiency on subcellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22, 53-71.

KROSING, M. 1978. Gervelekulturen unter Bormangel. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 141, 523-533.

KRUEGER, R.W., LOVATT, J., TREMBLAY, G.L. y ALBERT, L.S. 1979. The metabolic requirement of *Cucurbita pepo* for boron. *Plant Physiol.* 63, (Suppl.), 115.

KUIPER, P.J.C. 1968. Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiol.* 43, 1367-1371.

KUIPER, P.J.C., KÄHR, M., STUIVER, C.E.E. y KLYN, A. 1974. Lipid composition of whole roots and Ca^{2+} , Mg^{2+} -activated adenosine triphosphatases from wheat and oat as related to mineral nutrition. *Physiol Plant.* 32, 33-36.

KUIPER, D. y KUIPER, P.J.C. 1978. Lipid composition of the roots of *Plantago* species: response to alteration of the level of mineral nutrition and ecological significance. *Physiol Plant.* 44, 81-86.

KUIPER, P.J.C. 1985. Environment changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol. Plant.* 64, 118-122.

KUHN, D.N., KNAUF, M. y STUMPF, P.K. 1981. Subcellular localization of acetyl-CoA synthetase in leaf protoplast of *Spinacea olearacea*. *Biochem. Biophys.* 209, 441-450.

LAMBERS, H. 1980. The physiological significance of cyanide resistant respiration. *Plant Cell Environ.* 3, 293-302.

LAMBERS, H. 1982. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorilating electron transport pathway acting as an overflow. *Physiol. Plant.* 55, 478-485.

LECHEVALLIER, D. 1966. Les lipides des Lemnacées: analyse des acides gras des lipides des frondes de *Spirodela polyrrhiza*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 263, 1489-1852.

LEE, S.G. y ARONOFF, S. 1966. Investigations on the role of boron in plants. III. Anatomical observations. *Plant Physiol.* 41, 1570-1577.

LEE, S. y ARONOFF, S. 1967. Boron in plants: a biochemical role. *Science* 158, 788-799.

46 LEES, G.L. y THOMPSON, J.E. 1980. Lipid composition and molecular organization in plasma membrane-enriched fractions from senescing cotyledons. *Physiol. Plant.* 49, 215-221.

4 LEGGE, R.L., THOMPSON, J.E. y BAKER, J.E. 1982. Free radical mediated formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a spin-trap study. *Plant Cell Physiol.* 23, 171-177.

LEGGÉ, R.L. y THOMPSON, J.E. 1983. Involvement of hydroperoxides and an ACC-derived free radical in the formation of ethylene. *Phytochemistry* 22, 2161-2166.

LEOPOLD, A.C. 1975. Aging, senescence and turnover in plants. *Bioscience* 25, 659-662.

3) LEOPOLD, A.C. 1980. Aging and senescence in plant development. In *Senescence in Plants*. K.V. Thimann ed. pp. 1-12. CRC Press, Boca Raton, FL.

LEPAGE, M. 1967. Identification and composition of turnip root. *Lipids* 2, 244-250.

2) LESHEM, Y.Y. 1981. Oxy free radicals and plant senescence. *What's New Plant Physiol.* 12, 1-4.

33) LESHEM, Y.Y. 1984. Interaction of cytokinin with lipid-associated oxy free radicals during senescence: a prospective mode of cytokinin action. *Can J. Bot.* 62, 2943-2949.

34) LESHEM, Y.Y., SIDHARA, S. y THOMPSON, J.E. 1984. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage. *Plant Physiol.* 75, 329-335.

LESSIRE, R., JUGUELIN, H., MOREAU, P. y CASSAGNE, C. 1985. Elongation of acyl-CoAs by microsomes from etiolated leek seedlings. *Phytochemistry* 24, 6, 1187-1192.

LIEBERMAN, M. y MAPSON, L.W. 1964. Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* 204, 343-45.

37) LIEBERMAN, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 533-591.

35) LIEBERMAN, M. y WANG, S.Y. 1982. Influence of calcium and magnesium on ethylene production by apple tissue slices. *Plant Physiol.* 69, 1150-55.

LIN, Y.H., MOREAU, R.A. y HUANG, A.H.C. 1982. Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 70, 108-112.

LIN, J.H., WIMER, L.T. y HUANG, A.H.C. 1983. Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Plant Physiol.* 73, 460-463.

LONGO, G.P. y LONGO, C.P. 1970. The development of glyoxysomes in maize scutellum. *Plant Physiol.* 46, 599-604.

LORD, J.M. 1976. Phospholipid synthesis and exchange in castor bean endosperm homogenates. *Plant Physiol.* 57, 218-23.

LOVATT, C.J., ALBERT, L.S. y TREMBLAY, G.C. 1981. Synthesis, salvage and catabolism of uridine nucleotides in boron-deficient squash roots. *Plant Physiol.* 68, 1389-1394.

⊗ LOVATT, C.J. y BATES, L.M. 1984. Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *J. Exp. Bot.* 35, 297-305.

LOVATT, C.J. y DUGGER, W.M. 1984. Boron. In *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*. E. Frieden ed. pp. 389-421. Plenum Publishing Corporation.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

LURIE, S. y BEN-ARIE, R. 1983. Microsomal membrane changes during the ripening of apple fruit. *Plant Physiol.* 73, 636-638.

LULAI, F.C., BAKER, C.W. y ZIMMERMAN, D.C. 1981. Metabolism of linoleic acid by barley lipoxygenase and hydroperoxide isomerase. *Plant Physiol.* 68, 950-955.

Ⓐ LURSEN, K., NAUMANN, K. y SCHROEDER, R. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid. An intermediate of ethylene biosynthesis in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 285-294.

Ⓟ LYNCH, D.V. y THOMPSON, J.E. 1984. Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion during plant senescence. *FEBS Lett.* 173 251-254.

Ⓡ LYNCH, D.V., SIDHARA, S. y THOMPSON, J.E. 1985. Lipoxygenase-generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnations. *Planta* 164, 121-125.

MACEY, M. y STUMPF, P.K. 1983. β -oxidation enzymes in microbodies from tubers of *Helianthus tuberosus*. Plant Sci. Lett. 28, 207-212.

MACEY, M. 1983. β -oxidation and associated enzyme activities in microbodies from germinating peas. Plant Sci. Lett. 30, 53-60.

MAESHIMA, L.H. y ASAHI, T. 1984. Suppression by exogenous phospholipids of cyanide-insensitive respiration of submitochondrial particles from sweet potato root tissues. Plant Cell Physiol. 25, 6, 999-1008.

MANGOLD, H.K. 1961. Thin layer chromatography of lipids. J. Am. Oil Chemist Soc. 38, 708-727.

MARKWELL, M.A., MASSA, S.M., BIEBER, L. y TOLBERT, N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87, 206-210.

MARRIOTT, K.M. y NORTHCOTE, D.H. 1975. The induction of enzyme activity in the endosperm of germinating castor bean. Biochem. J. 152, 65-70.

MARSHALL, M.O. y KATES, M. 1973. Biosynthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidycholine in spinach leaves. FEBS Lett. 31, 199-202.

MARTIN, E.M. y MORTON, R.K. 1956. Enzymatic and chemical properties of cytoplasmic particles from wheat roots. Biochem. J. 64, 687-693.

MATOBA, T., HIDAKA, H., NARITA, H., KITAMURA, K., KAIZUMA, W. y KITO, M. 1985. Lipooxygenase-2 isozyme is responsible for germination of n-hexanal in soybean homogenate. J. Agric. Food Chem. 33, 852-855.

11 MAYAK, S., LEGGE, R.L. y THOMPSON, J.E. 1981. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. Planta 153, 49-55.

29 MAYAK, S., LEGGE, R.L. y THOMPSON, J.E. 1983. Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: an effect on membrane fluidity. Phytochemistry 22, 1375-1380.

MAZLIAK, P. 1968. Le metabolisme des lipides dans les plantes superieures. Paris Masson. 223 pp.

MAZLIAK, P., DE COTTE, A.M. y KADER, J.C. 1977. Effect of heavy metals (lead, cadmium and mercury) upon oleyl-CoA desaturase. *Chem. Biol. Interactions* 16, 115-119.

MAZLIAK, P., JOLLIOT, A. y BONNEROT, C. 1982. Biosynthesis and metabolism of phospholipids. *In Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Wintermans and P.J.C. Kuiper eds. pp. 89-98. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

MAZLIAK, P. y TCHANG, F. 1983. Installation et utilisation des réserves lipidiques dans les graines oléagineuses. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 130, Actual Bot. 3/4, 49-56.

10) McKEON, T.A. y YANG, S.F. 1984. A comparison of the conversion of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid stereoisomers to 1-butene by pea epicotyls and by a cell free system. *Planta* 160, 84-87.

13) McKERSIE, B.D., THOMPSON, J.E. y BRANDON, J.K. 1976. X-ray diffraction evidence for decreased lipid fluidity in senescent membranes from cotyledons. *Can. J. Bot.* 54, 1074-1078.

15) McKERSIE, B.D., LEPOCK, J.R., KRUVU, J. y THOMPSON, J.E. 1978. The effects of cotyledon senescence on the composition and physical properties of membrane lipid. *Biochem. Biophys. Acta* 508, 197-212.

9) McKERSIE, B.D. y THOMPSON, J.E. 1979. Phase properties of senescing plant membranes. Role of the neutral lipids. *Biochem. Biophys. Acta* 500, 48-58.

16) McMURCHIE, E.J., McGLASSON, W.B. y EAKS, L.L. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237, 235-236.

11) McRAE, D.G., THOMPSON, J.E. y BAKER, J. 1982. Evidence for the involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant Cell Physiol.* 23, 375-383.

MENGEL, K. y KIRKBY, E.A. (eds.) 1978. *Principles of Plant Nutrition* International Potash Institute. Bern Switzerland pp. 483-494.

MESQUITA, J.F. 1972. Ultrastructure des formations comparables aux vacuoles autophagiques dans les cellules des racines de l'*Allium cepa* L. et du *Lupinus albus* L. *Cytol.* 37, 95-110.

METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A. y PELKA, J.R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38, 514-515.

METTLER, I.J. y BEEVERS, H. 1980. Oxidation of NADH in glyoxysomes by a malate-aspartate shuttle. *Plant Physiol.* 66, 555-560.

MILLER, M.G. y OBENDORF, R.L. 1981. Use of tetraethylthiuram disulfide to discriminate between alternative respiration and lipoxygenase. *Plant Physiol.* 67, 962-964.

MITCHELL, R., McLANAHAN, J., HURT, D., BALGARN, D. y NEWMAN, D.W. 1974. Fatty acids of roots of selected species. *The Ohio J. Sci.* 74, 3, 150-154.

MITSUDA, H., YASUMOTO, K. y YAMAMOTO, A. 1967. Inhibition of lipoxygenase by saturated monohydric alcohols through hydrophobic bindings. *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 664-669.

MONTAGUE, M.J. y RAY, P.M. 1977. Phospholipid-synthesizing enzymes associated with Golgi dictyosomes from pea tissue. *Plant Physiol.* 59, 225-230.

MOORE, H.M. y HIRSCH, A.M. 1983. Effects of boron deficiency on mitosis and incorporation of tritiated thymidine into nuclei of sunflower root tips. *Amer. J. Bot.* 70, 2. 165-172.

MOORE, T.S., LORD, J.M., KAGAWA, T. y BEEVERS, H. 1973. Enzymes of phospholipid metabolism in the endoplasmic reticulum of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 52, 50-53.

MOORE, T.S. 1976. Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 57, 383-386.

MOORE, T.S. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 235-259.

MOORE, T.S. y TROYER, G.D. 1983. Phospholipid metabolism. *In Biosynthesis and Function of Plant Lipids.* J.B. Mudd y Gibbs eds. pp. 16-27. 6th Am. Soc. Plant Physiology. Rocville.

MOORE, T.S., MOLLY, J.R., PRICE-JONES, J. y HARWOOD, J.L. 1983. The effect of indoleacetic acid on phospholipid metabolism in pea stems. *Phytochemistry* 22, 11, 2421-2425.

MOORE, T.S. 1984. Biochemistry and biosynthesis of plant acyl lipids. In *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp. 83-93. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

MOREAU, R.A. y STUMPF, P.K. 1982. Solubilization and characterization of an acyl-coenzyme A: *o*-lysophospholipid acyltransferase from the microsomes of developing safflower seeds. *Plant Physiol.* 69, 1293-1297.

MOROHASHI, Y. y MATSUSHIMA, H. 1983. Appearance and disappearance of cyanide-resistant respiration in *Vigna mungo* cotyledons during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 73, 82-86.

MORRE, D.J., NYQUIST, S. y RIVERA, E. 1970. Lecithin biosynthetic enzymes of onion stem and the distribution of phosphorylcholine-cytidyl transferase among cell fractions. *Plant Physiol.* 45, 800-804.

MORRE, D.J. 1975. Membrane biogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 441-481.

MORRIS, L.J. y MARSHALL, M.O. 1966. Occurrence of *cis,trans*-linoleic acid in seed oils. *Chem. Ind. (London)* 35, 1493-1494.

MORRISON, W.R. 1984. Plants lipids. *Res. Food Sci. Nutr.* 5, 247-260.

MUDD, J.B. 1980. Phospholipid biosynthesis. In *The Biochemistry of Plants Vol. 4*, P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. pp. 250-282. Academic Press. New York.

34 MUKHERJEE, S.P. y CHOUDHURI, M.A. 1985. Implication of hidrogen peroxide-ascorbate system of membrane permeability of water stressed *Vigna* seedlings. *New Phytol.* 99, 355-360.

MURPHY, D.J. y STUMPF, P.K. 1979. Elongation pathway for a linolenic acid synthesis in spinach leaves. *Plant Physiol.* 64, 428-430.

MURPHY, D.J. y STUMPF, P.K. 1980. *In vivo* pathway of oleate and linoleate desaturation in developing cotyledons of *Cucumis sativus* L. seedlings. *Plant Physiol.* 66, 666-671.

MURPHY, D.J., WOODROW, F.E., LATZKO, E. y MUKHERJEE, S.P. 1983. The oleate desaturase system of pea leaf microsomes: solubilisation of oleoyl-CoA

thioesterase, oleoyl-CoA: phosphatidylcholine acyltransferase desaturase. FEBS Lett. 162, 442-446.

MURPHY, D.J., LATZKO, E., WOODROW, J.E. y MUKHERJEE, K.D. 1984. The oleate desaturase system of pea leaf microsomes. In Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. P. A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp. 45-50. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

MURPHY, D.J., HARWOOD, J.L., LEE, K.A., ROBERTO, F., STUMPF, P.K. y JOHN, B.J. 1985. Differential responses of a range of photosynthetic tissues to a substituted pyridazinone, Sandoz 9785. Specific effects on fatty acid desaturation. Phytochemistry 24, 9, 1923-1929.

MUTO, S.M. y BEEVERS, M. 1974. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. Plant Physiol. 54, 23-28.

NABORS, L., MORGAN, M.S., NEWMAN, D. y JAWORSKI, J.G. 1984. Preferential metabolism of linoleic acid by five-day-old barley shoots. Lipids. 19, 7, 507-514.

NEALES, T.F. 1980. Some effects of boron on root growth. Aust. J. Biol. Sci. 13, 232-248.

NEWMAN, J.C. y BRIGGS, D.F. 1976. Glycerid metabolism and gluconeogenesis in barley endosperm. Phytochemistry 15, 1453-1458.

39 NICHOLS, R. y FROST, C.E. 1985. Wound-induced production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and accelerated senescence of *Petunia* corollas. Sci. Horst. 26, 47-55.

NIELSEN, F.H. 1984. Possible role for boron in animals. Micronutr. News. 5, 1, 3.

NISHIMURA, M. y BEEVERS, M. 1979. Subcellular distribution of gluconeogenic enzymes in germinating castor bean endosperm. Plant Physiol. 64, 31-37.

4 NOODEN, L.D. 1980. Senescence in the whole plant. In Senescence in Plants. K. W. Thimann ed. CRC Press. Boca Raton. FL. pp. 219-258.

OLHROGGE, J.B., SHINE, W.E. y STUMPF, P.K. 1978. Characterization of plant acyl-ACP and acyl-CoA hydrogenases. Arch. Biochem. Biophys. 189, 382-391.

OLHROGGE, J.B., KUHN, K.N. y STUMPF, P.K. 1979. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplast of *Spinacia oleracea* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1194-1198.

OHLROGGE, J.B. y KUO, T.M. 1984. Acyl carrier protein: central cofactor for plant fatty acid metabolism. What's New Plant Physiol. 15, 11, 41-44.

OHLROGGE, J.B. y KUO, T.M. 1985. Plants have isoforms for acyl carrier protein that are expressed differently in different tissues. J. Biol. Chem. 260, 13, 8032-8037.

OHNISHI, J. y YAMADA, M. 1980. Glycerolipid synthesis in *Avena* leaves during greening of etiolated seedlings. II. α -Linolenic acid synthesis. Plant Cell Physiol. 21, 1607-1618.

ONISHI, J. y YAMADA, M. 1982. Glycerolipid synthesis in *Avena* leaves during greening of etiolated seedling. III. Synthesis of α -linoleoyl-monogalactosyl diacylglycerol from liposomal linoleoyl-phosphatidylcholine by *Avena* plastids in the presence of phosphatidylcholine-exchange protein. Plant Cell Physiol. 23, 5, 767-773.

ONO, T.A. y MURATA, N. 1982. Chilling-susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. III. Lipid phase of cytoplasmic membrane. Plant Physiol. 69, 125-129.

ORY, R.L., YATSU, L.Y. y KIRCHER, H.W. 1968. Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. Arch. Biochem. Biophys. 264, 255-264.

ORY, R.L. 1969. Acid lipase of the castor bean. Lipids 4, 177-185.

OURSEL, A., LAMANT, A., SALSAC, L. y MAZLIAK, PP. 1973. Etude comparée des lipides et de la fixation passive du calcium dans les racines et les fractions subcellulaires du *Lupinus luteus* et de la *Vicia faba*. Phytochemistry 12, 1865-1874.

(X) PACHECO DE AGUIRRE, A.C., DANTAS, J.P., TERNANDA DE MORAES, M. y VIANNA DE AMORIM, M. 1977. The carbohydrate content and activity of polyphenol oxidase and peroxidase in bean plants *Vigna sinensis* var. Pitiuba, cultivated in a Hoagland and Arnon nutritive solution with and without boron. Agropec. Brasilia (Brasil) 69, 2, 45-49.

- (X) PARISH, R.W. 1969. Studies on the effect of calcium and boron on peroxidases on plant cell walls. *Z. Pflanzenphysiol.* 60, 211-216.
- (7) PARR, A.J. y LOUGHMAN, B.C. 1983. Boron and membrane functions in plants. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*. D.R. Robbs y W.S. Pierpoint eds. pp. 87-107. Academic Press. London.
- PAUL, Y., KAUR, S., y SHARMA, B.N. 1985. Effect of kinetin (6-furfuryl aminopurine) on changes in lipids in relation to growth of excised cotyledons of squashmelon (*Citrullus vulgaris* var. *fistulosus*). *Plant Sci.* 41, 193-198.
- (28) PAULS, K.P. y THOMPSON, J.E. 1980. *In vitro* simulation of senescence related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* 283, 504-506.
- PAULS, K.P. y THOMPSON, J.E. 1981. Effects of *in vitro* treatment with ozone on the physical and chemical properties of membranes. *Physiol. Plant* 53, 255-262.
- (3) PAULS, K.P. y THOMPSON, J.E. 1984. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* 75, 1152-1157.
- PEARCE, R.S. 1985. The membranes of slowly drought-stressed wheat seedlings: a freeze-fracture study. *Planta* 166, 1-14.
- PEDASH, F.I. y SEREDA, V.P. 1983. Effect of boron on the composition of free aminoacids in main organs of sunflower plants. *Vestn. Khar'k Univ.* 250, 58-62.
- (K) PETERMAN, T.K. y SIEDOW, J.N. 1983. Structural features required for inhibition of soybean lipoxygenase-2 by propyl gallate. Evidence that lipoxygenase activity is distinct from the alternative pathway. *Plant Physiol.* 71, 55-58.
- PILBEAM, D.J. y KIRKBY, E.A. 1983. The physiological role of boron in plants. *J. Plant Nutr.* 6, 7, 563-582.
- PISTORIUS, E.K. y AXELROD, B. 1974. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 249, 3183-3186.

PISTORIUS, E.K., AXELROD, B. y PALMER, G. 1976. Evidence for the participation of iron in the lipoxygenase reaction from optical and electron spin resonance studies. *J. Biol. Chem.* 251, 7144-7148.

(1) PLATT-ALOIA, K.A. y THOMSON, W.W. 1985. Freeze-fracture evidence of gel-phase lipid in membranes of senescing cowpea cotyledons. *Planta* 163, 360-369.

(6) POLLARD, A. S., PARR, A.J. y LOUGHMAN, B.C. 1977. Boron in relation to membrane function to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.* 28, 831-841.

POLLARD, M.R. y STUMPF, P.K. 1980. Long chain fatty acid biosynthesis in developing seeds of *Tropaeolum majus*. *Plant Physiol.* 66, 641-48.

PRICE-JONES, M.S. y HARWOOD, J.L. 1983. Hormonal regulation of phosphatidylcholine synthesis in plants. *Biochem. J.* 216, 627-631.

PRICE-JONES, M.J. y HARWOOD, J.L. 1985. Purification of CTP: cholinephosphate cytidyltransferase from pea stems. *Phytochemistry* 24, 11, 2523-2527.

PULICH, W.M. 1978. Photocontrol of born metabolism in sea grasses. *Science* 200, 319-320.

(14) QUINN, P.J. y WILLIAMS, W.P. 1978. Plants lipids and their role in membrane function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24, 109-173.

(21) RABINOWITCH, H.D. y FRIDOVICH, I. 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochem. Photobiol.* 37, 6, 679-690.

RAISON, J.K. 1980. Membrane lipids: structure and function. *In the Biochemistry of Plants Vol. 4.* P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. pp. 57-83. Academic Press. New York.

RAJARATNAM, J.A. y LOWRY, J.B. 1974. The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guineensis*). *Ann. Bot.* 38, 193-200.

RAMASARMA, T. y WETTER, L. 1957. Choline kinase of rapeseed (*Brassica campestris* L.). *Can. J. Biochem. Physiol.* 35, 853-863.

RAPP, B.J. y RANDALL, D.D. 1980. Pyruvate dehydrogenase complex from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 65, 314-318.

REID, E.E., THOMPSON, P., LYTTLE, C.R., DENNIS, D.T. 1977. Pyruvate dehydrogenase complex from higher plant mitochondria and proplastids. *Plant Physiol.* 59, 5, 842-8.

REYNOLD, E.S. 1962. The use of lead citrate at high a pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.

ROBERTSON, G.A. y LOUGHMAN, B.C. 1974. Modification of phosphate transport in *Vicia faba* by boron deficiency, growth regulators and metabolic inhibitors. In *Membrane Transport in Plants*. U. Zimmerman y I. Dainty. pp. 444-449. Springer, Berlin.

ROHWER, F. y MADER, M. 1981. The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Z. Pflanzenphysiol.* 104, 363-372.

ROSSIGNOL, M. 1976. Composition lipidique des racines de diverses especes cultivées. *Phytochemistry* 15, 1893-1896.

ROSSIGNOL, M., THOMAS, P. y GRIGNON, C. 1982. Proton permeability of liposomes from natural phospholipids mixtures. *Biochem. Biophys. Acta* 684, 195-199.

ROTH-BEJERANO, N. e ITAI, C. 1981. Effect of boron on stomatal opening in epidermal strips of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.* 52, 302-304.

ROUGHAN, P.G., MUDD, J.B., McMANUS, T.T. y SLACK, C.R. 1979. Linoleic and α -linolenate synthesis by isolated spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 184, 571-574.

ROUGHAN, P.G. y SLACK, C.R. 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 97-132.

ROWLEY, D.A. y HALLIWELL, B. 1985. Formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of copper salts. *J. Inorg. Biochem.* 23, 103-108.

- SANCHEZ, J., y STUMPF, P.K. 1984. The effect of hypolipidemic drugs WY14643 and DH990, and lysophospholipids on the metabolism of oleate in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 1, 185-196.
- SANDMANN, G. y BÖGER, P. 1982. Volatile hydrocarbons from photosynthetic membranes containing different fatty acids. *Lipids* 17, 1, 35-41.
- SASTRY, P.S. y KATES, M. 1966. Biosynthesis of lipids in plants. II. Incorporation of glycerophosphate ^{32}P into phosphatides by cell-free preparations from spinach leaves. *Can. J. Biochem.* 44, 459-467.
- SATLER, S.O. y THIMANN, K.V. 1983. Metabolism of oat leaves during senescence. VII. The interaction of carbon dioxide and other atmospheric gases with light in controlling chlorophyll loss and senescence. *Plant Physiol.* 71, 67-70.
- SAUER, A. y HEISE, K.P. 1983. On the light dependence of fatty acid synthesis in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 73, 11-15.
- SCHONBAUM, G.R., BONNER, W.D., STOREY, B.T. y BAHR, J.T. 1971. Specific inhibition of cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* 47, 124-128.
- SCHUH, B. y GERHARDT, B. 1984. Size of the microbody population in sunflower cotyledons during the transition in cotyledonary microbody. *Z. Pflanzenphysiol.* 114, 477-484.
- SEKIYA, J., KAGIWARA, T., MUNESHIKA, K. y HATANAKA, A. 1983. Distribution of lipooxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. *Phytochemistry* 22, 9, 1867-1869.
- SEXTON, R. y WOOLHOUSE, H.W. 1984. Senescence and abscission. In *Advances Plant Physiol.* M.E. Wilkins ed. pp. 469-497. Pitman Press. Bath.
- SHIMAKATA, T. y STUMPF, P.K. 1982a. The procaryotic nature of the fatty acid synthetase of the developing *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 144-154.
- SHIMAKATA, T. y STUMPF, P.K. 1982b. Fatty acid synthetase of *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* 69, 1257-1262.
- SHKOL'NIK, M.Y. y KOPMAN, I.V. 1970. Effect of boron on the phospholipid level in the sunflower and the possible role of this element in the

structural organization of a cell. Tr. Bot. Inst. Akad. Nauk. USSR. 20, 108-113.

SHKOL'NIK, M.Y. 1974. General conception of the physiological role of boron in plants. Soviet Plant Physiol. 21, 140-150.

SHKOL'NIK, M.Y. y IL'INSKAYA, N.L. 1975. Effect of boron deficiency on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in plants with different boron requirements. Soviet Plant Physiol. 22, 695-699.

SHKOL'NIK, M.Y. y MAEVSKAYA, A.N. 1977. Differences insensitivity of various plant taxa to boron deficiency and their causes. Bot. Zh. 10, 1528-1540.

SHIMOKAWA, K. 1983. An ethylene-forming enzyme in *Citrus unshiu* fruits. Phytochemistry 22, 9, 1903-1908.

SHINE, W.E., MANCHA, M. y STUMPF, P.K. 1976. The function of acyl-thioesterases in the metabolism of acyl-coenzymes A and acyl-acyl carrier proteins. Arch. Biochem. Biophys. 172, 110-116.

SHIVE, J.B. y BARNETT, N.M. 1973. Boron deficiency effects of peroxidase, hydroxyproline, and boron in cell walls and cytoplasm of *Helianthus annuus* L. hypocotils. Plant Cell Physiol. 14, 573-583.

SIMON, E.W. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. New Phytol. 73, 377-420.

SKOK, J. 1958. The role of boron in the plant cell. In Trace Elements. C.A. Lamb, O.G. Bentley y J.M. Beattie eds. pp. 227-243. Academic Press. New York.

SKOK, J. 1968. Effects of brief withholding of essential elements on radiosensitivity of sunflower plants. Radial Bot. 8, 3, 245-250.

SLABAS, A.R., HARDING, J., HELLYER, A., SIDEBOTTOM, C., GWYNNE, H., KESSELL, R. y TOMBS, M.P. 1984. Enzymology of plant fatty acid biosynthesis. In Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp.3-11. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

SLACK, C.R., ROUGHAN, P.G., TERPSTRA, J. 1976. Some properties of a microsomal oleate desaturase from leaves. Biochem. J. 155, 71-80.

- SLACK, C.R., CAMPBELL, L.C., BROWSE, J.A. y ROUGHAN, P.G. 1983. Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta* 754, 10-20.
- SMYTH, D.A. y DUGGER, W.M. 1980. Effects of boron deficiency on ^{86}Rb uptake and photosynthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Plant Physiol.* 66, 692-695.
- SMYTH, D.A. y DUGGER, W.M. 1981. Cellular changes during boron-deficient culture of the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Plant Physiol.* 51, 111-117.
- SOLOMOS, T. y LATIES, G.G. 1976a. Induction by ethylene of cyanide-resistant respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 663-671.
- SOLOMOS, T. y LATIES, G.G. 1976b. Effects of cyanide and ethylene on the respiratory of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues. *Plant Physiol.* 58, 47-50.
- SOTTOCASA, G.L., ERNSTER, L., KUYLENSTIERNA, B. y BERGSTRAND, A. 1967. Occurrence of a NADH-cytochrome c reductase system in the outer membrane of rat liver mitochondria. In *Mitochondrial Structure and Compartmentation*. E. Wuagliariello, S. Papa, E.C. Slater y J.M. Tager eds. pp. 74-89. Bari Adriatica.
- SPARACE, S.A. y MOORE, T.S. 1979. Phospholipid metabolism in plant mitochondria. Submitochondrial sites of synthesis. *Plant Physiol.* 63, 963-972.
- SPARACE, S.A. y MOORE, T.S. 1981. Phospholipid metabolism in plant mitochondria. II. Submitochondrial sites of synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine. *Plant Physiol.* 67, 261-265.
- STEINER, A.A. 1961. A universal method for preparation nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil* 15, 134-154.
- STOBART, A.K., EL-HUSSEIN, S.A. y HAMMOND, J. 1982. Lipid metabolism in ageing leaves of dark-grown barley seedlings. *Phytochemistry* 21, 11, 2633-2640.
- STOBART, A.K., STYMNE, S. y GLAD, G. 1983. The synthesis of linoleate and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomes

of developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. Gila).
Biochem. Biophys. Acta 754, 292-297.

STOBART, A.K. y STYMNE, S. 1985. the regulation of the fatty acid composition of the triacylglycerols in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. *Planta* 163, 119-125.

STREET, H.E. y OPIK, H. 1984. Germination. In *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*. pp.4-25. E. Arnold Publisher Ltd. London.

STUIVER, C.E.E., KOK, L.J., HENDRIKS, A.E. y KUIPBER, P.J.C. 1982. The effect of salinity on phospholipid content and composition of two *Plantago* species, differing in salt tolerance. In *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Winternans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 455-458. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

STUMPF, P.K. y BARBER. G.A. 1956. Fat metabolism in higher plants. VII. Oxidation of fatty acids by peanut mitochondria. *Plant Physiol.* 31, 304-308.

STUMPF, P.K. 1962. Lipid Metabolism in higher plants. *Nature* 194, 1158-1160.

STUMPF, P.K. 1980. Biosynthesis of saturated and insaturated fatty acids. In *The Biochemistry of Plants Vol. 4*, P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. pp.117-204. Academic Press. New York.

STUMPF, P.K., SHIKAMATA, T., EATSWELL, K., MURPHY, D.J., LIEDVOGEL, B., OHLROGGE, J.B. y KUHN, D.N. 1982. Biosynthesis of fatty acids in a leaf cell. In *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. J.F.G.M. Winternans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 3-12. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

STUMPF, P.K. 1984. Fatty acid biosynthesis in higher plants. In *Fatty Acid Metabolism and its Regulation*. S. Numa ed. pp. 155-179. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

STYMNE, S. y GLAD, G. 1981. Acyl exchange between oleoyl-CoA and phosphatidylcholine in microsomes of developing soybean cotyledons and its role in fatty acid desaturation. *Lipids* 16, 298-305.

STYMNE, S., STOBART, A.K. y GLAD, G. 1983. The role of the acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-Carbon fatty acids and triacylglycerol

production in the microsomes of developing safflower seeds. *Biochem. Biophys. Acta* 752, 198-208.

STYMNE, S. y STOBART, K. 1984a. *Cis*-polyunsaturated fatty acid and triacylglycerol production in microsomal membranes from developing oil seeds. In *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger eds. pp.93-97. Elsevier Science Publisher. B.V.. Amsterdam.

STYMNE, S. y STOBART, A.K. 1984b. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* 223, 305-314.

STYMNE, S. y STOBART, A.K. 1985. Oil synthesis *in vitro* in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164, 101-104.

TAKAHAMA, V. 1985. Inhibition of lipoygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. *Phytochemistry* 24, 7, 1443-1446.

TANADA, T. 1974. Boron-induced bioelectric field change in mung bean hypocotil. *Plant Physiol.* 53, 775-776.

TANADA, T. 1978. Boron-key element in the actions of phytochrome and gravity ?. *Planta* 143, 109-111.

TANADA, T. 1982. Role of boron in the far-red delay of nyctinastic closure of *Albizzia* pinnules. *Plant Physiol.* 70, 320-321.

TANADA, T. 1983. Localization of boron in membranes. *J. Plant Nutr.* 6, 9, 743-749.

TANAKA, H. 1966. Boron requirement of higher plants as affected by the intensity of light. *J. Sci. Soil. Man. Japan* 37, 11, 563-567.

TAVENER, R.J.A. y LAIDMAN, D.L. 1972. Induction of lipase activity in the germination wheat grain. *Phytochemistry* 11, 3, 989-997.

TCHANG, F., ROBERT,, D. y MAZLIAK, P. 1980. Utilization des reserves lipidiques et formation de glyoxysomes et d'etioplastes dans les cotyledons de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Physiol. Veg.* 18, 117-130.

- TEVINI, M. 1971. Changes in phospho and glycolipids during greening of etiolated *Hordeum* seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* 66, 64-72.
- TEVINI, M. 1973. Formation of lipids following illumination of etiolated seedlings. *Proc. Int. Congr. Photosyn.* 3, 2471-2478.
- TEVINI, M. 1977. Light, function and lipids during plastid development. In *Lipids and Lipid Polymers in higher plants*. M. Tevini y H.K. Lichtenthaler eds. pp.121-145. Springer, Berlin.
- THEOLOGIS, A. y LATIES, G.G. 1980. Membrane-lipid breakdown in relation to the wound-induced and cyanide-resistant respiration in tissue slices. A comparative study. *Plant Physiol.* 66, 890-896.
- THEORELL, H., HOLMAN, R. T. y AKESON, A. 1947. Crystalline lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 14, 250-252.
- THIMANN, K.V. 1980. The senescence of leaves. In *Senescence in Plants*. K.V. Thimann ed. pp. 85-116. CRC Press. Boca Raton. FL.
- TIMASHOV, N.D. 1968. Effect of boron on oxidative phosphorylation and other biochemical properties of sunflower and barley mitochondria. *Fiziol. Rast.* 15, 4, 597-604.
- TIMASHOV, N.D. 1970. Effect of boron deficiency on respiration and ³²P esterification in intact sunflower tissues. *Sov. Plant Physiol.* 17, 838-844.
- TIMASHOV, N.D. 1977. Effect of boron deficiency on the incorporation of glucose-¹⁴C into fractions of polysaccharides of sunflower organ cell walls. *Vestn. Khar'k. Univ.* 158, 36-38.
- TORREY, J.G. 1965. Physiological bases of organization and development of the root. *Handb. Pflanzenphysiol.* 15, 1297-1327.
- TRELEASE, R. N. 1984. Biogenesis of glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 321-347.
- TRELEASE, R.N. y DOMAN, D.C. 1984. Mobilization of oil and wax reserves. In *Seed Physiology*. D.L. Murray ed. Vol. 2, pp. 201-245. Academic Press. Australia.
- TRMOLIERES, A. 1970. Les lipides des tissus photosynthetiques. *Anal. Biol.* 9, 133-156.

- TREMOLIERES, A. y LEPAGE, M. 1971. Changes in lipid composition during greening of etiolated pea seedling. *Plant Physiol.* 47, 329-334.
- TREWAVAS, A. J. 1982. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiol. Plant* 55, 60-72.
- VALANDON, L.R.G y KATES, M. 1984. Effect of perfluidone on metabolism of lipids in maize (*Zea mays* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Growth Regul.* 3, 111-120.
- VAN DER VENTER, H.A. y CURRIER, H.B. 1977. The effect of boron deficiency on callose formation and ¹⁴C translocation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Am. J.Bot.* 64, 861-865.
- VENIS, M.A. 1984. Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity. *Planta* 162, 85-88.
- VERHAGEN, J.G., VELDINK, A., EGMOND, M.R., Vliegenthardt, J.F.G., BOLDINGH, J. y VAN DERSTAR, J. 1978. Steady state kinetics of the anaerobic reactions of soybean lipoxygenase-1 with linoleic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 52, 369-379.
- VERNOOY-GERRITSEN, M., BOS, A.L.M., VELDINK, G.A. y Vliegenthardt, J.F.G. 1983. Localization of lipoxygenase 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol.* 73, 262-267.
- VICK, B. y BEEVERS, H. 1977. Phosphatidic acid synthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 59, 459-463.
- VICK, B. y BEEVERS, H. 1978. Fatty acid synthesis in endosperm of young castor bean seedlings. *Plant Physiol.* 62, 173-178.
- VICK, B.A. y ZIMMERMAN, D.C. 1982. Levels of oxygenated fatty acids in young corn and sunflower plants. *Plant Physiol.* 69, 1103-1108.
- VIKTOROV, D.P. 1975. Effect of boron and auxin-goup growth regulators on metabolisms of apple trees. *Fiziol. Fiz-Khim. Mekh. Regul. Obnenuuykh. Professov org.* 4, 15-19.
- VINKLER, C. y APELBAUM, A. 1983. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 162, 252-256.

VINKLER, C. y APELBAUM, A. 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in submitochondrial particles isolated from plants. FEBS Lett. 167, 64-68.

VIOQUE, A., ALBI, M.A. y VIOQUE, B. 1981. Role IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Phytochemistry 20, 1473-1475.

VLIEGENTHARDT, J.F.G. y VELDINK, G.A. 1977. On the mechanism of the reactions catalysed by plant lipoxygenases. Ann. Technol. Agric. 26, 2, 175-187.

VLIEGENTHARDT, J.F.G., VELDINK, G.A. VERHAGEN, J., SLAPPENDEL, S. y VERNOOY-GERRITSEN, M. 1982. Lipoxygenases, properties and mode of action. In Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids. J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper eds. pp. 265-274. Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.

VORBECK, M.L. y MARINETTI, G.V. 1965. Separation of glycosyldiglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. J. Lip. Res. 6, 3-6.

VOROB'EV, V.L.N. y PELKANOB, S.E. 1973. Possible effect of boron on the potassium-sodium permeability of membranes of the plant cells *Nitella syncarpa*. Khatov. Vodorski Ikh. Ispol'z Issled. Biol. Protessov Kletki Mater. USS. symp. pp. 394-403.

WAGNER, H. y MICHAEL, G. 1971. Influence of varied nitrogen supply on the production of cytokinin in the roots of sunflower plants. Biochem. Physiol. Pflanzen, 162, 147-158.

WANNER, G. y THEIMER, R.R. 1978. Membranes appendices of spherosomes (oleosomes). Possible role in fat utilization germinating oil seeds. Plant Physiol. 49, 937-943.

WANNER, G., FORMANEK, H. y THEIMER, R.R. 1981. The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells: ultrastructural evidence. Planta 151, 109-123.

WANNER, G., VIGIL, E.L. y THEIMER, R.R. 1982. Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark-grown watermelons (*Citrullus vulgaris* Schrad) seedlings. Planta 156, 314-325.

- WARDALE, D.A. y GALLIARD, T. 1975. Subcellular localization of lipoxygenase and lipolytic acyl-hydrolase enzymes in plants. *Phytochemistry* 14, 2323-2329.
- WARDALE, D.A. 1980. Lipid-degrading enzymes from potato tubers. *Phytochemistry* 19, 173-177.
- WAREING, A.J. Y LATIES, G.G. 1977. Dependence of wound-induced respiration in potato slices on the time restricted actinomycine-sensitive biosynthesis of phospholipids. *Plant Physiol.* 60, 5-10.
- WAREING, P.F. y PHILIPIS, I.D. 1978. *In The Control of Growth and Differentiation in Plants.* Pergamon Press, Oxford.
- WHARFE, J. y HARWOOD, J.L. 1979. Lipid metabolism in germinating seeds. Purification of ethanolamine kinase from soya bean. *Biochem. Biophys. Acta* 575, 102-111.
- WHITTINGTON, W.J. 1959. The role of boron in plant growth. II. the effect on the growth of the radicle. *J. Exp. Bot.* 10, 93-103.
- WILKINSON, M.C., LAIDMAN, D.L. y GALLIARD, T. 1984. Two sites of phosphatidylcholine synthesis in the wheat aleurone cell. *Plant Sci. Lett.* 35, 195-199.
- WOOD, C., McNEIL, P.H., BURGESS, N. y THOMAS, D.R. 1984. Carnitine long-chain acyltransferase and oxidation of palmitate, palmitoyl-coenzyme A and palmitoyl-carnitine by pea mitochondria preparations. *Planta* 161, 255-260.
- WOOD, BURGESS, N. y THOMAS, D.R. 1986. The dual location of β -oxidation enzymes in germinating pea cotyledons. *Planta* 167, 54-57.
- WULSTER, G.J., SACALIS, J.N. y JANES, H.W. 1984. Development of cyanide-resistant respiration in carnation flower petals. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 2, 202-206.
- YANG, S.F. y ADAMS, D.O. 1980. Biosynthesis of ethylene. *In The Biochemistry of Plants. Vol. 4.* P.K. Stumpf y E.E. Conn eds. pp.163-175. Academic Press. New York.
- YANG, S.F. 1981. Biosynthesis of ethylene and its regulation. *In Recent Advances of Fruit and Vegetables.* J. Friend y M.J.C. Rhodes eds. pp. 89-106. Academic Press. London.

38 YANG, S.F. y HOFFMAN, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev, Plant Physiol.* 35, 155-189.

39 YANG, S.F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. *HorstSci.* 20, 1, 41-45.

IX. ABREVIATURAS UTILIZADAS

A.....Almidón
 ACC.....Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
 AOA.....Acido aminooxiacético
 BHT.....Hidroxitolueno butilado
 AF.....Acido fosfatídico
 AGL.....Acidos grasos libres
 AVG.....Aminoetoxivinilglicina
 Brij W-1..... Eter de polioxietileno W-1
 BSA.....Albúmina bovina
 CP.....Cuerpo proteico
 Cr.....Cromosoma
 D.....Dictiosoma
 DAG.....Diacilglicerol
 DGDG.....Digalactosildiglicérido
 Dimetil
 POPOP.....2,2'-pFenilen-bis(4-metil-5-feniloxazol)
 DTT.....Ditiotreitol
 EFE.....Enzima sintetizante de etileno
 FC.....Fosfatidilcolina
 F-1,6-DP.....Fructosa 1,6-difosfato
 FI.....Fosfatidilinositol
 FID.....Detector de ionización de llama
 FL.....Fosfolípidos
 F-6P.....Fructosa-6-fosfato
 G.....Glioxisoma
 GL.....Glucolípidos
 HEPES.....Acido N-2 hidroxietil-piperazina N'-2 etanosulfónico
 i.....Inclusiones
 L.....Cuerpos lipídico
 LN.....Lípidos neutros
 M.....Mitocondria
 MAG.....Monoacilglicerol

MGDG.....Monogalactosildiglicérido
N.....Núcleo
Nu.....Nucleolo
OAA.....Acido oxalacético
P.....Plastidio
PC.....Pared celular
PEP.....Fosfoenolpiruvato
PPO.....2.5-difeniloxazol
PVP.....Polivinilpirrolidona
re.....Reticulo endoplasmático
SHAM.....Acido salicilhidroxámico
SOD.....Superóxido dismutasa
TAG.....Triacilglicerol
Tris.....Hidroximetilaminometano
V.....Vacuola
16:0.....Acido palmítico
18:0.....Acido esteárico
18:1.....Acido oléico
18:2.....Acido linoléico
18:3.....Acido linolénico