

**ESTUDIO DE LA RUTA BIOSINTETICA DEL ETILENO DURANTE EL
CRECIMIENTO DE EJES EMBRIONARIOS AISLADOS
DE SEMILLAS DE Cicer arietinum.**

M^a DEL MAR DELGADO CACERES

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**

1991



UNIVERSIDAD DE GRANADA
COMISION DE DOCTORADO

D. M^o del Mar Delgado Cárdenas de nacionalidad española con D.N.I. o Pasaporte n.º 52.541.136 nacido en Almería Provincia Jaén el día 5 de Junio de 19 65 (Licenciado, Ingeniero o Arquitecto) en Ciencias Sección Biología en 19 90, por la Universidad de Granada ha abonado la cantidad de pesetas Catorce mil quinientos catorce en letra 14.314.- en número

por derechos de expedición del TITULO OFICIAL DE DOCTOR en Ciencias Biológicas estudios que se han superado en el Departamento de Biología Vegetal dentro del Programa de Doctorado Fisiología del crecimiento y desarrollo en plantas supeoides y ha hecho constar su suficiencia en esta Universidad el día 25 de Junio de 19 91.

Lo que certificó a los efectos previstos en el artículo 13.2 del Real Decreto 185/1985 de 23 de enero (B.O.E. número 41 de 16 de febrero), en Granada a 27 de Junio de 19 91.



Sello de Secretaría

El Funcionario.

Núm. 118 folio 3

TIPO DE PRECIO	
1. Normal	<input checked="" type="checkbox"/>
2. Familia Numerosa	<input type="checkbox"/>
3. Premio Extraordinario	<input type="checkbox"/>
4. Reimpresión	<input type="checkbox"/>
5. Duplicado Gratuito	<input type="checkbox"/>
1.ª Categ.	<input type="checkbox"/>
2.ª Categ. Honor	<input type="checkbox"/>

En su caso:	
1. Extravío original	<input type="checkbox"/>
2. Deterioro	<input type="checkbox"/>
3. Rectificación	<input type="checkbox"/>
4. Cambio de nombre y/o apellido	<input type="checkbox"/>
5. Cambio Nacionalidad	<input type="checkbox"/>

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Estudio de la ruta biosintética del etileno durante el crecimiento de ejes
embrionarios aislados de semillas de Cicer arietinum.

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor
por la Licenciada en Ciencias
M^a del Mar Delgado Cáceres.

DIRECTOR:

Fdo: Dr. D. Angel J. Matilla Carro
Catedrático de Fisiología Vegetal.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

Esta Memoria de Licenciatura ha sido subvencionada por
la Dirección General de Investigación y Desarrollo
Tecnológico (Proyecto nº 87/0192).

Son muchas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo, a todas y cada una de ellas les doy el saludo al ver hoy finalizada esta Memoria.

Sin duda, es Angel Matilla Carro el responsable no sólo de esta Tesis Doctoral, sino del interés que ha despertado en mí la Fisiología Vegetal, ya que su apasionamiento en este campo se hace contagioso para quienes le rodean. Su capacidad de trabajo, su enorme paciencia y su asequibilidad hacen de él más que un jefe, un amigo.

A Trinidad Angosto Trillo y Milagros Bueno González, sin cuyo apoyo en los momentos en que sólo quedan los amigos, hubiera sido imposible la realización de este Trabajo.

A Isabel Sánchez Calle que me enseñó a dar los primeros pasos en este mundo; a Mercedes y Eduardo porque me echaron muchas manos. A Dolo y a Fatiha que vivieron conmigo la recta final.

Tengo que agradecer a Trinidad Angosto Trillo el enseñarme la técnica de extracción de ABA y el manejo del cromatógrafo gas-líquido. Gracias por estar conmigo y demostrarme tu confianza en mí en tantas ocasiones.

A Juan Manuel Caba Barrientos, una de las mejores personas a quien he tenido la suerte de conocer, por su amistad, su enorme paciencia, su apoyo, su amabilidad, su optimismo, ... por todo.

A Antonio Ocaña Cabrera, porque si he aprendido algo de informática, es gracias a él. A todos los miembros de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias, ya que todos ellos me han apoyado constantemente y me dieron su ayuda siempre que la necesité. A Dña. Carmen Lluch Plá, que además hizo posible mi estancia en Granada aquel año.

Al Dpto. de Bioquímica, de esta Facultad por la utilización de sus instalaciones. A José Luis Carrasco Giménez de la Unidad de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, por su ayuda con el contador de centelleo.

A D. Miguel Angel Albi Romero y José Maria Castellano que me presentaron a la ACC-sintasa, y que siempre me ayudaron en mis relaciones con ella. Asimismo, quiero dar las gracias Dña. Blanca Bioque y Juan Carlos Masculet que me ayudaron a resolver dudas sobre la EFE y a todos los amigos del Instituto de la Grasa de Sevilla por su cálida acogida.

A D. Alejandro Fernández Barrero, que me orientó en el trabajo de síntesis química e identificación del MACC. Quiero agradecer sinceramente la ayuda, simpatía y paciencia de Sofía Salido Ruíz, mi compañera del MACC, fue un trabajo interesante y agradable. Agradezco a José Miguel Ramos López el diseño informático de las fórmulas químicas. A Ignacio, Pablo, a los dos Armandos y a los demás miembros del Departamento de Química Orgánica, de la Facultad de Ciencias, que hicieron que mi estancia fuese más amena.

A Juan Moliz Medina y a la Dra. M. Esther Onorato Gutiérrez, de los Servicios Técnicos de esta Universidad, por su rápida colaboración en la realización de los espectros; si podemos decir que está es gracias a ellos.

A Cristina Alsina Alvarez, porque siempre ha estado conmigo. A Margarita Aragón Cortés, que me animó a continuar cuando todo parecía ponerse en contra. A Carolina, porque está ahí. A María, Curro, M^a del Mar, Carlos ... por su amistad.

A mis hermanos Asun, José Luis, Puri y Belén, por demostrarme cada día que son mi gente.

A mis padres.
A Enrique.

A mi abuela Lola.

Realmente, mi proceder no lo comprendo; pues no hago lo que quiero, sino que hago lo que aborrezco; puesto que no hago el bien que quiero, sino que obro el mal que no quiero (Romanos, 7, 15; 19).

Pues sabemos que la creación entera gime hasta el presente y sufre dolores de parto. Y no sólo ella; también nosotros, que poseemos las primicias del Espíritu, nosotros mismos gemimos en nuestro cuerpo. Porque nuestra salvación es en esperanza; y una esperanza que se ve, no es esperanza, pues ¿cómo es posible esperar una cosa que se ve? Pero esperar lo que no vemos, es aguardar con paciencia.

(Romanos 8, 22-25).

Porque de El, por El y para El son todas las cosas.

(Romanos 11, 35).

INDICE.

INTRODUCCION

1. FORMACION DE LA SEMILLA.

1.1 <u>Introducción</u>	2
1.2 <u>Estructura de la semilla</u>	3
1.3 <u>Embriogénesis</u>	6
1.4 <u>Maduración</u>	8

2. GERMINACION DE LA SEMILLA.

2.1 <u>Introducción</u>	9
2.2 <u>Factores que afectan a la germinación</u>	12
2.3 <u>Control</u>	14

3. REGULACION HORMONAL DE LA GERMINACION.

3.1 <u>Introducción</u>	16
3.2 <u>Giberelinas</u>	17
3.3 <u>Citoquininas</u>	18
3.4 <u>Auxinas</u>	18
3.5 <u>Acido abscísico</u>	19
3.6 <u>Poliaminas</u>	21
3.7 <u>Etileno</u>	25
3.7.1 <u>Biosíntesis.</u>	
3.7.1.1 <u>Localización</u>	27
3.7.1.2 <u>Ruta biosintética</u>	28
3.7.1.3 <u>Enzimas implicadas:</u>	
I.- <u>ACC-sintasa</u>	29
II.- <u>EFE</u>	33
III.- <u>N-malonil-ACC-transferasa</u>	38
3.7.1.4 <u>Control de biosíntesis de etileno</u>	41

3.7.2 Metabolismo	45
3.7.3 Modo de acción	49
<u>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO OBJETO DE ESTUDIO</u>	52
 <u>MATERIAL Y METODOS</u>	
1. MATERIAL VEGETAL	56
2. PREPARACION DEL MATERIAL	
2.1. <u>Esterilización del material fungible</u>	56
2.2. <u>Imbibición de las semillas</u>	56
2.3. <u>Obtención de los ejes embrionarios</u>	57
3. VALORACION DEL PESO FRESCO	57
4. PESO SECO Y PORCENTAJE DE AGUA	57
5. MINERALIZACION Y DETERMINACION DE LOS ELEMENTOS MINERALES	58
6. CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE ACTIVADORES O INHIBIDORES	59
7. EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA	60
8. DETERMINACION DE ETILENO.	
I. <u>Metodología</u>	60
II. <u>Medida del etileno liberado</u>	61
III. <u>Preparación de los patrones</u>	61
IV. <u>Instrumental</u>	61

V. <u>Expresión de los resultados</u>	61
9. DETERMINACION DE ACC LIBRE Y CONJUGADO	62
10. VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	
I. <u>ACC-Sintasa</u>	62
II. <u>N-Malonil-ACC-Transferasa</u>	63
III. <u>EFE</u>	63
11. IDENTIFICACION DEL ACC CONJUGADO.	
I. <u>Síntesis Química del MACC</u>	63
II. <u>Identificación del ACC Conjugado por Cromatografía de gases.</u>	
II.1- <u>Características del Cromatógrafo de Gases</u>	64
II.2- <u>Análisis de las muestras</u>	64
12. EXTRACCION Y ENSAYO DE LA ACTIVIDAD MACC-Hidrolasa .	65
13. VALORACION DE ABA.	
I.- <u>Extracción de ABA libre y ligado</u>	66
II. <u>Identificación del ABA</u>	67
III.- <u>Determinación del ABA por cromatografía gaseosa.</u>	
III.1- <u>Características del cromatógrafo</u>	68
III.2- <u>Análisis de las muestras</u>	68
III.3- <u>Cuantificación de las muestras</u>	68
14. REACTIVOS UTILIZADOS	69

RESULTADOS.

1. Crecimiento del eje embrionario aislado.

1.1. <u>Efecto del medio nutritivo sobre el crecimiento</u>	71
1.2. <u>Cinética del crecimiento</u>	72
1.3. <u>Efecto de SP, SPD y CV</u>	74
1.4. <u>Efecto del ABA</u>	76

2. Contenido iónico durante el crecimiento del eje aislado.

2.1. <u>Contenido en K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ y Pi</u>	77
2.2. <u>Efecto de las poliaminas</u>	78
2.3. <u>Efecto del ABA sobre el contenido en K⁺ y Ca⁺⁺</u>	83

3. Producción de etileno durante el crecimiento del eje embrionario.

3.1. <u>Evolución en la producción de gas</u>	84
3.2. <u>Efecto del pH y la composición del medio nutritivo</u>	85
3.3. <u>Efecto del Calcio (Cl₂Ca) sobre la producción de etileno.</u>	87
3.4. <u>Efecto de los inhibidores del crecimiento.</u>	

3.4.1. <u>Manitol, cicloheximida y 5-fluorouracilo.</u>	88
3.4.2. <u>Efecto de las altas temperaturas.</u>	90
3.4.3. <u>Efecto del ácido abscísico (ABA).</u>	91

3.5. Efecto de los activadores del crecimiento.

3.5.1. <u>Fusicoccina.</u>	93
3.5.2. <u>Poliaminas (PAs).</u>	95

4. <u>Cuantificación de los intermediarios de la ruta biosintética del etileno.</u>	
4.1. <u>Variación en el contenido de MACC.</u>	97
4.1.1. <u>Identificación de MACC en los ejes embrionarios.</u>	97
4.1.2. <u>Variación con la germinación.</u>	103
4.2. <u>Variación en el contenido de ACC.</u>	104
4.3. <u>Actividad ACC-sintasa durante la germinación.</u>	107
4.4. <u>Actividad MACC-transferasa y MACC-hidrolasa.</u>	108
4.5. <u>Actividad EFE durante la germinación.</u>	110
4.6. <u>Efecto del AVG.</u>	113
4.7. <u>Efecto del AOA.</u>	114
4.8. <u>Efecto del ABA en la ruta biosintética del etileno.</u>	
4.8.1. <u>Identificación del ABA extraído.</u>	116
4.8.2. <u>Cuantificación del ABA endógeno.</u>	119
4.8.3. <u>Efecto del ABA sobre los niveles de MACC y ACC (5 h).</u> ...	120
4.8.4. <u>Efecto del ABA sobre los niveles de</u> <u>MACC y ACC (7 horas)</u>	121
4.8.5. <u>Efecto del ABA sobre la actividad EFE.</u>	123
4.9. <u>Efecto de la espermina (SP) sobre</u> <u>el nivel de MACC y ACC (5 h.).</u>	123
<u>DISCUSION</u>	125
<u>CONCLUSIONES</u>	140
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	144

ABREVIATURAS

1- ABA	Acido abscísico.
2- AIB	Acido indolbutírico.
3- ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.
4- ADN	Acido desoxirribonucléico.
5- AIB	Acido indol butírico.
6- AIA	Acido indol acético.
7- AOA	Acido aminooxi-acético.
8- ARN	Acido ribonucléico.
9- ARNm	Acido ribonucléico mensajero.
10- ARNr	Acido ribonucléico ribosómico.
11- ARNt	Acido ribonucléico de transferencia.
12- AVG	Aminoetoxivinil-glicina.
13- BHT	2,6-Ditert-butil-p-fenol.
14- Cc.	Concentración.
15- CFE	Centro Formador de Etileno.
16- CG	Cromatografía de gases.
17- CH	Cicloheximida.
18- CV	Cadaverina.
19- DE	Desviación estandard.
20- EBP	Proteína de unión del etileno (Ethylene binding protein).
21- EFE	Enzima formadora de etileno.
22- EGTA	Etilen glicol (amino-etil-eter) tetraacético.
23- EM	Espectrometría de masas.
24- Fc	Fusicoccina.
25- Fig.	Figura.
26- FID	Detector de ionización de llama.
27- FU	5-Fluoruracilo.
28- g	Gramos.
29- h	Horas.
30- m	Metros.
31- MACC	Acido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico.
32- MDS	Mínimas diferencias significativas.
33- mg	Miligramos.

32- MDS	Mínimas diferencias significativas.
33- mg	Miligramos.
34- min	Minutos.
35- ml	Mililitros.
36- mm	Milímetros.
37- mM	Milimolar.
38- MS	Espectrometría de masas.
39- MSD	Mínimas diferencias significativas.
40- MTA	Metil-tio-adenosina.
41- MTR	Metil-tio-ribosa.
42- nl	Nanolitros.
43- nm	Nanometros.
44- nmol	Nanomoles.
45- PAs	Poliaminas.
46- PEG	Polietilenglicol
47- PEP	Fosfoenolpiruvato.
48- pmol	Picomoles.
49- ppm	Partes por milló...
50- POPOP	1,4-Bis-(2,4-metil-5-fenil-oxazolil)-benzeno
51- PPO	2,5-Fimetil-oxazol
52- Sac.	Sacarosa.
53- SAM	S-adenosil-metionina.
54- SP	Espermina.
55- SPD	Espermidina.
56- TU	Tiourea.
57- μ g	Microgramos.
58- μ l	Microlitros.
59- μ M	Micromoles.

INTRODUCCION

1. FORMACION DE LA SEMILLA

1.1. Introducción

En las plantas superiores, la semilla es el órgano que permite la dispersión, propagación y perpetuación de la especie, mediante su transformación en un nuevo individuo por el proceso de la germinación. Su estructura y fisiología están adaptadas para desempeñar el papel de unidad de dispersión, y posee reservas que sustentarán a la plántula hasta que ésta pueda establecerse como un organismo autosuficiente, autótrofo.

La formación de la semilla en el ciclo de vida de las plantas superiores es un proceso de adaptación único con el que se asegura que la planta madre sobreviva en la próxima generación. Así pues, con la semilla comienza, en las plantas superiores, la independencia de la nueva generación (Bewley y Black, 1982).

La semilla, una vez se ha formado en el proceso embriogénico, paraliza su crecimiento, acumula sustancias nutritivas en el tejido de reserva y finalmente se deseca. Para sobrevivir largos períodos de tiempo en este estado de desecación y, hasta que las condiciones medioambientales le sean favorables para germinar, las semillas han adquirido diversas formas de dormición.

Los estados que constituyen el desarrollo de una semilla y su germinación implican una regulación temporal y espacial del crecimiento de las células y tejidos que la forman.

Los niveles y actividades de varias hormonas cambian dramáticamente durante estos procesos secuenciales (Bewley y Black, 1985), por lo que la pregunta que actualmente se plantea es si estos cambios en los niveles de fitohormonas están correlacionados con el crecimiento del embrión.

Durante la maduración del embrión hay una acumulación de sustancias de reserva, paralización en el crecimiento, tolerancia a la desecación y adquisición de dor-

mición (Walbot, 1978). Como paso posterior a la desecación, se reactiva la actividad meristemática y se forma la plántula, la cual se nutre de las reservas del endospermo o cotiledones según que la planta sea mono ó dicotiledónea (Black, 1983). Como excepción, las plantas vivíparas germinan sobre la planta madre y sus semillas no tienen dormición (Robichaud y cois., 1980). Asimismo, un gran número de semillas que no tienen dormición, germinarán una vez tomen agua y las condiciones de temperatura sean las óptimas.

1.2. Estructura de la semilla.

La semilla se forma como resultado de un proceso de reproducción sexual, derivando del óvulo fértil y en ella pueden distinguirse:

I. Testa

Estructura derivada de los tegumentos del óvulo. Generalmente es una cubierta dura y en algunos casos presenta una cutícula interior y otra exterior (Angosto, 1990); a menudo está compuesta por lípidos o ceras y una ó más capas de células protectoras, lo cual tiene importancia fisiológica, pues confiere a la cubierta algún grado de impermeabilidad al agua y/ó a los gases, incluido el oxígeno. A veces la testa puede ser de mucílago, que juega un papel importante en la retención de agua por la semilla, así como en la inducción de la dormición primaria (Bewley y Black, 1982).

Se ha sugerido que la testa sirve para proteger a las semillas de la pérdida pasiva de sustancias intracelulares durante la imbibición (Simon y Rajaharum, 1972). Varios estudios han demostrado que durante la imbibición, se liberan de la semilla hacia el medio electrolitos, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas (Abde-Samad y Pearce, 1978; Branlage y cols., 1978; Hernández-Nistal y cols., 1983) y que suprimiendo la testa se aumenta la pérdida. Duke y Kakefuda (1981) han sugerido que durante la imbibición de las semillas de algunas leguminosas se producen grandes discontinuidades en la testa. Si quitamos la testa a estas semillas, durante la imbibición pueden romperse las células de los embriones, debido a la desintegración de los tejidos y a la presión ejercida sobre ellos por una hidratación desigual de los

mismos; por lo que la testa actuaría, entre otras formas, para proteger de la ruptura a las células del embrión, durante este período.

II. Perispermo y endospermo

La mayoría de las semillas carecen de perispermo, estructura derivada de la nucela. En algunas, el endospermo desaparece totalmente durante el desarrollo del embrión, el cual utiliza sus materiales de reserva para su propia formación y desarrolla una o dos hojas embrionales (cotiledones) donde se acumularán las sustancias que utilizará la semilla durante la germinación; cuando existe endospermo, los cotiledones son pequeños o están transformados en haustorios. De acuerdo con esto las semillas se dividen en endospérmicas y no endospérmicas.

III. Embrión

Consta de un eje embrionario con uno o más cotiledones unidos a él; dicho eje está compuesto por:

- hipocotilo, es el segmento por el que se une a los cotiledones.
- radícula, originaria de la raíz; normalmente es difícil delimitarla del hipocotilo y la plúmula o ápice del tallo que posee la primera hoja u hojas.
- mesocotilo, que raramente existe, y que en caso afirmativo es un entrenudo existente entre los cotiledones.

En las semillas endospérmicas, el embrión ocupa proporcionalmente menos espacio que en las que carecen de endospermo, los cotiledones no almacenan reservas y son a menudo delgados y en forma de hojas; en cambio, los cotiledones de las semillas llamadas no endospérmicas son mucho más voluminosos y en muchos casos, como en las semillas de *Vicia* y *Phaseolus* ocupan aproximadamente el 90% de la masa total de la semilla.

IV. Reservas de la semilla

Las semillas contienen cantidades relativamente grandes de reservas alimenticias que mantienen el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta puede establecerse por sí misma como planta autotrófica. Estas reservas (que incluyen lípidos, proteínas, carbohidratos, fosfatos orgánicos y varios compuestos inorgánicos), son guardadas en muchos casos, pero no exclusivamente, en distintas vacuolas; cuantitativamente estas sustancias varían de acuerdo con los distintos tipos de semillas.

Los materiales de reserva pueden ser almacenados en el embrión, en los tejidos extraembrionales (endospermo o más raramente perispermo) ó en ambos. En el caso de las leguminosas no endospermicas, las proteínas y los hidratos de carbono se localizan en los cotiledones, que permanecen bajo tierra durante la germinación y el crecimiento de la plántula (germinación hipogea, guisante); o son llevados hacia afuera cuando crece el hipocotilo (germinación epigea, judía).

Durante el desarrollo de las semillas de las leguminosas, los nutrientes son transportados a través del floema de la planta madre a los haces vasculares que conducen a la vaina, conectada con los tegumentos (testa incipiente) de la semilla en desarrollo (Pate y cols., 1974). No existe conexión directa entre los cotiledones o el eje embrionario y la testa, por lo que el embrión debe absorber los nutrientes liberados desde los tegumentos; de esta última transferencia se sabe relativamente poco, pero la absorción puede ser ayudada en algunas especies por células especializadas con mayor área superficial, llamadas células de transferencia, que se encuentran localizadas en la epidermis del embrión, las cuales tomarán los materiales liberados por unas células similares localizadas en la epidermis interna de los tegumentos (Gunning y Pate, 1974). Otra vía alternativa es que los materiales liberados por otras capas deben ser transportados al embrión a través del suspensor, que en algunas especies, como las del género *Phaseolus*, está muy desarrollado y también tiene células de transferencia.

El grado de desarrollo de estos componentes y si éstos son o no retenidos durante

el proceso de maduración de la semilla, son las diferencias estructurales fundamentales entre los distintos tipos de semillas.

1.3. Embriogénesis

Se conoce como embriogénesis la serie de cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar en el embrión desde que se forma el cigoto hasta que se produce un embrión maduro dispuesto a germinar, una vez las condiciones endógenas y medioambientales sean óptimas. También se puede definir como la serie de procesos de fertilización y diferenciación encaminados a la formación de la semilla; de la embriogénesis depende el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo de un nuevo individuo. Es, por consiguiente, una fase de preparación de la semilla para la germinación.

Durante los primeros estadios de la embriogénesis el programa del desarrollo se orienta a la producción de nuevas células. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la variación del ADN durante las primeras divisiones celulares (Vallade y cols., 1978; Kowyama, 1983).

Después de un período inicial de crecimiento por mitosis, el cotiledón crece por expansión celular y acumula gran cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos. Sin embargo, el ADN puede seguir replicándose aunque no exista división celular. En muchas semillas, entre ellas las leguminosas, el proceso de embriogénesis se acompaña de fenómenos de endoreduplicación; lo que provoca un incremento en el número de copias del ADN y, por tanto, un acúmulo en el ARN y proteínas diversas. En *Pisum arvense* aparecen células 32C y 64C (Smith, 1973); en algodón y en soja también se demostró este proceso de endoreduplicación (Walbot y Dure, 1976; Dhillon y Miksche, 1983). Todos estos procesos no parecen estar relacionados con una amplificación génica (Goldberg y cols., 1981; Fischer y Goldberg, 1982).

El metabolismo del ARN y de las proteínas tiene gran importancia durante la embriogénesis. Existen datos experimentales que indican que la síntesis "de novo" del ARN se produce incluso antes de la acumulación de proteínas de reserva (Dure y

cols., 1980, 1981). El ARN se acumula en cantidades muy superiores a las iniciales (Duffus y Rosie, 1975; Zhu y cols., 1980). Este material se utilizará, en parte, para la síntesis de proteínas que tiene lugar en fases más avanzadas de la embriogénesis cuando la transcripción apenas existe. Gran parte de la síntesis proteica en las primeras fases de la germinación se lleva a cabo con los ribosomas no degradados durante la embriogénesis. Sin embargo, la síntesis de ARN es necesaria para el inicio de la germinación (Cheung y cols., 1979). En cotiledones embriogénicos de guisante hay tres fases respecto a la capacidad ribosómica para sintetizar proteínas: lenta (embriones jóvenes), muy rápida (embriones con gran crecimiento) y nula (maduración y deshidratación). Sin embargo, "in vitro" el sistema ribosomal no parece ser el causante, ya que la adición de ARNm exógeno provoca síntesis proteica normal, lo que parece culpar a la maduración del "mensajero".

Actualmente, la investigación está encaminada a demostrar qué relación existe entre el ADN producido en el proceso endorreduplicativo y el incremento en la transcripción. En otras palabras, de qué modo se utiliza el número extra de copias de ADN.

La degradación del ARN, constituye un aporte muy notable de nucleótidos y azúcares al metabolismo embriogénico y, aunque se conoce muy poco, parece que no afecta en absoluto al proceso de transferencia y procesamiento de la información génica a los estadios siguientes del estado embriogénico.

Las fitohormonas, al igual que en otras fases del ciclo de vida de la planta, intervienen de forma relevante en el proceso embriogénico; así, la presencia de citoquininas coincide con el mayor índice de mitosis en el endospermo, por lo que se piensa que estas sustancias son las responsables del aumento en tamaño de las semillas, lo que redundaría en una mayor capacidad para almacenar sustancias de reserva. Se ha sugerido una relación entre las giberelinas y el suspensor (Brady y Walthall, 1985); así, se encuentran concentraciones mayores de esta hormona en el suspensor que en el resto del embrión, y además, el aporte exógeno de esta hormona puede ser sustituido por el suspensor en cultivos "in vitro". El nivel de proteínas disminuye ostensiblemente cuando los embriones se cultivan "in vitro" en ausencia del suspensor. La

concentración de giberelina y el tiempo en que esta hormona es transportada por el suspensor al endospermo parece ser crítica para el estado inicial del crecimiento del embrión; el suspensor, por tanto, parece ser el responsable del aporte de GAs al tejido de reserva (Pharis y King, 1985), así como el de ejercer un papel esencial en el crecimiento de embriones inmaduros (Cionini y cols., 1976; Yeung y Sussex, 1979). Se han aislado mutantes de maíz (Sheridan y Neuffer, 1982) y *Arabidopsis* (Meinke, 1986) con alteraciones puntuales en el desarrollo del endospermo y del embrión, lo que constituye una "herramienta" muy valiosa para el estudio del control fitohormonal en el desarrollo de la semilla en su estado embriogénico.

1.4 Maduración

Generalidades

En esta etapa, la semilla acumula una serie de materiales, tanto génicos como derivados de las diferentes rutas del metabolismo primario (proteínas, lípidos e hidratos de carbono, entre otros), cuya misión es abastecer al embrión durante la germinación, así como sustentar la proteínosíntesis en los períodos iniciales de la misma (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Las semillas de cereales utilizan las reservas del endospermo de forma muy limitada en el proceso de la maduración; en dicotiledóneas, por contra, se utilizan totalmente durante la maduración del embrión y son sustituidas por los cotiledones que actúan como órganos de reserva para la germinación. Así mismo, durante la maduración de la semilla, los tegumentos que rodean al óvulo sufren una serie de cambios, transformándose en la envuelta seminal o testa.

Tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas, el contenido de ADN aumenta en el embrión hasta que se inicia la maduración, mientras que en el endospermo cesa cuando lo hace la división celular. El ARN, por contra, incrementa durante la embriogénesis pero probablemente se mantenga constante en la maduración como consecuencia de que la proteínosíntesis se realice en base a este material "preformado" (Murray, 1984).

Las giberelinas y el ácido indolacético (AIA), son las hormonas de mayor importancia en el estadio embriogénico e inicial de la maduración y parecen asociados al incremento en el tamaño de la vaina y del propio grano (Mounler y cols., 1980). Estos datos hay que considerarlos con mucho cuidado ya que los cambios de sensibilidad de los tejidos a los niveles de hormonas en un momento determinado, son de importancia capital; parece que la sensibilidad al ácido giberélico (GA_3) disminuye, mientras que incrementa considerablemente al ABA (Pharis y King, 1985).

En el período medio y final de la maduración los niveles de GA_3 y AIA disminuyen mientras que los de ABA se disparan, alcanzando unos máximos que coinciden con el máximo crecimiento y peso seco; el máximo de acumulación de reservas y el comienzo en la pérdida de agua coinciden con un descenso en los niveles endógenos de esta fitohormona (King, 1976; Naumann y Dorffing, 1982; Karssen y cols., 1983)

La acumulación "in vivo" de ABA está correlacionada con los procesos de maduración que se inician en este período. En muchas especies hay una relación inversa entre los niveles endógenos de ABA y la capacidad de germinar el embrión inmaduro una vez que esta fitohormona ha sido eliminada de la semilla (Ackerson, 1984). En ciertas variedades de cebada hay una correlación entre la reducción en los niveles de ABA, el acortamiento de la dormición y la baja resistencia de los brotes (Michael y Beringer, 1980).

2. GERMINACION DE LA SEMILLA.

2.1 Introducción

La germinación se define como la serie de procesos morfogenéticos y metabólicos que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula capaz de valerse por sí misma y convertirse en una planta adulta. En la germinación se dan procesos secuenciados y sincronizados en un esquema tan organizado que el anabolismo y el catabolismo son simultáneos.

Morfológicamente, la germinación es la transformación del embrión en una plántula. Fisiológicamente, la germinación es la reanudación del metabolismo y crecimiento que antes se habían deprimido, y la puesta en marcha de la transcripción del genoma. Bioquímicamente, es la diferenciación secuencial de las rutas oxidativas y sintéticas (Jann y Amen, 1977).

Según Mayer y Poljakoff-Mayber (1982), la germinación es un sistema "semicerrado" en el sentido de que su iniciación es un tanto imprecisa pues no está bien definido el punto en el que termina la semilla y comienza la plántula. Sin embargo, se suele considerar que una semilla está germinada cuando se ha producido la emergencia radicular, aunque ésta no siempre va seguida por un desarrollo normal, y la germinación puede no llegar a completarse (Hegarty, 1978; Galli y cols., 1981).

La germinación comienza cuando la semilla toma agua del medio, lo que activa su metabolismo, prácticamente nulo en semillas secas y finaliza cuando se forma una plántula capaz de crecer normalmente de forma autosuficiente.

Para que se produzca la germinación de una semilla viable son necesarias tres condiciones: cierto grado de humedad, temperatura adecuada y aireación suficiente. La germinación pues, es un proceso limitado a una hidratación de la semilla y al inicio del crecimiento radicular. Se divide en tres fases (Hegarty, 1978; Côme, 1980/81):

1. Imbibición - La semilla se hidrata y se reactivan numerosos sistemas metabólicos, lo que da lugar, de forma rápida, a una síntesis de ATP en cantidades importantes (Perl, 1978), síntesis de proteínas (Sen y cols., 1975) y ARN (Cheung y cols., 1979).

Comienza la actividad respiratoria (Köllofel, 1970) tras la producción de sustratos y a pesar de los bajos niveles de oxígeno en la semilla en esos momentos; las membranas se hacen permeables y se produce una salida masiva de iones (entre ellos el K^+), parte de los cuales son reabsorbidos posteriormente en el proceso de reestructuración de aquellas. Al mismo tiempo los materiales almacenados durante la forma-

ción de la semilla entran a formar parte de las rutas metabólicas.

Durante la imbibición, la activación de la hidrólisis es realizada por hidrolasas preexistentes. La síntesis "de novo" de estas hidrolasas, necesariamente lleva consigo la activación de la síntesis de proteínas y el metabolismo oxidativo acompañante. Las primeras etapas pueden desarrollarse en anaerobiosis y no ser cruciales para la germinación, mientras que las últimas serán las que determinarán si una semilla se encamina hacia los procesos que llevarán a la germinación (Thimann, 1977).

2. Germinación - Se estabiliza la toma de agua, debido a que el potencial matricial de la semilla es menos negativo, así como el potencial osmótico. Comienza la síntesis de nuevos enzimas, la formación de nuevos orgánulos y un catabolismo activo de las sustancias de reserva, que son movilizadas desde los cotiledones. Las semillas durmientes y muertas mantienen este nivel de hidratación sin entrar en la fase de la germinación visible. Es importante señalar que en este momento se produce la reestructuración de las membranas (Simon, 1981) y una parte de las sustancias excretadas al medio en la fase anterior son reabsorbidas (Hernández-Nistal y cols., 1982).

3. Crecimiento (germinación visible) - Se inicia la elongación y división celular de la radícula que, emergerá, tras romper la testa. Ambos procesos tienen que ocurrir, pero no son necesariamente simultáneos. Algunos autores observan que en algunas semillas, la elongación celular en la radícula tiene lugar antes de que comience la actividad mitótica y la división celular (Rogan y Simon, 1975; Sánchez-Calle y cols., 1989). Durante esta fase se produce una entrada de agua debida a que parte de las proteínas y productos hidrocarbonados almacenados son hidrolizados a compuestos de menor peso molecular, los cuales constituyen sustratos osmóticamente activos y son transportados al eje embrionario en crecimiento (Bewley y Black, 1982).

En las células hidratadas existen componentes que no son de larga vida, por lo que deben sintetizarse en períodos pregerminativos o durante la misma germinación.

La replicación del ADN parece ser un fenómeno relativamente tardío en la ger-

minación, iniciándose después de que haya tenido lugar una considerable síntesis de proteínas, lo que demuestra la presencia en semillas de un ADN preformado durante la última fase de la maduración de la semilla.

2.2 Factores que afectan a la germinación.

La imposibilidad de una semilla para germinar puede deberse a varias causas; unas inherentes a la propia semilla (intrínsecas) y otras relacionadas con las condiciones ambientales que afectan al proceso (extrínsecas). Las respuestas mostradas por las semillas a la gran variedad de condiciones a las cuales están sujetas, pueden ser consideradas como adaptaciones para aumentar la probabilidad de sobrevivir, en un lugar y un medioambiente no predecible.

I. El agua.

La cantidad de agua en una semilla seca es muy baja (10-15%) y debe aumentar para que comience su metabolismo. Por otra parte, su potencial hídrico es considerablemente menor que el del medio, por lo que toma de él gran cantidad de agua de forma rápida, duplicando, la mayor parte de las veces, su peso (Payne y cols., 1978). En un ecosistema natural, las semillas próximas a la superficie del suelo, están expuestas a un riesgo de deshidratación y sólo germinarán si el agua se absorbe más rápidamente que se pierde (Fenner, 1985).

La rapidez en la imbibición depende de las propiedades inherentes a la propia semilla, tales como permeabilidad de su cubierta, contenido de sustancias hidratables, potencial de agua de la semilla, tamaño... Entre los componentes de la semilla que participan en la imbibición y retención de agua se encuentran : mucílagos y sustancias pécticas, celulosa y proteínas (Hegarty, 1978; Riggio-Bevilacqua y cols., 1984).

La imbibición puede verse afectada por factores externos como la temperatura. Las temperaturas bajas parecen dañar a las membranas celulares, interfiriendo así la toma de agua; mientras que las temperaturas moderadamente altas, permiten una toma de agua más rápida, debido a la disminución de la viscosidad de ésta.

II. Temperatura.

Las semillas germinan en un entorno amplio de temperatura dependiendo de las especies. La temperatura óptima para la mayoría de las semillas está entre 25 y 31°C. Tanto las temperaturas altas como las bajas impiden la germinación, así como el establecimiento de las plántulas y su posterior desarrollo. Las fluctuaciones diarias de temperatura pueden producir cambios en los porcentajes de germinación de una especie.

La mayoría de las semillas requieren un termoperíodo en el que se alterna una estación fría (de activación) con otra en la que el eje embrionario crece a temperaturas intermedias (20-30°C). Al tratamiento con bajas temperaturas se le denomina "estratificación", y durante él, se produce crecimiento del embrión y aumento de la toma de oxígeno tanto en este como en la hoja primaria. Así mismo, la relación activadores/inhíbidores de la germinación varía. En ocasiones, el tratamiento de frío puede ser sustituido por una aplicación de giberelinas, postulándose que la síntesis de estas sustancias reguladoras del crecimiento podría comenzar durante la estratificación. Sin embargo, los cambios que ocurren durante la estratificación son complejos, afectando a la semilla en distintos aspectos de su metabolismo.

Mayer y Marbach (1981) sugieren que las membranas son los sensores de la temperatura por los cambios que se producen en sus propiedades ante las variaciones de aquella. La temperatura crítica a la que la membrana pasa al estado fluido, coincide con la temperatura a la que la semilla presenta respuesta fisiológica (Hendricks y Taylorson, 1979).

III. Luz.

Ciertas semillas necesitan períodos más o menos largos de iluminación para poder germinar aunque germinan en oscuridad.

Los procesos luminosos están regulados por el fitocromo, cromoproteína que actúa como pigmento fotorreceptor, quien por fotorreversibilidad alterna entre una

forma activa (Pfr) y otra inactiva (Pr) (Kendrick, 1983). La forma inactiva absorbe luz del rojo convirtiéndose en activa; se inactiva con rojo lejano. Las semillas que responden a este efecto de denominan "fotoblásticas positivas" y absorben, preferentemente en la región del rojo. Las semillas "afotoblásticas" absorben en el rojo lejano. La importancia de la calidad de luz (rojo/rojo lejano) para la germinación de las semillas, se ha demostrado en un número elevado de especies (Dickie, 1977; Silvertown, 1981; Vázquez-Yanes y Smith, 1982).

El fitocromo en su forma activa, probablemente actúe a nivel de membrana funcionando como una permeasa específica regulable por fotoconversión (Frankland y Taylorson, 1983).

IV. Gases.

La energía que se requiere en la germinación proviene de los procesos de oxidación, en presencia o ausencia de oxígeno. Aunque existen semillas que germinan con niveles muy bajos de oxígeno, la mayoría requieren cantidades grandes de este gas, habiéndose comprobado que un aumento en su proporción en la atmósfera que rodea a una semilla favorece su germinación, mientras que, si el aumento es en la proporción de CO₂, la inhibe.

La cubierta seminal puede dificultar la difusión del oxígeno, retrasando o inhibiendo la germinación. En leguminosas este hecho es frecuente, por ello, en los primeros momentos de la germinación, el metabolismo es, mayoritariamente, fermentativo (De La Fuente y Nicolás, 1977).

2.3. Control.

Existen un gran número de sustancias capaces de inhibir la germinación. Algunos de estos compuestos son tóxicos para la vida del organismo y, a concentraciones elevadas, impiden la germinación de la semilla simplemente por que la matan; otras sustancias tienen un efecto fisiológico e inhiben la germinación sin dañar a la semilla irreversiblemente, afectando algunos de los procesos necesarios para que ésta se lleve

a cabo. Son éstas las sustancias de mayor interés y por tanto de las que nos ocuparemos principalmente.

Las plantas excretan sustancias al medio que pueden afectar a la germinación de las semillas (Walton, 1980). Los eucaliptos, así como el roble *Valonia* y otras especies, contienen inhibidores de la germinación en sus hojas impidiéndola en su área de influencia.

Los microorganismos del suelo forman, como productos intermediarios de su metabolismo, ácidos grasos de cadena corta, que afectan a la germinación y al crecimiento de las plántulas (Babiano y cols., 1989), posiblemente debido a que aumentan la fluidez de la membrana plasmática, afectando al intercambio iónico y a la actividad enzimática de los enzimas ligados a ella (Steward y Berrie, 1979; Metzger y Sebesta, 1982). Podemos diferenciar tres tipos fundamentales de inhibidores según el modo de actuación:

2.3.1. Inhibidores osmóticos.

El caso más sencillo y quizás el más frecuente en la naturaleza, es la inhibición osmótica, es decir, cuando una semilla se encuentra en una solución con alta presión osmótica no puede germinar; en cambio, si sustituimos este medio por agua, la semilla germinará normalmente. Son varias las sustancias capaces de originar esta elevada presión osmótica: azúcares, sales inorgánicas (ClNa, etc.) cambiando también la presión necesaria para ejercer esta inhibición según especie de que se trate (Munns y cols., 1983).

2.3.2. Inhibidores metabólicos.

Son aquellas sustancias que provocan inhibición al interferir en determinadas rutas metabólicas. Al estar la germinación estrechamente relacionada con un metabolismo activo, todos los compuestos que interfieren en el metabolismo normal, afectan a la germinación.

Un ejemplo de este tipo de interferencia son los inhibidores de la respiración, como cianuro, dinitrofenol, azida, hidroxilamina y otros, que inhiben la germinación a concentraciones similares, aunque no siempre idénticas a las que inhiben al proceso metabólico.

Otro tipo de inhibidores metabólicos de gran importancia en la germinación son los que interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como el 5-fluoruracilo que inhibe la síntesis de ARNr y ARNt (Key y cols., 1972); α -amanitina, que inhibe la síntesis de ARNm a bajas concentraciones (Jendrisak, 1980), cordicepina, que impide la poliadenilación del ARNm (Delseny y cols., 1981).

2.3.3. Control fisiológico.

Los inhibidores fisiológicos de la germinación afectan a algún proceso metabólico necesario para ésta. Los compuestos fenólicos la inhiben y dada su amplia distribución en frutos y plantas, se consideran inhibidores naturales de la germinación (Naqui y Hanson, 1982; Williams y Hoagland, 1982; Khan y Ungar, 1986).

3. REGULACION HORMONAL DE LA GERMINACION

3.1 Introducción

La germinación de semillas, como cualquier proceso de crecimiento y desarrollo, está regulada por las fitohormonas, sustancias sintetizadas por la propia semilla tanto en la embriogénesis y maduración como durante la germinación propiamente dicha.

La regulación hormonal se puede abordar bajo dos puntos de vista diferentes: a) observando los efectos provocados por la aplicación exógena de hormonas y/o b) estableciendo los niveles hormonales endógenos y tratar de correlacionar estos con un determinado estado del proceso germinativo. Hay que distinguir entre los efectos de las hormonas aplicadas exógenamente y la influencia del nivel endógeno de esta sustancia, para lo que se necesita un conocimiento previo de los niveles endógenos de

la fitohormonas antes de aplicarlas exógenamente. Sin embargo, no siempre es posible correlacionar el estado fisiológico de una semilla con su contenido hormonal (Black, 1980/81; Walton, 1980/81).

Las hormonas vegetales tienen un efecto dual; una respuesta rápida conllevaría alguna modificación a nivel de membranas y una respuesta lenta debida a un efecto sobre la expresión génica. No obstante, estos efectos dependen del nivel endógeno de estas fitohormonas, así como de la actividad metabólica y de la sensibilidad del tejido (Trewavas, 1982).

3.2 Giberelinas.

Las giberelinas regulan, entre otros procesos, la síntesis y secreción de las proteínas y los enzimas necesarios para la germinación, por intervenir en la elaboración de un sistema de endomembrana y en la síntesis de nuevas especies de ARNm (Northcote, 1987; Jones y cols, 1987). Así mismo, las giberelinas estimulan la germinación de las semillas cuya dormición esté impuesta por el desarrollo incompleto del embrión, resistencia mecánica de las cubiertas o presencia de inhibidores (MacMillan, 1985).

Las giberelinas, al igual que otras fitohormonas abundan particularmente en zonas de rápido crecimiento o diferenciación; pero en las semillas, los lugares de acción pueden dividirse en dos categorías distintas:

- 1- Los relacionados con la activación y las primeras etapas del crecimiento en extensión del eje embrionario (Ilan y Gepstein, 1981).
- 2- Los lugares relacionados con la movilización de los materiales de reserva (capas de aleurona, entre otros) (Mozer, 1980; Jones y cols, 1987).

Parece que existen diferencias básicas en la sensibilidad entre los dos grupos, aunque estas son, casi enteramente, temporales. En lo que se refiere a los lugares relacionados con la movilización, son activados por giberelinas sintetizadas o liberadas en

el eje embrionario (Parys y cols., 1983).

3.3 Citoquininas.

Diversas sustancias con actividad citoquinínica promueven la germinación y eliminan la dormición en semilla, contrarrestando los efectos de algunos inhibidores.

Las citoquininas pueden actuar a varios niveles. Burrows (1975), sugiere tres niveles principales de actuación:

- 1- Control a nivel de la expresión génica.
- 2- Control a nivel de traducción.
- 3- Regulación de la función proteica.

Existen pocas pruebas a favor de estos tres niveles, aunque ello no quiere decir que no contribuyan a la acción de las citoquininas sobre la germinación.

Un papel importante de las citoquininas en la semilla, es posiblemente alterar la permeabilidad de la membrana (Bearder, 1980) y la movilización de las reservas en dicotiledóneas (Metivier y Paulilo, 1980).

3.4 Auxinas.

El ácido indolacético no parece estar implicado en la germinación de las semillas, sino que su papel se relaciona con el crecimiento, mediante su acción sobre la extensión de la pared celular (Cleland, 1983).

La existencia de AIA en semillas y el hecho de que el contenido aumente en respuesta a cambios en las condiciones que favorecen la germinación, puede indicar que esta hormona es importante en dicho proceso. Aunque no está claro que papel juegan las auxinas en la germinación, la liberación del AIA desde las formas ligadas o conjugadas debe, sin embargo, contribuir al control del crecimiento temprano de la plántula.

El ácido indolacético es promotor de la germinación de algunas semillas (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982), y estimula la producción de etileno en ejes embrionarios y cotiledones (Abeles, 1972; Esashi y cols., 1977); por ello, parece probable que en los casos que el AIA promueve la germinación se deba a la activación de la producción de etileno.

3.5 Acido abscísico.

El ABA es el inhibidor fisiológico más importante de la germinación. Su presencia en semillas está generalizada, e incluso se ha comprobado la existencia de una relación entre los niveles endógenos y la incapacidad para germinar (Milborrow, 1974; Narasimhareddy y Swamy, 1979). Existen muchas pruebas de que los niveles de ABA disminuyen durante la estratificación, como paso previo para su germinación en el laboratorio, aunque no siempre es así, y en algunos casos, esta disminución no es suficiente para romper la dormición (Sondheimer y cols., 1974; Barthe y Bulard, 1978). Se ha sugerido que una función del ABA sería evitar el viviparismo de los embriones durante la formación de la semilla (Dure y Caryl, 1981); actúa también como inductor de la dormición, proceso correlacionado con los niveles de ABA (Milborrow, 1974).

Es evidente que el ABA interacciona con otros reguladores del crecimiento, y, en particular con citoquininas y giberelinas, controlando la dormición y la germinación de semillas (Pinfield, 1987; Karssen y Groot, 1987).

Se ha comprobado que las semillas sometidas a un "stress" osmótico o iónico durante la germinación, aumentan los niveles de ABA "libre" o "ligado" (Hasson y Poljakoff-Mayber, 1981); un posible papel del ABA sería frenar el proceso en los primeros estadios de la germinación (Walton, 1977). El "stress" hídrico sufrido por las semillas sería el estímulo necesario para la producción del inhibidor, de forma similar a lo que parece ocurrir en la maduración de semillas (Morris y Bowles, 1987). Recientemente, Gómez y cols., (1988), aislaron un gen activado por ABA en respuesta a "stress" hídrico, que codifica por una proteína rica en glicina.

El modo de acción del ABA, aún no es bien conocido, aunque las evidencias sugieren que actúa de un modo complejo afectando a numerosos procesos relacionados con la germinación:

- Inhibe la salida de protones y la absorción de iones potasio que se produce durante los primeros estadios de la germinación de las semillas (Ballarin-Denti y Cocucci, 1979; Galli y cols., 1979), reduciendo la toma de agua y elongación de la radícula (Walton, 1980).
- Aumenta la sensibilidad de las semillas a la temperatura (Reynolds y Thompson, 1971; Aldasoro y cols., 1981).
- Influye en el metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas (Walton, 1980; Dure y cols., 1981), inhibiendo la traducción de ciertos ARNm que codifican por enzimas específicos de la germinación y en algunos casos disminuye la síntesis de ADN.
- Presenta efectos inhibidores sobre la α -amilasa; Jacobsen y cols., (1980); Ho, (1979) y Rodríguez y cols., (1985), han observado que el tratamiento de ABA causa la aparición de varios péptidos "in vivo" e "in vitro". Estos péptidos son formados en presencia y en ausencia de giberelinas, tienen una vida media corta y son sensibles a los inhibidores de la transcripción y la traducción.

La interpretación de los efectos del ABA se complica más aún con el hecho de que esta sustancia se metaboliza normalmente en los tejidos de la semilla (Walton, 1980) y algunos de los productos de este metabolismo especialmente el ácido fáséico, son activos en ciertos tejidos vegetales (Dashek y cols., 1979; Sharkey y Raschke, 1980).

A primera vista parece que el efecto del ABA en tejidos vegetales es siempre inhibitorio, sin embargo, una revisión cuidadosa de los estudios realizados, revela que puede también promover algunos procesos fisiológicos. Analizando las proteínas

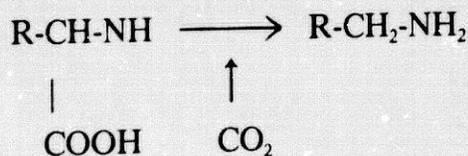
sintetizadas en embriones de algodón (Dure y cols., 1980) se observó que el ABA, además de inhibir la síntesis de una serie de proteínas relacionadas con la germinación, también induce la síntesis de proteínas nuevas. Su función en este sistema no sería impedir, sino regular los procesos de desarrollo. Por tanto, es incorrecto considerar al ABA simplemente como un inhibidor de la germinación o de otros procesos celulares, sino más bien como un regulador del crecimiento que coordina la fisiología general de la planta, inhibiendo o promoviendo, según el caso, ciertos procesos fisiológicos.

3.6 Poliaminas.

Las poliaminas son derivadas del amoníaco, en cuya molécula se produce una sustitución a nivel de los átomos de hidrógeno originándose aminas primarias, secundarias o terciarias según se produzcan una, dos o tres sustituciones alquílicas respectivamente.

Al carecer de algún grupo carboxilo, las aminas, en algunas ocasiones, se comportan como cationes a pH fisiológico, reemplazando a ciertos cationes en el metabolismo celular; tal es el caso del reemplazamiento de espermina y espermidina por Mg^{++} en sistemas "in vitro" de síntesis de proteínas (Matilla y cols., 1980).

Normalmente, y por descarboxilación del aminoácido precursor, se forma la amina correspondiente, quien posteriormente sufre las modificaciones oportunas:



Las aminas, presentan una distribución muy amplia en plantas superiores y sirven, a menudo, como precursores de alcaloides y, en otros casos de fitohormonas; así la triptamina, en algunas plantas, origina el ácido indolacético (AIA) (Vía de la triptamina).

Sin embargo, y como queda explícito, las aminas pueden ser funcionales "per se", como es el caso de la mescalina en el cactus (papel anipredador), o de ciertas aminas conjugadas que son importantes antifúngicos o antivirales.

En plantas superiores, las poliaminas se biosintetizan a partir de la arginina y de forma especial de la ornitina, según la ruta mostrada en la Figura I.

La ausencia de K^+ en el medio, incrementa la actividad de los enzimas reseñados, así como los niveles de putrescina (aproximadamente noventa veces), y agmatina (cinco veces).

En muchas especies de plantas superiores, las poliaminas se encuentran en forma conjugada con ácido cinámico y sus derivados. Las amidas conjugadas del ácido hidroxicinámico pueden ser inhibidores de virus naturales.

V.1- Funciones de las poliaminas en plantas.

El estudio de las poliaminas tomó auge cuando se encontró que al añadirlas exógenamente inducían crecimiento en ciertas especies y ciertos órganos (Evans y Malmberg, 1989).

Poliaminas como espermina y espermidina estimulan la síntesis de proteínas "in vitro"; se desconoce el porqué pero se barajan varias alternativas: sustituir al Mg^{++} , facilitar el completado de cadenas polipeptídicas, inhibir RNAsas "in vivo", disminuir la dependencia de Mg^{++} en el sistema "in vitro", etc.

El crecimiento de ciertas especies vegetales como *Helianthus tuberosus* inducido por AIA, conlleva la acumulación de poliaminas; igualmente, el tratamiento con ciertas poliaminas provoca un crecimiento importante. Es posible pues, que el mecanismo de acción de las auxinas tenga algo que ver con las poliaminas (Smith, 1985).

Actualmente, se han establecido varios mecanismos por los que las poliaminas pueden implicar un aumento en el crecimiento:

- Actúan "in vitro" sobre la síntesis de ADN y ARN.
- Afectan a la síntesis protéica.
- Estabilizan las membranas (en condiciones de "stress") probablemente uniéndose a fosfolípidos, impidiendo la pérdida masiva de iones (Bagni y cols, 1982; Roberts y cols., 1986).
- Previenen la pérdida masiva de clorofila en hojas.
- Probablemente prevengan la síntesis de etileno.

Los protoplastos aislados de hojas de avena son inestables y experimentan una senescencia progresiva que desemboca en la lisis, la cual puede retrasarse por la presencia de poliaminas. Las poliaminas añadidas a protoplastos durante su aislamiento reducen la síntesis de RNasa (Kaur-Sawhney y cols., 1978).

Debido a las características policatiónicas de las poliaminas a pH fisiológico, es probable que se unan al sustrato (ARN) y lo protejan de la degradación por lo que, y como consecuencia de ello, retrasan el período de senescencia de las plantas o de ciertos órganos (Altman, 1982 a; Merlo y cols., 1988).

Las poliaminas presentan un efecto protector de las membranas; así, cuando se trata el tejido vegetal con etanol al 8% la membrana es "reparada" por espermina (Naik y Srivastava, 1978).

Las concentraciones de poliaminas son anormalmente altas tanto en tumores de animales como de plantas. La inhibición de la formación de amino-oxidasa por AIA, puede ser el resultado de la acumulación de aminas (Srivastava y cols., 1977).

La función de las poliaminas ha sido estudiada en una cepa de *Aspergillus nidulans* que requiere poliaminas para el crecimiento de los conidios. Cuando los conidios se colocaron en un medio mínimo suplementado con putrescina, el crecimiento fue semejante al de la cepa salvaje. La ausencia de putrescina disminuye el crecimiento a

las 5-6 horas después de la inoculación, tiempo en que las poliaminas se acumulan en los conidios de tipo salvaje. La deficiencia en putrescina en este mutante parece ser ocasionada por la carencia de la ornitina-descarboxilasa (Winther y Stevens, 1979).

Un probable mecanismo de acción de las poliaminas, como consecuencia de su carácter catiónico a pH fisiológico, sería su unión a ácidos nucleicos estabilizando y organizando tanto al ADN como al ARN y a sus actividades. En plantas, se ha demostrado que las poliaminas se unen al ADN compitiendo con la actinomicina-D cuya acción es bien conocida por unirse al ADN (Evans y Malberg, 1989).

Existen estudios "in vitro" que demuestran que espermina y espermidina protegen al ADN frente a la desnaturalización térmica. Estos efectos estabilizadores fueron atribuidos a la neutralización de las cargas negativas de los grupos fosfatos (Cohen, 1971; Tabor y Tabor, 1976).

Cuando se estimula la síntesis de ARN en la célula también se promueven los niveles de poliaminas intracelulares; lo que parece indicar que ambas moléculas están interrelacionadas, en lo que a sus efectos fisiológicos se refiere. Es muy probable que los incrementos en poliaminas y ARN sean consecuencias distintas de un mismo efecto primario, no pudiéndose atribuir la función promotora de la síntesis de ARN a la ornitina-descarboxilasa.

Si bien "in vitro" existen grandes cantidades de experimentos realizados con poliaminas, no sucede lo mismo "in vivo", obteniéndose resultados que dependen del material o tejido empleado. Así mismo, las poliaminas estimulan a distintas proteín-kinasas, estimulación que varía con el tipo de preparación (Galston y Sawhney, 1990).

3.7 Etileno.

El etileno es la única fitohormona conocida de carácter gaseoso en condiciones fisiológicas de temperatura y presión. Además de ser reconocida como la "hormona de la maduración" el etileno está implicado en otros procesos del desarrollo como: la

germinación de las semillas, la abscisión, inhibición de raíces, iniciación floral, liberación de la dormición de ápices y semillas, epinastia de hojas, senescencia de varios órganos y en muchos procesos de stres ambiental (McKeon y Yang, 1987).

El etileno induce respuestas en las plantas a concentraciones de menos de $0,1 \mu/l$. El papel estimulante del etileno en la germinación de semillas tanto durmientes como quiescentes, es conocido desde hace mucho tiempo (Vacha y Harvey, 1927; Hale y cols., 1943; Ruge, 1947). Denny y Miller (1935) obtuvieron los primeros indicios de que las semillas producían etileno, el cual, rompía su dormición, aumentaba o conservaba su vigor y estimulaba su metabolismo.

En semillas de cacahuete se ha demostrado que es el etileno el factor natural implicado en la liberación de la dormición, ya que las menos durmientes (situadas en la parte apical de la vaina) tienen una germinación ligeramente más alta, concentraciones medias de etileno mayores y mayor velocidad de síntesis de gas, que las semillas más durmientes (situadas basalmente en la vaina) (Ketring y Morgan, 1969; 1970; 1972).

En semillas de lechuga el etileno produce la liberación de la dormición en el período de imbibición inmediatamente anterior a la emergencia de la radícula; el período inicial de imbibición no requiere la presencia de etileno (Fu y Yang, 1983).

El etileno promueve el crecimiento longitudinal de los ejes embrionarios de *Phaseolus* y *Xanthium*, aunque el efecto depende de las concentraciones de gas, del tiempo de exposición y de las zonas de crecimiento examinadas (Goto y Esashi, 1974 a, b; Katoh y Esashi, 1975 a, b).

Podemos explicar muchas acciones hormonales del etileno por su carácter gaseoso y, por consiguiente, difusible. Otra ventaja de la difusibilidad del etileno podría ser el hecho de que su concentración en el tejido puede alterarse simplemente al cambiar la velocidad de síntesis. Mientras que reducir la concentración de otras hormonas requiere metabolismo o detoxificación de los niveles endógenos, el etileno se desprende, y su concentración celular alcanza rápidamente el equilibrio entre el grado

de producción y el de difusión. Podemos pensar que respuestas rápidas del crecimiento, como la respuesta al estímulo por contacto, y la inhibición o aceleración de la elongación de los tallos, se beneficiarían de tal sistema de respuesta rápido y sensitivo.

El etileno no fué reconocido como una hormona vegetal hasta los años 50, y su ruta biosintética no quedó perfectamente esclarecida hasta que se demostró que el intermediario clave, ACC, era su precursor inmediato. Aunque en la última década se han hecho muchos progresos en el estudio de la biosíntesis y acción del etileno, aún queda mucho por estudiar.

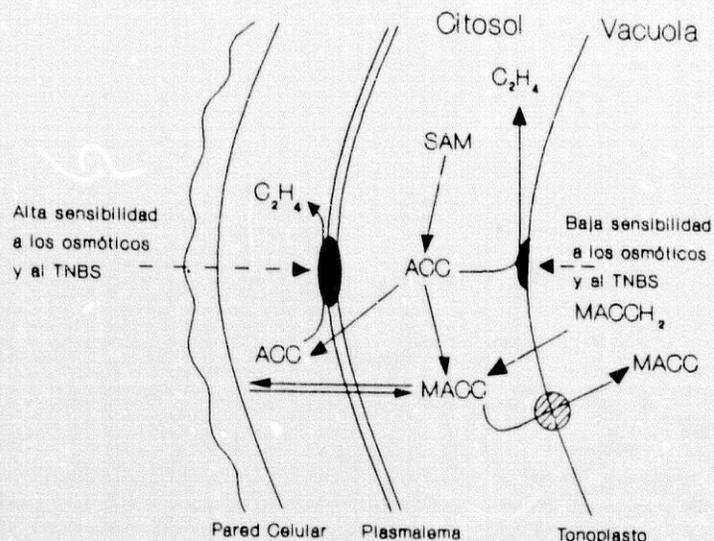
3.7.1 Biosíntesis.

3.7.1.1 Localización.

El etileno es producido en casi todos los órganos vegetales variando su intensidad con el tipo de órgano y con su estado fisiológico.

La localización de la biosíntesis de etileno a nivel tisular o celular es poco conocida. No obstante, en algunos órganos como semillas de melocotón o aguacate, o hipocotilos de *Phaseolus* se localiza en la cubierta seminal (Jerie y cols., 1976; Adato y Gazit, 1977a) y epidermis (Sakai e Imaseki., 1982), respectivamente. En otras semillas, el embrión es el principal lugar de producción de etileno (Morgan y cols., 1970; Sánchez-Calle, y Matilla, 1987).

En cuanto a su localización subcelular, se ha demostrado que la producción de gas está relacionada con el plasmalema (Bouzayen y cols., 1990); también se ha indicado que el enzima formador de etileno desde ACC, está en el tonoplasto (Guy y Kende, 1984), o en la membrana interna de la mitocondria (Vinkler y Apelbaum, 1985), lo que no excluye la posibilidad de que otras membranas también conviertan el ACC a etileno (Mayne y cols., 1986); La integridad de la membrana es siempre necesaria para dicha síntesis (Yang y Hoffman, 1984).



Localización subcelular de la producción de etileno según Bouzayen y cols., (1990).

3.7.1.2 Ruta Biosintética.

Aunque se han propuesto numerosos precursores, sólo la metionina era rápidamente convertida en etileno mediante un sistema "in vitro" que contenía Cu^{2+} y ácido ascórbico (Lieberman, 1979). Los carbonos 3 y 4 de la metionina son los que se convierten "in vivo" en etileno (Lieberman, 1979). Después se propuso a la S-adenosil-metionina, SAM, como intermediario, ya que la conversión de metionina a etileno era inhibida por inhibidores de la fosforilación oxidativa, implicando esto un paso dependiente de energía (ATP). Adams y Yang (1977) demuestran en tejidos de manzana que la ^{35}S -metionina y 3H -metil-metionina liberaban metil-tio-adenosina, MTA, y su hidrólisis producía metil-tio-ribosa, MTR, que posteriormente se convertía en etileno. Así, la metionina debe ser convertida en SAM antes de que sea liberado el etileno.

Adams y Yang (1979) identificaron ACC, MTA y MTR como los productos marcados que se acumulaban cuando se incubaban tejidos de manzanas con L(U- ^{14}C)-metionina bajo condiciones anaeróbicas, que bloquean la producción de etileno. La incubación posterior del tejido con O_2 , tenía como resultado la producción de etileno marcado a partir de el ACC radioactivo que se había acumulado. Coincidiendo con estos hallazgos, Lürssen y cols., (1979) demostraron que el ACC estimulaba dramáti-

camente la producción de etileno en tejidos vegetales. Por analogía con la síntesis química de ACC, dedujeron que éste podía derivar del SAM, y propusieron corregir la ruta biosintética del etileno.

El ACC fue aislado en 1957, pero su interés no fué reconocido hasta que se aceptó como precursor de la síntesis de etileno. El ACC, además de convertirse en etileno, puede ser metabolizado a N-malonil-ACC (MACC). Este conjugado fué identificado independientemente por dos grupos diferentes. Amrhein y cols., (1981, 1982) buscaban una ruta alternativa para el metabolismo del ACC basándose en el hecho de que algunas bacterias y levaduras metabolizaban el ACC a otros productos además de etileno. Encontraron que el ACC se metabolizaba a un conjugado que identificaron como MACC. Hoffman y cols., (1982) encontraron que las hojas de trigo marchitas perdían más ACC del que era necesario para la conversión a etileno; demostrando con posterioridad que este tejido podía metabolizar ACC a MACC.

Una consideración importante en la biosíntesis de etileno es la cantidad limitada de metionina presente en plantas. Se vió que para mantener una velocidad alta de producción de etileno, el azufre de la metionina debía ser reciclado. Se demostró que el grupo 5'-metilo del MTA era reciclado a metionina (Murr y Yang, 1975); usando un doble marcaje (^{35}S , ^{14}C -metil)- MTA, se demostró que el grupo $\text{CH}_3\text{-S}$ del MTA era utilizado, como una unidad, para resintetizar metionina (Adams y Yang, 1977). Los últimos trabajos han demostrado que la mitad ribosa del MTA provee el esqueleto carbonado para la porción 2-aminobutirato de la metionina (Wang y cols., 1982; Yung y cols., 1982). La actual ruta biosintética del etileno se observa en la Figura 1.

3.7.1.3 Enzimas implicadas.

I.- ACC-Sintasa

La ACC-Sintasa, enzima que cataliza la conversión de SAM a ACC y MTA, juega un papel clave en la regulación de la producción de etileno. Los niveles de ACC-Sintasa se afectan por cambios en los niveles hormonales y por alteraciones del desarrollo (Yang y Hoffman, 1984).

La ACC-Sintasa, preparada a partir de pericarpo de tomate, ha sido purificada y caracterizada (Boller y cols., 1979; Yu y cols., 1979; Yang, comunicación personal). La enzima requiere piridoxal fosfato para su actividad y es sensible a sus inhibidores especialmente a la aminoetoxivinilglicina, AVG, ($K_i = 0.2 \mu\text{M}$) y el ácido amino-oxiacético, AOA, ($K_i = 0.8 \mu\text{M}$). Estos inhibidores han sido de gran ayuda para estudiar la regulación de la producción de etileno, ya que permiten distinguir entre los efectos de la ACC-Sintasa y los de EFE (Adams y Yang, 1979). El sustrato preferido por la ACC-Sintasa es el (-)SAM, isómero natural, con una K_m de $20 \mu\text{M}$, mientras que (+)SAM es un inhibidor efectivo (Kahani-Oskouee y cols., 1984). Recientemente se ha demostrado que la ACC-Sintasa es inactivada tras incubación con SAM y este proceso puede ser responsable de la corta vida media del enzima "in vivo" (Satoh y Esashi, 1986).

Muchos autores proponen que, el SAM cuando es activado por la ACC-sintasa, puede modificar irreversiblemente al enzima en una "inactivación suicida" (McKeon y Yang, 1987).

Este enzima aparece en niveles muy bajos en los tejidos con respecto a otras proteínas, y presenta una gran inestabilidad. No está claro si la enzima es inestable "per se" o si son los procesos de heridas, que se usan rutinariamente para inducir altos niveles del mismo, los que promueven la aparición de enzimas hidrolíticas que producen cortes proteolíticos dando lugar a una sintasa menos estable.

La ACC-sintasa juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis de etileno. Los procesos del desarrollo incluyendo germinación, maduración y senescencia, así como respuestas a stress por heridas, drogas, encharcamiento, congelación, agentes tóxicos, infección o picaduras de insectos, etc., se relacionan con una alta producción de etileno (Lieberman, 1979; Yang y Hoffman, 1984). En todos estos casos, se ha demostrado que los mayores niveles de etileno están acompañados de una alta producción de ACC, debido a la inducción o activación de la ACC-sintasa (Yang y Hoffman, 1984). Esta estimulación se demuestra por medidas directas del incremento en los niveles de ACC y por la capacidad del AVG para bloquear o dis-

minuir el aumento, tanto de la síntesis de ACC como de la producción de etileno. Se cree que existe una verdadera inducción de la ACC-Sintasa ya que la cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas, bloquea eficazmente el incremento en la producción de etileno (Adams y Yang, 1977), al igual que los inhibidores de la síntesis de ARN (Yoshii e Imaseki, 1982). Sin embargo, trozos de pericarpio de tomate tratados con óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$) desarrollan una ACC-Sintasa con una mayor densidad que el control incubado con agua, mostrando que la ACC-sintasa es sintetizada "de novo" después de la herida (Acaster y Kende, 1983). La velocidad de producción de etileno se ve afectada no sólo por el propio etileno, si no también por otras hormonas vegetales como las auxinas, citoquininas y ABA; todos ellos regulan dicha producción a nivel de la síntesis de ACC, aunque pueden ejercer sus efectos por diferentes mecanismos bioquímicos.

Las auxinas (AIA) promueven la producción de etileno por inducir la síntesis de ACC-Sintasa, lo que conduce a niveles mayores de ACC; el incremento en la producción de etileno es paralelo al incremento en ACC, y tratamientos con AVG bloquean el incremento de etileno inducido por AIA (Yoshii e Imaseki, 1981; Yu y Yang, 1979). Esta inducción auxínica de la ACC-sintasa es inhibida no sólo por los diferentes inhibidores de la síntesis de proteínas, cicloheximida y 2-(4-metil-2,6-dinitroanilino)-N-metilpropionamida, si no también por actinomicina-D y α -amanitina, inhibidores de la síntesis de ARN. Estos datos sugieren que la inducción de ACC-Sintasa se produce a nivel transcripcional (Yoshii e Imaseki, 1982). Sin embargo, no está claro si el AIA induce directamente la sintasa o interviene algún otro proceso celular en el efecto de esta hormona.

El ABA reduce de forma efectiva la producción de etileno inducida por el marchitamiento en las hojas de trigo (Wright, 1980); pretratamientos con ABA inhiben la acumulación de ACC durante el tratamiento posterior de marchitamiento, pero no afecta significativamente los niveles de ACC en hojas turgentes (McKeon y cols., 1982). Además, cuando los hipocotilos de *Vigna radiata* L. estimulados por AIA son tratados con ABA, la acumulación de ACC se bloquea como resultado de reducir la actividad ACC-Sintasa (Yoshii e Imaseki, 1981). Parece que el ABA no reprime la ACC-Sintasa en tejidos no inducidos, pero inhibe la inducción del enzima causada

por marchitamiento o por tratamientos con AIA.

De forma contraria a lo que ocurre con el ABA, las citoquininas estimulan la producción de etileno conjuntamente con otros tratamientos que incrementan la síntesis del mismo. Así, la producción de etileno, en tejidos tratados con AIA (Yoshii e Imaseki, 1981) o tejidos estresados por encharcamiento (McKeon y cols., 1982), aumenta en respuesta a la aplicación de benciladenina como resultado de una mayor actividad ACC-Sintasa y, el consecuente incremento en la acumulación de ACC. Debido a que las citoquininas por sí mismas no afectan marcadamente a los niveles de ACC, su efecto sobre la ACC-Sintasa debe ser a través de algún otro factor que afecte el nivel de inducción. Ya que las citoquininas y el ABA afectan los niveles de ACC-Sintasa sólo bajo condiciones de inducción, la inducción de ACC-Sintasa representará un sistema ideal para comprender el efecto que estas hormonas vegetales tienen sobre la expresión génica de la ACC-Sintasa, cuando su material genético lleve a ser disponible.

Dependiendo del tejido, el etileno puede promover su producción (autocatálisis), o inhibirla (autoinhibición). Durante la autocatálisis en frutos maduros, el etileno afecta inicialmente a la conversión de ACC en etileno aunque, posteriormente, se produce un incremento masivo en la síntesis de ACC (Liu y cols., 1985). El etileno actúa directamente sobre la ACC-sintasa durante la autoinhibición. Cuando se trataron tejidos de uva con etileno durante 10 horas, se liberó sólo el 6% del etileno liberado en aquellos tejidos tratados con aire (control); este efecto autoinhibitorio del etileno resultó de la inhibición de la síntesis de ACC (Riov y Yang, 1982).

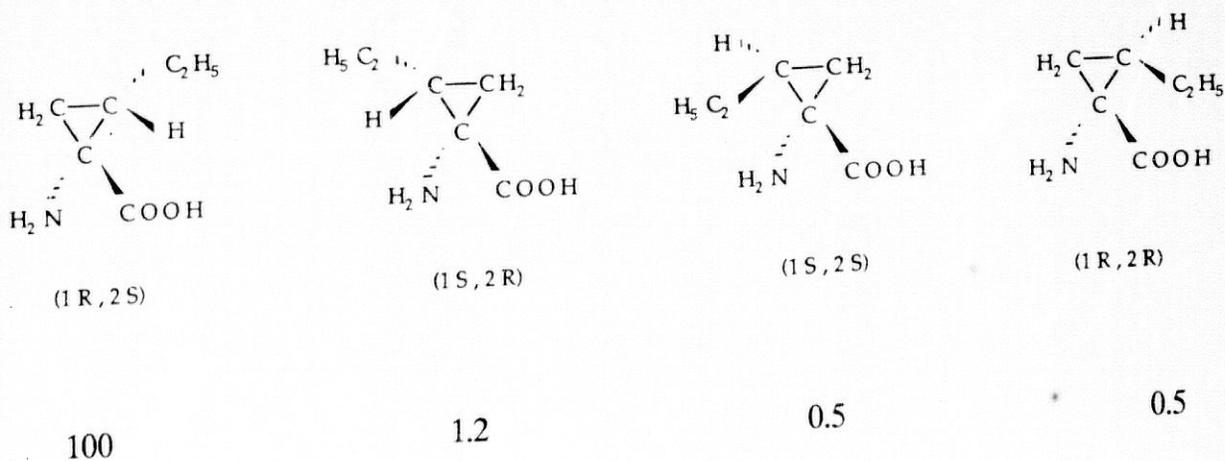
En hipocotilos de *Vigna radiata* L., el tratamiento con AVG inhibe fuertemente la producción de etileno inducida por auxinas, pero causa un incremento de 3-4 veces en la actividad ACC-sintasa (Yoshii e Imaseki, 1982); la incubación con etileno o ACC de los tejidos tratados con AVG, reduce el desarrollo inducido de la ACC-Sintasa. Estos resultados sugieren que, el tratamiento con etileno reduce el nivel de ACC-sintasa bien por inhibir las síntesis del enzima bien por aumentar su degradación (Yoshii e Imaseki, 1982).

II.- EFE.

La conversión de ACC a etileno es llevada a cabo por un enzima oxidativo o sistema enzimático denominado enzima formador de etileno (EFE). Adams y Yang en 1979 fueron los primeros en describir la actividad EFE; aislaron ACC a partir de un tejido de manzana incubado en una atmósfera de N_2 , y demostraron su conversión a etileno bajo condiciones aeróbicas. Como el EFE no ha sido todavía aislado del material celular intacto (vacuolas, protoplastos o tejidos), toda la caracterización del enzima se ha realizado "in vivo". Esta situación necesariamente complica la interpretación de muchos experimentos porque los efectos observados sobre el EFE pueden ser atribuidos a su acción directa o indirecta. A pesar de este problema, se conocen bastantes características de EFE.

El EFE tiene un alta afinidad para el ACC como sustrato. McKeon y Yang (1984), utilizando segmentos de hipocotilo de guisante tratados con concentraciones variables de ACC, basándose en la dependencia entre la velocidad de producción de etileno y la concentración endógena de ACC, demostraron que el EFE tenía una K_m de 66 μM . Guy y Kende (1984) obtuvieron una K_m similar (61 μM) en vacuolas de hojas de guisante.

Cuando uno de los hidrógenos del anillo de ACC es sustituido por un grupo etilo, se generan 4 estereoisómeros del ACC, 1-amino-2-etil-ciclopropano-1-carboxílico (AEC):



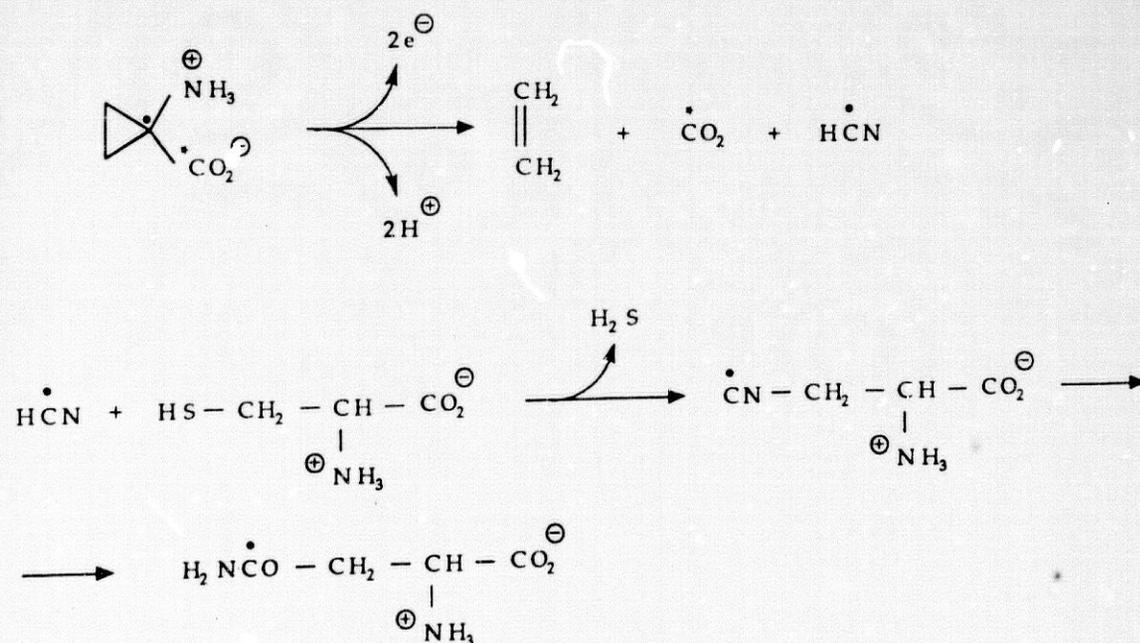
Hoffman y cols., (1982), demostraron que en manzana, melón e hipocotilos etioldos de *Vigna radiata* L., el EFE utiliza preferentemente uno de los estereoisómeros (1R, 2S)-ACC, para la síntesis del análogo 1-buteno del etileno. Tanto el ACC como el AEC parecen ser degradados por el mismo enzima EFE, ya que ambas reacciones son inhibidas de forma similar por disminución en los niveles de O_2 y Co^{2+} ; cuando están presentes ambos sustratos se inhiben mutuamente. Esta estereoselectividad del EFE para el isómero ACC, ha sido empleada como uno de los criterios para demostrar si los sistemas enzimáticos aislados correspondían a los sistemas "in vivo" (McKeon y Yang, 1984). El otro sustrato del EFE es el oxígeno. La concentración de O_2 requerida para la actividad semimáxima, en pétalos de flores, se ha estimado en el 1% (Konze y cols., 1980) pero la función precisa del O_2 en la reacción es desconocida hasta el presente.

Se han conocido numerosos inhibidores del EFE. El ión cobalto no tiene efecto sobre la síntesis del ACC, pero es muy eficaz inhibiendo el EFE cuando se aplica en el rango de concentración de 10 a 100 μM (Lürssen y cols., 1979; Yu y Yang, 1979). El ácido α -aminoisobutírico, un análogo estructural del ACC, inhibe competitivamente la conversión de éste a etileno, aunque se requieren niveles relativamente altos (Sato y Esashi, 1980); presumiblemente su parecido estructural es el responsable de sus propiedades inhibitorias, y las evidencias indican que el α -aminoisobutirato también se oxida por EFE (Liu y cols., 1984). Es interesante el resaltar que tanto la ciclopropilamina como el ácido 1-aminociclopropano-1-fosfórico, que son convertidos químicamente a etileno el ensayo para ACC (Lizada y Yang, 1979), no son ni eficaces como inhibidores ni convertidos a etileno "in vivo". Los secuestradores de radicales libres representan otra clase de inhibidores. Aunque muchos de ellos son eficaces bloqueando la conversión de ACC a etileno "in vivo" (Yang y Hoffman, 1984), carecen de la especificidad deseada para la acción diana de los inhibidores enzimáticos.

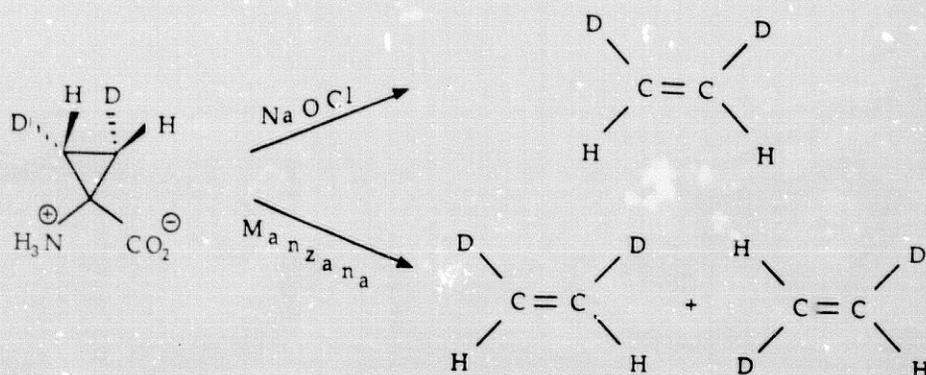
Mientras que la conversión de ACC a etileno en vegetales estaba inicialmente considerada como una reacción extremadamente inusual, se conocen numerosas preparaciones enzimáticas (AIA-Oxidasa, peroxidasa, lipooxigenasa, homogenados de tallos de guisante o preparaciones microsómicas), que convierten ACC a etileno en

presencia de varios cofactores. Mientras que estos sistemas son generalmente dependientes de O_2 , carecen de la especificidad y afinidad para el ACC característicos del EFE nativo (Guy y Kende, 1984; McKeon y Yang, 1984; Venis, 1984). Estos sistemas enzimáticos exhiben una K_m para el ACC de 3 a 389 mM, por lo que su afinidad para este compuesto es mucho más baja que la encontrada para el EFE. Además, estos sistemas, no discriminan entre los 2-etil-ACC estereoisómeros como lo hace el EFE (Guy y Kende, 1984; McKeon y Yang, 1984; Venis, 1984). Es probable que estos sistemas generen especies de oxígeno activo, tales como peróxido de hidrógeno o superóxido, que pueden reaccionar químicamente con el ACC para producir etileno (McRae y cols., 1982; Yang y Hoffman, 1984).

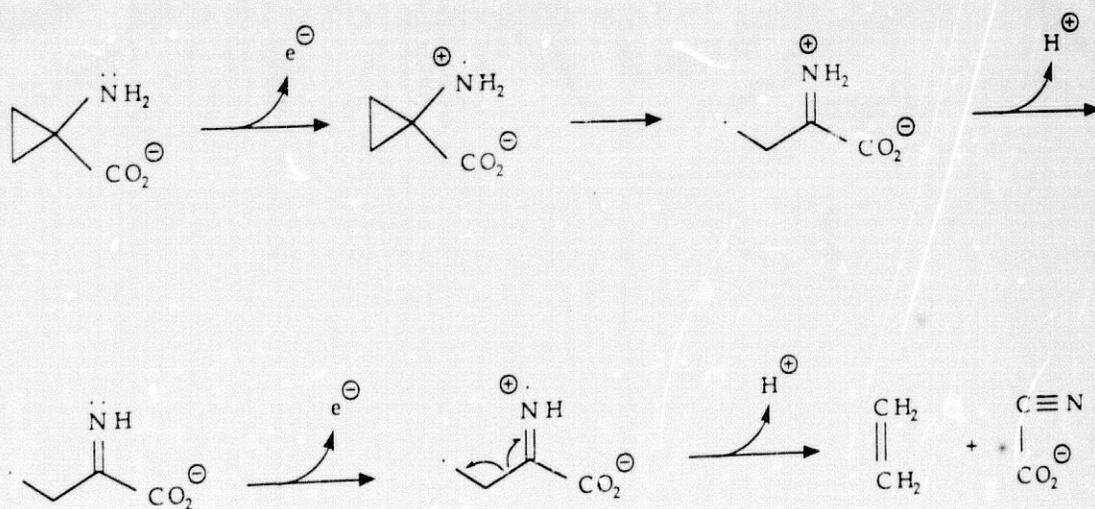
El estudio de los productos de reacción del EFE ha sido muy importante para comprender el mecanismo del enzima. Como la 1-fenilciclo-propilamina es oxidada químicamente dando etileno y benzonitrilo, via ión nitronium (Adams y Yang, 1981) se propuso que el ACC debía ser oxidado por el EFE formando el correspondiente intermediario ión nitronium, que es degradado a etileno (derivado de los C-2 y C-3 del ACC) y ácido cianofórmico (derivado del grupo carboxilo del ACC), el cual es degradado espontáneamente a HCN (derivado del C-1 del ACC) y CO_2 (derivado del grupo carboxilo del ACC). En base a los productos de reacción propuestos, Peiser y cols., (1984) demostraron que el grupo carboxilo del ACC es liberado como CO_2 , mientras que el C-1 produce HCN, que es rápidamente metabolizado para producir β -cianoalanina y asparragina.



Puede notarse que en la conversión de ACC a CO_2 , HCN y etileno está implicada la oxidación de $2e^-$. Cuando el cis- y trans-2,3- dideutero-ACC son oxidados con hipoclorito se libera cis- y trans-dideutero-etileno respectivamente, confirmando que esta reacción ocurre por un mecanismo concertado, probablemente vía ion nitronium (Adlington y cols., 1983). Sin embargo, cuando se incuban secciones de manzana con uno de estos dideutero-ACC, el marcaje se reparte homogéneamente y se producen cantidades iguales de cis y trans dideutero-etileno.



Estas observaciones indican que las reacciones biológicas no ocurren de manera concertada, pero actúan mediante un mecanismo secuencial implicando a un intermediario que permite un intercambio homogéneo de los hidrógenos del anillo. Debido a que la oxidación electrolytica del cis-2,3-dideutero-ACC también produce HCN y da lugar a un reparto en el marcaje en el 1,2-dideutero-etileno, como se observó en tejidos vegetales, se sugiere que ambas reacciones, la electrolytica y la del EFE, ocurren por medio de la oxidación de 1 ó 2 electrones del ACC a través de un radical catiónico, y no a través del intermediario ión nitronium, que es el producto de la oxidación de 2 electrones (Pirrung, 1983).



Un problema con tal intermediario (así como para el ion nitronium) es que es muy reactivo y requiera su estabilización "in vivo". Baldwin y cols., (1985) encontraron que varios metales de transición oxidantes (Cu^{2+} , MnO_4^- , FeO_4^{2-}) producen etileno desde el 2,3-dideutero-ACC con pérdida estereoquímica como se observa en tejidos vegetales. Postularon que estaba implicado un ión metálico en la generación y estabilización del radical catiónico.

La caracterización del EFE aislado es esencial para comprender la regulación de la biosíntesis del etileno, aunque el aislamiento del EFE es uno de los puntos claves en la investigación del etileno. Los protoplastos y vacuolas intactos poseen EFE funcionales (Guy y Kende, 1984), pero después de la ruptura de la membrana plasmática o la membrana vacuolar, la actividad EFE se pierde. Obviamente, el secreto del aislamiento del EFE reside en conocer por qué el EFE pierde toda la actividad después de romperse la membrana celular. La sensibilidad del EFE a los detergentes, frío y osmóticos, entre otros tratamientos, sugieren que se requiere una membrana intacta para aislar EFE funcional. La membrana puede ejercer muchas funciones: se propuso que la actividad EFE estaba relacionada con un flujo de protones a través de la membrana que sólo funciona en vesículas intactas; esta idea se basa en la inhibición de EFE por el 2,4-dinitrofenol, un desacoplador del transporte de protones; de forma alternativa, el EFE debe necesitar un sistema transportador de e^- unido a membrana. Ya que la oxidación del ACC por el EFE implica una transferencia secuencial de e^- la ruptura de la membrana podría conducir a una pérdida de actividad por interferir con la integridad de la cadena transportadora de e^- . Finalmente, la membrana puede proteger el EFE por mantener una concentración alta de un cofactor todavía no caracterizado o, por otra parte, proteger al EFE de la inactivación.

El EFE, medido como producción de etileno en presencia de una concentración saturante de ACC, está presente en muchos tejidos de vegetales superiores, con la excepción de frutos no maduros (Yang y Hoffman, 1984). Sin embargo, bajo algunas condiciones de stress, en respuesta al etileno, o en ciertos estadios del desarrollo (tales como maduración de frutos), el nivel de EFE incrementa marcadamente y regula eficazmente la producción de etileno (Yang y Hoffman, 1984). Melón y tomate preclimáticos intactos presentan bajos niveles de EFE que aumentan marcada-

mente al ser tratados con etileno (Liu y cols., 1985). El EFE también responde al stress ambiental, aumentando por encima de 8 veces en una hora con tratamiento de marchitamiento y disminuyendo después de la rehidratación (McKeon y cols., 1982). Las altas temperaturas (superiores a 35°C) provocan una caída de la actividad EFE que desaparece a 40°C (Yang y Hoffman, 1984).

III.- N-malonil-ACC-Transferasa.

Como consecuencia del aumento en los niveles endógenos de ACC durante el crecimiento o en respuesta a stress, parece lógico que los vegetales requieran algún medio para secuestrar etileno a fin de evitar una superproducción del mismo. La N-malonización del ACC tiene este fin; la producción de etileno "in vivo" se reduce por la N-malonización del ACC y es promovida por su bloqueo (Liu y cols., 1983).

La ACC-N-malonil-Transferasa ha sido aislada y parcialmente purificada de hipocotilos de *Vigna radiata* (Kionka y Amrhein, 1984). El donador de malonil es la malonil-CoA, con una K_m de 0.25 mM; a concentraciones superiores a 0.75 mM, el malonil-CoA inhibe la Transferasa (Kionka y Amrhein, 1984). La K_m para el ACC es 0.15 mM; AEC (ácido 1-amino-2-etilciclopropano carboxílico (Liu y cols., 1984), D-Aas no polares (D-metionina, D-fenilalanina y D-alanina) (Kionka y Amrhein, 1984; Su y cols., 1985) y ácido α -aminoisobutírico (Liu y cols., 1984) pueden también ser malonizados. Se cree que la D-aminoacil-maloniltransferasa y la ACC-malonil-Transferasa son la misma enzima (Liu y cols., 1984; Su y cols., 1985).

La siguiente cuestión es el papel fisiológico del MACC. Se propuso la hipótesis de que el MACC era una manera de almacenar ACC en forma no reactiva y que podría ser hidrolizado a ACC, cuando se necesitara, para la producción de etileno. Tal sistema debe ser utilizado, por ejemplo, para la producción de etileno durante la germinación de la semilla. No obstante, en semillas de cacahuete en germinación, que contienen altos niveles de MACC (50 a 100 nmoles/g de tejido), el etileno procede, casi exclusivamente, del ACC producido "de novo" y el MACC se convierte en etileno con una velocidad de menos del 2% de la velocidad con que se transforma el ACC (Hoffman y cols., 1983). Previamente, Satoh y Esashi (1981) publicaron que la aplicación

de D-Aas aumentaba el contenido de ACC y promovía la producción de etileno en cotiledones de *Xanthium pennsylvanicum* Wallr. Estos resultados pueden explicarse ahora porque conocemos que los D-Aas inhiben la malonización del ACC, con lo que aparece un nivel más alto de ACC y, por lo tanto, una mayor velocidad de producción de etileno. Cuando a los cotiledones mungbean se les añade ACC y D-Aas, se inhibe la formación de MACC, apareciendo mayores niveles endógenos de ACC y un incremento paralelo tanto en la producción de etileno como en la malonización del D-Aa (Liu y cols., 1983). Así, el MACC actuaría como un sumidero de ACC reduciendo sus niveles y, por tanto, reduciendo la producción de etileno.

La Transferasa está presente en una amplia variedad de tejidos vegetales. Además, la expresión de actividad malonil-transferasa en tomate preclimatérico está fuertemente promovida por tratamientos con etileno (Liu y cols, 1985), suministrando un mecanismo autorregulador por limitar la producción de gas.

Como se describió anteriormente, el reciclamiento del grupo tio-metilo del SAM es importantísimo para el mantenimiento de la producción de etileno. La ruta de reciclamiento del MTA no ha sido esclarecida completamente ni en plantas ni en animales (Fig. 1), pero los productos e intermediarios conocidos son similares en plantas (Fig. 1) y animales con una excepción: mientras que los animales usan MTA-fosforilasa para metabolizar MTA a MTR-1-P en un único paso, las plantas utilizan MTA-nucleosidasa, que convierte el MTA en MTR, y a continuación la MTR-kinasa, que convierte MTR en MTR-1-P (Kushad y cols., 1983). En ambos sistemas, el MTR-1-P es convertido posteriormente en metionina a través de varios pasos enzimáticos que han sido parcialmente caracterizados (Fig. 2). El MTR-1-P es, finalmente, convertido en α -ceto-metilbutirato, KMB, en una serie de reacciones enzimáticas en las que se utiliza O_2 molecular, perdiéndose el C-1 del MTR-1-P como ácido fórmico (Kushad y cols., 1983). Aunque en extractos de tejidos animales se producen al menos dos intermediarios en este paso (y presumiblemente también en extractos vegetales), éstos no han sido identificados. Para completar el ciclo, el KMB es transaminado a metionina, la cual es adenosilada para formar SAM. El resultado total de este ciclo es que la mitad ribosa del ATP provee la mitad de 4 carbonos de la metionina de la que procede el ACC; el grupo CH_3S de la metionina, sin embargo, se conserva para la

regeneración continua de metionina (Yang y Hoffman, 1984). Sin embargo sobre la regulación de esta ruta recicladora se conoce poco hasta el momento.

Debido a que el SAM es el elemento clave en la biosíntesis de poliaminas y en las reacciones de metilación, su disponibilidad para la síntesis de ACC podría también ser un factor limitante en la producción de etileno. La enzima ATP:L-metionin-S-adenosil-Transferasa (metionina-adenosiltransferasa) es responsable de la conversión de metionina en SAM. Esta enzima no ha sido estudiada en profundidad en vegetales, pero la metionina-adenosil-transferasa de plántulas de guisante, que ha sido parcialmente purificada (Aarnes, 1977) parece ser similar a la de fuentes animales, además de poseer similares K_m para la metionina (0.4 mM) y ATP (0.3 mM); el enzima es también inhibido por altos niveles de SAM. Sin embargo, la transferasa es inhibida por AMP y estimulada por ADP, sugiriendo una posible regulación por la carga energética del adenilato (Aarnes, 1977). Esta enzima en hojas de cebada parece estar localizada en el citosol (Wallsgrave y cols., 1983) no encontrándose ninguna actividad en orgánulos aislados.

Existen evidencias experimentales que sugieren que los niveles de SAM pueden regular la producción de etileno. La adición de seleno-metionina a flores senescentes de *Ipomea tricolor* provoca un mayor velocidad de producción de etileno que las alimentadas con metionina (Konze y Kende, 1979); estos autores proponen que esta estimulación en la producción de etileno, se debe a la mayor reactividad de la seleno-metionina con la Metionina-adenosil-transferasa que con respecto a la metionina.

La concentración de SAM puede afectar a la producción de etileno, según se deduce de los estudios acerca de la inhibición de la producción de etileno por poliaminas. La inhibición de la síntesis de ACC por AOA provoca un incremento en la producción de poliaminas, mientras que la inhibición de la biosíntesis de PAs aumenta los niveles tanto de ACC como de etileno (Roberts y cols., 1984).

La producción de ACC y PAs pueden ser, por consiguiente, mutuamente inhibidoras porque ambas son derivadas del grupo aminopropilo del SAM, y compiten por los niveles disponibles del mismo. La función de la actividad adenosil-transferasa en

relación con la regulación de la biosíntesis de etileno todavía no está perfectamente clara.

3.7.1.4- Control de la biosíntesis de etileno.

Se han hecho bastantes progresos para comprender la biosíntesis de etileno y su regulación aunque siempre se han estudiado tejidos intactos o sistemas enzimáticos relativamente crudos. Hasta ahora los objetivos primarios para la aclaración de la regulación bioquímica de la biosíntesis de etileno, son el aislamiento y purificación de la enzimas individuales, las cuales una vez purificadas facilitarán mucho el aislamiento del correspondiente material genético; es decir, que el conocimiento de la biosíntesis de etileno se extiende a nivel genético. Este conocimiento, basado en el uso eventual de la biología molecular, servirá para alterar, de forma predecible, el desarrollo y la conducta ambiental de los vegetales, mejorando su producción y sus características cualitativas.

Existen muchos factores que afectan a la producción de etileno: temperatura, luz, otros gases (oxígeno y anhídrido carbónico, principalmente) y muchas situaciones de "stress", tales como déficit hídrico, tratamientos con ciertos agentes químicos, bajas temperaturas, encharcamiento, radiaciones, heridas de insectos y mecánicas e infecciones microbianas, entre otros (Mansour y cols., 1987; McKeon y Yang, 1987).

A.- Etileno y auxinas.

El AIA induce la producción de etileno en gran número de plantas, atribuyéndose al gas muchos de los efectos que ejerce la auxina sobre el crecimiento. La auxina y el O_2 deben estar continuamente presentes para que se produzca etileno (Abeles, 1973; Lau y Yung, 1974; Imaseki y cols., 1977). La auxina estimula la conversión enzimática de SAM en ACC (Jones y Kende, 1979; Yu y Yang, 1979; Yu y cols., 1979), único paso no constitutivo de plantas, e induce la formación de ACC-sintasa (Yu y Yang, 1979; Jones y Kende, 1979).

B.- Etileno y giberelinas.

Estas dos sustancias reguladoras del crecimiento unas veces actúan sinérgicamente y otras antagónicamente (Koning y Raab, 1987; Raab y Koning, 1987). Se ha visto que en los sistemas donde el etileno actúa como promotor del crecimiento, el CO₂ y las giberelinas son antagónicas del mismo (Lieberman y Kunishi, 1972). En semillas, las giberelinas son inactivas o tienen poco efecto sobre la producción de etileno, aunque la inducción de la germinación por el etileno es parcialmente dependiente de los sistemas biológicos alternativos, regulados por giberelinas (Dunlap y Morgan, 1977 a, b).

C.- Etileno y citoquininas.

Las citoquininas aumentan la producción de etileno en muchas especies (Abeles, 1973; Lieberman, 1975; Zimmerman y cols., 1977); rompen la dormición de muchas semillas, pero su efecto sobre la producción del etileno no ha sido suficientemente estudiado.

La influencia estimuladora del Ca⁺⁺ sobre la producción de etileno, puede estar relacionada con la estabilización del sistema enzimático implicado (Legge y cols., 1982), supuestamente localizado en la membrana plasmática (Mattoo y Lieberman, 1977 a, b; Forney y cols., 1982) y/o en el tonoplasto (Bouzayen y cols., 1990), y con la regulación del intercambio iónico que ocurre a través de la membrana (Hanson, 1984); otra posibilidad sería la expuesta por Cheverry y cols., (1988), los cuales proponen que el Ca⁺⁺ del citosol favorece el transporte del ACC, desde sus lugares de síntesis o almacenaje, hasta los sitios de conversión en el plasmalema. La quinina actúa sinérgicamente con el Ca⁺⁺ y el AIA en la producción de etileno (Lau y cols., 1977), probablemente suprimiendo el sistema de conjugación de las auxinas libres, aunque la explicación más probable es que la quinina estimula la síntesis de AIA (Noor-Saleh y Hemberg, 1980 a, b).

Se ha sugerido que en ausencia de quinina, el Ca⁺⁺ se liga a un componente de la pared celular, por lo que no está disponible en el lugar de producción del etileno

(Lau y Yang, 1975; Lejohn y Stevenson, 1973); mientras que en presencia de quinina, ésta podría estimular la liberación de iones Ca^{++} desde la pared celular y aumentar su transporte al lugar de la célula en que se sintetiza etileno. Aunque, tanto la quinina como los iones Ca^{++} , pueden actuar también directa y cooperativamente en la producción de etileno.

La bencil-adenina, BA, incrementa la disponibilidad del ACC del lugar de síntesis de etileno, controlando los niveles endógenos de ACC-sintasa (Yoshii y cols, 1980).

D.- Etileno y Acido Abscísico.

El ABA inhibe la germinación de muchas semillas y reduce los niveles de producción de etileno en semillas de cacahuete. Al igual que el etileno, el ABA, inhibe el crecimiento de plántulas de guisante etiolado, presentando una disminución en la producción de etileno aquellas plántulas que han sido tratadas con ABA (Lieberman y Kunishi, 1972). La adición conjunta de ABA y etileno sobre plántulas de guisante etiolado, conduce a un incremento en la inhibición con respecto a los resultados obtenidos para cada hormona por separado (Lieberman y Kunishi, 1972). Estos resultados sugieren que el ABA y el etileno inhiben el crecimiento por mecanismos diferentes. Gertman y Fuchs (1972), utilizando el mismo material biológico, observaron que el ABA causaba una inhibición en la producción de etileno, tanto endógena como inducida por auxinas (Kondo y cols., 1975). McKeon y cols., (1982) observaron que hojas de trigo pretratadas con ABA, previenen la acumulación de ACC inducida por estrés; el ABA aparentemente no tenía efecto sobre la actividad del EFE, lo cual les permitió sugerir que el ABA regulaba la producción de etileno inducida por estrés a nivel de la síntesis de ACC.

E.- Etileno y poliaminas.

Tanto el etileno como las poliaminas son biosintetizadas en reacciones que utilizan el grupo aminobutirato del SAM. En la biosíntesis del etileno este grupo se libera como ACC, que se oxida a etileno con la liberación de HCN y CO_2 (Yang y Hoffman, 1984). En la biosíntesis de poliaminas, el SAM actúa como fuente de gru-

pos aminopropilo de la espermina y espermidina. Aquí el SAM es primero descarboxilado, transformando al grupo aminobutirato en un grupo aminopropilo. Parte de este aminopropilo se cede a la putrescina, formando la poliamina espermidina, la cual puede de esta forma ser aminopropilada por un mecanismo similar a la producción de espermina (Slocum y cols., 1984).

En relación con la biosíntesis de etileno, se ha demostrado que durante la oxidación del ACC a etileno, el grupo amino del ACC es liberado como HCN. Posteriormente, el nitrógeno del HCN es incorporado en el grupo amida de la asparagina (Peiser y cols., 1984), y posiblemente el nitrógeno de este grupo pueda ser finalmente transferido a la metionina, constituyéndose así el reciclado del nitrógeno. En la síntesis de poliaminas, sin embargo, el nitrógeno de la metionina es incorporado en ellas, por lo que no puede ser reciclado.

Desde que se sabe que tanto la síntesis de etileno como de poliaminas dependen del ciclo de la metionina, se piensa que la regulación de este ciclo puede actuar como un mecanismo de control para la biosíntesis de estos compuestos. No obstante, la regulación de este ciclo es poco conocida.

La biosíntesis de etileno y poliaminas muestran al SAM como precursor común, por lo que existe la posibilidad de que la inhibición de la síntesis de uno pueda promover la del otro; tal hipótesis se basa en el hecho de que la inhibición de la síntesis de ACC desde SAM, produce un aumento de su nivel endógeno que conduce a un incremento en la síntesis de espermidina (Even-Chen y cols., 1982).

La espermidina y espermina parecen inhibir el último paso de la ruta biosintética de la formación de etileno (Even-Chen y cols., 1982). Tratamientos con AVG y espermidina reducen sustancialmente el nivel de ACC en tejidos de hipocotilos de haba de soja.

El hecho de que la espermidina inhibiese la conversión de ACC en etileno (Even-Chen y cols., 1982), parece indicar que esta poliamina inhibe al menos dos pasos de la ruta biosintética del etileno. Podría argumentarse que la inhibición de la

producción de etileno por poliaminas sea meramente un reflejo del hecho de que estos compuestos inhiben el metabolismo celular en general; sin embargo, existen multitud de trabajos que lo hacen improbable.

Las poliaminas y el etileno tienen a menudo efectos opuestos; el etileno promueve procesos relacionados con la senescencia, mientras que las poliaminas pueden retardar muchos de estos procesos (Slocum y cols., 1984). Sin embargo, es dudoso que esta regulación ocurra "in vivo".

3.7.2- Metabolismo del Etileno.

Está bien establecido que muchos microorganismos pueden metabolizar etileno. Este fenómeno ha sido investigado en profundidad en unos pocos casos; Bont (1979) demostró que *Mycobacterium* puede convertir etileno en óxido de etileno, el cual es incorporado sucesivamente en el ciclo del glioxilato, donde el etilen glicol constituye un intermediario importante.

Hasta hace poco, se creía que las plantas superiores carecían de los medios para metabolizar el etileno. Sin embargo, en 1975 Beyer, utilizando ^{14}C -etileno altamente purificado, demostró que las plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) eran capaces de metabolizarlo; la velocidad del metabolismo, a concentraciones fisiológicas (sobre $10 \mu\text{l/l}$), era muy baja (alrededor de $0.01 \mu\text{l}\cdot\text{kg peso fresco}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) lo que parece indicar que existen dos clases de productos, el CO_2 , y otros desconocidos que se incorporan al tejido. Los dos sistemas serán referidos respectivamente en el resto del texto como OX (oxidación de etileno a CO_2) y TI respectivamente.

Aunque el metabolismo del etileno en vegetales fué considerado durante algún tiempo como un artefacto debido a las impurezas del etileno marcado (Abeles, 1973), actualmente está claro que en algunos tejidos el etileno es oxidado a CO_2 , (OX), en otros es incorporado en el tejido, (TI), por conversión a óxido de etileno y etilen-glicol, y en algunas plantas se producen ambos procesos (Smith y Hall, 1984). La diversidad de plantas implicadas en el metabolismo de etileno, sugiere que es un

fenómeno general. En muchos casos, la velocidad del metabolismo es casi de primer orden con respecto al etileno, incluso a grandes concentraciones ($> 40 \mu\text{l/l}$), con una K_m muy alta; en el guisante, la concentración de etileno necesaria para obtener una velocidad de metabolismo semimáxima es 1000 veces superior a la necesaria para obtener una velocidad semimáxima en el test de crecimiento del guisante (Beyer, 1975).

Sin embargo, la K_m para etileno del TI en *Vicia faba*, se corresponde estrechamente con los niveles que provocan respuesta fisiológica (Smith y Hall, 1984). Aunque los sistemas TI y OX en guisantes están semisaturados sólo a niveles muy altos de etileno, Beyer demostró que la eliminación del O_2 y el tratamiento con Ag^+ , retardadores de la acción del etileno, inhiben de forma similar tanto su metabolismo como su respuesta (Beyer y cols., 1984; Smith y Hall, 1984). Son varios los vegetales en los que se relaciona la capacidad para metabolizar etileno con la respuesta que presentan frente al él durante su desarrollo. No obstante, no puede excluirse la posibilidad de que el metabolismo del etileno pueda ser una consecuencia no esencial de la acción del mismo, además de un mediador indispensable de su acción. El papel fisiológico del metabolismo del etileno no se conoce todavía.

Desde los primeros trabajos, parecía evidente que al ser tan baja la velocidad del metabolismo del etileno, el proceso debía tener un pequeño o inexistente impacto en la concentración del gas endógeno, lo que parecía cuestionar seriamente su significado fisiológico. No obstante, Beyer (1984) fue capaz de demostrar que el metabolismo del etileno estaba generalizado por todo el Reino Vegetal, y que los cambios observados en la magnitud de su actividad, en determinados tejidos, estaba correlacionado con los cambios en la sensibilidad al etileno de estos tejidos durante su ciclo de vida.

Por ejemplo, en *Ipomea tricolor*, las yemas florales son insensibles a la aplicación de etileno y, son incapaces de metabolizarlo; pero cuando se desarrollan, sí dan respuesta (lo cual acelera la senescencia de los pétalos), existiendo un incremento paralelo en el metabolismo del etileno (Beyer 1972). Una correlación similar se observó en guisantes, claveles, abscisión de hojas de algodón y hojas senescentes de haba

(Beyer 1977; Hall y cols., 1982). Beyer en 1977 y 1979(a) demostró que los quelatos de metales, como el dietil carbamato y 8-hidroxiquinoleína, y sustancias tales como CS₂ (disulfuro de carbono) y COS (sulfuro de carbonilo) inhibían el metabolismo del etileno, al igual que las bajas presiones de oxígeno.

Estas observaciones estaban de acuerdo con los trabajos realizados por Burg y Burg (1967) los cuales indicaban que bajas tensiones de oxígeno inhibían los fenómenos inducidos por etileno, como la triple respuesta en guisante. Por todo ello se pensó durante mucho tiempo que en la acción del etileno estaba implicado un receptor que contenía un metal.

La baja velocidad del metabolismo imposibilitaba su estudio "in vitro". Con el descubrimiento en cotiledones de (*Vicia faba*) de un sistema metabolizante de etileno (Jerie y Hall 1978), se resolvía en parte este problema; este sistema difería en dos aspectos respecto al de guisantes: primero, el metabolismo era rápido a concentraciones fisiológicas de etileno (2 o 3 veces superior al de guisante) y segundo, sólo se formaba un producto primario, el óxido de etileno (C₂H₄O), no ocurriendo una conversión significativa de etileno a anhídrido carbónico.

Gracias a la alta actividad mostrada por este sistema metabolizante de etileno, resultó posible caracterizar extensamente el enzima implicado (Smith y cols., 1985). Este enzima era una monooxigenasa, que requería oxígeno y NADPH para su actividad catalizando la siguiente reacción:



Blomstrom y Beyer (1980), demostraron en guisante que el primer producto detectable en TI era etilen glicol el cual se convertía en su conjugado glucosilado (β -2-hidroxietyl-D-glucósido). El óxido de etileno es fácilmente convertido a etilen glicol en una reacción, enzimática o no, via hidrasa epóxida, por lo que parece probable que tanto en guisante como en *Vicia* el primer producto del TI sea precisamente el óxido de etileno (es decir, TI también es un sistema oxidante).

En sistemas como el guisante, en donde se forma CO_2 y óxido de etileno, el primero no se produce a partir del segundo (ya que plantas crecidas con óxido de etileno no producen CO_2) por tanto ambos sistemas no pertenecen a la misma vía.

Estructuras análogas fisiológicamente activas, como el propileno y el acetileno, inhiben competitivamente la oxidación de etileno en *Vicia* y su capacidad de inhibición era paralela a la falta de efectividad para minimizar los efectos del etileno sobre el control de los procesos del desarrollo. Estructuras análogas inactivas, tales como el etano, carecen de efecto en la oxidación de etileno.

A. Cinética de la monooxigenasa "in vivo".

Se han comparado "in vivo" los sistemas metabolizantes de etileno en guisantes y en *Vicia* (Smith y cols., 1985), concluyéndose que la K_m de la monooxigenasa en *Vicia* es, para el etileno, del orden de 10^{-9} M mientras que TI y OX en haba tienen una K_m alrededor de 10^{-6} M. Es decir, que el enzima en *Vicia* tiene una mayor afinidad por el sustrato que en *Pisum*.

B. Papel del óxido de etileno

Aunque en trabajos anteriores se demostraba que el óxido de etileno no tenía efecto o era tóxico (Lieberman y Mapson, 1962) en la actualidad se sabe que no tiene efecto por sí mismo sobre los procesos sensibles al etileno, pero existe sinergismo entre el etileno y sus respuestas; es decir, que a concentraciones de etileno subóptimas, la inclusión de óxido de etileno produce una respuesta óptima o casi óptima. Esto se demostró en la triple respuesta del guisante, en la abscisión de hojas de algodón y en el crecimiento de coleótilos de arroz (Beyer, 1984).

Se encontraron sitios de unión para el etileno en *Phaseolus vulgaris* y *Vigna radiata*, (lugares en los que el gas se une con alta afinidad y especificidad).

3.7.3 Modo de Acción.

Todavía no está suficientemente claro. Se sabe que el etileno se puede metabolizar y existen fuertes evidencias que indican que el metabolismo es esencial para su acción. Se conoce que el etileno provoca muchas respuestas fisiológicas y se ha demostrado que induce cambios específicos en la expresión génica; todos estos cambios deben estar mediados en alguna medida por un receptor proteico. Queda por demostrar como es posible que un simple hidrocarburo, el etileno, tenga este efecto dramático sobre el desarrollo vegetal.

Se ha demostrado que el etileno induce la síntesis de nuevos ARNm y proteínas (Christoffersen y Laties, 1982; Kelly y cols., 1987). Por analogía con otras hormonas vegetales y animales, se cree que su acción está mediada por un receptor, sin embargo, siguen existiendo discusiones acerca de si el etileno actúa por medio de un metabolito, como por ejemplo óxido de etileno o el etilen-glicol (Beyer, 1975; Smith y Hall, 1984).

El sitio de unión del etileno ha sido aislado y parcialmente purificado de varias especies vegetales incluyendo tabaco, judías y tomates (Sisler y Goren, 1981; Smith y Hall, 1984); la unión del etileno a estos sitios es saturable a niveles fisiológicos y la K_D para el etileno.

En todos los casos, el componente de unión al etileno (EBP) está ligado a la membrana y es soluble en detergentes. Parece una proteína por la sensibilidad que presenta al calor, a las proteasas, a los agentes sulfidrilos y por su solubilidad y su conducta cromatográfica (Sisler, 1982; Smith y Hall, 1984). Las propiedades del receptor aislado son similares a las esperadas según los estudios de la acción del etileno "in vivo".

Recientemente, Sanders y cols., (1991) han localizado en *Pisum sativum* dos lugares de alta afinidad para el etileno: la afinidad del primero es tan rápida que probablemente sea el receptor; respecto al segundo lugar, se especula que está relacionado

con un receptor responsable de las respuestas lentas del etileno. Wood (1990), purificó y caracterizó la proteína que se une al etileno en *Phaseolus vulgaris*; está localizada preferentemente en el plasmalema (integral) de las células del cotiledón y zona de abscisión, con diferentes afinidades para cada uno, lo que refuerza los resultados de Sanders y cols., (1991).

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO OBJETO DE ESTUDIO.

Es bien sabido que el desarrollo de las plantas está íntimamente relacionado con las sustancias reguladoras del crecimiento ó fitohormonas, y que la alteración de sus concentraciones, así como la relación existente entre ellas, provocan las diferentes etapas en el crecimiento de la planta en general y de sus órganos en particular.

En los últimos años se han venido realizando gran cantidad de trabajos de investigación con el fin de esclarecer los fenómenos que ocurren en el eje embrionario de la semilla durante los primeros momentos de la germinación, período éste de gran importancia para el posterior desarrollo de la futura plántula, que en un espacio de tiempo más ó menos largo, va a convertirse en una planta autosuficiente. Las semillas de leguminosas son quizás de las más estudiadas en este sentido.

La aplicación exógena de fitohormonas, a concentraciones relativamente bajas (cerca de la endógena), sirve para tener un conocimiento aproximado de su(s) efectos tanto a nivel morfológico como fisiológico. La reversión de su acción por sustancias naturales o sintéticas, cuyo efecto es conocido, sirve para acercarnos al mecanismo de acción de la fitohormona objeto de estudio.

Con esta Memoria se inicia una Línea de Investigación tendente a conocer y aclarar una serie de características relacionadas con el control de la germinación de semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) por etileno; el estudio se realizó en el eje embrionario aislado, el cual constituye un sistema modelo muy apropiado ya que podemos conocer que factor(es) procedentes del cotiledón modifican o coordinan el crecimiento y desarrollo del órgano. Si conocemos estas sustancias del material de reserva, podemos introducirlas en el medio nutritivo y simular en cierto modo al cotiledón.

El espacio de tiempo elegido para este estudio fue de 24 horas; implicando por tanto un período altamente complejo, ya que durante el mismo se van a producir un buen número de procesos que tendrán una incidencia decisiva en la inducción de una plántula viable y autosuficiente.

El etileno, es la única hormona gaseosa conocida y, al igual que sucede con las giberelinas y citoquininas, promueve la germinación de una gran variedad de semillas cuando es aplicado exógenamente o se promueve su síntesis. Sin embargo, una serie de investigadores coinciden en señalar que la producción de etileno durante la germinación es un efecto de la propia germinación y no una causa.

Las poliaminas, son consideradas actualmente por ciertos autores, bien por su efecto sobre la biosíntesis de etileno, bien por sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo en plantas superiores, como una nueva familia de hormonas vegetales (Galston y Kaur-Sawhney, 1988), aunque también existen investigadores que opinan que su papel es simplemente el de un "mensajero" y que nada tienen que ver con las fitohormonas.

Ejes embrionarios aislados de semillas imbibidas durante 4 horas en agua destilada, se pusieron a crecer en placas Petri durante el tiempo requerido, bien en presencia de la correspondiente poliamina (espermina, espermidina o cadaverina) ó bien en presencia de agua destilada estéril. Al cabo del tiempo deseado, se midieron los siguientes parámetros:

- 1- Peso fresco, peso seco y contenido de agua inducidos por:
 - la composición del medio.
 - la presencia de diversas poliaminas exógenas.
 - la presencia de ácido abscísico exógeno.

- 2- Nivel de los principales iones en el eje embrionario.
 - Efecto de las poliaminas añadidas exógenamente.

- 3- Producción de etileno:
 - Efecto de las poliaminas exógenas.
 - Efecto del ABA aplicado exógenamente.
 - Efecto de inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas.
 - Efecto de inhibidores osmóticos.

El conocimiento del metabolismo del etileno y su mecanismo de acción como hormona serán de gran utilidad para controlar aquellos procesos en los que esté implicado. Su precursor fisiológico en plantas superiores es el aminoácido metionina, y en la ruta que lo transforma en etileno actúan como intermediarios el S-adenosilmetionina (SAM) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Yang y Hoffman, 1984). Así mismo, el SAM es también un precursor para la síntesis de poliaminas (espermina y espermidina) (Slocum et al., 1984).

En este sentido se realizaron las siguientes determinaciones:

- 1.- Valoración de ACC, Malonil-ACC (ACC-ligado) en el eje embrionario de garbanzo durante las primeras 24 h de germinación.
- 2.- Actividad ACC-sintasa (SAM \rightarrow ACC), actividad EFE (ACC \rightarrow gas) así como actividad N-malonil-ACC-transferasa (ACC \rightarrow MACC).
- 3.- Producción de etileno durante las primeras 24 horas de germinación del eje embrionario aislado.
- 4.- Cuantificación del ABA libre y ligado endógeno durante las primeras 24 h de germinación.
- 5.- Incidencia del ABA (ácido abscísico) exógeno tanto sobre el nivel de los intermediarios como sobre la actividad de los enzimas relacionadas con la biosíntesis de etileno.
- 6.- Alteraciones provocadas por ABA y poliaminas exógenas en la producción de etileno.
- 7.- Influencia de diferentes tipos de activadores e inhibidores sobre la producción de etileno, sus intermediarios y enzimas relacionadas.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* L. seleccionadas por homogeneidad de tamaño y correspondientes a las cosechas 1986-1990. Su conservación y almacenamiento se llevó a cabo a 4°C hasta el momento de su utilización. Previo al inicio de nuestros experimentos hemos realizado un test de germinación; el porcentaje de emergencia radicular osciló entre el 95-98% (18-24 horas).

2. PREPARACION DEL MATERIAL.

2.1. Esterilización del material fungible.

El material de vidrio, una vez limpio, así como el papel de filtro se esterilizó en una estufa a 100°C durante un mínimo de 4 horas. El agua destilada se esterilizó en autoclave. Las bateas se esterilizaron lavándolas con alcohol etílico y dejándolas evaporar en cámara de flujo laminar. Las pinzas se esterilizaron a la llama.

2.2. Imbibición de las semillas.

Una vez escogidas las semillas, cuya cantidad dependía del estudio a realizar, y después de hacer una selección previa desechando aquellas que presentaban alguna alteración externa, se lavaron tres veces con agua destilada y una cuarta con agua destilada estéril; a continuación se cubrieron con agua destilada estéril dejándose 4 horas en imbibición a temperatura ambiente y oscuridad en cámara de flujo laminar. Se eligió este tiempo de imbibición porque era el tiempo mínimo necesario para que los ejes embrionarios se imbibieran totalmente, separándose así de los cotiledones a los cuales estaban íntimamente unidos mientras las semillas estaban secas, permitiendo, de esta forma, aislar los ejes embrionarios con facilidad y sin riesgo de rotura.

2.3. Obtención de los ejes embrionarios.

Transcurrido este periodo de imbibición, los ejes embrionarios son separados manualmente en una cámara de flujo laminar y lavados con abundante agua estéril; a continuación se secaron en superficie y pesaron hasta obtener 0.5 g/batea; se contaron para evaluar su peso fresco/eje así como la producción de etileno por eje.

Una vez pesados, se depositaron en bateas estériles que contenían papel de filtro estéril. Dicho papel de filtro se humedeció con 40 ml de una solución tampón: Tris-ClH 10 mM, ClK 20 mM, sacarosa libre de ribonucleasa 10 mg/ml, cloranfenicol 50 μ g/ml, (Sánchez-Calle y cols, 1989) a la que se añadieron los diferentes tratamientos.

El crecimiento de los ejes embrionarios se llevó a cabo en una estufa a 25°C, en oscuridad y una humedad relativa del 70%, durante el tiempo requerido para cada experiencia en concreto.

3. VALORACION DEL PESO FRESCO.

Una vez transcurrido el tiempo deseado de crecimiento, los ejes embrionarios son cuidadosamente secados en papel de filtro, contados y pesados con el fin de determinar el peso que han inducido los distintos tratamientos. Inmediatamente se calcula el peso por eje embrionario.

4. PESO SECO Y PORCENTAJE DE AGUA.

El material vegetal, una vez valorado el peso fresco, se lleva a una estufa a 70°C-80°C durante 16-24 horas, hasta que el peso sea constante. Transcurrido este tiempo, el material vegetal se deposita en un desecador de 10 a 15 minutos a fin de que no tome agua en el proceso de enfriamiento.

El peso correspondiente, una vez enfriados, se considera el peso seco, siendo la diferencia con el de partida el contenido en agua, cuyo porcentaje se calculó por la expresión:

$$\%H_2O = \frac{\text{peso fresco-peso seco}}{\text{peso fresco}} * 100$$

5. MINERALIZACION Y DETERMINACION DE LOS ELEMENTOS MINERALES.

El material recogido y preparado como se ha indicado anteriormente, se sometió a una mineralización sulfúrica (Wolf, 1982).

Las muestras una vez desecadas en estufa y pesadas, se depositaron en sendos kjeldahls y se les añadieron 5 ml de SO_4H_2 concentrado depositándose en rampas de mineralización durante 10-15 minutos; una vez frios se les añadieron 2 ml de H_2O_2 de 110 volúmenes (30% de concentración y libre de fósforo), y se depositaron nuevamente en la rampa de mineralización; esta operación con el agua oxigenada se repite tantas veces como sea necesario para destruir la materia orgánica. Es muy importante enfriar el mineralizado antes de añadirle el H_2O_2 ; la adición del peróxido de hidrógeno produce una reacción exotérmica y si el mineralizado está caliente la energía generada puede volatilizar numerosos compuestos perdiéndose para la valoración.

Para eliminar el fósforo del agua oxigenada, se pasa por una resina aniónica en agitación que lo retiene.

Una vez destruida la materia orgánica, el mineralizado adquiere color transparente; momento en el cual, una vez frío, se le añade agua destilada estéril que provoca una nueva reacción exotérmica, por lo que debe dejarse enfriar nuevamente; se enrasa hasta 50 ml con agua destilada estéril y se pasa la solución resultante a botes de plástico, debidamente etiquetados, lavados previamente con abundante agua estéril y secados en estufa a $60^\circ C$ durante 24 horas.

Del mineralizado resultante se determinarán los siguientes elementos:

- Potasio y sodio: por fotometría de llama (Lachica y cols., 1973).
- Calcio: la determinación se realiza por espectrofotometría de absorción atómica (Pinta, 1973) a una longitud de onda de 422.7, 285.2, 279.3 nm respectivamente y una llama de aire-acetileno en todos los casos. Previamente se efectuó una dilución con O_2 . La para evitar interferencias (Lachica y cols., 1973).
- Fósforo: se basa en la medida colorimétrica del azul de molibdeno obtenida a partir del complejo fosfomolibdico, utilizando ácido ascórbico como reductor, en presencia de tartrato de potasio y antimonio (González y Baez, 1972).

6. CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE ACTIVADORES O INHIBIDORES.

Las sustancias cuyas concentraciones se detallan, se han administrado a los ejes embrionarios en solución nutritiva tampón bajo las condiciones ya descritas:

ABA	(5, 25 y 50 μ M)
ACC	(200 μ M)
AOA	(0.1, 0.5, 1, 5 mM)
AVG	(1 mM)
CH	(20 μ g/ml)
Cl_2Co	(1 mM)
CV	(0.1, 1, 5, 10 mM)
EGTA	(5, 10, 15 mM)
5-FU	(5 mM)
MACC	(4 mM)
MANITOL	(10, 50, 100 y 500 nM)
SACAROSA	(5, 10, 20 mg/ml)
SP	(0.1, 1, 5, 10 mM)
SPD	(0.1, 1, 5, 10 mM)
TU	(50 mM)

7. EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA.

Para establecer el pH óptimo de la solución nutritiva tampón, se pusieron a crecer los ejes embrionarios bajo distinto rango de pH en tampón Tris-Clorhídrico.

Así mismo se hizo un estudio sobre el efecto de la temperatura en la producción de gas a 25, 30 y 35°C, estableciéndose como temperatura de producción óptima 25°C.

8. DETERMINACION DE ETILENO.

I. Metodología.

Se utilizaron frascos de vidrio de 25 ml, provistos de tapón de rosca horadado y cubierto el orificio con un septum de silicona solidificable para asegurar el cierre hermético, desechándose los que se encontraban deteriorados. Los frascos llevaban en su interior un disco de papel de filtro sobre el que se colocaba el material vegetal.

Media hora antes de transcurrido el tiempo requerido, el material de cada batea se pasaba a sendos frascos con tapón de rosca para la medida de etileno. El papel de filtro estéril que contienen estos frascos, se humedece con 0.25 ml de la solución correspondiente, se cierran los frascos tomando el tiempo exacto de cierre y se envuelven en papel de aluminio para conservar la oscuridad en su interior; el trasvase del material vegetal se realizó en cámara de luz verde.

Transcurrida exactamente media hora se procede a medir el etileno producido por los ejes embrionarios de cada bote tomando un mililitro de la atmósfera interior mediante una jeringa de gases y determinando el etileno por cromatografía gaseosa.

Tras la medida de etileno se tomaron los ejes de cada bote se lavaron con abundante agua destilada estéril, se secaron en superficie y pesaron nuevamente para ver el incremento de peso producido. El material posteriormente se congeló en N₂ para su futura utilización.

II. Medida del etileno liberado.

Pasada media hora desde que se cerraron los frascos se tomó un mililitro de la atmósfera interior mediante una jeringa de gases, determinando el etileno por cromatografía gaseosa.

III. Preparación de los patrones.

Como patrón se utilizó etileno suministrado por la S.E.O. de una pureza del 99.3%, inyectando siempre en el cromatógrafo 0.3 ml. de las concentraciones que expresadas en $\mu\text{l/l}$ fueron las siguientes:

0.01 0.1 1 10 100

Con estos valores se realizó una curva patrón, poniendo en abscisas el área de los picos del gráfico del cromatógrafo y en ordenadas las concentraciones inyectadas. Los valores de las medidas realizadas se obtuvieron por interpolación en la gráfica.

IV. Instrumental.

El cromatógrafo utilizado fue Carlo-Erba FTV-2350 que posee un detector de ionización de llama de hidrógeno con un flujo de 30 ml/min y un flujo de aire de 300 ml/min.

La columna empleada fue un POROPAK-R de 80-100 mesh, con un tamaño de 2 m de longitud por 3 mm de diámetro interno. La temperatura del horno fue de 70°C y la del inyector de 150°C y la del detector 200°C. El gas portador fue nitrógeno, con una velocidad de flujo de 20 ml/min.

V. Expresión de los resultados.

El etileno desprendido se expresó de tres formas distintas: $\text{nl.eje}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $\text{nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\text{nmoles.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Para ver el etileno desprendido a las distintas horas, se realizaron idént-

ticas experiencias en las que únicamente se variaba el tiempo de incubación, en todos los casos el material vegetal se mantuvo solamente media hora en frasco de 25 ml de tapón de rosca.

9. DETERMINACION DE ACC LIBRE Y CONJUGADO.

Transcurrido el tiempo de germinación deseado el material vegetal (1 g) se homogeneizó en mortero con 30 ml de etanol frío al 70% y se mantuvo en ebullición a reflujo durante 20 minutos tras los cuales se filtró por gasa cuádruple y se llevo a sequedad en rotavapor BUCHI R 110 a 45°C . El residuo se resuspendió en 2 ml de agua bidestilada y se centrifugó a 27.000 g durante 20 minutos (SORVALL RC-5B; rotor SS-34). En el sobrenadante se cuantificó el contenido en ACC según el método de Lizada y cols, (1979).

Para la determinación del ACC conjugado se realizó la hidrólisis básica del sobrenadante; a 0.6 ml se les añadió un volumen equivalente de NaOH 12 N incubándolo a 100°C durante 3 h en atmósfera de N₂. La diferencia entre el contenido en ACC del extracto crudo y del hidrolizado es el contenido en ACC conjugado.

10. VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

I. ACC-Sintasa.

La conversión de ACC en etileno requiere oxígeno y su ausencia bloquea el último paso de la ruta biosintética (Adams y Yang, 1979); por lo cual la ACC-sintasa se cuantificó "in vivo" determinando el incremento en la acumulación de ACC, durante la incubación en anaerobiosis; para ello el material vegetal se dividió en dos lotes idénticos; uno se utilizó como control y en el otro se cuantificó el ACC tras la incubación en atmósfera de nitrógeno durante 4 horas (el contenido de oxígeno en los frascos de incubación era siempre inferior al 0,1%) (De Laat y Van Loon (1982). La diferencia entre el ACC inicial y el cuantificado tras la anaerobiosis era consecuencia

de la actuación acumulativa de la ACC-Sintasa durante el periodo de incubación, actividad que se expresó como nmoles ACC·g⁻¹ de peso fresco·h⁻¹. Experiencias con Cicloheximida demostraron que durante este periodo de incubación no existía síntesis de proteínas, además no incrementaba ni el peso fresco ni el seco de los ejes embriónicos.

II. N-malonil-ACC-Transferasa.

La N-malonil-ACC-Transferasa se cuantificó por determinación del ACC conjugado endógeno existente en nuestro material vegetal antes y después de la incubación en nitrógeno durante 4 horas, mediante hidrólisis básica y siguiendo igual método que para la determinación de la actividad ACC-Sintasa; la diferencia entre el contenido endógeno de ACC Conjugado inicial y el existente en los ejes incubados bajo anaerobiosis se tomó como actividad de este enzima (expresada como nmoles ACC Conjugado·g⁻¹ peso fresco·h⁻¹).

III. EFE.

La actividad EFE se cuantificó como la diferencia entre el etileno desprendido por gramo de tejido procedente de la incubación en presencia y ausencia de ACC (200 μM) exógeno durante el tiempo requerido (Hoffman y cols., 1983). La concentración de ACC fue saturante en nuestras condiciones.

11. IDENTIFICACION DEL ACC CONJUGADO.

I. Síntesis Química del MACC.

Se realizó siguiendo el método descrito por Satoh y Esashi en 1984; se basa en la formación de una amida entre el cloruro de metil-malonilo (Aldrich Chemical Co.) y el ACC, en medio básico. Se tomaron 1.67 g de cloruro de metil-malonilo y 5 ml de NaOH (4 M) y se añadieron muy lentamente a una solución fría compuesta 1.01 g de ACC y 6 ml de NaOH (2 M). Tras la adición de 1 ml de NaOH la mezcla de

reacción se dejó durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla se fraccionó frente a 10 ml de éter. La fase acuosa se pasó por una columna DOWEX 50x8-100 mesh W (H⁺) (de 30 ml de volumen muerto) que se lavó con agua hasta obtener un efluente neutro, el cual junto con el agua de lavado se evaporaron a vacío hasta sequedad en un rotavapor BUCHI R 110 a 40°C. El residuo se guardó en refrigerador durante al menos 1 día y se obtuvieron cristales de MACC (mp 60-75°C). El MACC se recrystalizó con acetonitrilo frío 0.95 g (50.6%); mp 139-140°C (descomposición).

II. Identificación del ACC Conjugado por Cromatografía de gases.

II.1- Características del Cromatógrafo de Gases.

Se utilizó un equipó Konik KNK-3000-HRGC con un sistema split de inyección y un detector de ionización de llama (FID) La columna utilizada fue una columna capilar BP-1 (12 m x 0.33 mm) de metil-silicona y 0.25 μ m de tamaño de partícula.

Todo el sistema (horno, inyector y detector) estuvo controlado por un microprocesador KNK-019-385, conectado a un integrador KNK SP-4290 para el registro de los cromatogramas.

Como gas portador se utilizó nitrógeno (N-48, suministrado por Oxídrica Malageña, S.A.) con un flujo constante en columna de 8 ml/min y una relación de Split de 33:8. La temperatura del inyector fue de 270°C y la del detector 200°C con una temperatura inicial del horno de 80°C, una temperatura final de 300°C y una rampa de 10°C/min.

II.2- Análisis de las muestras.

El extracto se evaporó bajo vacío a sequedad a 40°C; el residuo se resuspendió en éter, y tras su metilación con diazometano se analizó por Cromatografía de Gases. Para el análisis de las muestras se realizaron inyecciones de 1 μ l.

La metilación se realizó con diazometano en éter. El diazometano se genera por tratamiento de la N-metil-N-nitroso-4-toluensulfonamida (precursor) con KOH en metanol al 10%, empleando las proporciones:

- 1.25 g N-metil-N-nitroso-4-toluensulfonamida en 6 ml de éter etílico.
- 5 ml de una disolución KOH-metanol 10%.
- Extracto disuelto en 3ml de éter etílico.

En un matraz de dos bocas, provisto de un embudo de adición y una cabeza de destilación, se coloca el precursor disuelto en éter. Sobre la disolución, sometida a agitación magnética, se adiciona gota a gota la disolución de KOH en metanol. El diazometano generado es arrastrado por el éter y conducido al tubo de reacción a través del sistema de destilación. El flujo de diazometano se mantiene uniforme, calentando de vez en cuando suavemente el matraz generador.

Después de la reacción se eliminan mediante evaporación el éter y el diazometano en exceso, obteniéndose un residuo seco en el que va incluido el ácido esterificado. El residuo seco, una vez metilado, se disolvió en 500 μ l de éter etílico.

12. EXTRACCION Y ENSAYO DE LA ACTIVIDAD MACC-Hidrolasa.

Se realizó según el Método de Jiao y cols., (1986); 6 g de ejes embrionarios aislados germinados durante 5 horas en solución nutritiva (Sanchez-Calle y cols., 1989) a 25°C, se homogeneizaron con 25 ml de tampón K-fosfato pH 7.0. El homogenado se filtró por gasa miracloth y se centrifugó a 27.000 g durante 12 min en una centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34. El sobrenadante se fraccionó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; el precipitado obtenido a 35-80% de saturación se redisolvió en 2 ml de 10 mM K-fosfato (pH 7.0) y se dializó durante toda la noche en el mismo tampón. El extracto dializado se empleó como la solución enzimática. La concentración de proteínas se determinó por Bradford (1977). El ensayo de actividad se realizó en un volumen total de 1 ml en una mezcla de reacción que contenía MACC (4 mM), K-fosfato (10 mM) (pH 8.0), MnSO_4 (1 mM), y 10 mg de proteína. Tras la incubación a 37°C durante 1 h

la reacción se paró transfiriendo los tubos a 0°C y el ACC formado se determinó de acuerdo con Lizada and Yang (1979). Para el control, el ensayo se realizó de forma similar pero hirviendo la mezcla de reacción a tiempo cero. La actividad enzimática se expresó como nmol de ACC·mg⁻¹ proteína·h⁻¹ una vez restado el control.

13. VALORACION DE ABA.

I.- Extracción de ABA libre y ligado.

Para el proceso de extracción de ABA endógeno se siguió fundamentalmente una modificación del método descrito por Vaugham y Milborrow (1984).

El material vegetal (2 g) se homogenizó en un mortero con arena de cuarzo añadiendo, poco a poco, 50 ml de acetona:ácido acético (99:1 v/v) y 100 mg/l de BHT como antioxidante (Zeevart, 1980). Se adicionó una cantidad conocida de ¹⁴C-ABA (0.04 μCi; actividad específica = 11.4 mCi.mmol) y AIB que se utiliza como patrón interno para ver las pérdidas ocasionadas durante el proceso de extracción y para obtener un factor de respuesta relativo, que nos relacione las variaciones en los tiempos de retención con las áreas del patrón interno y, de los picos de interés.

El homogenado obtenido se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34. El sobrenadante se guardó en frío y el precipitado fue reextraído 2 veces con acetona:ácido acético (99:1, v/v), después de una hora en agitación en cada paso; los sobrenadantes obtenidos, tras centrifugar en idénticas condiciones a las anteriormente descritas, se mezclaron con el primero y se llevaron a sequedad en rotavapor a 35°C (Guerrero y Mullet, 1986). El precipitado final fue desechado.

El extracto seco se disolvió en 60 ml de una mezcla de etanol:ácido acético al 0.2% (1:1, v/v) y se filtró a través de cuatro cartuchos Sep-Pak C18 (Waters) puestos en serie. En este paso se retienen la mayoría de los lípidos y pigmentos.

El filtrado se redujo en rotavapor hasta aproximadamente 5 ml y se sometió a un triple fraccionamiento contra igual volumen de éter etílico frío. En la fase etérea se obtiene el ABA libre del extracto que se concentró a vacío hasta sequedad. En la fracción acuosa quedarían los metabolitos más polares y el ABA ligado, para cuya extracción se realizó una hidrólisis en medio alcalino durante 30 minutos a 60°C, ajustando el pH a 11 con NaOH 1 M. Una vez enfriado el hidrolizado, se ajustó el pH a 3 con ClH 1 N y se realizó un triple fraccionamiento con éter etílico frío. En la fracción etérea se obtiene el ABA ligado, que se concentró a vacío hasta sequedad.

Durante todo el proceso se preservó al extracto de la iluminación directa, efectuándose todas las manipulaciones en una habitación oscura, iluminada con una lámpara de incandescencia de 25 W protegida por varias hojas de papel celofán de color verde.

Los extractos secos y perfectamente cerrados, se conservaron en congelador a -40°C hasta su valoración.

La metilación se realizó con diazometano en éter siguiendo el método descrito con anterioridad (apartado 11.II.2)

II. Identificación del ABA.

Los métodos que utilizamos precisaban de una alta concentración de producto para su identificación, por lo cual, realizamos todo el proceso con 1 Kg de semillas de *Cicer arietinum* L.

- Espectrometría de RMN

Los espectros de RMN-1H se realizaron en un espectrometro Bruker WP 80 SY (80 MHz) utilizando TMS como referencia interna y cloroformo deuterado (99% de grado de deuteración) como disolvente. Los desplazamientos químicos (escala δ) se expresan en partes por millón (ppm).

- Espectrometría de masas

Se realizaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 5988a, utilizando una energía de ionización de 70 eV por inyección directa. Como disolvente se utilizó éter etílico y helio como gas portador.

III.- Determinación del ABA por cromatografía gaseosa.

III.1- Características del cromatógrafo.

Se utilizó un equipo Konik KNK-3000-HRGC con un sistema split de inyección y un detector de ionización de llama (FID). La columna utilizada fue una columna capilar BP-1 (12 m x 0.33 mm) de metil-silicona y 0.25 μm de tamaño de partícula.

Todo el sistema (horno, inyector y detector) estuvo controlado por un microprocesador KNK-019-385, conectado a un integrador KNK SP-4290 para el registro de los cromatogramas.

III.2- Análisis de las muestras.

El residuo seco, una vez metilado, se disolvió en 500 μl de éter etílico. Para el análisis de las muestras se realizaron inyecciones de 1 μl con una razón Split de 60:1 y utilizando como gas portador hidrógeno, con un flujo constante de 20 ml/min.

III.3- Cuantificación de las muestras.

La cuantificación se hizo por comparación de las áreas de los picos problema, con las áreas de los picos patrones con concentraciones conocidas. Inicialmente se inyectaron 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μg de ABA patrón (Sigma) para construir una recta patrón, relacionando las áreas correspondientes a estas concentraciones.

Para la cuantificación final del ABA en las muestras se tuvieron en cuenta las pérdidas debidas al proceso de extracción, por la determinación de sus coeficientes de recuperación, mediante la medida de la radiactividad inicial y final en el extracto. A 200 μ l de muestra se añadieron 3 ml de líquido de centelleo para líquidos, con la siguiente composición :

PPO.....	3 g
POPOP	0.2 g
Naftaleno.....	60 g
Etilenglicol	20 ml
Metanol bidestilado	100 ml
Dioxano	880 ml

La radiactividad se midió en dpm en un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS-7500.

14. REACTIVOS UTILIZADOS.

Todos fueron de grado Sigma, Merk y Scharlau.

RESULTADOS

4.1. Crecimiento del eje embrionario aislado.

El eje embrionario, futura plántula en condiciones apropiadas de crecimiento, es un órgano que tiene una dependencia importante del tejido de reserva, el cual le aporta la gran mayoría de las sustancias necesarias para el inicio y etapas tempranas de crecimiento y desarrollo. Por consiguiente, si se germinan ejes aislados es factible el estudiar la influencia de una serie de sustancias, tanto de carácter hormonal como de otro tipo, en el desarrollo de este órgano, por lo que es una "herramienta" importante en la fisiología de la germinación en general y en el crecimiento y desarrollo del eje embrionario en particular.

La dependencia nutricional respecto a los cotiledones fue la razón que justificó la presencia de una serie de componentes tales como la sacarosa y el K^+ , en el medio nutritivo de crecimiento para los ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo (imbibidas 4 horas).

4.1.1. Efecto del medio nutritivo sobre el crecimiento.

Previo a decidir cual debería ser la composición del medio nutritivo hemos realizado varios experimentos modificando las concentraciones de potasio (KCl) y sacarosa. El peso fresco incrementa a medida que lo hace la concentración de potasio en el medio; los valores más elevados corresponden a 20 mM (KCl) en presencia de sacarosa (10 mg/ml) (Fig. 1A). La sacarosa que indujo un mayor índice de crecimiento fue la de 5 mg/ml, puesto que valores mayores o menores lo redujeron en mayor o menor cuantía (Fig. 1B).

Por consiguiente, la composición óptima del medio nutritivo debe ser Tris-HCl 10 mM pH 7.6, KCl (20 mM) y sacarosa (5 mg/ml). Sin embargo, hemos elegido una concentración de sacarosa de 10 mg/ml fundamentalmente porque la producción de gas

era ligeramente mayor que con 5 mg/ml y no tan elevada como con 20 mg/ml; el crecimiento del eje también alcanza valores intermedios (Fig. 1).

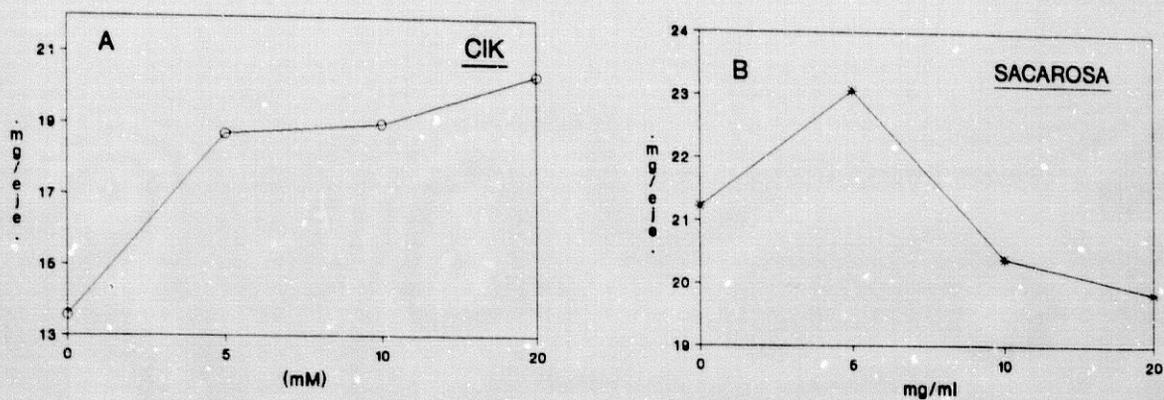


Figura 1. Efecto del K^+ (KCl) (panel A) y sacarosa (panel B) sobre el crecimiento de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. El KCl fue diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7.6 conteniendo sacarosa (10 mg/ml), mientras que la sacarosa lo fue en Tris-HCl 10 mM pH 7.6 conteniendo KCl 20 mM. El tiempo de crecimiento fue de 18 horas.

4.1.2. Cinética del crecimiento.

El peso fresco aumenta de forma de forma lineal, tanto en ejes embrionarios incubados en agua estéril, como los que lo fueron en solución nutritiva (Fig. 2). Sin embargo, a partir de las 18 h. se produce una aceleración en el crecimiento en los ejes tratados con solución nutritiva, obteniéndose a 48 horas 1.75 veces más peso fresco que el control.

Un componente importante en la inducción del crecimiento celular es el agua, y por tanto su variación a lo largo del crecimiento del eje debe mantener una pauta parecida al crecimiento del órgano. En la Fig. 3 se expresan estos resultados, que relacionan el contenido en agua (en porcentaje) respecto al peso seco, datos que se observan en la Figura 4. Este parámetro, se altera durante las primeras 48 horas de crecimiento en un 19.6% (control) y 21.5% (solución nutritiva); los resultados de peso seco entre el control y problema no tienen unas diferencias estadísticamente significativas, lo que hace pensar

en un proceso preferentemente de toma de agua; no obstante, si bien la elongación celular es muy abundante en estas primeras horas de germinación, la mitosis tiene un papel muy importante a lo largo de este tiempo tal y como hemos demostrado en nuestro grupo de Investigación con este mismo material vegetal.

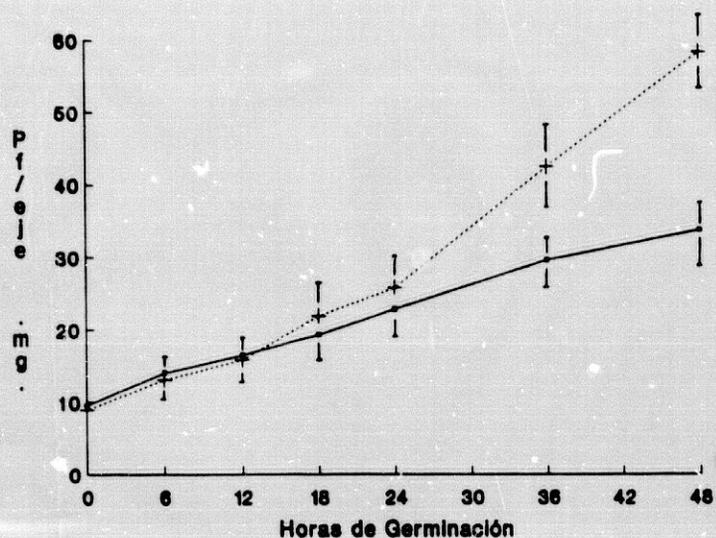


Figura 2. Variación del peso fresco durante las primeras 48 horas de germinación en ejes aislados de semillas de garbanzo. Solución nutritiva (+ - +) y agua destilada (· · ·). Repetición de al menos 5-8 veces.

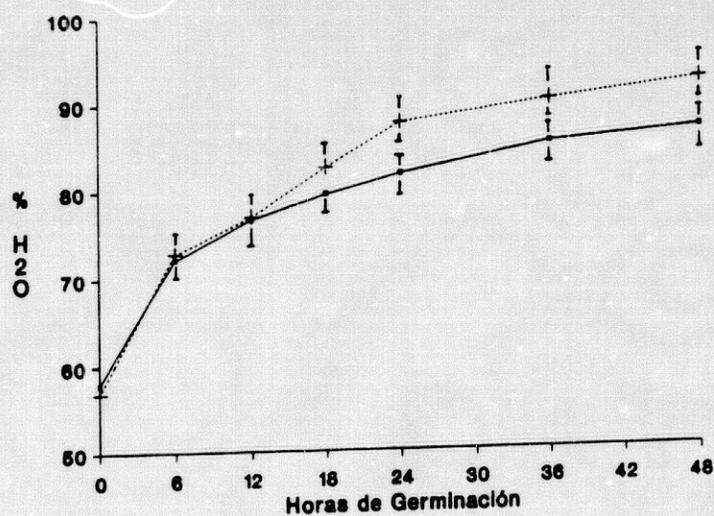


Figura 3. Variación en el contenido de H_2O , expresado en porcentaje, durante las primeras 48 horas de germinación de ejes aislados de semillas de garbanzo. Solución nutritiva (+ - +) y agua destilada (· · ·). Repetición de al menos 5-8 veces.

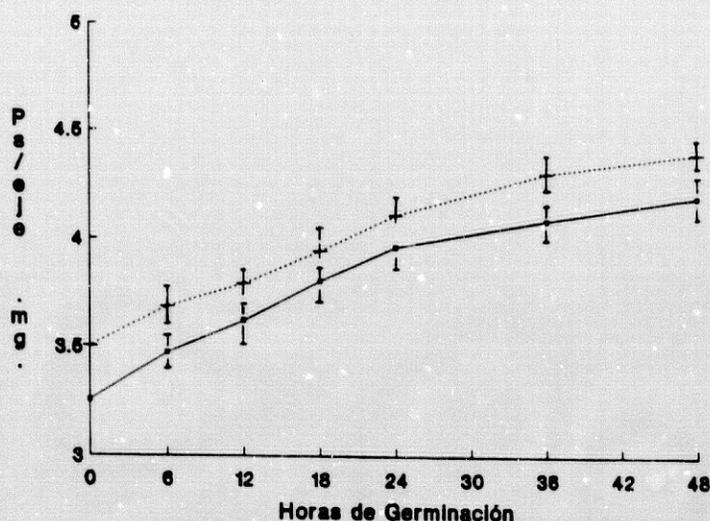


Figura 4. Variación de peso seco durante el crecimiento de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinadas en solución nutritiva (+ - +) y agua destilada (· - ·). Media de 5-8 experimentos.

4.1.3. Efecto de SP, SPD y CV.

Al objeto de estudiar el efecto de las poliaminas más importantes sobre el crecimiento celular y por extensión sobre el eje embrionario aislado, se incluyeron las aminas citadas (tetra, tri y diamina) en el medio nutritivo. El peso fresco, peso seco y contenido en agua fue cuantificado, al cabo de 18 horas de germinación, en presencia de 0.1, 1.0, 5.0 y 10 mM de PAs.

El peso seco no se altera durante los tratamientos con poliaminas, al menos en cantidades estadísticamente significativas. La toma de agua (Tabla 1), parece ser, por tanto, la responsable de las modificaciones obtenidas respecto al peso fresco (crecimiento) (Fig. 5) inducido por SP y SPD, ya que la CV no altera este parámetro.

Concentraciones de SP y SPD entre 0.1-1.0 mM estimulan el crecimiento, mientras que superiores a 1.0 mM lo reducen. Tanto la estimulación como la inhibición parecen de alguna forma relacionadas con la riqueza de grupos amino presentes en la molécula; así, la SP (0.1 mM) incrementa el peso fresco un 15.4%, mientras que la SPD (0.1 mM)

lo hace un 8.8%; respecto a la inhibición, SP (10 mM) y SPD (10 mM) lo reducen un 34.3% y 24.4% respectivamente (Fig. 5).

TABLA 1. Efecto de distintas concentraciones de espermina (SP), espermidina (SPD) y cadaverina (CV) sobre el peso fresco y el % de agua de ejes embrionarios aislados y germinados durante 18 horas. Cada valor es la media de tres repeticiones.

mM	Peso fresco/eje (mg)			% H ₂ O		
	SP	SPD	CV	SP	SPD	CV
0	20.45b	20.45a,b	20.45a	81.62a	81.62a	81.62a
0.1	23.37a	21.10a	20.34a	83.64a	81.72a	81.84a
1	22.18a	21.10a	20.52a	83.16a	81.84a	82.17a
5	14.10c	18.21b	20.84a	74.33b	79.84b	82.31a
10	13.49c	15.36c	20.90a	73.63b	77.42c	82.45a

Medias seguidas de la misma letra, no presentan diferencias estadísticas significativas, según un test de mínimas diferencias significativas (MDS), a un nivel de probabilidad de (P=0.05).

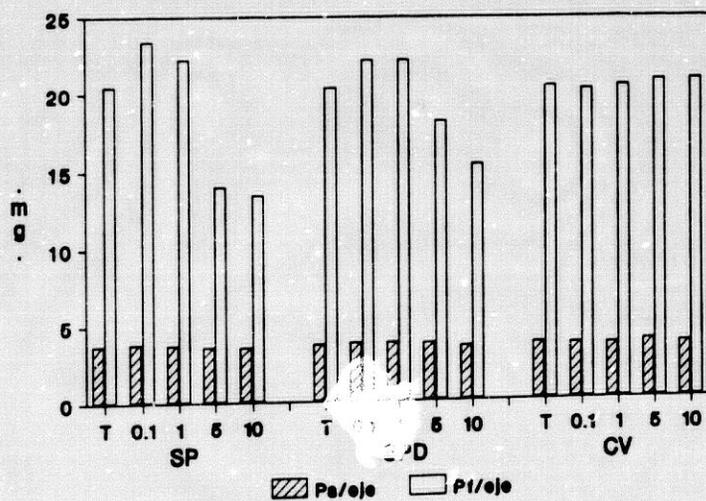


Figura 5. Efecto de diversas poliaminas a las concentraciones indicadas sobre el crecimiento de ejes aislados y germinados durante 18 horas. Las aminas fueron disueltas en solución nutritiva; los resultados son la media de 3-4 experimentos.

4.1.4. Efecto del ABA.

El ABA (5, 25 y 50 μM) fue añadido a la solución nutritiva completa (Cf. Mat. y Met.) y a soluciones nutritivas carentes de alguno de sus componentes; este experimento fue planificado para observar que sustancia presente en la solución era más importante en el efecto inhibitorio del ABA, por lo que al crecimiento se refiere (Tabla 2).

TABLA 2. Efecto del ABA sobre el crecimiento de ejes aislados de semillas de garbanzo germinadas en diferentes medios nutritivos. El tiempo al que se midió el peso fresco fue 18 horas.

ABA (μM)	Peso fresco/eje (mg)				
	+KCl +Sac.	-KCl +Sac.	-KCl -Sac.	+KCl -Sac.	H ₂ O
0	20.400d	18.152c	17.822c	21.074c	17.997c
5	17.276c	16.459b	14.440b	17.197b	12.847b
25	12.411b	12.071a	13.430a,b	13.215a	10.862a,b
50	10.508a	11.591a	12.360a	12.618a	9.169a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna significan que no existen diferencias significativas según un test de MDS ($P=0.05$).

La presencia de ABA induce una inhibición del crecimiento a 18 horas concomitante con la concentración de la fitohormona; la ausencia de sacarosa y KCl (medio compuesto exclusivamente por Tris-HCl pH 7.6) provoca un incremento del 11-12% en el crecimiento del eje respecto a los valores obtenidos con ABA en agua destilada (Tabla 2). La adición de K⁺ sólamente es capaz de elevar el crecimiento del eje a bajas concentraciones de ABA (5 μM) obteniéndose valores próximos al control (+H₂O); sin embargo, el control (+K⁺) aumenta un 22% (Tabla 2), respecto al calculado en presencia de H₂O o Tris-HCl pH 7.6, respectivamente.

4.2. Contenido iónico durante el crecimiento del eje aislado.

Durante la maduración de la semilla, varios tipos de iones inorgánicos son transportados hacia los cotiledones o al eje embrionario en forma libre; en estos órganos son almacenados como iones libres o como complejos orgánicos hasta que se inicie el proceso de germinación. Durante las primeras fases de la germinación la gran mayoría de estos iones se transportan, siguiendo el comportamiento de fuente (cotiledón), sumidero (eje embrionario), para ayudar al crecimiento y desarrollo de la futura nueva plántula. Las membranas biológicas juegan un papel muy importante en todos estos transportes iónicos, ya no solamente célula-célula, sino también célula-medio externo, a donde van a parar al cabo de las primeras horas de germinación buena cantidad de iones almacenados en la embriogénesis y maduración; una parte de ellos retornan al interior del órgano como consecuencia de los procesos de reestructuración de las membranas que tienen lugar durante las primeras horas de crecimiento.

Por los resultados obtenidos y comentados en el apartado 4.1.1., estamos en presencia de un proceso en el que la toma de agua tiene un papel preferencial; la cuantificación de los cationes implicados en el potencial hídrico (K^+), mecanismos de permeabilidad (Ca^{++}), y metabolismo energético (fósforo) son de gran interés. Se estudia, por consiguiente, en este apartado el efecto que tienen las poliaminas empleadas anteriormente (apartado 4.1.3) y el ABA (apartado 4.1.4.) sobre el contenido iónico durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios aislados.

4.2.1. Contenido en K^+ , Na^+ , Ca^{++} y P_i .

Las alteraciones en los niveles de estos elementos minerales durante las primeras 48 horas de crecimiento de ejes embrionarios aislados se presentan en la Fig. 6. El contenido en K^+ aumenta de forma lineal durante todo el período estudiado, alcanzando a las 48 h. valores 3,6 veces superiores a los cuantificados a 6 horas ($75 \mu g/eje$). La presencia de este elemento en el medio de crecimiento quizás explique estos resultados; asimismo, el paralelismo entre esos datos y los obtenidos al evaluar el contenido en agua demuestran su íntima relación.

El Pi es el elemento mas abundante, después del K^+ , en este órgano, su contenido apenas tiene fluctuaciones durante el período estudiado; si acaso alcanza valores ligeramente elevados entre 12-30 horas de crecimiento.

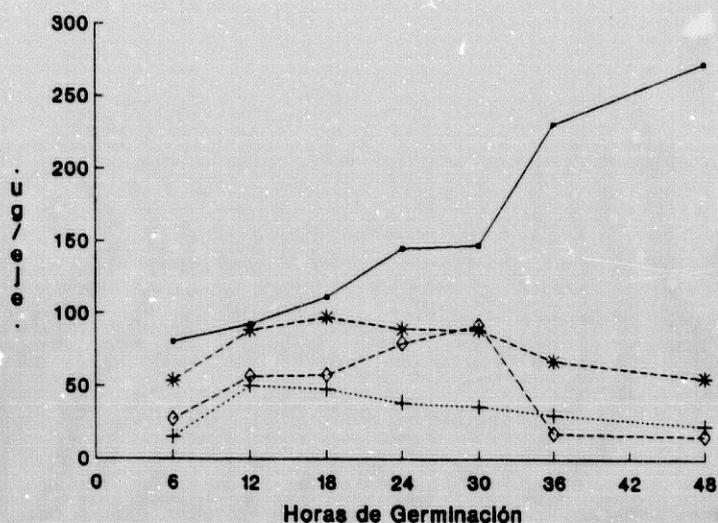


Figura 6. Contenido iónico en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. K^+ (---), Pi (*-*), Ca^{++} libre (-) y Na^+ (+-+). Cada valor es la media de tres repeticiones con la desviación estandar que se indica.

Con respecto al Ca^{++} libre podemos observar un ascenso lineal en su contenido durante las primeras 30 horas de crecimiento, descendiendo bruscamente hasta las 48 horas. Su nivel es idéntico al Na^+ durante las primeras 12 h de crecimiento; sin embargo este elemento sufre una disminución a partir de este momento alcanzando a las 48 horas niveles idénticos al Ca^{++} ; es el elemento menos abundante en el eje embrionario.

4.2.2. Efecto de las Poliaminas.

El papel de las poliaminas en el crecimiento de plantas todavía es muy fraccionario; sin embargo, su acción en la estabilización de las membranas parece claro.

La presencia de SP, SPD y CV (0,1-10 mM) en el medio de crecimiento tiene

un efecto muy parecido con respecto a todos los elementos minerales estudiados: incremento conforme aumenta la concentración de poliamina, y descenso en los niveles endógenos a medida que la poliamina está menos enriquecida en grupos amino.

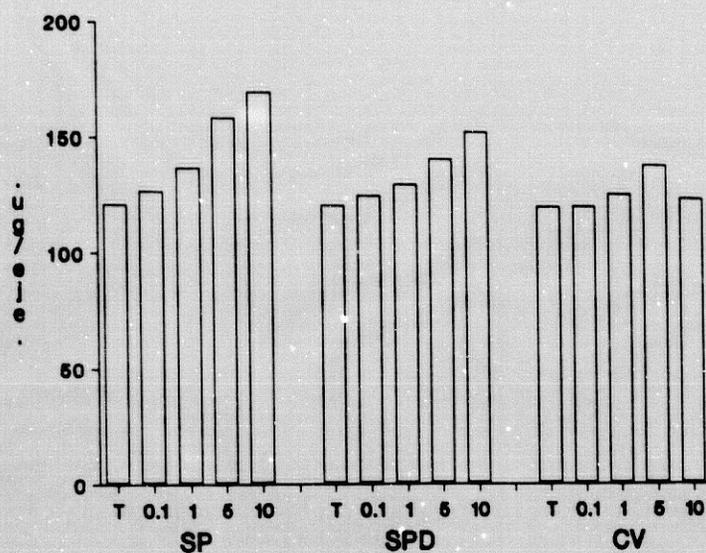


Figura 7. Contenido en K^+ en el eje embrionario aislado de semillas de garbanzo germinado durante 18 horas en presencia de concentraciones crecientes de poliaminas (0,1-10 mM). Los datos son la media de 3-4 determinaciones con el análisis estadístico que se indica en la Tabla adjunta.

TABLA 3. Contenido en potasio en ejes embrionarios aislados tratados con concentraciones crecientes de poliaminas.

mM	Potasio ($\mu\text{g}/\text{eje}$)		
	SP	SPD	CV
0	120.891c	120.891c	120.891a
0.1	127.017b,c	125.269c	121.209a
1	136.901b	130.438b,c	126.833a
5	158.714a	141.309a,b	139.632a
10	169.979a	153.143a	125.190a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente según un test de MSD ($P=0.05$).

Así, el K^+ incrementa 1,4 veces en presencia de SP (10 mM), 1,2 veces con SPD (10 mM) y no se altera si le añadimos igual concentración de CV (Fig. 7).

El Na^+ ve estimulada su movilización por poliaminas en mayor cuantía que el K^+ : 1,9 veces en presencia de SP (10 mM), 1,4 veces con SPD (10 mM) y 1.13 veces en presencia de CV (10 mM) (Fig. 8).

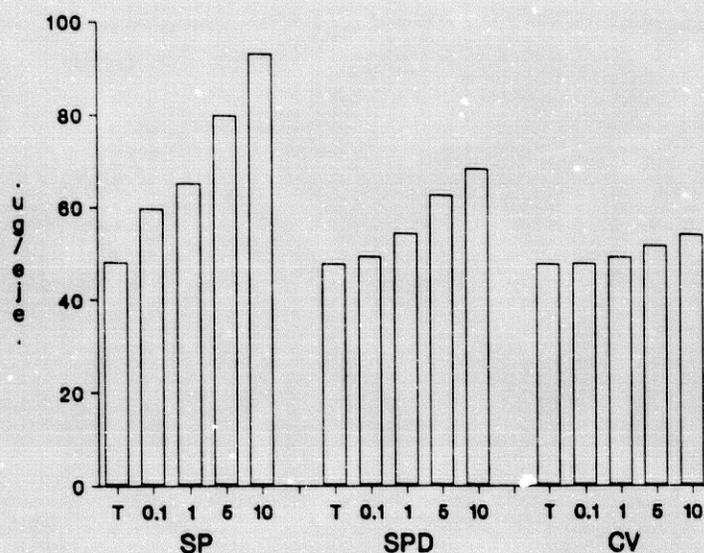


Figura 8. Contenido en Na^+ en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinadas durante 18 horas en presencia de diferentes concentraciones de poliaminas (mM). Los datos son la media de 3-4 experiencias con el análisis estadístico que se adjunta en la Tabla inferior.

TABLA 4. Contenido en sodio en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*, L. tratados con concentraciones crecientes de poliaminas.

mM	Sodio ($\mu\text{g}/\text{eje}$)		
	SP	SPD	CV
0	48.140d	48.140d	48.140a
0.1	59.821c	49.826d	48.652a
1	65.243c	54.853c	50.052a
5	80.199b	63.304b	52.710a
10	93.497a	69.151a	55.181a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra, dentro de la misma columna, no difieren estadísticamente según un test de MDS ($P=0.05$).

El contenido en calcio libre es estimulado por concentraciones de SP entre 1 y 10 mM, obteniéndose a esta última concentración valores 2 veces superiores que en ausencia de poliaminas (Fig. 9).

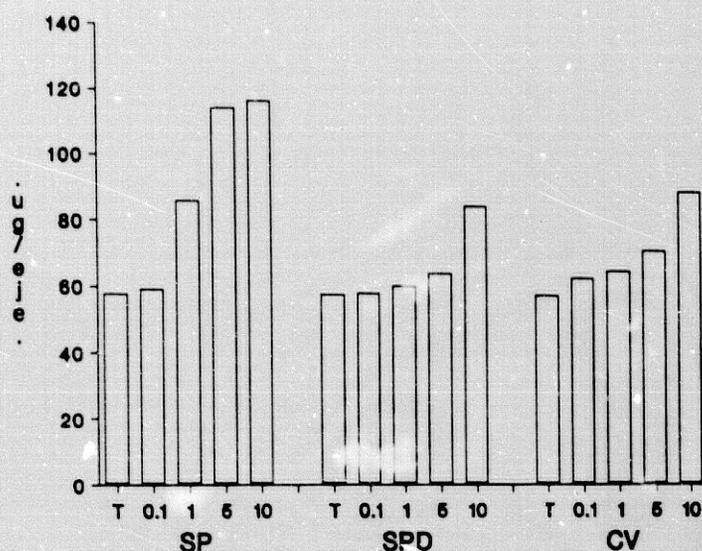


Figura 9. Contenido en Ca^{++} libre en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinadas durante 18 horas en presencia de concentraciones crecientes de poliaminas (mM). Los datos son la media de 3-4 experiencias con el análisis estadístico que se adjunta en la Tabla 5.

TABLA 5. Contenido en calcio en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*, L. tratados con concentraciones crecientes de poliaminas.

mM	Calcio ($\mu\text{g}/\text{eje}$)		
	SP	SPD	CV
0	57.642c	57.642c	57.642c
0.1	59.205c	58.192c	63.000b,c
1	85.879b	60.282b,c	65.307b,c
5	114.461a	64.284b	71.544b
10	116.735a	84.698a	89.688a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna, no difieren estadísticamente según un test de MDS ($P=0.05$).

El enriquecimiento en grupos (-NH₃⁺) favorece la acumulación de Pi 1,25, 1,35 y 1,5 v. con CV, SPD y SP a concentración de (10 mM) (Fig.10).

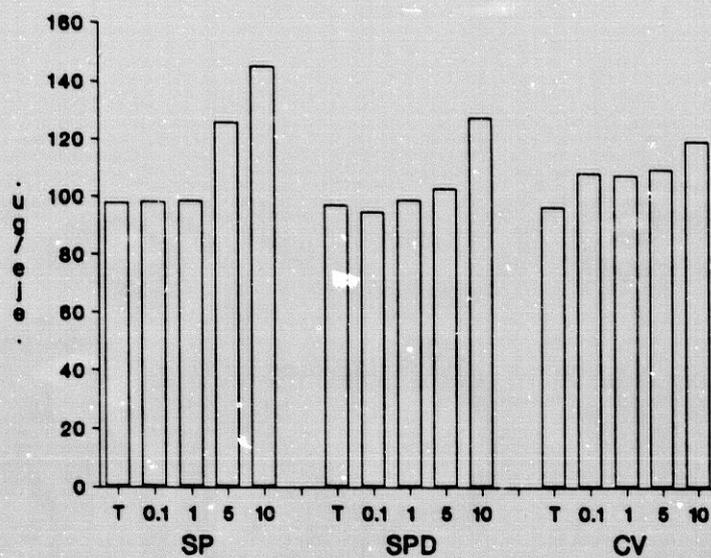


Figura 10. Contenido en fósforo inorgánico en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinadas durante 18 horas en presencia de concentraciones crecientes de diferentes poliaminas (mM). Los datos son la media de 3-4 experiencias con el análisis estadístico que se indica en la Tabla 6.

TABLA 6. Contenido en fósforo en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*, L. tratados con las concentraciones de poliaminas que se indican.

mM	Fósforo (µg/eje)		
	SP	SPD	CV
0	98.004c	98.004b	98.004c
0.1	98.237c	95.572b	109.992b
1	98.792c	99.720b	109.323b
5	126.512b	103.858b	111.710b
10	145.970a	128.923a	121.899a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna, no difieren estadísticamente según un test de MDS (P=0:05).

4.2.3. Efecto del ABA sobre el contenido en K⁺ y Ca⁺⁺.

Los niveles de K⁺ y Ca⁺⁺ disminuyen en el eje embrionario a medida que aumenta la concentración de ABA en el medio de germinación (Tabla 7). Durante la germinación de semillas, el K⁺ del eje embrionario procede fundamentalmente del cotiledón; sin embargo, en ejes aislados proviene, bien del K⁺ almacenado durante la embriogénesis o del medio de germinación (contiene este elemento, como se expone en Mat. y Met.). El ABA induce unas concentraciones de K⁺ y Ca⁺⁺ en el medio de crecimiento inversamente correlacionadas con los niveles endógenos encontrados en el órgano aislado (datos no mostrados). Así mismo, el contenido en K⁺ está directamente correlacionado con el nivel de agua (r= 0.947), lo que confirma nuevamente que estamos en presencia de un proceso de crecimiento en que la elongación celular tiene un papel importante.

TABLA 7. Efecto del ABA sobre el contenido en K⁺, Ca⁺⁺ y porcentaje de agua en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. El tiempo de germinación fue de 18 h. y los valores son la media de 3-4 experimentos. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada fila no difieren estadísticamente según un test de MDS (P=0.05).

Elemento	ABA (μ M)			
	0	5	25	50
K ⁺	120.9a	115.8b	109.4c	103.0d
Ca ⁺⁺	57.6a	55.3b	50.9c	48.7d
H ₂ O	83.0a	81.3b	75.0c	73.3d

4.3. Producción de etileno durante el crecimiento del eje embrionario.

El eje embrionario es uno de los órganos de las semillas que produce mayor cantidad de etileno; las razones son muy diversas, pero en su gran mayoría están relacionadas con el hecho de ser un órgano en el que son muy abundantes los proce-

sos de diferenciación, mitosis y elongación celular; procesos, todos ellos, relacionados de un modo u otro con la biosíntesis de gas. Es, por consiguiente, un buen material biológico para llevar a cabo un estudio en profundidad acerca de los factores que afectan a la producción de etileno así como de las alteraciones que se producen en los intermediarios de su ruta biosintética a lo largo del desarrollo de este órgano.

4.3.1. Evolución en la producción de gas.

Los ejes embrionarios aislados se germinaron un máximo de 48 horas y se midió la velocidad en la producción de etileno a intervalos de 6 horas de crecimiento. Esta medida se realizó durante 60 min., tiempo que hemos considerado óptimo ya que la producción de gas era perfectamente cuantificable por Cromatografía Gaseosa en todas las condiciones experimentales y así mismo el tiempo no era demasiado largo como para que el gas producido indujese procesos relacionados con su propia síntesis o con el crecimiento del órgano en cuestión.

En la Figura 11 se expresan los resultados obtenidos tanto en agua destilada como en solución nutritiva; el máximo en la producción de gas se obtiene a las 18 horas; esto mismo sucede cuando se adicionan al medio diversas sustancias, ya no sólo de carácter fitohormonal sino también inorgánicas u orgánicas (datos no mostrados). Sin embargo, la presencia de la solución nutritiva como medio de germinación induce una mayor velocidad en la aparición de etileno; sobretodo en el período comprendido entre 12-36 horas (Figura 11). Cuando existe solamente agua destilada como medio de germinación, el máximo es reducido un 55%.

Según estos resultados, parece evidente que los ejes aislados y germinados durante 18 horas sean los apropiados para estudiar algunos factores que modifican la producción de gas.

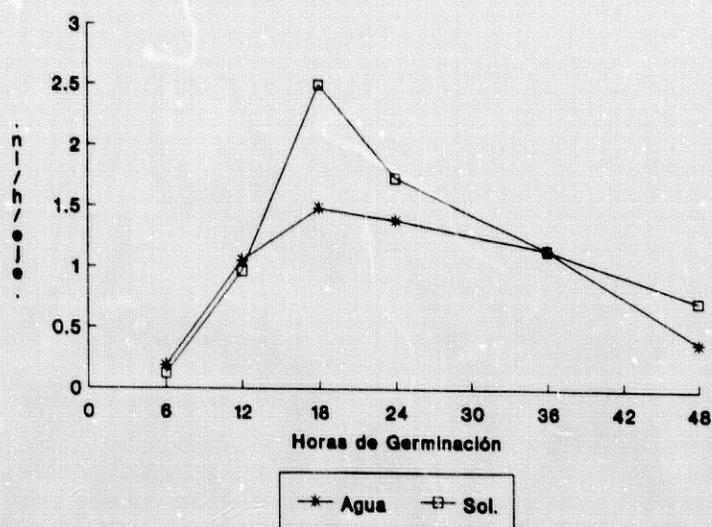


Figura 11. Producción de etileno durante las primeras 48 horas de crecimiento de ejes embrionarios aislados de garbanzo en agua y solución "standard". Los valores son la media de 3-4 experimentos.

4.3.2. Efecto de pH y la composición del medio nutritivo.

Se ha medido la capacidad de producción de etileno por parte del eje embrionario germinado en diferentes medio nutritivos (apartado 4.1.1). Los resultados globales de peso fresco y etileno se expresan en la Tabla 8.

Se observa que, tanto el incremento en la concentración de K^+ como de sacarosa, producen aumentos correlativos en la aparición de gas y crecimiento. Un medio conteniendo Tris-HCl pH 7.6, sacarosa (20 mg/ml) KCl (20 mM) induce la mayor cantidad de etileno; no obstante hemos preferido tomar como "standard" la solución que contenga 20 mM de potasio y valores intermedios de sacarosa (10 mg/ml).

Para estudiar el efecto de pH del medio sobre la producción de gas, se germinaron ejes embrionarios durante 18 horas en la solución nutritiva "standard" de diferentes pH (7.0-9.0). Apenas se modifica la aparición de etileno en este rango (Figura 12).

TABLA 8. Efecto del K^+ (KCl) y la sacarosa sobre la producción de etileno en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinados durante 18 horas. A=Tris-HCl (10 mM) pH 7.6 + Sacarosa (10 mg/ml); B=Tris-HCl (10 mM) + KCl (20 mM).

	Etileno (nl·h ⁻¹ ·eje ⁻¹)	Peso fresco/eje (mg)
Tris-HCl pH 7.6	3.351±0.25	17.820±0.20
A-KCl	2.687±0.30	13.570±0.15
A+KCl (5 mM)	2.773±0.15	18.710±0.30
A+KCl (10 mM)	2.900±0.30	19.000±0.15
A+KCl (20 mM)	3.099±0.10	20.400±0.25
B-Sacarosa	2.348±0.15	21.224±0.10
B+ Sacarosa (5 mg/ml)	2.938±0.30	23.074±0.35
B+ Sacarosa (10 mg/ml)	3.890±0.35	20.400±0.40
B+ Sacarosa (20 mg/ml)	6.244±0.15	19.846±0.25

Cada valor es la media de 3-4 repeticiones con las DE que se indica.

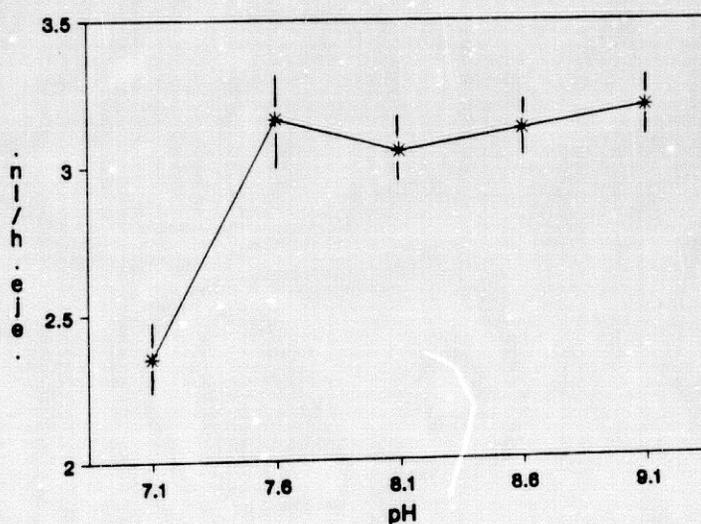


Figura 12. Efecto del pH (en el rango básico) sobre la producción de etileno en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. El tiempo de incubación fue de 18 horas y la solución "standard" contiene: Tris-HCl (10 mM) pH 7.6; sacarosa (10 mg/ml); KCl (20 mM). Los resultados son media de 3 experimentos con la desviación standard que se indica.

4.3.3. Efecto del Calcio (CaCl_2) sobre la producción de etileno.

La producción de etileno en semillas de garbanzo se incrementa por calcio exógeno (Tabla 9), obteniéndose la máxima velocidad con CaCl_2 (10 mM), lo que constituye una estimulación de 2.6 veces sobre el control sin Ca^{++} ; valores 10 veces menores de calcio provocan una estimulación bastante alta (2.3 veces sobre el control sin Ca^{++}). El comportamiento de este catión en la estimulación de la producción de etileno no varía cuando se expresan los resultados respecto a la unidad de crecimiento o referidos a la unidad de peso (Tabla 9).

La presencia de EGTA (agente quelante de Ca^{++}) a nivel equimolecular con el Ca^{++} , induce una reducción del 50% en la producción de etileno (Tabla 9); por consiguiente, este proceso objeto de estudio tiene una clara dependencia de calcio.

TABLA 9. Efecto de distintas concentraciones de Cl_2Ca y EGTA sobre el etileno producido por ejes embrionarios aislados.

mM	ETILENO			
	$(\text{nl} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{eje}^{-1})$		$(\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1})$	
	Cl_2Ca	EGTA	Cl_2Ca	EGTA
0	3.837d	3.837d	61.98d	61.98d
1	5.154c	3.063c	86.44c	55.91c
5	8.384b	4.515b	142.14b	81.59b
10	10.012a	5.133a	171.26a	87.26a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna, no difieren estadísticamente según un test de MDS ($P=0.05$).

4.3.3. Efecto de los inhibidores del crecimiento.

4.3.3.1. Manitol, cicloheximida y 5-fluorouracilo.

La inclusión de manitol (osmótico) en el medio de incubación, provoca una reducción en el desprendimiento de etileno de forma paralela a como se reduce la toma de agua y la elongación celular (Tabla 10). Concentraciones de manitol de 100 mM inducen una inhibición del 82% en la producción de gas y un 52% de reducción en la toma de agua.

TABLA 10. Efecto de concentraciones crecientes de manitol en el medio nutritivo sobre la producción de etileno en ejes embrionarios germinados 18 horas.

Manitol (mM)	Etileno		Peso fresco/eje
	(nl·h ⁻¹ ·eje ⁻¹)	(nmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	(mg)
0	2.937c	42.952c	20.400d
10	2.984c	50.422c	18.084c
50	2.799c	46.004c	17.190d
100	0.234a	41.904a	9.573a

Cada valor es la media de 3 experiencias. Medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente según un análisis de MDS (P=0.05).

Si en el medio con manitol incluimos tiourea (TU) (agente capaz de inducir la toma de agua y la elongación celular, por un mecanismo que implica la toma de K⁺) se detecta, en contra de lo esperado, una disminución importante en la producción de gas (Tabla 11) si bien el peso fresco incrementa respecto al control con manitol (Tabla 10-11). En la discusión de esta Memoria incidiremos en este hecho en términos de que la TU es un inhibidor de la producción de radicales libres.

TABLA 11. Efecto de concentraciones crecientes de manitol, aplicado conjuntamente con tiourea (50 mM) sobre el etileno producido y el peso fresco por eje (mg) en ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum* germinados durante 18 horas.

M. (mM) + TU (50 mM)	Etileno		Peso fresco/eje
	(nl·h ⁻¹ ·eje ⁻¹)	(nmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	(mg)
0	3.290d	52.691d	20.400c
10	0.279a	3.707a	24.347b
50	0.385a	5.447a	23.207b
100	0.383a	6.150a	20.511a
500	0.263a	7.273a	11.808a

*M. = Manitol. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de cda columna no difieren estadísticamente, según un análisis de MDS (P=0.05).

La cicloheximida (20 µg/ml), una concentración que inhibe la síntesis de proteína en semillas de garbanzo, indujo un descenso en peso fresco del 33.5% y una inhibición en la producción de etileno del 87% (Figura 13). Experimentos con pulsos cortos de cicloheximida, para conocer cual era el período de tiempo más importante en relación con la síntesis de enzimas implicados en la biosíntesis del gas y con su producción, han demostrado que la inhibición de la síntesis proteica durante las primeras 18 horas era mucho más importante que la de las 6 horas restantes (datos no mostrados).

El 5-fluoruracilo, inhibidor de la síntesis de ARN en esta semilla a concentraciones de (5 mM), induce una reducción en la producción de gas del 52% y en el peso fresco en un 9.2% (Figura 13).

De estos resultados se deduce que la producción de etileno depende más de la síntesis de proteínas que de ARN, lo que puede ser debido a la presencia de una mayor proporción de ARN almacenado que de sistema enzimático relacionado con la síntesis de gas.

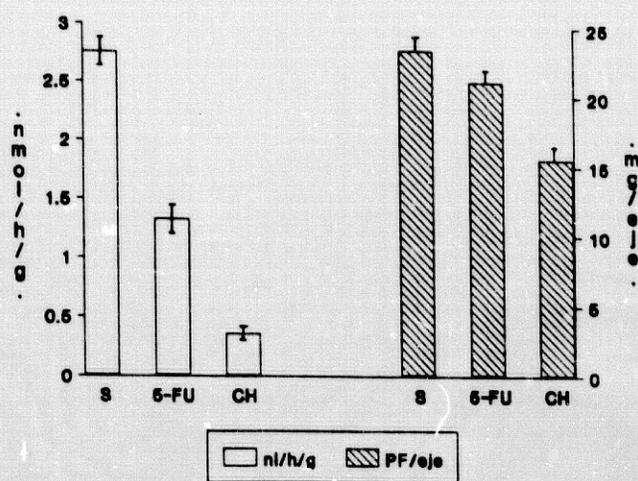


Figura 13. Efecto de la CH (20 $\mu\text{g/ml}$) y el 5-FU (5 mM) sobre la producción de etileno en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo y germinadas 18 horas. Los valores son la media de 3-4 experiencias, con la DE indicada.

4.3.4.2. Efecto de las altas temperaturas.

En semillas de garbanzo, temperaturas de 30°C o superiores retrasan la emergencia radicular porque impiden la toma de K^+ (H_2O), y por tanto el crecimiento por elongación al no crearse la presión de turgencia apropiada. La producción de etileno en ejes embrionarios aislados se estimula al incrementar la temperatura de 25 a 35°C (Figura 14); este etileno bien podría ser una consecuencia del "stress" que se induce al órgano por altas temperaturas.

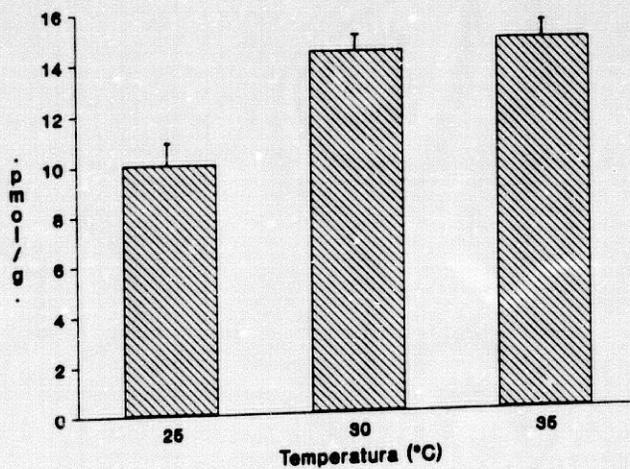


Figura 14. Efecto de las altas temperaturas sobre el desprendimiento de etileno en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, germinados durante 18 horas en solución nutritiva. Los valores son la media de 3 repeticiones con la DE que se indica.

4.3.4.3. Efecto del ácido abscísico (ABA).

La inclusión de ABA en el medio nutritivo tiene como finalidad el inhibir, o en su caso reducir, la toma de agua (elongación celular) del eje embrionario mediante un mecanismo inducido por una fitohormona y no, como en el caso anterior (4.3.3.1.), por una sustancia no natural. Los resultados se exponen en la tabla 12. En ella están incluidas las respuestas que tiene el eje embrionario aislado y germinado durante 18 horas; por lo que se refiere a la producción de etileno, en medios nutritivos, todos ellos con diferentes concentraciones de ABA, pero con distinta composición de K^+ y sacarosa. La finalidad de este experimento tan complejo fue vislumbrar qué componente del medio nutritivo era más importante en revertir el efecto del ABA.

Concentraciones mayores de $5 \mu M$ ABA (en agua destilada), inducen descensos en la producción de gas; así el ABA ($25 \mu M$) la inhibe el 41%, mientras que el ABA ($50 \mu M$) lo hace en un 84.2% (Tabla 12). Valores parecidos, en cuanto al porcentaje de inhibición inducido por ABA, se obtienen cuando el medio está compuesto exclusivamente por Tris-HCl pH 7.6; KCl (20 mM) o sacarosa (10 mg/ml). Solamente el KCl (20 mM) es capaz de revertir el efecto inhibitorio inducido por ABA ($25 \mu M$); así, cuando el medio nutritivo se compone de Tris-HCl pH 7.6; KCl (20 mM) y sacarosa (10 mg/ml), el ABA ($5-25 \mu M$) no sólo no afecta a la producción de gas, sino que los resultados parecen indicarnos que se ha producido una estimulación respecto al control (-ABA). Probablemente, la inclusión de KCl (50 mM) en el medio revirtiese el efecto inhibitorio del ABA ($50 \mu M$); el K^+ parece, por consiguiente, ser el único responsable de esta reversión, pero la fuente energética debe estar presente, ya que si no los resultados obtenidos en presencia de KCl (20 mM) no tendrían sentido en este contexto.

Idéntico razonamiento podemos hacer cuando expresamos los resultados anteriores como nmol gas por hora y gramo de peso fresco (Tabla 12). El efecto inhibitorio del ABA no puede ser revertido por TU ($50 \mu M$) aunque el crecimiento esté ligeramente estimulado (Tabla 13). El tener la TU una acción sobre la producción de radicales libres puede ser la explicación de estos resultados.

TABLA 12. Efecto de distintos niveles de ABA en agua o en tampón Tris-ClH, pH=7.6 en ausencia o en presencia de ClK (20 mM) ó en sacarosa (10 mg/ml), sobre la producción de etileno en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, incubados durante 18 horas.

ABA (μ M)	(nl·h ⁻¹ ·eje ⁻¹)				H ₂ O
	+KCl +Sac.	-KCl +Sac	-KCl -Sac.	+KCl -Sac.	
0	3.098d	3.448d	3.351c	2.348c	1.610c
5	3.406c	3.044c	2.306b	2.113c	1.603c
25	3.675b	1.607b	1.767b	1.231b	0.946b
50	0.267a	0.917a	0.940a	0.644a	0.254a

ABA (μ M)	(nmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹)				H ₂ O
	+KCl +Sac.	-KCl +Sac.	-KCl -Sac.	+KCl -Sac	
0	59.031d	73.837d	73.089c	43.309c	34.774c
5	76.636c	71.891c	62.076b	47.762c	48.502c
25	115.102b	51.749b	40.263b	36.209b	33.854b
50	9.877a	63.752a	29.562a	19.939a	10.768a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de distinta letra dentro de cada columna, no presentan diferencias estadísticas significativas según un análisis de MDS (P=0.05).

TABLA 13. Efecto del ABA (0-50 μM) en combinación con TU (50 mM) sobre la producción de etileno y el peso fresco de los ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, incubados durante 18 horas.

Tratamientos	Etileno		Peso fresco/eje
	$\text{nl}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{eje}^{-1}$	$\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	mg
ABA (0 μM)+TU (0 mM)	3.000d	47.481d	20.400a
ABA (0 μM)+TU (50 mM)	0.605a	13.420a	21.198a
ABA (5 μM)+TU (50 mM)	0.899b,c	10.300b,c	21.629a
ABA (25 μM)+TU (50 mM)	0.696a,b	12.516a,b	22.376a
ABA (50 μM)+TU (50 mM)	0.785a,b	9.744a,b	19.360a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra dentro de una misma columna, significa que no existen diferencias estadísticamente significativas según un test de MDS ($P=0.05$).

4.3.5. Efecto de los activadores del crecimiento.

En este apartado se emplearon dos tipos de sustancias; una, la fusicoccina (Fc), cuya acción positiva sobre la elongación celular está más que probada; otra, las poliaminas (PAs), de acción todavía no muy clara sobre el crecimiento, pero que en semillas de garbanzo parece lo estimulan (Figura 5).

4.3.5.1. Fusicoccina.

La inclusión de Fc (0-20 μM) en el medio de crecimiento provoca una rápida elongación celular, lo que implica un ascenso en el peso fresco de los ejes embrionarios; con Fc (20 μM) la estimulación es del 62% respecto al control sin Fc.

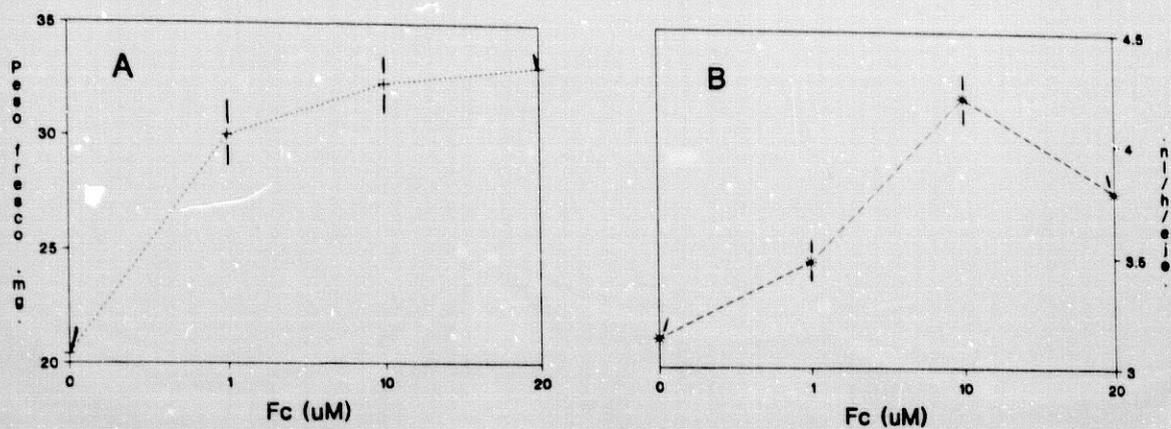


Figura 15. Efecto de concentraciones crecientes de fusicoccina sobre el peso fresco por eje (mg, panel A) y el etileno desprendido ($\text{nl}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{eje}^{-1}$, panel B). Cada valor es la media de 3 repeticiones con la DE que se indica.

La producción de etileno es estimulada por Fc entre 0 y 10 μM (Figura 15). Esta sustancia es capaz, por otra parte, de revertir parcialmente la inhibición provocada por polietilenglicol (PEG), del mismo modo que lo hace con el peso fresco (Tabla 14).

TABLA 14. Efecto de la Fc y el PEG en el crecimiento y producción de etileno de ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* germinadas 18 horas. Las soluciones fueron preparadas en solución nutritiva y las experiencias se repitieron 3-4 veces \pm DE.

	Etileno ($\text{nl}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{eje}^{-1}$)	Peso fresco/eje (mg)
Sol. nutritiva	3.08 ± 0.1	20.45 ± 0.5
PEG	2.77 ± 0.08	18.25 ± 0.5
Fc	4.20 ± 0.5	32.33 ± 0.8
PEG + Fc	3.21 ± 0.2	23.59 ± 0.4
TU	0.60 ± 0.4	21.20 ± 0.2

4.3.5.2. Poliaminas (PAs).

Cuando se incluye en el medio nutritivo concentraciones crecientes de PAs y se valora la producción de etileno en ejes embrionarios a las 18 horas de germinación, se observa que solamente la tetraamina SP induce incremento en la aparición de gas.

TABLA 15. Variación en el etileno desprendido por ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* incubados durante 18 horas en concentraciones crecientes de las poliaminas espermina (SP), espermidina (SPD) y cadaverina (CV).

Poliaminas (mM)	nl·h ⁻¹ ·eje ⁻¹		
	SP	SPD	CV
0	3.139c	3.138b	3.139a
0.1	4.980a	2.473a	3.145a
1	4.435b	2.573a	3.469a
5	1.091d	1.709c	3.579a
10	0.805d	0.896d	3.88a

Poliaminas (mM)	nmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹		
	SP	SPD	CV
0	149.576c	149.576b	149.576a
0.1	188.596a	117.378a	154.402a
1	176.919b	122.080a	161.859a
5	68.475d	88.601c	168.856a
10	65.094d	58.452d	171.879a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Medias seguidas de la misma letra, dentro de cada columna, no presentan diferencias estadísticas significativas, según un test de MDS (P=0.05).

Esta inducción en la producción de etileno, se produce a concentraciones de SP entre 0.1-10 mM (1.5 y 1.4 veces respectivamente), ya que valores de SP entre 5 y 10 mM provocan una disminución en la aparición de etileno del 65 y 75% respectivamente (Tabla 15).

Las restantes PAs probadas o disminuyen la síntesis de gas (SPD) o apenas modifican la producción cuantificada en el control (menos PAs) (CV).

4.4. Cuantificación de los intermediarios de la ruta biosintética del etileno.

Tal y como quedó reflejado en la Introducción de esta Memoria, la aparición de etileno es una consecuencia de la transformación de SAM $\xrightarrow{1}$ ACC $\xrightarrow{2}$ Etileno, catalizada sucesivamente por los enzimas ACC-sintasa (1) y EFE (2). Sin embargo, una porción de ACC puede acumularse en forma de MACC implicando a la N-malonil-ACC-transferasa; el MACC resultante, y mediante la actividad MACC-hidrolasa, puede transformarse total o parcialmente en ACC nuevamente.

Debido a la importancia de lo anteriormente expuesto nos ha parecido oportuno el estudiar en el tiempo la aparición de estos intermediarios relacionados con la producción de gas. La experimentación fue planificada en un período de tiempo comprendido entre las 0-18 horas ya que es el momento en que se cuantificó máxima producción de etileno (Figura 11).

Los intermediarios cuantificados (ACC y MACC) lo fueron en ejes embrionarios aislados de semillas que estuvieron almacenadas (0-4°C) durante un mínimo de 10-12 meses. La razón, como se expondrá (apartado 4.4.2) y discutirá oportunamente, fue que en este momento se obtuvieron unas cantidades importantes de ambos metabolitos, en comparación a las presentes en períodos de almacenaje de 2-4 meses y 6-8 meses respectivamente (Tabla 17).

4.4.1. Variación en el contenido de MACC.

Al igual que los restantes parámetros, el MACC fue cuantificado en intervalos de 60 minutos a partir del momento en que el eje embrionario fue puesto a germinar ($t=0$); es importante recordar que el eje fue aislado a partir de semillas imbibidas en agua destilada estéril durante 4 horas (Cf. Mat. y Met.).

El MACC se cuantificó alternativamente por hidrólisis básica y ácida (Tabla 16); los resultados indican un mayor rendimiento con la segunda que con la primera, pero nos demuestran que mediante ambas podemos obtener ACC a partir de un molécula que "supuestamente" es MACC. Seguidamente expondremos los datos que nos han llevado a concluir y demostrar la identidad de tal metabolito; metabolito que efectivamente era el derivado malonizado del ACC.

TABLA 16. Cuantificación de ACC libre y conjugado (MACC) mediante hidrólisis ácida HCl (1 N) y básica NaOH (12 N). Los resultados se expresan como nmol/g.

Horas	ACC	MACC	
4	0.003 ± 0.0015	$0.003^* \pm 0.001$	$0.003^{**} \pm 0.001$
5	1.989 ± 0.0700	$33.699^* \pm 1.500$	$22.398^{**} \pm 2.701$
6	2.558 ± 0.1790	$0.186^* \pm 0.025$	$0.145^{**} \pm 0.073$

* hidrólisis ácida.

** hidrólisis básica.

A partir de este experimento hemos preferido obtener MACC mediante hidrólisis básica. En discusión comentaremos las razones.

4.4.1.1. Identificación de MACC de ejes embrionarios.

Para demostrar que la sustancia que mediante hidrólisis producía ACC era su derivado malonizado (MACC), se sintetizó químicamente a partir de cloruro de metil

malonilo y ACC. Al MACC obtenido se le hicieron las siguientes determinaciones:

- a.- Comparación mediante cromatografía de gases de las muestras sintética y natural.
- b.- Espectrometría de Masas de ambos compuestos.
- c.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones y de carbono-13.

Las características espectroscópicas de los compuestos sintetizados químicamente son las siguientes:

Los cristales de ACC: ^1H NMR (300 MHz): δ (acetona- d_6) 1.45 (2H, m), 1.61 (2H, m), AA'BB' sistema de H-2 y H-3; ^{13}C NMR (75 MHz): δ (acetona- d_6) 175.66 (COOH), 36.67 (C-1), 16.00 (C-2 y C-3).

El dimetil ester del MACC presenta un pico en CGL con R_t 12.80. MS: m/z (rel. int.); 215 (M^+ , 23), 184, (35), 183 (98), 156 (24), 155 (19), 142 (8), 124 (12), 115 (33), 114 (52), 101 (63), 100 (75), 96 (15), 83 (100), 82 (20), 74 (21), 59 (91), 56 (43), 55 (68), 54 (69) (esquema 1). ^1H NMR (80 MHz): δ (acetona- d_6) 1.09 (2H, m), 1.40 (2h, m), AA'BB' sistema de H-2 y H-3; 3.25 (s, H-2'), 3.60 (s, -OCH₃), 3.64 (s, -OCH₃), ^{13}C NMR (75 MHz): δ (acetona- d_6) 170.89 (C-1'), 168.87 (-O-CO-C₁), 166.81 (C-3'), 52.42 (-OCH₃), 52.19 (-OCH₃), 42.86 (C-2'), 34.00 (C-1), 17.53 (C-2 y C-3).

Una vez caracterizado el MACC sintetizado, se pasó a aislarlo a partir de ejes embrionarios aislados y germinados 5 horas. Los espectros de Cromatografía de Gases combinada con Espectroscopía de Masas del MACC endógeno muestran un espectro de EM idéntico al obtenido del MACC sintético (Figura 16 A y B).

Todas las muestras obtenidas por nosotros (Cf. Mat y Met.) resultaron coincidentes en el resto de sus propiedades químicas y espectroscópicas con las muestras naturales.

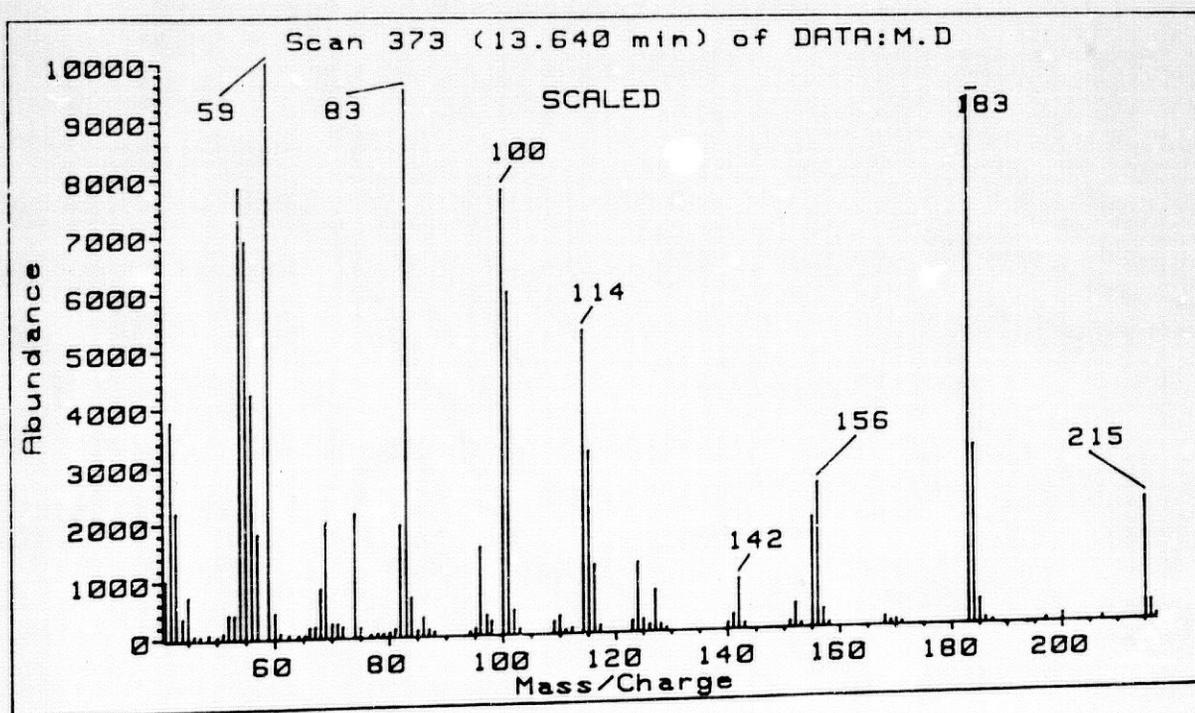
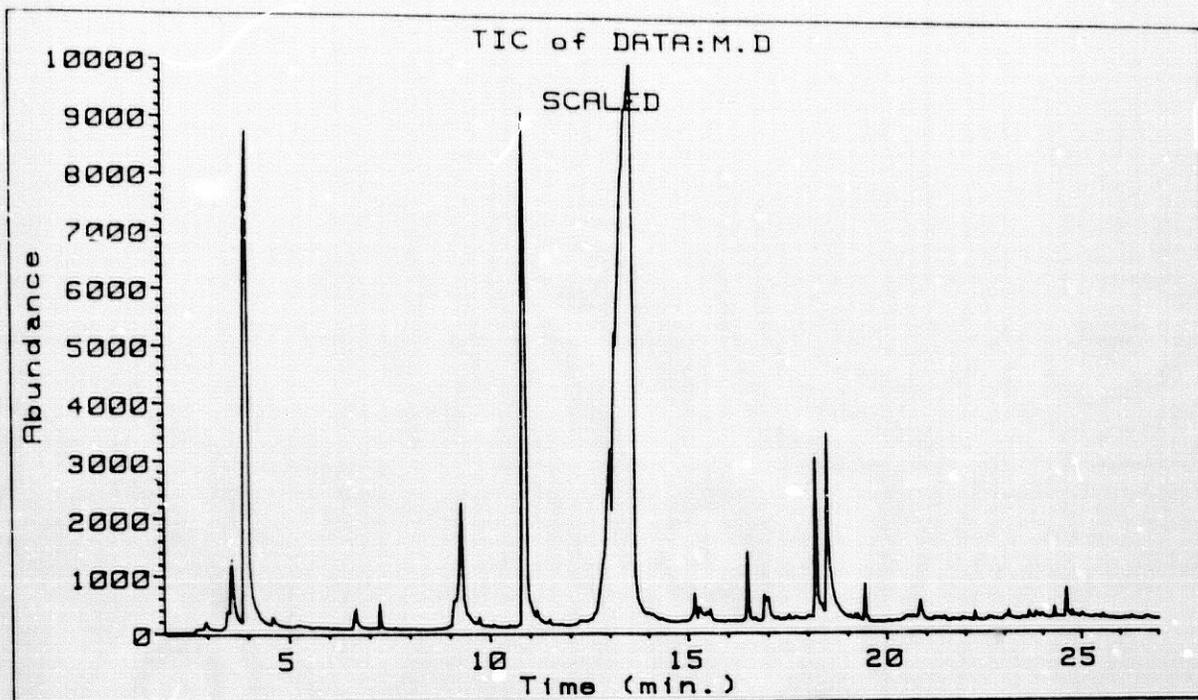


Figura 16 A-I. Cromatografía de gases y Espectrometría de masas del dimetil éster del MACC sintético.

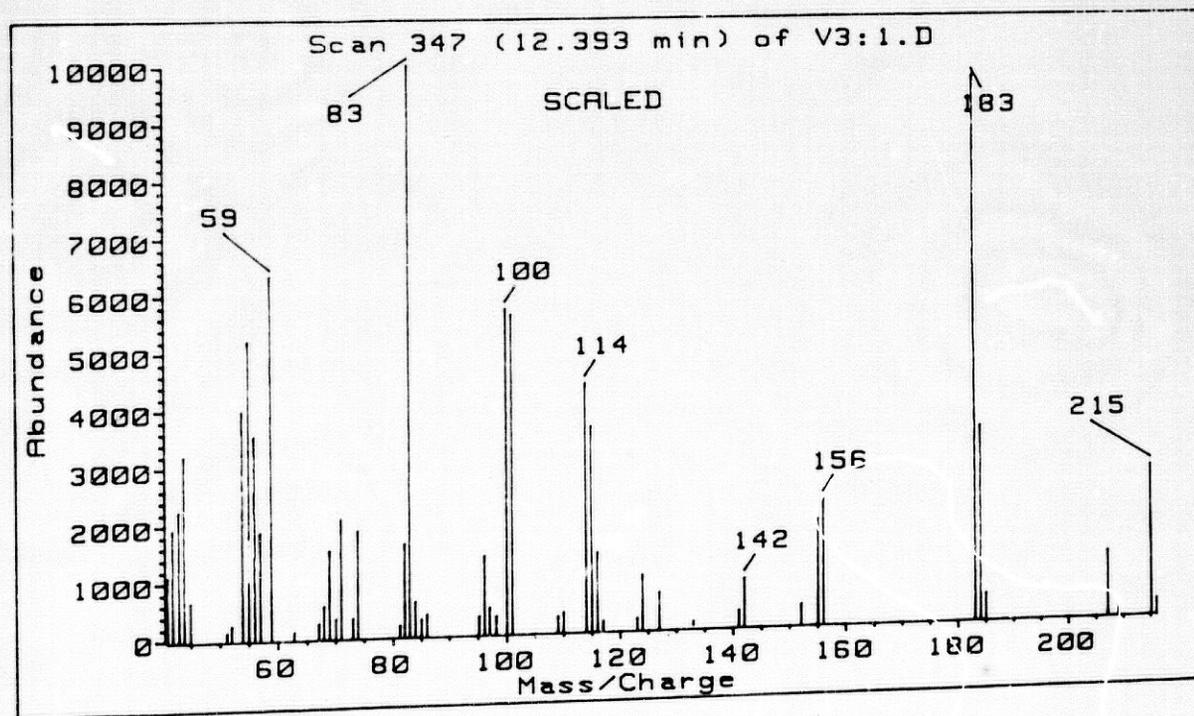
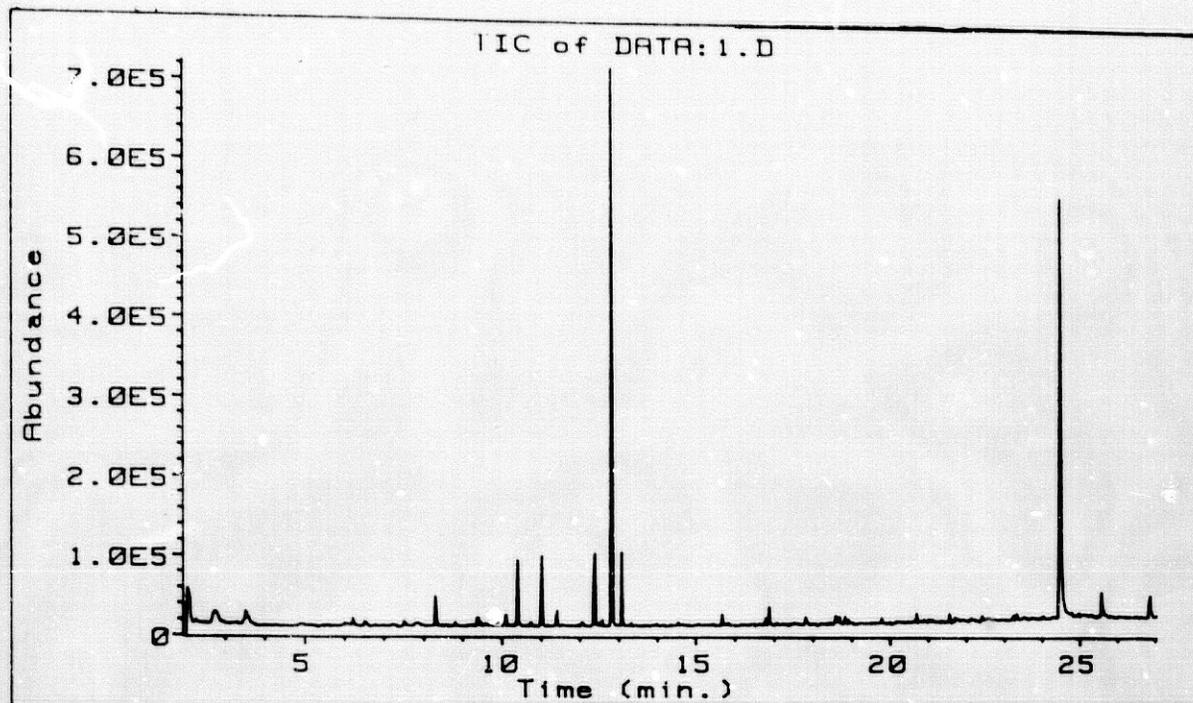


Figura 16 A-II. Cromatografía de gases y Espectrometría de masas del dimetil éster del MACC natural.

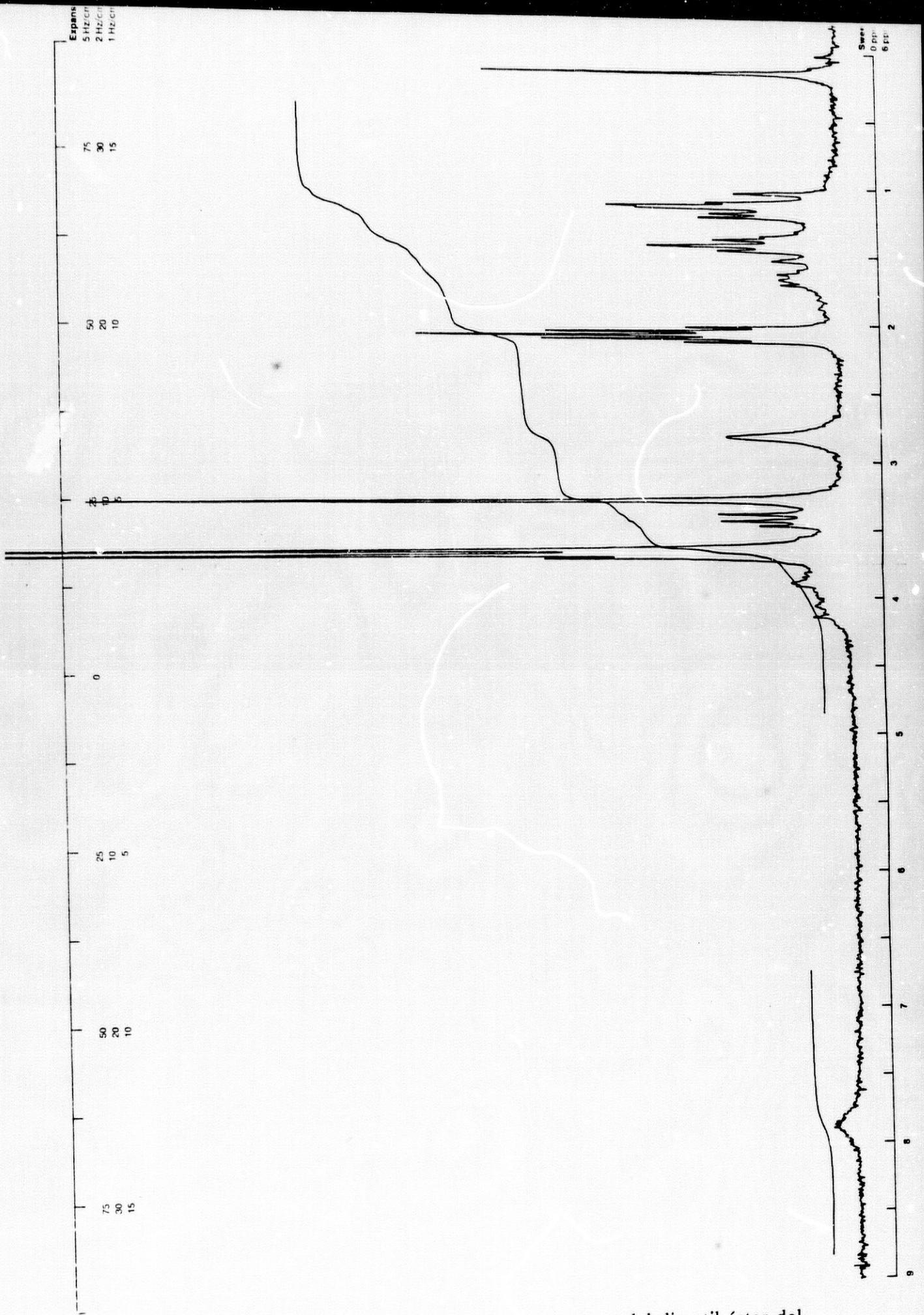


Figura 16 B-1. Resonancia magnética nuclear de protones del dimetil éster del MACC esterificado sintético.

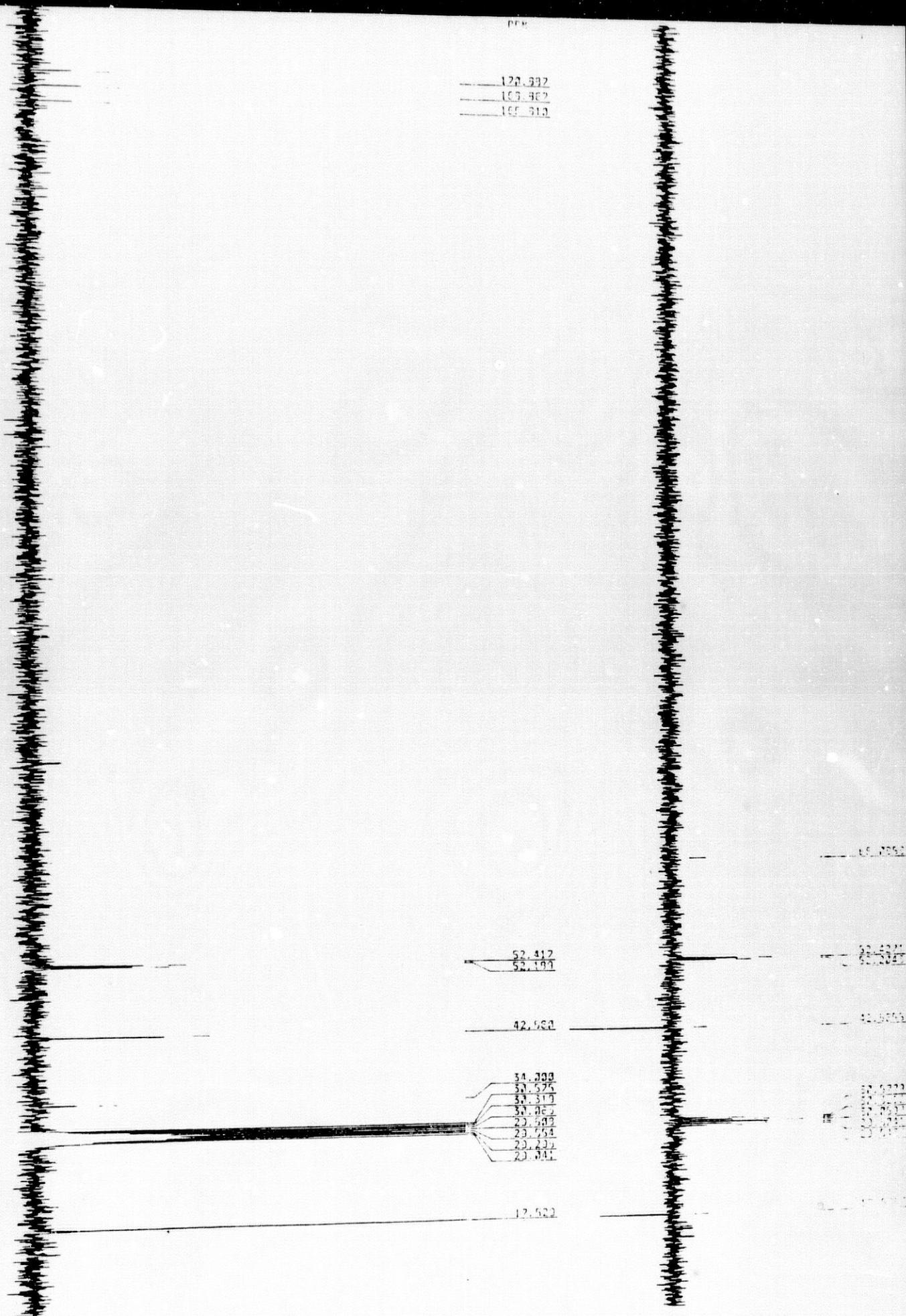
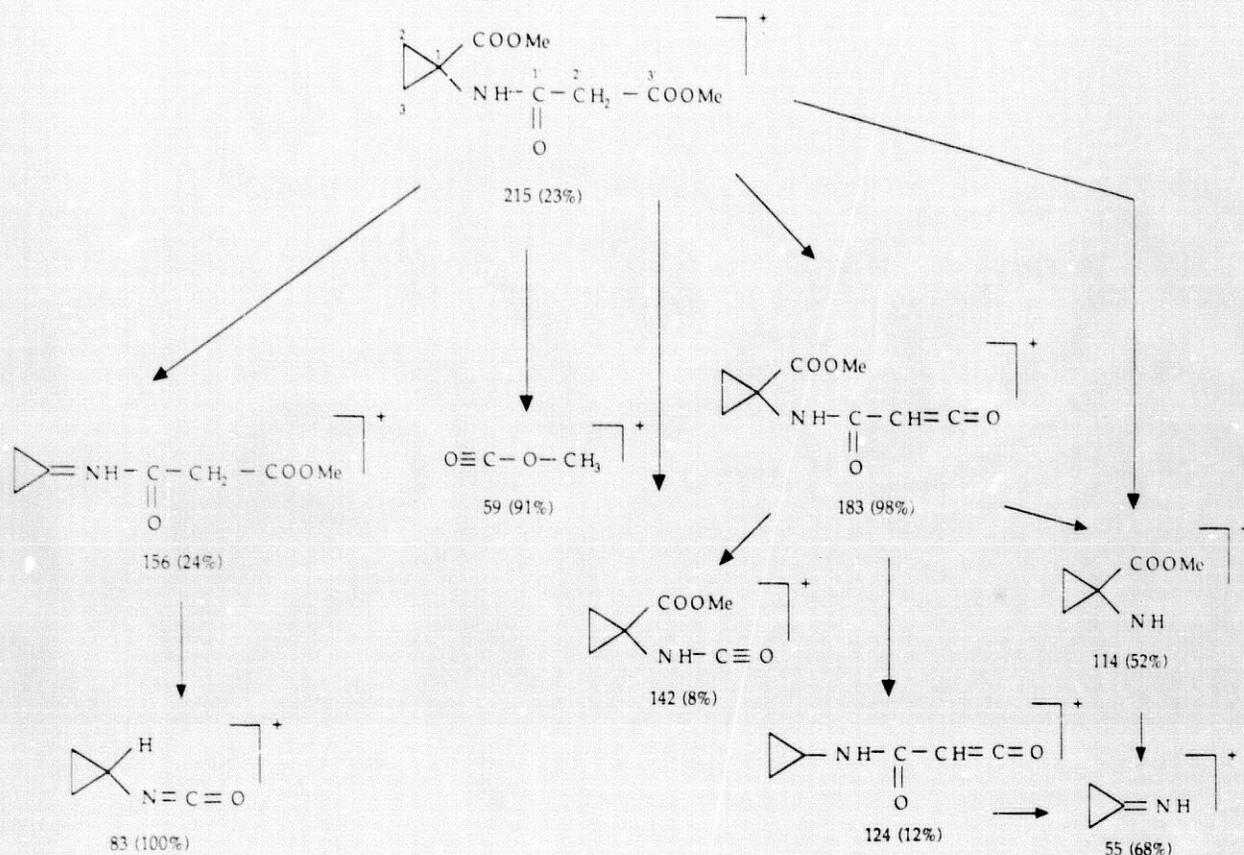


Figura 16 B-2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 del MACC esterificado sintético.

Las principales fragmentaciones observadas en el MS del dimetil ester del MACC se observan en el siguiente esquema.



El pico base proviene de la ruptura del ester metílico unido al ciclopropano lo que origina el fragmento m/z 156 y parte del m/z 59.

Si m/z 156 sufre una nueva degradación en alfa del grupo carbonilo de la amida, se obtiene el fragmento m/z 83. Otros fragmentos menos significativos pueden verse en el esquema y coinciden totalmente con los de la muestra de MACC obtenida por síntesis química.

4.4.1.2. Variación con la germinación.

A las 5 horas de germinación en solución nutritiva "standard", se encuentra un pico de acumulación de MACC (Tabla 17), con valores muy superiores a los encontrados en el resto del período de tiempo estudiado, donde apenas es cuantificable.

Este pico de MACC es menor cuanto menor es el tiempo de almacenaje a (0-4°C) de la semilla: en 8 meses disminuye un 96% y en 4 meses lo hace en un 99.5% (Tabla 17); además conforme aumenta el tiempo de almacenaje (estratificación) la capacidad de síntesis de MACC a las 5 horas va en aumento; lo que no ocurre a las otras horas (Tabla 17).

4.4.2. Variación en el contenido de ACC.

El ACC es el segundo intermediario que aparece de forma clara durante los primeros instantes de la germinación de ejes aislados de garbanzo. Su acumulación se localiza 2 horas más tarde que el MACC, si bien puede empezar a detectarse a partir de las 5 horas de germinación (Tabla 17). El ACC cuantificado entre 5-7 horas equivale al 99.5% del que existe durante las primeras 8 horas; a 4 y 8 horas los niveles de ACC apenas son cuantificables; como tampoco lo eran en el caso del MACC.

La molécula de ACC fue identificada "in vivo" siguiendo un metodología similar que la usada para el MACC, utilizando como "standard" el ACC comercial puro químicamente de SIGMA (Figura 17).

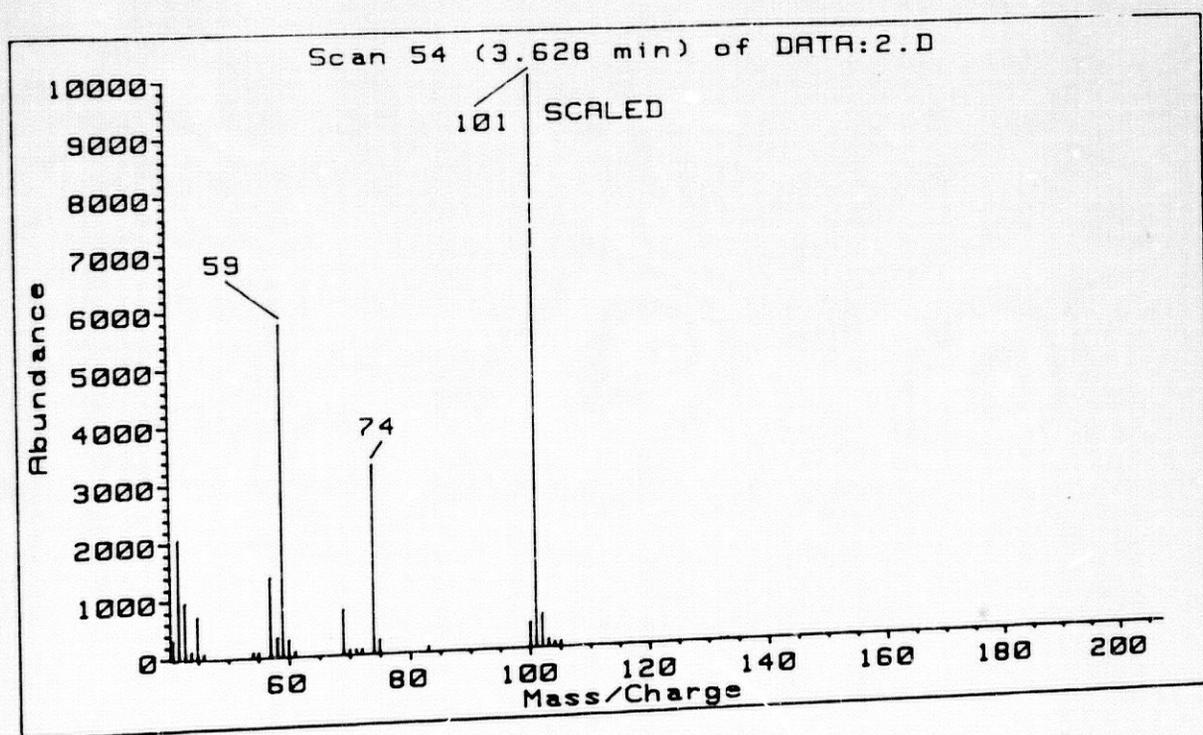


Figura 17. Espectrometría de Masas del éster metílico del ACC puro.

TABLA 17. Variación en el contenido de ACC libre y MACC con el tiempo de germinación de ejes embrionarios aislados y con el período de almacenaje de las semillas de garbanzo a (0-4°C).

h.	2-4 Meses		6-8 Meses		10-12 Meses	
	ACC	MACC	ACC	MACC	ACC	MACC
4	0.0056 ± 0.0001	0.0994 ± 0.0001	0.0314 ± 0.0019	0.5632 ± 0.0108	0.0031 ± 0.0008	0.0025 ± 0.0004
5	0.0079 ± 0.0001	0.0963 ± 0.0002	0.0049 ± 0.0001	0.8432 ± 0.0103	1.9889 ± 0.1108	22.3984 ± 1.0025
6	0.0053 ± 0.0001	0.0584 ± 0.0012	0.0320 ± 0.0015	0.3048 ± 0.0100	2.5579 ± 0.1263	0.1453 ± 0.0261
7	0.0066 ± 0.0001	0.0604 ± 0.0015	0.0403 ± 0.0011	0.0144 ± 0.0091	3.2821 ± 0.1529	0.3811 ± 0.0415
8	0.0073 ± 0.0001	0.0581 ± 0.0014	0.0219 ± 0.0018	-	0.0188 ± 0.0011	-

Valores medios de 3-4 experimentos ± DE. Los datos están expresados en nmol/g.

Durante los primeros meses de almacenaje el contenido en ACC es casi imperceptible; sin embargo, su síntesis se acelera en un momento dado alcanzando a las 10-12 meses valores 82 veces superiores que a los 6-8 meses de almacenaje y 550 veces superiores que a los 2-4 meses (Tabla 17).

Durante el período de tiempo entre 0-9 horas, en que el MACC y ACC tienen sus máximos de acumulación, los niveles de producción de etileno están entre (2-8 nmol/g) mientras que a partir de las 14 horas (19 nmol/h) se produce una aceleración en la aparición hasta alcanzar un máximo a las 18 horas (65 nmol/g) (Figura 18).

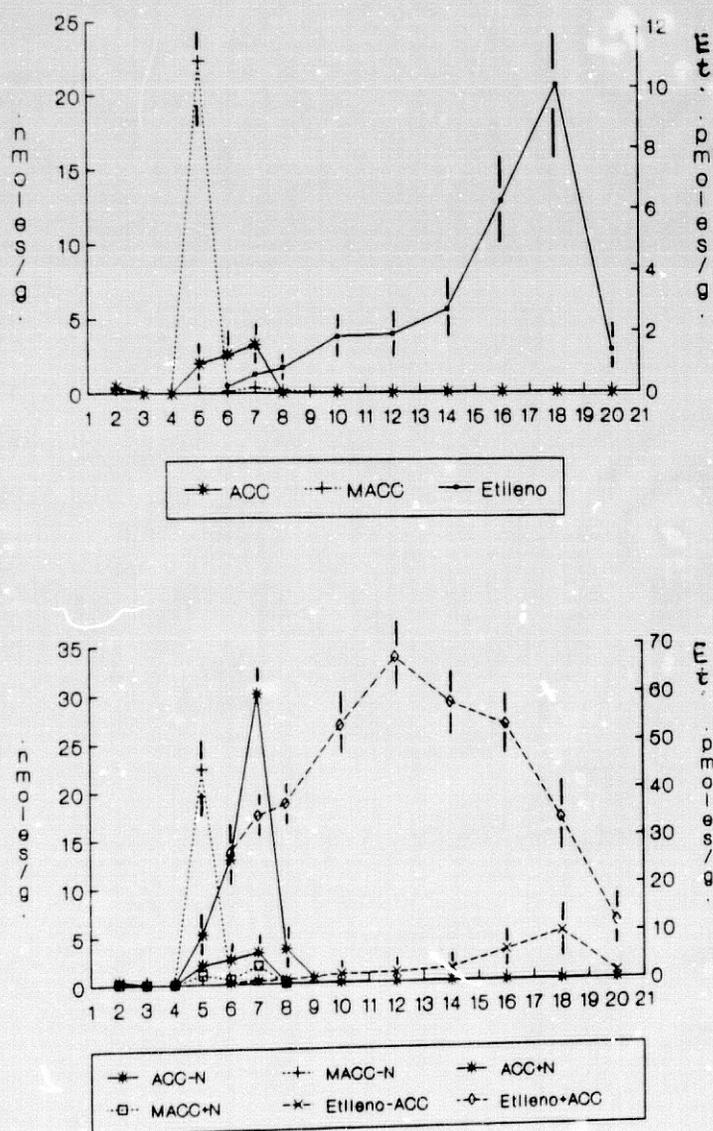


Figura 18. Acumulación de MACC, ACC y producción de etileno durante las primeras 20 horas de germinación de ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*. Datos media de 3-4 experiencias \pm DE. Los valores de MACC y ACC a $t=0$ fueron 4.5 y 5.3 respectivamente.

4.4.3. Actividad ACC-sintasa durante la germinación.

Como ha quedado expuesto en la Introducción de esta Memoria la transformación de ACC en etileno mediante la actuación del complejo enzimático EFE es un proceso dependiente de aerobiosis; por lo tanto, en ausencia de O_2 esta reacción no podrá llevarse a término y el ACC se acumulará.

Basándonos en este hecho, hemos determinado la actividad ACC-sintasa ($SAM \rightarrow ACC$): cuantificación de los niveles de ACC en atmósfera de N_2 . Para ello, se ha realizado un estudio preliminar a fin de conocer cual era el tiempo de incubación en anaerobiosis apropiado para conseguir una medida de ACC suficientemente cuantificable y a su vez repetitivo.

Como puede observarse en la Figura 19, la producción de ACC es perfectamente lineal durante las 6 primeras horas de incubación en atmósfera de N_2 . Hemos tomado para nuestros experimentos un tiempo intermedio de 4 horas.

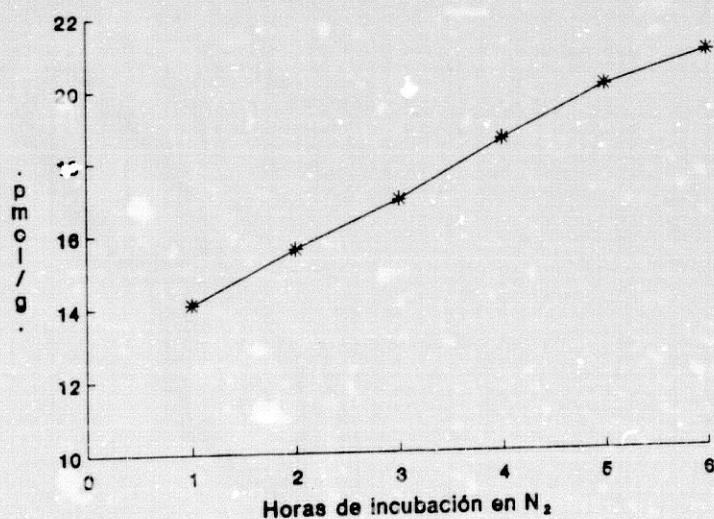


Figura 19. Producción de ACC en ejes embrionarios aislados incubados en atmósfera de N_2 durante 1-6 horas a $30^\circ C$ y oscuridad. Valores media de 3-4 experiencias \pm DE.

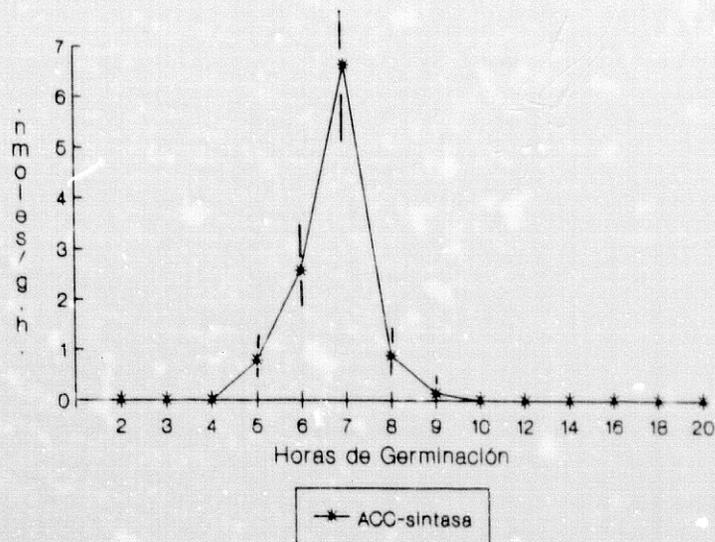


Figura 20. Actividad ACC-sintasa durante las primeras 20 horas de germinación de ejes embrionarios aislados incubados en solución "standard". Valores media de 3-4 experiencias.

La actividad ACC-sintasa expresada como moles de ACC·g⁻¹·h⁻¹, fue determinada a lo largo de las primeras 18 horas de germinación (Figura 20). El máximo de actividad se encontró a las 7 horas, coincidiendo con el máximo de acumulación de ACC (Figura 18), pudiendo detectarse desde las 4 hasta las 8 horas. Sin embargo, no hemos encontrado actividad medible por este método en períodos fuera de los comentados.

4.4.4. Actividad MACC-transferasa y MACC-hidrolasa.

La actividad MACC-transferasa (transformación de ACC en MACC) y MACC-hidrolasa (transformación de MACC a ACC) fueron determinadas de forma similar a la ACC-sintasa, en tanto en cuanto se cuantificó el nivel de MACC y de ACC (formado a partir de MACC) después de 4 horas en atmósfera de N₂.

Los resultados se expresan en la Figura 21. La actividad MACC-hidrolasa y por tanto la MACC-transferasa, al actuar estas dos enzimas en la misma reacción pero en sentido contrario, tienen su máximo muy bien definido a las 5 horas de germinación,

no detectándose en periodos anteriores ni posteriores (fue medida hasta las 20 horas). Esta actividad MACC-transferasa puede explicar el pico de MACC (5 horas) a partir de ACC, cuyos valores a esta hora son relativamente altos (Figura 18). Por otra parte, la actividad MACC-hidrolasa, debe ser la causante de la aparición de una porción de ACC (entre 4-8 horas) puesto que otra porción de él la produce la ACC-sintasa ya comentada (Figura 20).

La actividad MACC-hidrolasa fue así mismo caracterizada siguiendo las técnicas convencionales de purificación enzimática (extracción con tampón salino apropiado, precipitación con sulfato amónico a diferentes grados de saturación y medida de la aparición de ACC una vez añadido al medio de reacción el MACC sintetizado químicamente por nosotros. En la Tabla 18 puede verse que la aparición de ACC, expresada $\text{nmol ACC} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína $\cdot \text{h}^{-1}$, incrementa con el tiempo de incubación obteniéndose a la hora un valor 2.3 veces superior que a 30 min. La actividad transformante de MACC en ACC parece que presente en este sobrenadante obtenido por nosotros a partir de ejes embrionarios aislados y germinados 5 horas (punto máximo de actividad MACC-hidrolasa).

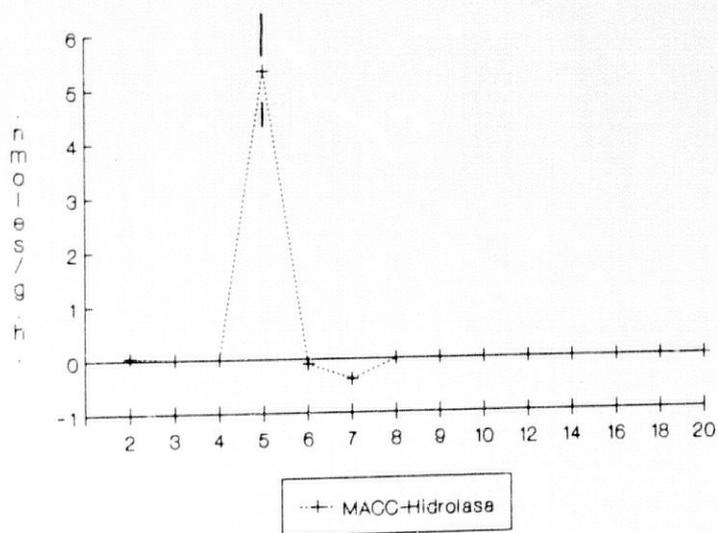


Figura 21. Actividad MACC-hidrolasa durante las primeras 20 horas de germinación de ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*, incubados en solución "standard". Valores media de 3-4 experiencias \pm DE.

TABLA 18. Efecto de la incubación con MACC (4 mM) en el desarrollo de la actividad MACC-hidrolasa en extractos enzimáticos de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. El enzima se extrajo a partir de 6 g de material vegetal, germinado en solución nutritiva durante 5 h. a 25°C, como se describe en Material y Métodos.

Tiempo	Actividad MACC-hidrolasa nmol ACC·mg ⁻¹ proteína·h ⁻¹
Control (0 min)	0.1
30 min	1.1
60 min	2.6

Hemos cuantificado la actividad MACC-hidrolásica a lo largo del almacenaje de la semilla. Los resultados (Tabla 19) demuestran que la capacidad que posee una semilla almacenada 2-4 meses de hacer desaparecer el MACC y transformarlo en ACC es 1.5 veces menor que en las almacenadas 6-8 meses y 48 veces menor que las que lo estuvieron 10-12 meses. Estos resultados parecen apoyar el hecho de que una parte importante del ACC procede de la actividad MACC-hidrolasa.

TABLA 19. Efecto del almacenaje sobre la actividad MACC-hidrolasa en ejes embrionarios aislados germinados durante 5 horas en solución nutritiva.

Actividad MACC-hidrolasa (nmol MACC·g ⁻¹ ·h ⁻¹)			
	3 meses	7 meses	11 meses
5 h.	0.11	0.18	5.36

4.4.5. Actividad EFE durante la germinación.

La actividad del enzima formador de etileno (EFE) fue determinado en presencia de concentración saturante de ACC exógeno en el medio de germinación y com-

parando la producción de etileno con la obtenida en ausencia de ACC. Los resultados se observan en la Figura 22. EFE comienza a detectarse a las 6 horas de germinación alcanzando un máximo a las 12 horas (6 horas antes de que se produzca la máxima producción de gas).

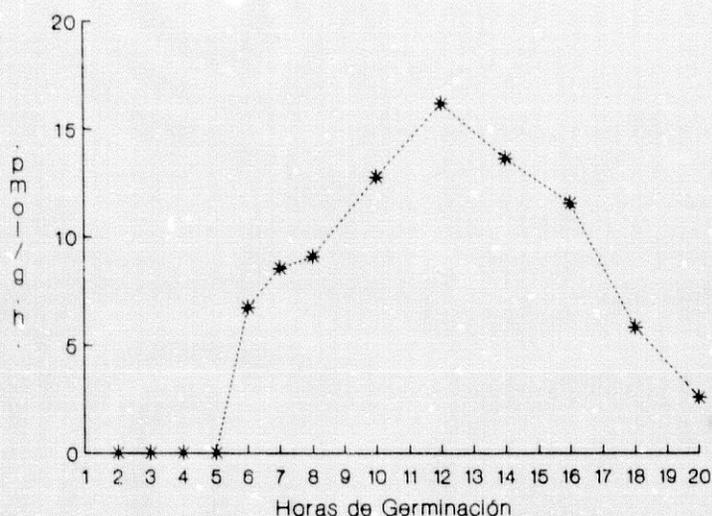


Figura 22. Actividad EFE durante la germinación de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Medias de 3-4 experimentos \pm DE.

Como resumen de los resultados referentes a las actividades enzimáticas relacionadas con la última parte de la ruta biosintética del etileno, podemos decir que existe una perfecta y bien delimitada separación temporal en los máximos (Figura 23): 5 h (MACC-hidrolasa), 7 h (ACC-sintasa) y 12 h (EFE).

Por otra parte, y resumiendo del mismo modo los resultados encontrados para la acumulación de MACC, ACC y producción de etileno (Figura 18) podemos hacer idéntico comentario que en el caso de las actividades enzimáticas (Figura 23) puesto que existe una perfecta secuencia en la aparición de tales moléculas a lo largo de la germinación: MACC (5h.), ACC (7h.) y etileno (18 h.) respectivamente (Figura 24).

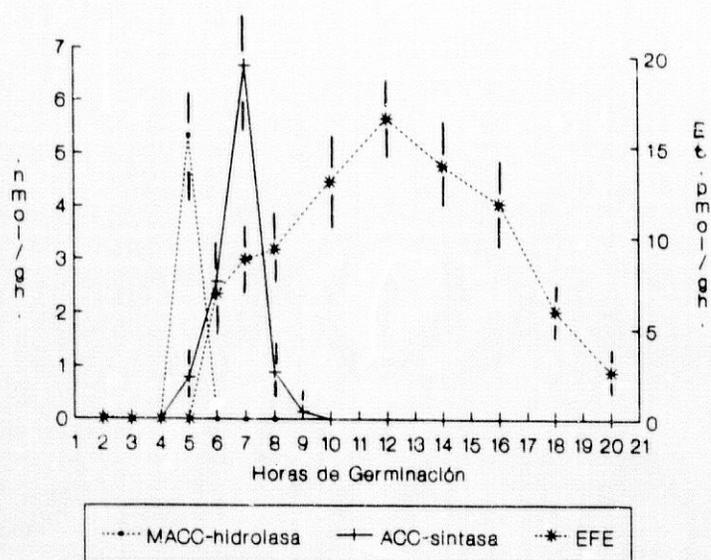


Figura 23. Aparición secuencial de las actividades MACC-hidrolasa, ACC-sintasa y EFE durante la germinación de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Los resultados son la media de 5-6 experimentos \pm DE.

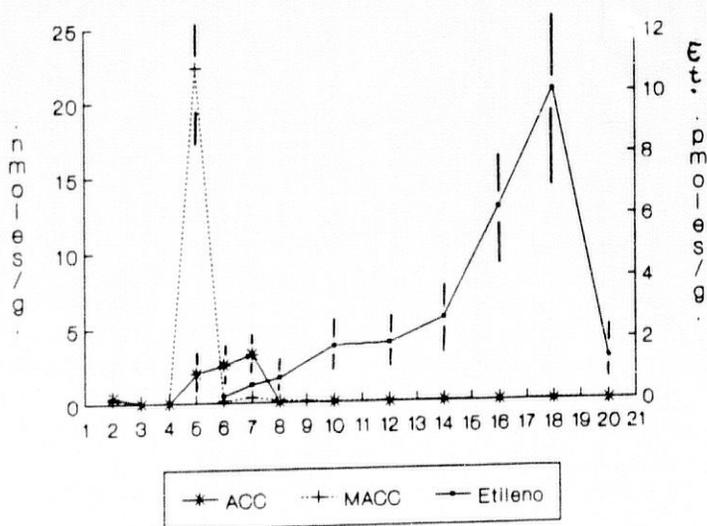


Figura 24. Aparición secuencial de la acumulación de MACC, ACC y producción de etileno durante de germinación de ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*. Valores media de 5-6 experimentos \pm DE.

4.4.6. Efecto del AVG.

La presencia de AVG (1 mM) en el medio de imbibición, así como en la solución nutritiva "standard" provoca, a las 5 horas, una disminución tanto en el contenido en MACC como en ACC (Figura 25).

Estos resultados parecen indicar que el AVG, en estas condiciones de ensayo, además de inhibir la ACC-sintasa (descenso en el contenido de ACC en un 60%) induce una desaparición de MACC que no parece ser "vía MACC-hidrolasa" ya que de lo contrario, esto implicaría un incremento correlativo en ACC, lo que no se observa (Figura 25).

Si partimos de la base de que AVG inhibe (a esta concentración) la ACC-sintasa como sucede en otros tejidos, el ACC presente con AVG debe originarse de la transformación MACC a ACC, implicando a la MACC-hidrolasa.

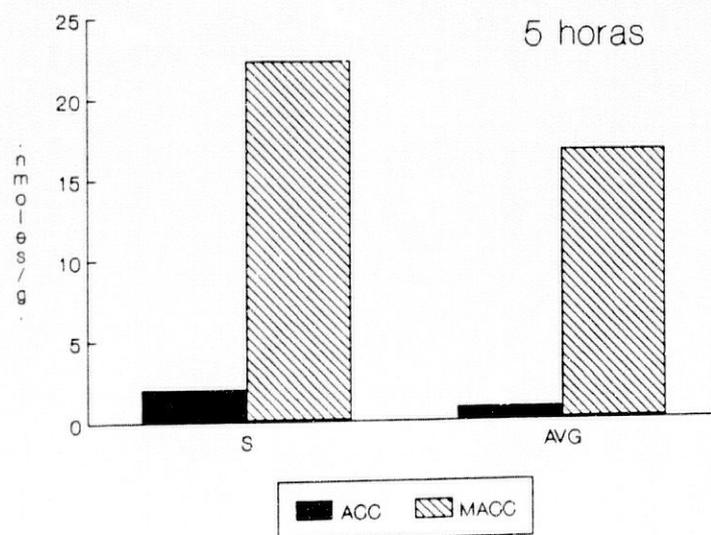


Figura 25. Alteraciones en el contenido en ACC y MACC provocadas por AVG (1 mM) adicionado al medio de imbibición y solución nutritiva. Los ejes aislados se germinaron 5 h. (máximo de producción de MACC). Medias de 2-3 experimentos \pm DE.

4.4.7. Efecto del AOA.

Para realizar este experimento, se imbibieron las semillas en AOA a concentraciones 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mM; los ejes embrionarios aislados se pusieron a germinar durante 5 h. (máximo de MACC y MACC-hidrolasa) y 7 h. (máximo de ACC y ACC-sintasa), respectivamente. Se cuantificó el contenido en ACC, MACC y etileno. El contenido en ACC incrementa cuando lo hace la concentración de AOA tanto a 5 h. como a 7 horas (Figura 26).

Respecto al contenido en MACC (Figura 27), a 5 h se encuentra un perfil similar que para ACC (Figura 26), sin embargo, a 7 horas apenas existe MACC (pero si cantidades apreciables de ACC). Los resultados encontrados a 7 h. (ACC y MACC) parece que demuestran la presencia de una actividad MACC-hidrolásica importante, además de otra "vía" de desaparición de MACC no caracterizada en esta Memoria ya que el incremento en ACC y descenso en MACC no son estequiométricos.

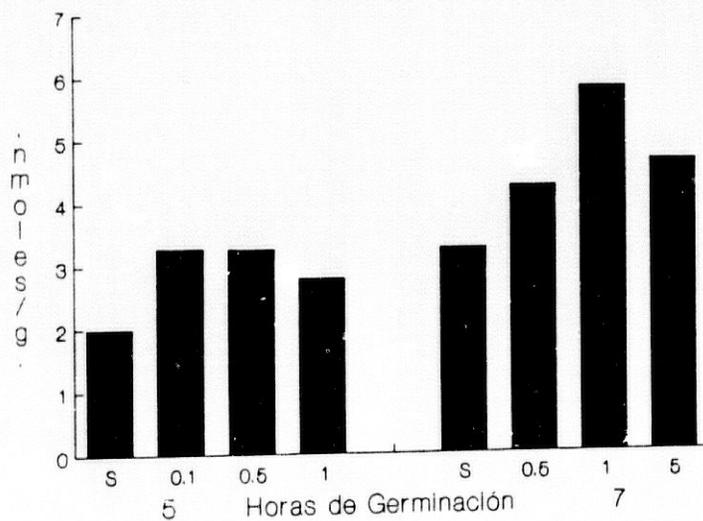


Figura 26. Efecto del AOA en el contenido de ACC durante la germinación de ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*. Valores medios de 7-8 experimentos \pm DE.

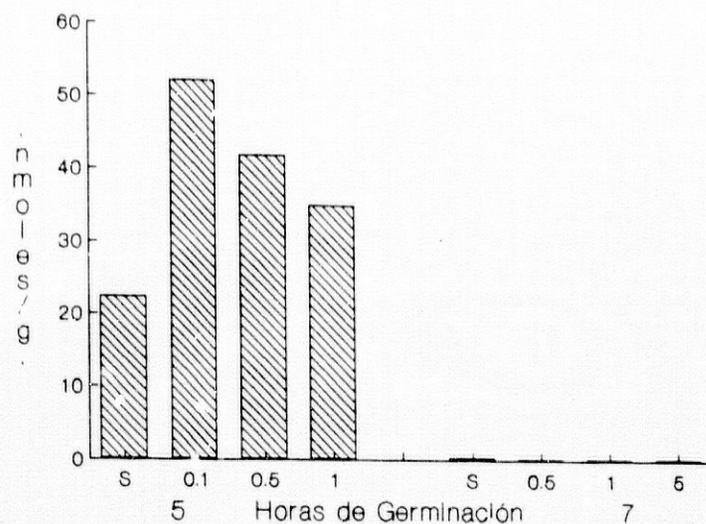


Figura 27. Efecto del AOA en la variación del contenido de MACC a 5 y 7 horas de germinación de ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*. Medias de 3-4 experiencias con su DE.

La producción de etileno en presencia de AOA a las concentraciones citadas se expresan en la Figura 28. Claramente, los perfiles de variación de ACC y etileno son contrarios a 5 y 7 horas respectivamente.

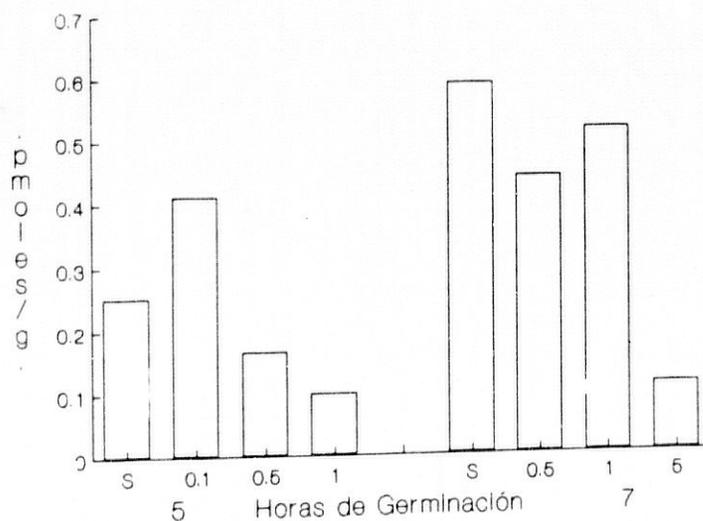


Figura 28. Efecto del AOA en la producción de etileno a 5 y 7 horas de germinación de ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*. Medias de 3-4 experiencias con su DE.

No obstante, para intentar explicar estos resultados del porqué la presencia de AOA no permite transformar el ACC en gas en una mayor proporción, se midió la actividad EFE a las 12 horas (máxima actividad, Cf. Figura 22) en presencia de AOA y de Cl₂Co (Tabla 20). Los resultados indican que la presencia de AOA inhibe la actividad EFE en un 90% aproximadamente. El Cl₂Co tiene todavía un efecto mucho más drástico que el AOA.

TABLA 20. Efecto del AOA y Cl₂Co a las concentraciones reseñadas sobre la actividad EFE en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* y germinadas 12 horas (máximo de EFE). Los resultados son la media de 3 experimentos ± DE y están expresados en pmol/g/h.

	Actividad EFE
Solución	65.509 ± .056
AOA (5 mM)	5.821 ± 0.01
Cl ₂ Co	1.316 ± 0.02

4.4.8. Efecto del ABA en la ruta biosintética del etileno.

El ABA es una fitohormona que tiene una serie de acciones sobre el crecimiento y desarrollo de la célula, estando su mecanismo relacionado con la permeabilidad celular (H⁺/K⁺, 2K⁺/Ca⁺⁺ ...), síntesis de proteínas (tanto a nivel de transcripción como de traducción) y niveles de fitohormonas, entre otros efectos.

Previo a decidir que concentración de ABA se debería de añadir al medio para estudiar la acción sobre el nivel de intermediarios y enzimas relacionadas con el etileno, hemos creído conveniente cuantificar sus niveles endógenos.

4.4.8.1. Identificación del ABA extraído.

A partir de ABA (grado Sigma), se realizaron las siguientes determinaciones orgánicas:

- a) Cromatografía de gases. Se obtienen dos picos bien diferenciados (isómero "trans" e isómero "cis") a tiempos de retención 5.4 y 6.5 respectivamente (Figura 29 A).
- b) Espectrometría de Masas. La cromatografía de gases se acopló a Espectrometría de Masas; ambos isómeros presentan idéntico patrón de descomposición (Figura 29 B): el ión molecular a 278, una señal a 260 que procede de la pérdida de una molécula de H₂O, a 190 el pico base con un 100% de abundancia y que procede de la pérdida de 5 carbonos, 8 hidrógenos y 2 oxígenos, y a 91 que es el pico característico del ión tropilio (anillo aromático de 7 carbonos).
- c) Resonancia Magnética Nuclear. Se observa lo siguiente: a 1.1 una doble señal de su gem-dimetilo, a 1.9 y 2.3 dos metilos en doble enlace, y a 5.8, 5.9, 6.2 y 6.3 la señal de los protones olefinicos; la señal a 7.3 es del disolvente y a 3.7 del grupo metilo terminal.

Todas las muestras de ABA obtenidas por nosotros (Cf. Mat. y Met.) reúnen las características reseñadas en a), b) y c).

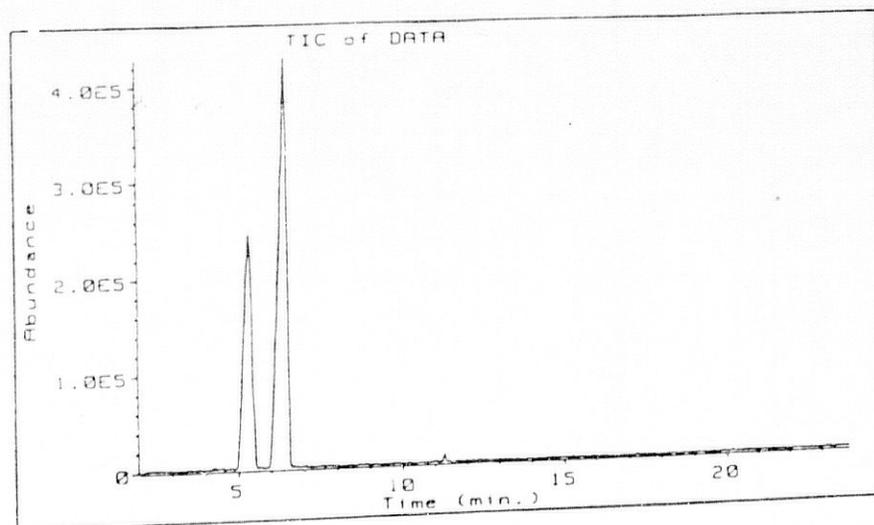


Figura 29 A-1. Identificación por cromatografía de gases del éster metílico del ácido abscísico (ABA).

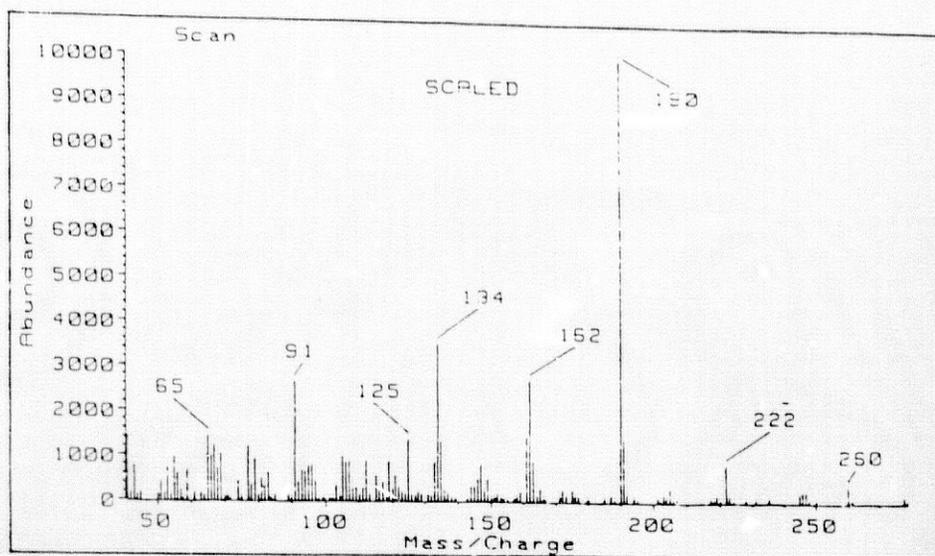


Figura 29 A-2. Espectro de masas del éster metílico del ácido abscísico (ABA).

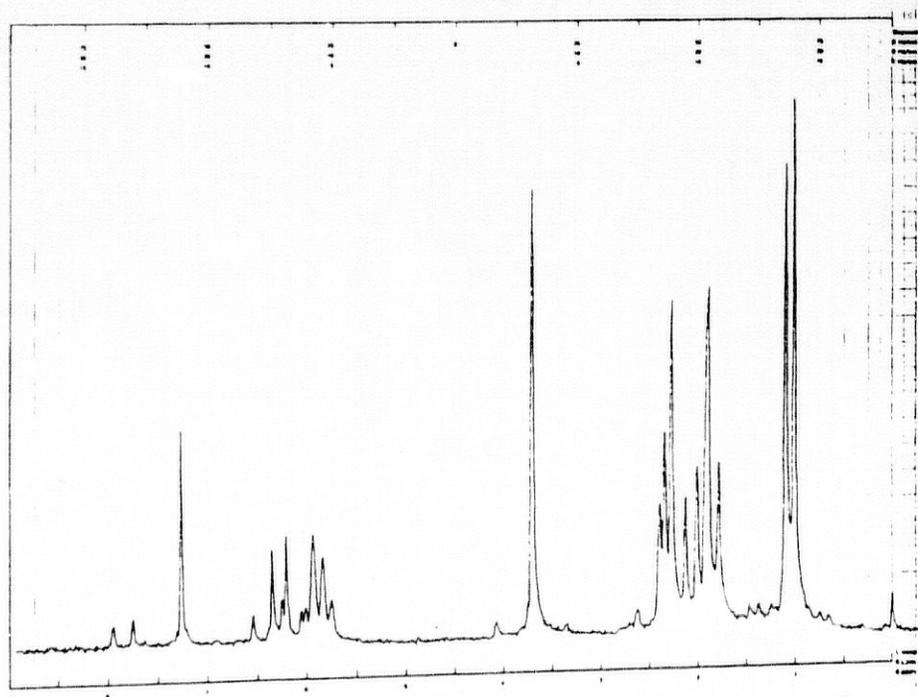


Figura 29 B. Resonancia magnética nuclear de protones del éster metílico del ácido abscísico (ABA).

4.4.8.2. Cuantificación del ABA endógeno.

El ABA "libre" apenas se modifica durante la germinación; hemos cuantificado valores que oscilan entre 3.7 nmol/g (6 h) y 5.6 nmol/g (18 h), este último corresponde a un máximo (Figura 30).

Respecto al ABA "conjugado", presenta variación con la germinación; así, el máximo (12 h), corresponde a un valor de 29.6 nmol/g y el mínimo (6 h) a uno de 7.0 nmol/g (Figura 30).

La relación entre ambos tipos de ABA es de 2 veces (6 h) (la más pequeña) y de 7 veces (12 h) (la más elevada).

Estos resultados nos han dado pie para utilizar concentraciones exógenas de ABA que oscilan entre 5 y 50 μM .

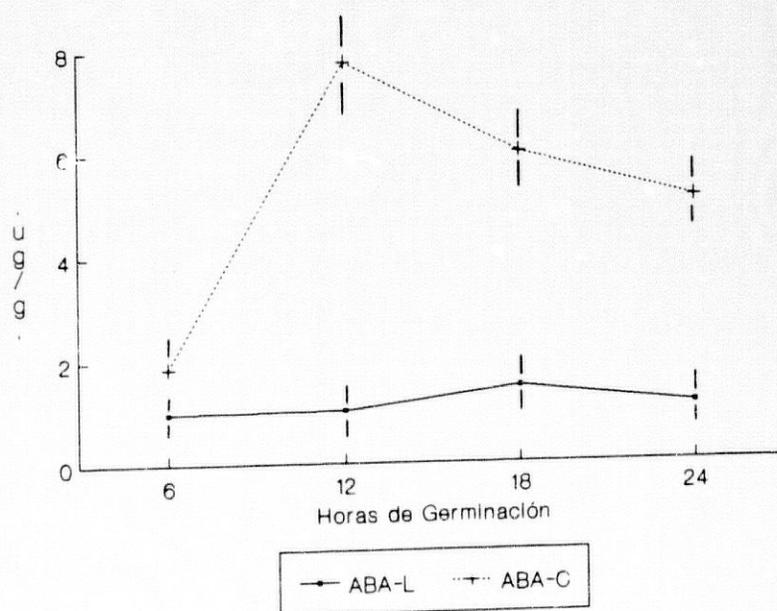


Figura 30. Contenido endógeno de ABA "libre" y "conjugado" durante las 24 primeras horas de germinación de ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*. Media de 3 experimentos \pm DE.

4.4.8.3. Efecto del ABA sobre los niveles de MACC y ACC (5 h).

Se estudió la acción de diferentes concentraciones de ABA sobre el contenido en ACC y MACC a 5 h, punto en que la concentración de MACC y la actividad MACC-hidrolasa es máxima (Figura 18).

El MACC se acumula con ABA (5 μM); sin embargo, concentraciones mayores de ABA inducen fuertes descensos en el contenido de MACC (72% a 25 μM y 58% a 50 μM) (Figura 31). La variación de ACC en presencia de ABA exógeno tiene un perfil muy similar al del MACC.

La actividad MACC-hidrolasa se estimula por concentraciones de ABA relativamente pequeñas (5 μM); por contra, la adición de concentraciones de ABA 5-10 veces superiores, inducen una disminución muy importante en esta actividad, impidiendo que el MACC se transforme en ACC (Figura 32).

En cuanto a la actividad ACC-sintasa, tiene una estimulación a 25 y 50 μM de ABA (Figura 32). Todo este ACC producido puede que sea malonizado, cooperando al descenso en la producción de etileno provocado por ABA.

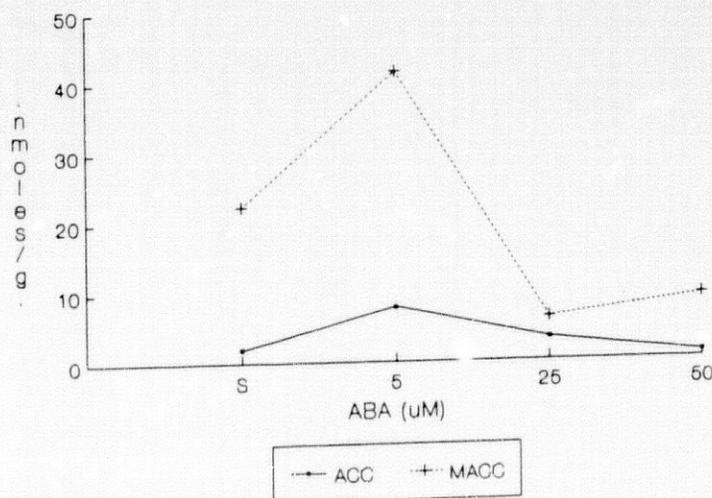


Figura 31. Variación en el contenido de MACC y ACC provocada por ABA en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo que fueron germinadas durante 5 horas (máximo de MACC y MACC-hidrolasa). Valores media de 3 experimentos \pm DE.

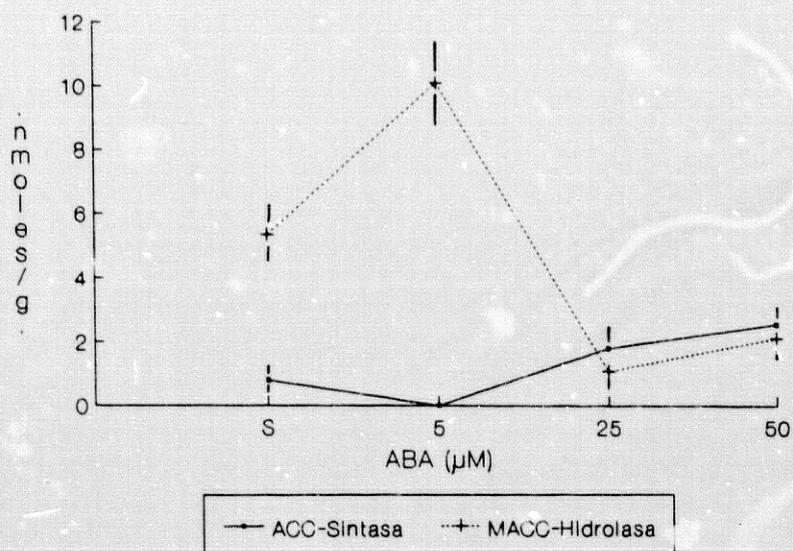


Figura 32. Variación en la actividad MACC-hidrolasa y ACC-sintasa provocada por ABA en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo que fueron germinadas durante 5 horas (máximo de MACC y MACC-hidrolasa). Valores media de 3 experimentos \pm DE.

4.4.8.4. Efecto del ABA sobre los niveles de MACC y ACC (7 horas).

Como se dijo en su momento, a las 7 h. se ha encontrado un máximo tanto en el contenido de ACC como en la actividad ACC-sintasa, durante la germinación de ejes aislados de semillas de garbanzo (Figura 18). Este máximo de ACC apenas se modifica en presencia de ABA exógeno (Figura 33); igual sucede con los niveles de MACC que no son detectados con ningún tratamiento.

La actividad ACC-sintasa disminuye a medida que aumenta el ABA en el medio de germinación (a 50 μ M ABA la actividad enzimática disminuye un 75% respecto al control) (Figura 34).

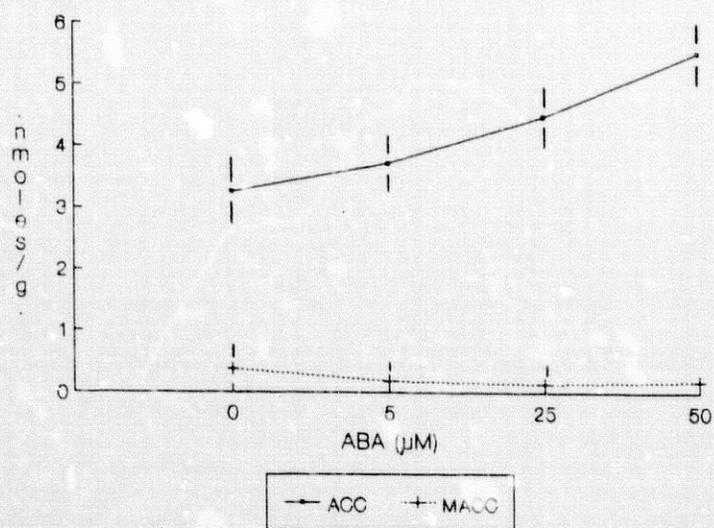


Figura 33. Efecto de diferentes concentraciones de ABA en el medio nutritivo sobre el contenido de ACC y MACC; los ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum* fueron germinados durante 7 horas en las condiciones que indican. Los resultados son la media de 3 determinaciones \pm DE.

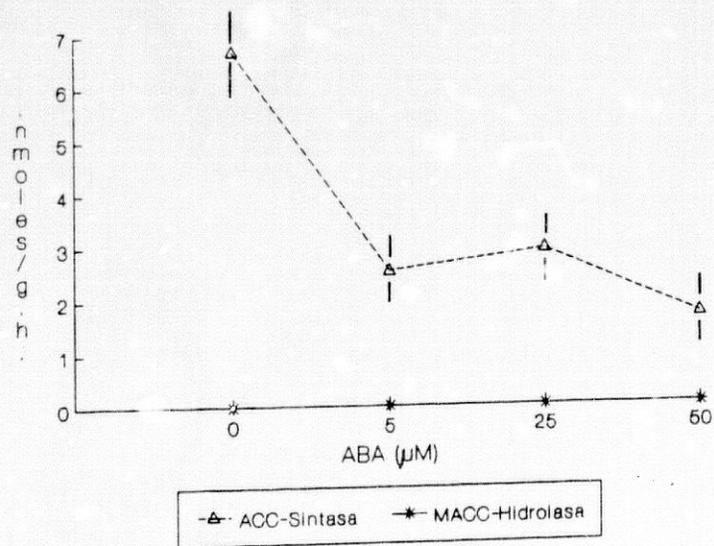


Figura 34. Influencia de la adición al medio de ABA (5, 25 y 50 μ M) sobre la actividad MACC-hidrolasa y ACC-sintasa en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo germinadas durante 7 horas. Los valores son la media de 3 experiencias con la desviación standard que se indica (DE).

4.4.8.5. Efecto del ABA sobre la actividad EFE.

Se estudia el efecto de 3 concentraciones de ABA (5, 25 y 50 μM) sobre la actividad EFE a las 12 horas de germinación de ejes aislados (punto máximo de actividad).

Bajas concentraciones de ABA (5 μM) apenas modifican EFE; sin embargo, concentraciones 5 y 10 veces superiores aumentan 1.3 y 1.7 veces respectivamente la actividad enzimática (Figura 35).

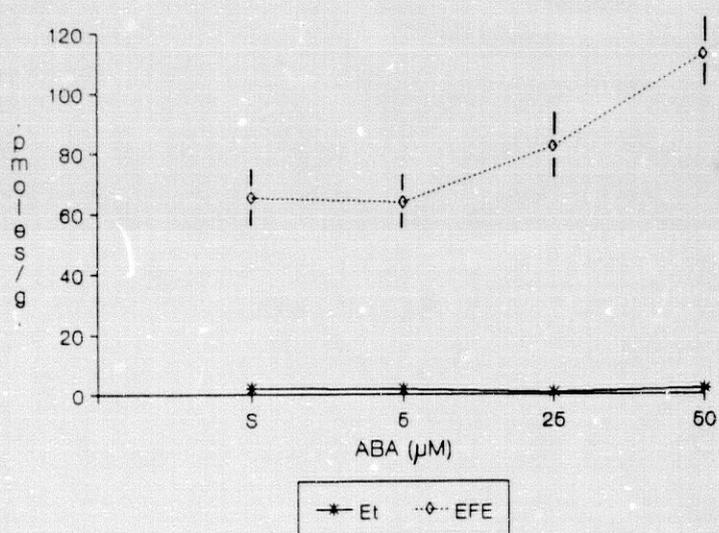


Figura 35. Efecto de diferentes concentraciones de ABA en el medio nutritivo sobre la actividad EFE (expresada en $\text{pmoles} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) en el momento de máxima actividad, para lo cual, los ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum* fueron germinados durante 12 horas en las condiciones que se indican. Los resultados son la media de 3 determinaciones \pm DE.

4.4.9. Efecto de la espermina (SP) sobre el nivel de MACC y ACC (5 h.).

En la Figura 35, se muestran los resultados que apoyan la inducción, por parte de SP (0.1 mM), de una ligera producción de ACC (20% más respecto al control); las concentraciones superiores provocaron una disminución en el contenido de ACC endógeno de un 81 y 82%, respectivamente.

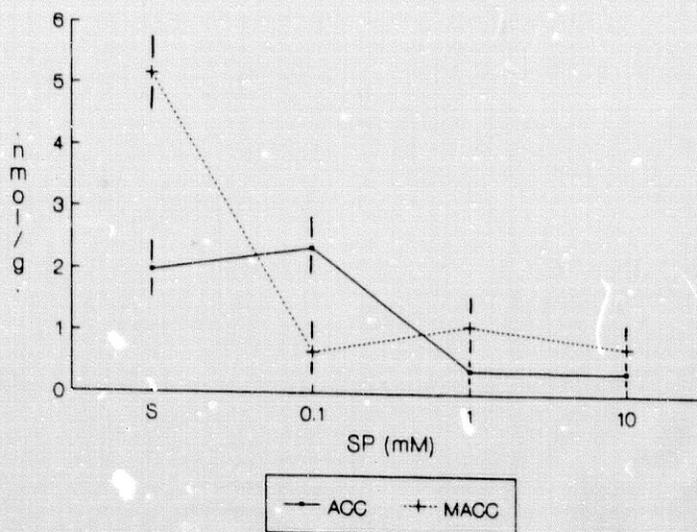


Figura 36. Efecto de la SP (0.1-10 mM) sobre los niveles de ACC y MACC en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*, germinadas durante 5 horas. Los valores son la media de 3 determinaciones \pm DE.

El MACC disminuye drásticamente en presencia de SP a todas las concentraciones estudiadas (Figura 36). La MACC-hidrolasa no se ha detectado en presencia de SP (Figura 37), mientras que la ACC-sintasa incrementa con el aporte de poliamina, alcanzando a 10 mM valores 4.25 veces el control (Figura 37).

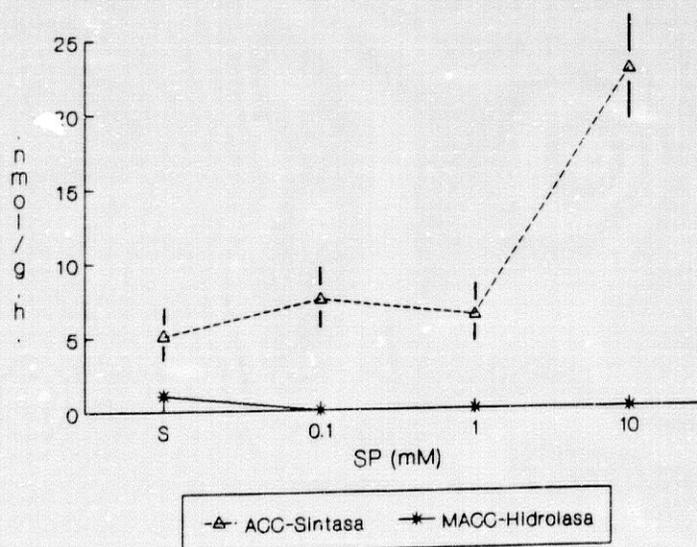


Figura 37. Efecto de la SP (0.1-10 mM) sobre los niveles de ACC-sintasa y MACC-hidrolasa en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante 5 horas. Los valores son la media de 3 experimentos \pm DE.

DISCUSION

El etileno es una sustancia reguladora del crecimiento de carácter gaseoso que está implicada en la gran mayoría de los estados de crecimiento y desarrollo de plantas superiores (Adams y Yang, 1981). Su mecanismo y modo de acción es desconocido, aunque básicamente se barajan dos posibilidades: una, en la que el etileno actuaría no como tal sino mediante la acción de un metabolito y, por tanto, el catabolismo de esta hormona tendría especial relevancia en la acción fisiológica (Sanders y cols., 1986); la otra posibilidad sugiere que el etileno actúa previa unión a un receptor y que, como consecuencia de esta reacción, se desencadena el proceso(s) fisiológico en cuestión (Bengoechea y cols., 1980).

Recientemente (Wood y Connern, 1991) han caracterizado el receptor de etileno en tres sistemas alternativos: cotiledones, peciolo y zona de abscisión de *P. vulgaris*, resultando ser una proteína (EBP) con un peso molecular aproximado de 67.000 daltons y compuesta por dos subunidades idénticas; su localización, mediante empleo de microscopía electrónica, parece ser el plasmalema.

Por lo que a su intervención fisiológica se refiere, el etileno regula, o al menos tiene especial significado, en procesos tan importantes en el crecimiento y desarrollo de plantas superiores como expansión celular (Apelbaum y Burg, 1972), maduración de frutos (Goodenough, 1986), expresión sexual, germinación, senescencia y abscisión, entre otros (Lieberman, 1979).

Como consecuencia de la intervención del etileno en procesos de crecimiento, hemos creído interesante el iniciar un estudio sobre la producción de gas durante el desarrollo de ejes embrionarios de semillas de garbanzo, como paso previo para abordar el papel que juega esta fitohormona en la germinación de esta leguminosa, tal y como hemos iniciado en *Phaseolus vulgaris* (Sánchez-Calle y Matilla, 1988).

El eje embrionario aislado de semillas de *Cicer arietinum*, L. es un órgano morfogénicamente sencillo, que tiene un crecimiento perfectamente diferenciado en lo que a mitosis y elongación celular se refiere, y por tanto es un material muy apropiado para estudiar el contenido endógeno en fitohormonas ó el efecto que tiene sobre su desarrollo su aporte exógeno (Merlo y Matilla, 1985), pues es relativamente

factible el comprobar sobre que fase del crecimiento actúa o está implicada la fitohormona.

A fin de que el crecimiento del eje embrionario aislado fuese homogéneo y verdadero en el tiempo, se ha suplementado el medio de crecimiento con una fuente azucarada así como con un aporte de potasio, resultando un desarrollo de este órgano perfectamente lineal durante el período de tiempo estudiado en esta Memoria (48 horas). Así mismo, los procesos de mitosis y elongación celular se producen de forma adecuada, tal y como se describen para otros tejidos y órganos vegetales (Sánchez-Calle y cols., 1989), lo que no se observa si el medio es agua destilada. Por todo ello, el crecimiento y desarrollo del eje embrionario aislado es en nuestro caso un 41% y 68% más que en agua destilada a las 24 y 48 horas de crecimiento respectivamente (Figura 2).

La toma de agua por el eje embrionario es muy rápida entre 6 y 18 horas pasando desde un contenido del 73% al 84%, lo que equivale a un incremento de aproximadamente el 1% por hora (Figura 3). Esta velocidad no se alcanza en períodos posteriores de crecimiento, ya que los procesos de elongación celular no son tan importantes como en los primeros estadios del desarrollo (datos no mostrados).

Esta gran toma de agua es una consecuencia del bajo potencial hídrico que posee el tejido debido a los procesos de desecación que tienen lugar durante la maduración de la semilla (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982). La toma de agua no tiene el mismo perfil en todas las semillas, ya que depende de los componentes mayoritarios de reserva, así como de la conductividad apoplástica del tejido (Bewley y Black, 1982). Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos en semillas de trigo (Jendrisak, 1980) y tomate (Berrie y Drennan, 1971).

Debido a que en el período de tiempo estudiado la variación de peso seco no tiene diferencias estadísticamente significativas (Figura 4), podemos aventurar que los procesos de crecimiento están gobernados básicamente por la presión de turgencia promovida por la toma de agua. Sin embargo, se requiere una actividad metabólica para llevar a término el crecimiento del eje embrionario, aunque ésta no se vea

reflejada en el incremento en peso seco por ser poco importante cuantitativamente.

La presencia de inhibidores metabólicos en el medio modifica el desarrollo del eje embrionario. Así, si bien la presencia de 5-fluorouracilo (inhibidor de la síntesis de ARNr en semillas de garbanzo) (Rodríguez y cols., 1982) apenas modifica el crecimiento (Figura 13), cuando la cicloheximida (20 $\mu\text{g/ml}$) se incluye en el medio, el incremento en peso fresco se altera significativamente (Figura 13), incluso en cortos períodos de tiempo (18 horas); la síntesis de proteínas mediada por un material preformado en la semilla, y que en garbanzo tiene gran connotación (Matilla y cols., 1980), puede ser la principal responsable en el desarrollo del eje embrionario.

El papel de las poliaminas en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas superiores no es completamente conocido en la actualidad, pero por los datos existentes podría asignárseles un papel fitohormonal, en tanto en cuanto controlan y modifican ciertos parámetros relacionados con el crecimiento y el desarrollo; tal es el caso de la estabilización de las membranas (Srivastava y Smith, 1982), inducción del crecimiento en cultivos celulares (Tabor y Tabor, 1984), modificación de la actividad RNásica (Merlo y cols., 1988), actividad fosfatásica (Angosto y cols., 1988) y otros (Smith, 1985).

La presencia de espermina (tetraamina) a concentraciones relativamente bajas (0.1-1.0 mM), incrementa el peso fresco; sin embargo, espermidina (triamina) y cadaverina (diamina) lo hacen en menor intensidad (Figura 5). Concentraciones más elevadas reducen el crecimiento probablemente como consecuencia de efectos tóxicos promovidos por excesiva cantidad de amina exógena añadida. En ciertos casos, las poliaminas han sido citadas como fuentes de nitrógeno; sobre todo en cultivos celulares (Bagni, 1979).

Dado que las poliaminas aplicadas exógenamente apenas modifican el peso seco (Figura 5), las alteraciones en el crecimiento del eje embrionario ocasionadas por ellas, podrían ser promovidas por la presión de turgencia celular y en definitiva por cambios en el potencial hídrico tisular.

Durante las primeras horas de crecimiento (imbibición) tanto de semillas enteras como de sus órganos, hay una gran pérdida de solutos al medio como consecuencia de un proceso, supuestamente pasivo, vinculado con la reestructuración de las membranas (Simon y Rajaharum, 1972). Este proceso está relacionado con la presencia, en las membranas biológicas de las semillas desecadas, de unas placas exagonales con gran cantidad de poros que facilitan la salida de las sustancias. A medida que se desarrolla el proceso de toma de agua, se reestructuran los fosfolípidos, se controla la salida de solutos, y su cinética se complica con otras variables, entre las que los procesos activos están implicados.

Una gran parte de los iones que salen al medio, son normalmente reabsorbidos para ser utilizados en el crecimiento del órgano. Sin embargo, si en el medio de incubación se encuentra el ABA, la tiourea, la fusicoccina u otras sustancias, bien de carácter hormonal ó simplemente metabolitos excretados por la propia semilla ó producidos por la actividad biológica del suelo, se altera la germinación por interferencias en la reabsorción de iones, lo que le confiere a este proceso un importante aspecto ecológico.

Los niveles endógenos de sodio, potasio, calcio y fósforo fueron medidos durante las primeras 48 horas de crecimiento (Figura 6). Inicialmente, todos estos iones incrementan hasta las 18 horas, lo que ocurre fundamentalmente por la reabsorción de solutos comentada y demostrada previamente por nosotros (Merlo y cols., 1986).

A partir de las 18 horas, el contenido endógeno de potasio sigue aumentando en el eje embrionario, debido a la presencia del mismo en la solución nutritiva, mientras que el sodio y el fósforo tienden a descender hasta el final del período estudiado. El calcio, que incrementa en las primeras horas la etapa considerada, disminuye posteriormente, posiblemente como resultado de una lenta movilización de este ión, que como es sabido se relaciona fundamentalmente con las paredes celulares.

La presencia de poliaminas en el medio de incubación, provoca un ascenso en el contenido endógeno de estos iones (Figuras 7, 8, 9 y 10), siendo el efecto más acusado conforme mayor sea el peso molecular de la amina probada. Se ha descrito

que las poliaminas actúan sobre la ATPasa del plasmalema (Veluthambi y Poovaiah, 1984), lo que podría estar relacionado con los resultados encontrados por nosotros. La entrada de otros iones sería una consecuencia de lo anterior para, entre otras causas, compensar cargas. Relacionado con este proceso, podrían verse implicados otros solutos, como aminoácidos y azúcares, cuya salida al medio está influenciada por poliaminas (Delgado y cols., 1989).

Una vez concluido el estudio sobre el crecimiento y contenido endógeno de iones en ejes embrionarios aislados, se pasó a cuantificar la producción de etileno por estos órganos a lo largo del período de tiempo reseñado. El sistema productor de etileno ocasiona unos niveles de gas que son lineales durante las primeras 18 horas de crecimiento, descendiendo paulatinamente en períodos sucesivos, alcanzándose a las 48 horas valores 3.35 veces menores que a las 18 horas (máxima producción) (Figura 11). Es precisamente a las 18 horas cuando la elongación celular tiene una mayor velocidad, mientras que el índice mitótico no es detectable (Sánchez-Calle y cols., 1989). En ejes embrionarios crecidos en agua destilada la cinética de producción de etileno tiene el mismo perfil, aunque con valores sensiblemente menores.

Este máximo de producción de etileno, en un momento en que fundamentalmente existe elongación celular, podría estar relacionado con los procesos preparatorios de la célula anteriores al inicio del crecimiento propiamente dicho. De ahí que en el proceso germinativo, en el que se produce etileno, se detecte el gas en períodos previos a la emergencia radicular ó incluso durante la rotura de la cubierta, etapas, todas ellas, que apenas implican mitosis pero que son anteriores al inicio del crecimiento y desarrollo de la nueva plántula (Ketring y Morgan, 1972; Kepczynski, 1986).

Ciertas poliaminas como putrescina, cadaverina, espermidina, y espermina abundan en el Reino Vegetal (Smith, 1985) pero su función no es conocida; al menos en una gran variedad de procesos de desarrollo.

Las poliaminas, espermina y espermidina, y el etileno están relacionadas biosintéticamente ya que ambos compiten por el mismo precursor (SAM) (Altman y

cols., 1982; Altman y Bachrach, 1981). La interrelación entre ambas sustancias es, por tanto, evidente. La naturaleza exacta de esta interacción todavía no ha sido aclarada en los sistemas utilizados habitualmente para este estudio (senescencia); por tal motivo, en procesos con escasos estudios como el germinativo, los datos son muy escasos.

Las poliaminas exógenas inhiben la producción de gas en pétalos senescentes de *Tradescantia*, del mismo modo que el etileno inducido por AIA en hipocotilos de soja (Suttle, 1931). Probablemente, una de las razones para esta inhibición lo constituyan las altas concentraciones utilizadas (1-10 mM). Así mismo, las poliaminas también reducen la transformación de ACC a etileno así como los niveles endógenos de este precursor. Algunos autores opinan incluso, que las poliaminas exógenas inhiben todos los pasos de la ruta biosintética del etileno; lo que parece un contrasentido, ya que la adición exógena de poliaminas debería de inducir la utilización prioritaria del SAM hacia etileno. La adición conjunta de Ca^{++} y poliaminas reduce el efecto inhibitorio de estas.

Las poliaminas pueden reducir la producción de etileno a partir de metionina mediante la inhibición de la actividades ACC-sintasa y EFE, siendo esta última la más afectada (Fuhrer y cols., 1982; Apelbaum y cols., 1985). De nuevo, el Ca^{++} revierte parcialmente esta inhibición.

En presencia de AVG se estimula la transformación de metionina radioactiva en espermidina, lo que sugiere que, por la inhibición de la biosíntesis de etileno, el SAM se canaliza preferentemente hacia poliaminas. Datos similares se obtienen con AOA, otro inhibidor de la ACC-sintasa.

En definitiva, una manera de explicar los resultados existentes acerca de poliaminas y etileno deberían de pasar por considerar el hecho de que estos poliaminas también modifican la expresión génica (síntesis de ARN y proteínas) y permeabilidad celular, procesos ambos muy relacionados con la producción de etileno.

En la presente Memoria, sólo la espermina a concentraciones entre 0.1-1 mM estimula la producción de etileno; las demás aminas probadas, espermidina y

cadaverina, ó bien reducen su producción, ó no la alteran (Tabla 15). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en las cinéticas de crecimiento; sin embargo, los comentarios realizados en esta Memoria en relación con la producción de etileno y con los procesos de crecimiento por elongación, quizás no tengan cabida en el caso de las poliaminas, ya que éstas aceleran en el tiempo la mitosis y por tanto el máximo de producción de gas coincide con el mayor índice mitótico (Sánchez-Calle y cols., 1989).

Sin embargo, la reducción en la producción de etileno por poliaminas en flores senescentes no se acompaña por una reducción en la intensidad del deterioro de membranas. Lo que parece indicar que las aminas ejercen una influencia selectiva en el proceso de senescencia afectando a una etapa ó paso concreto (Suttle, 1981).

El calcio, a altas concentraciones, es uno de los factores descritos en la bibliografía como retardante de la senescencia; sin embargo, si bien su mecanismo de acción no es conocido, han sido descritos efectos sobre la respiración y supresión de la producción de etileno en tejidos deficitarios en calcio (Owen, 1988). Lo que sí es evidente, es que este catión se requiere para estabilizar las membranas, y por tanto su relación con el complejo enzimático productor de gas no sería extraño. Cuando añadimos exógenamente concentraciones de calcio entre 0-10 mM se produce una estimulación en la producción de etileno; producción que se anula si el EGTA (agente quelante específico del calcio) está presente (Tabla 9). Estos datos preliminares nos hacen pensar que, bien este catión, bien alguna molécula relacionada con él, tal es el caso de la calmodulina (Owen, 1988), podía estar implicado en la regulación de la producción de etileno.

En discos de pericarpo de tomate, se ha descrito que el Cl_2Ca causa una estimulación en la producción de etileno y un aumento paralelo en el desprendimiento de CO_2 (Burns y Evensen, 1986). En el año 1984, Guy y Kende propusieron que el calcio ayudaba a que el ACC fuese más accesible al EFE con lo que intervendría como regulador de la biosíntesis del etileno. Resultados similares a los de Burns fueron obtenidos por Hasenstein y Evans en 1986.

La presencia de un osmótico como el manitol reduce el crecimiento del eje embrionario, disminuyendo la elongación celular, por dificultar la entrada de agua en la vacuola (Tabla 10). La producción de etileno se ve reducida de forma paralela al crecimiento, lo que sería otro dato que apoyaría la relación etileno-elongación (Tabla 10). Sin embargo la presencia de tiourea, un agente que facilita la entrada de agua y el crecimiento por elongación (Hernández-Nistal y cols., 1983), si bien revierte el efecto osmótico, no sólo no promueve la producción de etileno, sino que la lleva a niveles mínimos (Tabla 11). Una explicación podría ser que, por un lado los "shocks" osmóticos reducen la producción de gas (Imaseki y Watanabe, 1978), y por otro, que tanto el manitol como la tiourea son conocidos inhibidores de la producción de radicales libres, fuerza conductora en la síntesis de etileno por el EFE. Por tanto, el proceso de elongación celular promovido por tiourea sería secundario en la biosíntesis de gas. Sea como fuere, la tiourea provoca una aceleración en la germinación en semillas de garbanzo con dormición impuesta por altas temperaturas (termodormición) (Hernández-Nistal y cols., 1983); la intensidad de producción de gas en semillas termodormidas en presencia de tiourea se reduce considerablemente (Gallardo y cols., 1991).

En relación con altas temperaturas, nosotros hemos cuantificados la producción de etileno en ejes sometidos a 25°C (control), 30°C y 35°C. A diferencia de lo que sucede en semillas enteras, las altas temperaturas inducen una gran producción de gas (Figura 14); estos resultados pueden explicarse en base a un etileno de "stress" o bien a que estemos cuantificando etileno difusible y etileno almacenado (ligado), que puede obtenerse elevando la temperatura tal y como describe (Hall y cols., 1987) y nosotros mismos en semillas de *Phaseolus vulgaris* (Sánchez-Calle y cols., 1989). También, y a diferencia de ejes embrionarios procedentes de semillas enteras tratadas con altas temperaturas, las cuales las incapacitan inicialmente para tomar agua (Hernández-Nistal y cols., 1983), los ejes aislados no están afectados por temperaturas supraóptimas, probablemente por carecer de un aporte de ABA del cotiledón, y sobretodo, por existir K⁺ en el medio nutritivo. El hecho de que el crecimiento no se vea afectado por estas temperaturas, refuerza todavía más la conclusión de que el etileno liberado es de "stress" o etileno compartimentalizado.

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona cuyo mecanismo de acción se relaciona, bien con procesos de intercambio H^+/K^+ a nivel de las membranas biológicas y la consiguiente reducción de toma de agua; bien con la expresión génica, induciendo la síntesis de ciertas proteínas reguladoras del proceso germinativo, bien impidiendo la acción de otras. Sea como fuere, el mecanismo de acción concreto no está aclarado. Recientemente se ha relacionado al ABA con la calmodulina mediante un complicado mecanismo provocado por una elevación del Ca^{++} citosólico inducido por ABA, implicando un bloqueo en los canales de este catión (Owen, 1988).

La presencia de esta fitohormona en el medio reduce la producción de etileno, siendo su acción más acentuada conforme es mayor su aporte exógeno (Tabla 12); su efecto no se ve modificado por la composición del medio nutritivo, excepto cuando sacarosa y potasio están presentes conjuntamente; en este caso, se requieren altos niveles de ABA ($50 \mu M$) para reducir la producción de etileno. Las razones que provocan estos resultados no las conocemos, pero, lo que parece evidente es que el K^+ es el único factor, de los utilizados por nosotros, que puede revertir la inhibición de la producción de etileno por ABA; por consiguiente, debe existir una presión de turgencia suficiente como para que se sintetice etileno, aspecto este que es inhibido por ABA. Como era de esperar, y en base a lo comentado anteriormente, la tiourea no provoca ninguna reversión en el efecto promovido por ABA (Tabla 13). Todos estos datos (ABA, osmóticos, tiourea, etc.) apoyan la íntima relación de la producción de etileno con las membranas biológicas, si bien la expresión génica en un momento concreto y todavía no establecido por nosotros, debe tener un gran significado.

Un apartado importante de esta Memoria se dedicó a la cuantificación de los intermediarios de la ruta biosintética del etileno (ACC y MACC), así como de las actividades enzimáticas implicadas. La razón fundamental era el estudiar el momento de la germinación del eje embrionario, en que aparece cada uno de estos parámetros en mayor intensidad, si existe una separación temporal, así como el efecto que las poliaminas y el ABA exógeno ejercen sobre ellos.

Previamente, hemos decidido estudiar el efecto de la duración de la estratificación sobre el contenido endógeno de ACC y MACC, a fin de : primero, observar si

durante la estratificación se inducen alteraciones en el contenido de ambos intermedios, lo que estará directamente relacionado con la germinación; germinación que en estas semillas es dependiente de la síntesis de etileno, y segundo, por tanto, elegir el período de almacenaje óptimo.

Como se observa en la Tabla 17, el contenido de ACC y MACC se modifica de forma muy importante con la estratificación, de forma parecida a como ocurre con otras fitohormonas y sus precursores inmediatos (Julin-Tegelman, A., N. Pinfield, 1982). Tanto es así, que a 10-12 meses de almacenaje (0-4°C) el contenido en ACC y MACC es muy superior al encontrado en tiempos menores de estratificación; por ello, se utilizaron semillas estratificadas durante este período de tiempo.

El primer intermediario detectado fue el MACC, el cual se acumula entre las 4-6 horas de crecimiento no detectándose valores significativos en períodos posteriores. La identificación y confirmación de esta sustancia, fue realizada mediante la técnica combinada de espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases de su ester metílico, comparativamente con un estándar de MACC preparado y esterificado por síntesis química tal y como se describe en material y métodos.

El origen del MACC detectado a 5 horas debería ser múltiple: a) MACC existente a $t=0$; b) malonización del ACC presente a $t=0$ y c) malonización del ACC de nueva síntesis debido por una parte a la baja K_m de la N-malonil-ACC-Transferasa, que reduce los niveles de ACC libre capaces de producir etileno (Kionka y Amrhein, 1984), y por otra como consecuencia de la baja velocidad relativa del EFE.

Un estudio detallado de la cinética de malonización del ACC, ha demostrado que este proceso se lleva a cabo en el citoplasma (Bouzayen y cols., 1988); el MACC así formado se envía a la vacuola, "vía" un transportador protéico, en donde se almacena, en contra de gradiente, o bien se transporta por el apoplasto a través de la membrana plasmática. La salida del MACC a través del tonoplasto parece ser un proceso de difusión pasiva.

Dos horas más tarde de que se acumule el MACC, aparece un pico de ACC que también es cuantificable a 5-6 horas (Figura 18).

La desaparición del contenido en MACC a partir de las 5 horas es consecuencia de la presencia de una actividad hidrolásica que transforma el MACC en ACC (Jiao y cols., 1986). Cuando se germinan ejes embionarios aislados de semillas, imbibidas en AOA (5 mM), la presencia de este inhibidor en el medio de crecimiento produce una acumulación de ACC a 5 y 7 horas no detectándose valores significativos de MACC a 7 horas. Este aumento de ACC debe de proceder de la hidrólisis del MACC por la MACC-Hidrolasa que, como hemos visto previamente tiene su máximo de actuación a las 5 horas.

Respecto a la acumulación de ACC a 7 horas es debida a una fuerte actividad ACC-Sintasa (Figura 20) correlacionada con la aparición de ACC y al componente MACC-hidrolasa. La ACC sintasa, medida como producción de ACC en atmósfera de N₂ (De Laat y Van Loon, 1982), empieza a detectarse a las 5 horas de crecimiento y alcanza su máxima expresión a las 7 horas, descendiendo paulatinamente hasta valores no detectables a partir de 9 horas (Figura 20). La presencia de atmósfera inerte (N₂) no induce síntesis de la ACC-sintasa puesto que la cicloheximida no provoca cambios significativos en la actividad enzimática.

A medida que el ACC se va formando, se detecta también actividad EFE, enzima que alcanza su máximo valor a las 12 horas de crecimiento (Figura 22); si pensamos que el pico de ACC es a las 7 horas (Figura 18) y no coincide con el máximo de EFE, debemos de suponer que el ACC debe ser gradualmente transportado a las proximidades del complejo EFE (probablemente el plasmalema; Bouzayen y cols., 1990) en donde se transformaría en gas. Los grupos -SH localizados en el propio centro activo o en lugares próximos a él, parecen estar implicados en la transformación de ACC en etileno (Pech y cols., 1990). La pared celular no parece estar relacionada con esta transformación; no obstante, Ton y Gross (1990) logran estimular la producción de etileno con un componente de paredes celulares de tomate. El etileno puede ser parcialmente compartimentalizado (etileno endógeno, no cuantificado por nosotros), o bien ser eliminado por difusión al exterior con una velocidad máxima a

las 18 horas (Figura 18). La poca velocidad de producción de etileno en los períodos iniciales del crecimiento, debe ser por tanto una consecuencia de la baja actividad ACC-sintasa y EFE y de la alta actividad N-malonil-ACC-transferasa quien produce MACC con objeto de detoxificar el citoplasma (Mansour y cols., 1986).

Cuando se ensayó la actividad MACC-hidrolasa "in vitro" en ejes embrionarios aislados de semillas imbibidas en agua durante 4 h, y germinados en solución nutritiva durante 5 h a 25°C, se observó que la cantidad de ACC formada en presencia de MACC exógeno tras 1 hora de incubación a 37°C, era 20 veces superior frente al control de la reacción a tiempo 0 (Tabla 18).

En consecuencia, por los resultados obtenidos con AOA, por la desaparición de MACC observada en la Figura 18 (5-6 h), y por los experimentos "in vitro" de la transformación de MACC a ACC (Tabla 18), podemos aventurar la existencia de una actividad MACC-hidrolasa "in vivo" responsable de la desaparición parcial del MACC. Este enzima ha sido detectado en algún otro sistema por Jiao y cols. (1986).

Por los datos discutidos hasta ahora, los ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo constituyen un sistema modelo muy apropiado para estudiar la biosíntesis de etileno (Sánchez-Calle y cols., 1989) y otros procesos fisiológicos durante las primeras horas de germinación. Las alteraciones en la síntesis de poliaminas fueron estudiadas por nosotros (Bueno, 1991); encontrándose las poliaminas más importantes así como alteraciones también muy significativas (acumulación de los niveles endógenos) cuando el ABA estaba presente en el medio germinativo.

Como ha sido comentado anteriormente, las poliaminas pueden actuar como agentes antisenescentes en relación con el metabolismo del etileno. Sus efectos pueden estar relacionados con la inhibición de la conversión de SAM a ACC o también mediante un mecanismo relacionado con EFE (Galston y Kaur-Sawhney, 1990). La distribución del SAM hacia la ruta del etileno o poliaminas, es el paso que controla, muy posiblemente, la senescencia y porqué no, otros procesos del desarrollo, dentro de los que la germinación puede estar implicada. Pensemos que el SAM no sólo sirve como sustrato en la producción de ACC, sino también como fuente de la mitad

amino-propilo necesaria para la síntesis de espermina y espermidina, poliaminas generalizadas en plantas superiores (Smith, 1980). Sin embargo, aunque las poliaminas y el etileno están biosintéticamente relacionadas, sus funciones fisiológicas son muy diferentes: cuando, el nivel de poliaminas es muy elevado se provoca una síntesis de ADN y un crecimiento activo (Palavan y Galston, 1982); mientras que niveles elevados de etileno provocan estrés, deterioro de órganos y senescencia (Saftner y Baldi, 1990).

Este complicado mecanismo de interrelación poliaminas-etileno no está estudiado en el proceso germinativo. En la presente Memoria iniciamos su estudio en ejes aislados de semillas de garbanzo; órganos con una perfecta separación temporal, ya no sólo de los estados de elongación y mitosis (Sánchez-Calle y cols., 1989), sino también en la aparición de etileno, sus precursores y enzimas relacionadas (presente Memoria) posiblemente debido a un proceso muy complejo de compartimentalización (Pech y cols., 1990).

La inclusión de espermina en el medio nutritivo induce la síntesis de etileno, siempre que su concentración no exceda de 1 mM; valores mayores reprimen la aparición de gas. Esta represión no podemos, con los escasos datos que tenemos, explicarla coherentemente; sin embargo, pensando en que: a) las poliaminas se unen de forma iónica a las membranas, y que esta unión si es muy "densa" puede incluso alterar su conformación con el consiguiente efecto sobre EFE, b) que existe una alta actividad ACC-sintasa, MACC-hidrolasa no detectable y bajos niveles de ACC y MACC y c) que la espermina acelera, en este órgano, a altas concentraciones la salida de solutos al medio, quizás no sea muy aventurado el indicar que una parte importante de ACC y MACC sea expulsado al medio, al igual que sucede en semillas enteras (Gallardo y cols., 1991), con el consiguiente efecto negativo en la producción de gas. Asimismo, altas concentraciones de espermina (10 mM) pueden romper el sistema de compartimentalización necesario para que se produzca etileno (Pech y cols., 1990).

Por último, el ACC difícilmente puede transformarse en etileno en presencia de altas concentraciones de poliaminas ya que EFE está inhibido (Fuhrer y cols, 1982), y además también lo está el sistema productor de radicales libres (Drolet y

cols., 1986). Quizás a bajas concentraciones de espermina todos estos factores barajados anteriormente no coexistan (el ACC es más elevado), y el descenso producido en MACC, respecto al control, pueda ser debido a una ruta que nada tenga que ver con la biosíntesis de etileno. No olvidemos que algunos autores, hoy piensan todavía que el MACC es un producto final en la ruta del etileno (Hoffman y cols 1983 a,b).

En cuanto al papel del ABA en el metabolismo del etileno, los resultados son todavía más escasos en la bibliografía que para las poliaminas. ABA y etileno parecen inhibir el crecimiento por mecanismos diferentes. Sin embargo, el ABA puede modificar la producción de gas mediante alteraciones derivadas de su mecanismo de acción: descenso en presión de turgencia y elongación celular, inhibición de las bombas electrogénicas o efectos sobre la expresión génica.

Cuando el ABA está presente en el medio nutritivo a muy bajas concentraciones ($5 \mu\text{M}$), acelera la acumulación de MACC (Figura 31), y activa la MACC-hidrolasa (Figura 32). Por contra, concentraciones mayores de ABA inducen considerables descensos en ambos parámetros a 5 h. de germinación. A 7 horas, cuando la actividad ACC-sintasa y el ACC tienen una expresión importante, el ABA exógeno induce una fuerte disminución del enzima (Figura 34), pero acelera la acumulación de ACC (Figura 33). Resultados estos que no sabemos explicar; pero lo que parece claro es que la actividad EFE se estimula por ABA paralelamente a como incrementa el ACC endógeno (Figuras 33, 35). Sin embargo no se produce etileno; las razones no las conocemos, ni tampoco tenemos bibliografía que nos ayude a discutirlo. Una posibilidad podría ser que este etileno se compartimentalizase en la célula y no hayamos sido capaces de cuantificarlo por estar "retenido". Otra, bien podría estar relacionada con la gran acumulación de poliaminas inducidas por ABA en el eje embrionario, las cuales por un mecanismo(s), tampoco conocido por nosotros, inducirían estos resultados.

En cualquier caso, ambos aspectos están bajo investigación en este momento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se estudia, en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, la producción de etileno y enzimas implicados, así como el efecto de las poliaminas y ABA sobre estos parámetros y el crecimiento.

1) La efectividad de las poliaminas estudiadas en la inducción del crecimiento, depende, por una parte, de la concentración utilizada; y por otra, del número de grupos amino presentes en la molécula. La espermina, a concentraciones entre 0.1-1.0 mM es la que ejerció un mayor efecto.

2) La toma de agua (presión de turgencia) es uno de los parámetros relacionados con el crecimiento más afectado por poliaminas; lo que se refleja en un aumento en el contenido endógeno de K^+ , Na^+ y Ca^{++} y en la constancia en el peso seco del órgano.

3) El ABA exógeno induce una inhibición en el crecimiento que puede revertirse modificando las concentraciones de K^+ en el medio nutritivo. Los niveles de K^+ en el eje embrionario disminuyen conforme es mayor la concentración de ABA exógeno; la variación de este catión en el medio nutritivo es inversamente proporcional al contenido endógeno.

4) La producción de etileno, que es dependiente de la síntesis de ARN y proteínas y estimulada por la composición del medio nutritivo, es lineal hasta las 18 horas de germinación; momento de máxima síntesis coincidente con el máximo tamaño celular (elongación).

5) La máxima producción de etileno puede afectarse positivamente por la adición de Ca^{++} (implicando muy probablemente a la calmodulina), así como por fusicoccina, K^+ o sacarosa. Por contra, se reduce en presencia de un osmótico (PEG) o bien de ABA, sustancias que inducen descensos en la presión de turgencia celular.

6) Sólo la espermina (0.1-1.0 mM) estimula la producción de etileno en el punto máximo; espermidina y cadaverina, o no la afectan o la reducen.

7) Las poliaminas y tiourea, que inducen importantes tomas de agua, no son sustancias estimuladoras de producción de etileno a concentraciones elevadas; su efecto negativo en la producción de radicales libre puede ser una razón. Sin embargo, la fusicoccina, cuya acción en la producción de radicales libres no está descrita, estimula la elongación celular (acelera la bomba electrogénica de H^+), y activa la producción de gas.

8) Los procesos relacionados con la elongación celular parecen estar implicados en el mecanismo de producción del etileno.

9) Se estudia, en los períodos de tiempo anteriores a 18 horas, la evolución de los principales intermediarios y enzimas implicados en la biosíntesis de etileno. La aparición de MACC y MACC-hidrolasa a 5 horas, de ACC y ACC-sintasa a 7 horas y EFE a 12 horas, en sus valores máximos, demuestran una separación temporal de todos estos metabolitos y actividades enzimáticas; por lo cual este órgano constituye un buen sistema modelo para el estudio de la regulación de la síntesis de etileno por ABA y poliaminas.

10) El período de almacenamiento y estratificación de las semillas induce importantes modificaciones en el nivel de ACC, MACC y enzimas relacionados; lo que tiene una gran connotación a la hora de explicar las variaciones en una serie de parámetros relacionados con el proceso germinativo.

11) El ABA estimula la acumulación de ACC y la actividad EFE, sin embargo no se produce etileno de forma correlativa. La compartimentalización o la "unión" del etileno inducido por ABA, en el interior de la célula puede ser una explicación.

12) Debido a la desaparición "in vivo" de MACC a partir de las 5 h., por los resultados obtenidos con AOA, así como por los experimentos "in vitro" de la transformación de MACC en ACC, podemos aventurar la presencia de una actividad MACC-hidrolasa "in vivo" responsable de la desaparición parcial de este conjugado.

13) Se pone a punto la metodología de cuantificación de los intermediarios más importantes relativos a la biosíntesis de etileno, así como la cuantificación "in vivo" de la actividad ACC-sintasa y la identificación de MACC por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*.

BIBLIOGRAFIA

Aarnes, H. (1977). Partial purification and characterization of methionine adenosyl transferase from pea seedlings. *Pl. Sci. Lett.* **10**: 381-390.

- (1979). Partial purification and characterization of methionine adenosyltransferase from pea seedlings. *Pl.Sci. Lett.* **10**: 381-390.

Abdel-Samad, I.M., R.S. Pearce, (1978). Leaching of ions inorganic molecules and enzymes from seeds of peanut (*Arachis hypogaea*, L.) imbibing without testas or with intact testas. *J. Exp. Bot.* **23**: 1471-78.

Abeles, F.B. (1972). Biosynthesis and mechamism of action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 259-292.

- (1973). Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York pp. 302.

- (1984). A comparative study of ethylene oxidation in *Vicia faba* and *Mycobacterium paraffinicum*. *J. Plant Growth Regul.* **3**: 85-95.

- (1986). Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv. "Grand rapids" seed germination. *Plant Physiol* **81**: 780-787

Acaster, M.A., H. Keen. (1983). Properties and partial purification of 1-aminocyclo propane-1-carboxylate synthase. *Plant Physiol.* **72**: 139-145.

Ackerson, R.C. (1984). Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **35**:403-413.

Adams, D.O., S.F. Yang, (1977). Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* **60**: 892-896.

- (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 170-74.
- (1981). Ethylene the gaseous hormone: mechanism and regulation of biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **6**: 161-164.

Adato, I., S. Gazit, (1977a). Role of ethylene in avocado fruit development and ripening. I. Fruit drop. *J. Exp. Bot.* **28**: 636-643.

Adkins, L.W., J.D. Ross, (1981). Studies in wild oat seed dormancy. I. The role of ethylene in dormancy breakage and germination of wild oat seed (*Avena fatua*, L.). *Plant Physiol.* **67**: 358-362.

Adlington, R.M., J.E. Baldwin, B.J. Rawlings, (1983). On the stereochemistry of ethylene biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 290-292.

Aldasoro, J.J., A. Matilla, G. Nicolás, (1981). Effect of ABA, fusaric acid and thiourea on germination and K^+ and glucose uptake in chick-pea seeds at different temperatures. *Physiol. Plant.* **53**: 139-145.

Altman, A. (1982a). Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* **54**: 189-193.

- **U. Bachrach, (1981).** Involvement of polyamines in plant growth and senescence. *Advances in Polyamine Research*, vol. 3, Calderera, C.M., Zappia, V., and Bachrach, U., Eds., Raven Press, New York, 365.

- **R. Friedman, D. Amir, N. Levin, (1982).** Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. *Plant Growth Substances 1982*, Wareing, P.F., Ed., Academic Press, London.

Amrhein N., D. Schneebeck, H. Skorupka, S. Tophof, (1981). Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften*. **68**: 619-620.

- F. Breuing, J. Eberle, H. Skorupka, S. Tophof, (1982). The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. En: PF Wareing, ed, *Plant Growth Substances 1982*. Academic Press, London, pp. 249-258

Angosto, T., F. Gonzalez, A.J. Matilla, (1988). Partial purification and some biochemical properties of acid phosphatase in germination chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Physiol Plant* **74**: 715-719

Angosto, T. (1990). Estudio sobre la germinación y cubierta seminal de semillas silvestres de diferentes habitats: niveles de ABA, Poliaminas y Proteínas. Tesis Doctoral.

Apelbaum, A., S.P. Burg, (1972). Effects of ethylene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cellular expansion in *Pisum sativum*. *Plant Physiol*. **50**: 125-131.

- A. Goldlust, I. Ickson, (1985). Control by arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol*. **79**: 635.

Babiano, M.J., J.J. Aldasoro, J. Hernández-Nistal, D. Rodriguez, A. Matilla, G. Nicolás, (1984). Effect of nonanoic acid and other short chain fatty acids on exchange properties in embryonic axes of *Cicer arietinum* during germination. *Physiol. Plant*. **61**: 391-395.

Babiano, M.J., G. Nicolás, A.J. Matilla, (1989). Changes in the cellular permeability of the embryonic axis in *Cicer arietinum* L. seeds during germination. *Biol. Plant*. **31**: 92-99.

Bachrach, V. (1973). Function of naturally occurring polyamines. Academic Press, New York.

Bagni, N. (1979). Polyamines as role nitrogen sources for *Helianthus tuberosus*. En: Nitrogen assimilation in plants. Acad. Press. New York.

- **D. Serafini-Fracassini, P. Torrigiani, (1982).** Polyamines and cellular growth processes in higher plants. En: Wareing, P.F. ed. Plant Growth Substances 1982 Academic Press, New York, pp. 473-482.

Ballarin-Denti, A, M. Cocucci, (1979). Effects of ABA, GA₃ and FC on the transmembrane potential during the early phases of germination in radish (*Raphanus sativa* L.) seeds. *Planta* 146: 19-23.

Baldwin, J.E., D.A. Jackson, R.M. Adlington, B.J. Rawlings, (1985). The stereochemistry of oxidation of 1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* pp. 206-207.

Barthe, PH., C. Bulard, (1978). Bound and free abscisic acid levels in dormant and after-ripened embryos of *Pyrus malus* L. cv. Golden delicious. *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 201-208.

Bearder, J.R. (1980). Plant hormones and other growth substances their background, structures and occurrence. En: Hormonal Regulation of Development. I. Molecular Aspects of Plant Hormones, Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series, ed. J. MacMillan Springer, Berlin, vol. 9. pp. 9-112.

Bengoechea, T., J.H. Dodds, D.E. Evans, P.H. Jerie, B. Niepel, A.R. Shaari, M.A. Hall, (1980). Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris*, L. I. Separation and characterization. *Planta* 148: 397-406.

Berrie, A.M., D. Drennan, (1971). The effect of hydration-dehydration on seed germination. *New Phytol.* 70: 135-142.

Beyer, E.M. Jr. (1972). Mechanism of ethylene action. Biological activity of deuterated ethylene and evidence against isotopic exchange and cis-trans-isomerization. *Plant Physiol.* **49**(6): 672-675.

- (1975). $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: Its incorporation and metabolism by pea seedlings under aseptic conditions. *Plant Physiol.* **56**: 273-278.
- (1977). $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: Its incorporation and oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ by cut carnations. *Plant Physiol.* **60**: 302-206.
- (1978). $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ metabolism in morning glory flowers. *Plant Physiol.* **61**: 896-899.
- (1979a). Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiol.* **63**: 169-173.
- (1979b). (^{14}C)-ethylene metabolism during leaf abscission in cotton. *Plant Physiol.* **64**: 971-974.
- (1984). Why do plants metabolize ethylene. En: *Ethylene Biochem. Physiol. and Applied ASpects* (4. Fuchs and E. Chalutz. eds) pp. 65-74.
- (1985). Ethylene metabolism. *Easter Sch. Agric. Sci. Univ. Nottingham (Proc; 1984) (Pub. 1985) 39th Ethylene Plant Dev.* 127-137.
- P.W. Morgan, S.F. Yang, (1984). Ethylene. En: *Advanced Plant Physiology* pp. 11-26, ed. M.B. Wildins, Pitman Publishing Limited, London.

Bewley, J.D., M. Black, (1978). *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, vol.1: Development, Germination and Growth. Springer-Verlag: New York, N.Y) pp. 306.

- (1982). *Physiology and biochemistry of seeds*. vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, Berlin.

Black, M. (1980/81). The role of endogenous hormones in germination and dormancy
Isr. J. Bot. **29**: 181-192.

- **(1981).** The role of endogenous hormone in germination and dormancy. Isr. J.
Bot. **29**: 246-92.

- **(1983).** Abscisic acid in seed germination and dormancy. En: Abscisic Acid. (F.T.
Addicott, ed.) Praeger Publishers, New York pp. 331-363.

Blomstrom, D.C., Beyer, E.M. Jr. (1980). Plants metabolize ethylene to ethylene-
glycol. Nature. **283**: 66-68.

Boller, T., R.C. Herner, H. Kende, (1979). Assay for an enzymatic formation of an
ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Planta **145**: 293- 303

Bont, J.A.M., M.M. Attwood, S.B. Primrose, W. Harder, (1979). Epoxidation of short
chain alkenes in *Mycobacterium* E20: the involvement of a specific monooxygen-
ase. FEMS Lett. **6**: 183-188.

Bouzayen, M., A. Latché, G. Alibert, J.C. Pech, (1988). Intracellular sites of synthesis
and storage of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in *Acer pseudo-*
platanus cells. Plant Physiol. **88**: 613-617.

- **A. Latché, J.C. Pech, (1990).** Subcellular localization in the sites of conversion of
1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. Planta **180**:
175-180.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of micro
gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.
Biochem. **72**: 248-254.

Brady, T., E.D. Walthall, (1985). The effect of the suspensor and gibberellic acid on
Phaseolus vulgaris embryo protein content. Develop. Biol. **107**: 531-536.

- Bramlage, W.J., A.C. Leopold, D.J. Parrish, (1978).** Chilling stress to soybeans during imbibition. *Plant Physiol.* **61**: 525-529.
- Bufler, G. (1986).** Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various storage of fruit development. *Plant Physiol.* **80**: 539-543.
- Burg, S.P., E.A. Burg, (1967).** Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* **42**: 144-152.
- Burns, S.P., K.B. Evensen, (1986).** Ca⁺⁺ effects on ethylene, carbon dioxide and ACC-synthase activity. *Physiol. Plant.* **66**: 609-615.
- Burroughs, L.F. (1957).** 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: A new amino acid in perry pears and cider apples. *Nature* **179**: 360-361.
- Burrows, W.J. (1975).** Mechanism of action of cytokinins. *Curr. Adv. Plant Sci.* **7**: 837-847.
- Cheung, C.P., J. Wu, R.J. Suhadolnik, (1979).** Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. *Nature* **277**: 66-67.
- Cheverry, J.L., J. Poliquen, H. Le Guyadet, P. Marcellin, (1988).** Calcium regulation of exogenous and endogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conversion to ethylene. *Physiol. Plant.* **74**: 53-57.
- Chrispeels, M.J., R.L. Jones, (1980/81).** The role of the endoplasmic reticulum in the mobilization of reserve macromolecules during seedling growth. *Israel J. Bot.* **29**: 225-245.
- Christoffersen, R.E., G.G. Laties, (1982).** Ethylene regulation of gene expression in carrots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4060-4063.

- Cionini, P.G., A. Benici, A. Alpi, F. D'Amato, (1976). Suspensor gibberellin and in vitro development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* **131**: 115-117.
- Cleand, R.E. (1983). The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of avena coleoptile cell elongation. *J. Exp. Botany*. **34**: 676-680.
- Cohen, S.S. (1971). En: Introduction to the polyamines. Englewood Cliff, NJ: Prentice Hall. pp. 179.
- Côme, D. (1980/81). Problems of embryonal dormancy as exemplified by apple embryo. *Isr. J. Bot.* **29**: 145-156.
- Cornnern, C.P. (1991). Immuno-characterisation of ethylene receptors. *British Society for Plant Growth Regulation*. **1**: 14-15.
- Dashek, M.V., B.N. Singh, D.C. Walton, (1979). Abscisic acid localization and metabolism in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **64**: 43-48.
- De Laat, A.M.M., L.C. Van Loon, (1982). Regulation of ethylene biosynthesis in virus infected tobacco leaves. II. Time course of leaves of intermediates and in vivo conversion rates. *Plant Physiol.* **69**: 240-245.
- De La Fuente, P., G. Nicolás, (1977). Appearance of an alternate pathway cyanide-resistant during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *Plant Physiol* **60**: 524-527.
- Delgado, M.M., I.M. Sánchez-Calle, M. Diaz-Miguel, A.J. Matilla (1989). Effects of polyamines on the ion content and solutes excretion of isolated embryonic axes and the germination rate of seeds of chickpea. *J. Plant Nutrition* **12(4)**: 509-22.
- Delseny, M., L. Aspart, R. Cooke, (1981). Studies on ribonucleic acids during radish seed germination: a search for potential regulatory mechanisms. *Israel J. Bot.* **29**: 246-258.

Denny, F.E., L.P. Miller, (1935). The role of the surface microflora in measurements of the respiration rate of germinating seeds. *Contrib Boycethomp Inst.* 7: 97-102.

Dhillon, S.S., J.P. MIKSCHE, (1983). DNA, RNA, protein and heterochromatin changes during embryo development and germination of soybean (*Glycine max* L.). *Histochem. J.* 15: 21-37.

Dickie, J.B. (1977). The reproduction and regeneration of some chalk grassland perennials, PhD thesis, University of Cambridge.

Dodds, J.G., J.G. Heslop-Harrison, M.A. Hall, (1980). Metabolism of ethylene to ethylene oxide by cell-free preparations from *Vicia faba* L. cotyledons: effects of structural analogues and of inhibitors. *Pl. Sci. Lett.* 19: 175-180.

Duffus, C.M., R. Rosie, (1975). Biochemical changes during embryogeny in phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90: 173-177.

Dunlap, J.R., P.W. Morgan, (1977a). Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kinetin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 60: 222-224.

- (1977b). Characterization of ethylene/gibberellic acid control of germination in (*Lactuca sativa* L.) *Plant Cell Physiol.* 18: 561-568.

Duke, S.H., G. Kakefuda, (1981). Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. *Plant Physiol.* 67: 449-456.

Dure, L.S. III. (1975). Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 259-278.

- A.M. Capdevila, S.C. Greenway, (1980). Messenger RNA domains in the embryo genesis of cotton cotyledons. En: *Genome Organization and Expression in Plants.* Leaver, C.J. ed. Plenum Publishing corp., New York. pp. 124-146.

- **S.C. Greenway, G.A. Galau, (1981).** Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: Changing messenger ribonucleic acid populations as shown by "in vitro" and "in vivo" protein synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162-4168.

- Dure, L.S., C. Caryl, (1981).** Developmental biochemistry of cotton seed embryo genesis and germination. XII. Purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiol.* **68**: 180-186.

- **G.A. Galah, S.C. Greenway, (1981).** Changing protein patterns during cotton cotyledon embryogenesis and germination as shown by "in vitro" synthesis. *Israel J. Bot.* **29**: 293-306.

- **(1985).** Embryogenesis and gene expression during seed formation. En: *Oxford Surveys in Plant Molecular and Cell Biology.* (B.J. Miflin, ed.) Oxford Univ. Press. vol. 2, pp. 179-197.

- Esashi, Y., H. Katoh, A.C. Leopold, (1977).** Dormancy and impotency of cocklebur seeds. IV. Effects of gibberellic acid, benzyl-adenine, thiourea and potassium nitrate on the growth of embryonic axis and cotyledon segments. *Plant Physiol.* **59**: 117-121.

- Evans, P.T., R.L. Malmberg, (1989).** Do polyamines have roles in plant development?. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **40**: 235-269.

- Evenari, M. (1961).** Chemical influences of other plants (allelopathy). En: *Encyclopedia of Plant Physiology* vol. 16. (W. Ruhland, ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 804-847.

- Even-Chen, Z., A.K. Mattoo, R. Goren, (1982).** Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts level from 3,4-C-methionine into spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.* **69**: 385-388.

- Fenner, M. (1985). Seed ecology. Chapman and Hall Ltd. London.
- Field, R.J. (1985). The effect of temperature on ethylene production by plant tissues. En: JA Roberts, GA Tucker, eds, Ethylene and Plant Development. Butterworths, London, pp. 47-69.
- Fischer, R.L., R.B. Goldberg, (1982). Structure and flanking regions of soybean seed protein genes. *Cell* 29: 651-660.
- Forney, C.F., R.N. Arteca, S.J. Wallner, (1982). Effects of amino and sulfhydryl reactive agents on respiration and ethylene production in tomato and apple fruit disks. *Physiol. Plant.* 54(39): 329-332.
- Frankland, B., R. Taylorson, 1983. Sight control of seed germination. En: EPP, New Series, Springer-Verlag, New York. ISBN 0-387-12143-9, Vol. 16 A, pp 428-456.
- Fu, J.R., S.F. Yang, (1983). Release of heat pretreatment induced dormancy in lettuce seeds by ethylene or cytokinin in relation to the production of ethylene and the synthesis of ACC during germination. *J. Plant Growth Reg.* 2: 185-192.
- Fuhrer, J., R. Kaur-Sawhney, L. Shih, A.W. Galston, (1982). Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. II. Inhibition of ethylene biosynthesis and possible mode of action. *Plant Physiol.* 70: 1597.
- C.B. Fuhrer-Fries, (1985). Formation and transport of 1-aminocyclo-propane-carboxylic acid in pea plants. *Phytochemistry* 24: 19-22.
- Gallardo, M., M.M. Delgado, I.M. Sánchez-Calle, A. Matilla (1991). Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant. Physiol.* (en prensa).
- Galli, M.G., P. Miracca, E. Sparvoli, (1979). Interaction between abscisic acid and fusicoccin during germination and post-germinative growth in *Haplopappus*

gracilis. Plant Sci. Lett. 12: 105-111.

Galli, M.G., M. Levi, E. Sparvoli, (1981). Lack of correlation between overall protein synthesis and the onset of cell elongation in germinating embryos of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant. 51: 321-325.

Galston, A.W., R.K. Sawhney, 1990. Polyamines in Plant Physiology. Plant Physiology, 94: 406-410.

German, E., Y. Fuchs, (1972). Effects of abscisic acid and its interaction with other plant hormones on ethylene production in two plant systems. Planta 50: 194-195.

Goldberg, R.B., G. Hoschek, S.H. Tam, G.S. Ditta, R.W. Breidenbach, (1981). Abundance, diversity, and regulation of mRNA sequence sets in soybean embryogenesis. Develop. Biol. 83: 201-217.

Gómez, J., D. Sánchez-Martinez, V. Stiefel, J. Rigan, R. Puigdomenech, M. Pages, (1988). A gene induced by the plant hormone ABA in response to water stress encodes a glycine-rich protein. Nature 334: 262-264.

González, C., M. Baez, (1972). Método de determinación de fósforo en tejidos vegetales. Agrochim. 16: 342-344.

Goodenough, P.W. (1986). A review of the role of ethylene in biochemical control of ripening in tomato fruit. Plant Growth Regulation. 4: 125-137.

Goto, N., Y. Esashi, (1974a). Stimulation by ethylene of axis and hypocotyl growth in bean and cocklebur seedlings. Physiol. Plant. 34: 204-210.

- (1974b). Differential hormone responses in different growing zones of the bean hypocotyl. Plant (Berl.) 116: 225-241.

Guerrero, F., J.E. Mullet, (1986). Increased abscisic acid biosynthesis during plant

dehydration requires transcription. *Plant Physiol.* **80**: 588-591.

Gunning, B.E.S., J.S. Pate, (1974). En: Dynamic aspects of plant ultrastructure. Robards, A.W. ed. London Mc. Graw-Hill. pp. 441-480.

Guy, M. (1990). Vacuolar ethylene formation does depend on membrane potential. *Physiol. Plant.* **79**: 526-530.

- **H. Kende, (1984).** Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum*, L. *Planta.* **160**: 281-87.

Hale, W.S., S. Schwimmtr, E.G. Bayfield, (1943). Treating wheat with ethylene (I) Effect on high-moisture wheat. *Cereal Chem.* **20**: 224-235.

Hall, M.A., M.A. Acaster, T. Bengoechea, J.H. Dodds, D.E. Evans, J.F. Jones, P.H. Jerie, G.C. Mutumba, B. Niepel, A.R. Shaari, (1979). Ethylene and seeds. En: *Plant Growth Substances* (Ed. F. Skoog). Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, pp. 199-208.

- **D.E. Evans, A.R. Smith, J.E. Taylor, M.M.A. Mutawa, (1982).** Ethylene and Senescence. En: *Growth Regulators in Plant Senescence* (M.B. Jackson, B. Grout and I.A. MacKenzie, eds) pp. 103-111. Monograph 8 BPGRG Wessex Press, Oxfordshire.

- **G.C. Mutumba, I.O. Sanders, A.R. Smith, R.J. Starling, R.A.N. Williams, (1987).** Ethylene in seed physiology. En: *Growth Regulators and Seeds*. (N.J. Pinfield and M. Black, eds.), pp. 1-15. British Plant Growth Regulator Group, Bristol. Monograph n° 15.

Hanson, J.B. (1984). The roles of calcium in plant growth. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol., Proc. Inaug. Plant Biochem. Physiol. Symp.* **1**: 1-24.

- Hasenstein, K.H., M.L. Evans, (1986).** Calcium ion dependency of ethylene production in segments of primary roots of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **67**: 570-575.
- Hasson, E., A. Poljakoff-Mayber, (1980/81).** En: The germination of seeds 3^a ed. (A.M. Mayer y A. Poljakoff-Mayber, eds.) Pergamon Press, Oxford. pp. 32.
- Hegarty, T.W. (1978).** The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant, Cell Environment.* **1**: 101-119.
- Hendricks, S.B., R.B. Taylorson, (1979).** Dependence of termal responses of seeds on membrane transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 778-781.
- Hernández-Nistal, J., J.J. Aldasoro, D. Rodriguez, A.J. Matilla, G. Nicolás, (1983).** Effect of thiourea on the ionic content and dark fixation of CO₂ in embryonic axes of (*Cicer arietinum*) seeds. *Physiol. Plant.* **57**: 273-278.
- Ho, D.T. (1979).** On the mode of action of abscisic acid in barley aleurone cell. *Plant Physiol.* **64**: Suppl. 79.
- Hoffman, N.E., S.F. Yang, A. Ichihara, S. Sakamura, (1982).** Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by plant tissues. Conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropanecarboxylic acid to 1-butene. *Plant Physiol.* **70**: 195-199.
- **S.F. Yang, T. McKeon, (1982).** Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 765-770.
- **J.R. Fu, S.F. Yang, (1983).** Identification and metabolism of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. *Plant Physiol.* **71**: 197-199.

- Y. Liu, S.F. Yang, (1983). Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-carboxylic acid content. *Planta* **157**: 518-523.
- Ilan, I., S. Gepstein, (1981). Hormonal regulation of food reserve breakdown in germinating dicotyledonous seeds. *Israel J. Bot.* **29**: 193-206.
- Imaseki, H., A. Watanabe, S. Odawara, (1977). role of oxygen in auxin-induced ethylene production. *Plant Cell. Physiol.* **18**: 577-586.
- A. Watanabe, (1978). Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* **19**: 345-348.
- Jacobsen, J.V., T.J.V. Higgins, J.A. Zwa, (1980). Hormonal control of endosperm function during germination. En: *The plant seed: Development, preservation and germination.* (I. Rubinstein ed.) New York. Academic.
- Jann, R.C., R.C. Amen, (1977). What is germination?. En: *The physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination.* (Khan A.A. ed.) Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. pp. 5-28.
- Jendrisack, J. (1980). The use of α -amaritin to inhibit "in vivo" RNA synthesis and germination in wheat embryos. *J. Biol. Chem.* **255**: 8529-33.
- Jerie, P.H., D.J. Chalmers, (1976). Some characteristics of ethylene production in peach (*Prunus persica* L.) seeds. *Planta* **132**: 13-17.
- M.A. Hall, (1978). The identification of ethylene oxide as a major metabolite of ethylene in *Vicia faba* L. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **200**: 87-94.
- Jiao, X., S. Philosoph-Hadas, S. Ling-Yuan, S.F. Yang, (1986). The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-

carboxylic acid in plant tissues. *Plant Physiol.* **81**: 637-641.

John, P. (1983). The coupling of ethylene biosynthesis to a transmembrane, electrogenic proton flux. *FEBS Lett.* **152**: 141-143.

Jones, J.F., H. Kende, (1979). Auxin-induced ethylene biosynthesis to a transmembrane electrogenic proton flux. *FEBS Lett.* **152**: 141-143.

Jones, R.L., D.S. Bush, A.K. Biswas, (1987). Gibberellic acid and calcium participate in the synthesis of active α -amylase molecules. En: *British Plant Growth Regulator Group. Monograph n° 15.*

Julin-Tegelman, A., N. Pinfield, (1982). Changes in the level of endogenous cytokinin-like substances in *Acer pseudoplatanum* embryos during stratification and germination. *Physiol. Plant.* **54**: 318-322.

Karssen, C.M., D.L.C. Brinkhorts-Van Der Swan, A.E. Breekland, M. Koornneef, (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh. Planta* **157**: 158-165.

Karssen, C.M., S.P.C. Groot, (1987). The hormone balance theory of dormancy evaluated. En: *British Plant Growth Regulator Group. Monograph n° 15.*

Kato, H., Y. Esashi, 1975a. Dormancy and impotency of cocklebur seeds. I. Carbon-dioxide, ethylene, oxygen and high temperature. *Plant. cell. Physiol.* **16**: 687-696.

(1975b). Dormancy and impotency of cocklebur seeds. II. Phase sequence in germination processes. *Plant. Cell. Physiol.* **16**: 697-706.

Kaur-Sawhney, E., A. Altman, A.W. Galston, (1978). Dual mechanism in polyamine-mediated control of ribonuclease activity in oat leaf protoplast. *Plant Physiol.* **62**: 158-160.

- Kelly, P., A. Trewavas, L. Lewis, M. Durbin, R. Sexton, (1987). Translatable mRNA changes in ethylene induced abscission zones of *Phaseolus vulgaris* (Red Kidney). *Plant, Cell and Environment*. **19**: 11-16.
- Kende, H. (1989). Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol*. **91**: 1-4.
- Kendrick, R.E. (1983). The physiology of phytochrome action. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **36**: 275-303.
- Kepecynski, J. (1986). Ethylene dependent action of gibberellin in seed germination of *Amaranthus caudatus*. *Physiol. Plant*. **67**: 584-587.
- C.M. Karssen, (1985). Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of (*Amaranthus caudatus*). *Physiol. Plant*. **63**: 49-52.
- Ketring, D.L., P.W. Morgan, (1969). Ethylene as a component of the emanations from germinating peanut seeds and its effects on dormant Virginia-type peanut seeds. *Plant Physiol*. **44**: 326-330.
- (1970). Physiology of oil seeds. I. Regulation of dormancy in Virginia-type peanut seeds. *Plant Physiol*. **45**: 268-273.
 - (1972). Physiology of oil seeds. IV. Role of endogenous ethylene and inhibitory regulators during natural and induced after ripening of dormant Virginia-type peanut seeds. *Plant Physiol*. **50**: 382-387.
 - (1973). Germination inhibitors seed. *Sci. and Technol*. **1**: 305-324.
 - (1977). Ethylene and seed germination. En: A.A. Khan, eds. *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. Elsevier-/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 147-148.

- Key, J.L., C.J. Leaver, J.R. Cowles, J.M. Andersen, (1972).** Characterization of short time labeled adenosine mono-phosphate rich ribonucleic acids of soybean. *Plant Physiol.* **49**: 783-788.
- Khan, M.A., I.A. Ungar, (1986).** Inhibition of germination in *Atriplex triangularis* seeds by application of phenols and reversal of inhibition by growth regulators. *Bot. Gaz.* **147**: 148-151.
- Khan, A.A., X.L. Huang, (1988).** Synergistic enhancement of ethylene production and germination with kinetin and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in lettuce seeds exposed to salinity stress. *Plant Physiol.* **87**(4): 847-852.
- Khani-Oskouee, D., J.P. Jones, R.W. Woodard, (1984).** Stereochemical course of the biosynthesis of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid. I. Role of the asymmetric sulfonium pole and the α -amino acid center. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **121**: 181-187.
- Kionka, C., N. Amrhein, (1984).** The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mung bean hypocotyls. *Planta* **162**: 226-235.
- King, R.W. (1976).** Abscisic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta* **132**: 43-51.
- Köllofel, C. (1970).** Oxidative and phosphorylative activity of mitochondria from pea cotyledons during maturation of the seeds. *Planta* **91**: 321-328.
- Kondo, K., A. Watanabe, H. Imaseki, (1975).** Relationships in actions of indoleacetic acid, benziladenine and abscisic acid in ethylene production. *Plant Cell Physiol.* **54**: 846-851.
- Konze, J.R., H. Kende, (1979).** Interactions of methionine and selenomethionine with methionine adenosyltransferase and ethylene-generating systems. *Plant Physiol.* **63**: 507-510.

- Konze, J.R., J.F. Jones, T. Boller, H. Kende, (1980).** Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on the production of ethylene in senescing flowers of *Ipomoea tricolor* Cav. *Plant Physiol.* **66:** 566-571.
- Kowiyama, Y. (1983).** Cell-cycle dependency of radiosensitivity and mutagenesis in fertilized egg cells of rice, *Oryza sativa* L. 1. Autoradiographic determination of the first DNA synthetic phase. *Theor. Appl. Genet.* **65:** 303-308.
- Kushad, M.M., D.G. Richardson, A.J. Ferro, (1983).** Intermediates in the recycling of 5-methylthioribose to methionine in fruits. *Plant Physiol.* **73:** 257-261.
- Lachica, M., A. Aguilar, J. Yañez, (1973).** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Aidín (II). *Anal. Edafol. y Agrobiol.* **32:** 1033-1047.
- Lau, O.L., S.F. Yung, (1974).** Sinergistic effect of kinetin on IAA-induced ethylene production. *Plant Cell Physiol.* **15** 29-35.
- **S.F. Yang, (1975).** Interaction of kinetin and calcium in relation to their effect on stimulation of ethylene production. *Plant Physiol.* **55:** 738-740.
 - **W.W. John, S.F. Yang, (1977).** Effect of different cytokinins on ethylene production by mung bean hypocotyls in the presence of indole-3-acetic acid or calcium ion. *Physiol. Plant.* **39:** 1-3.
- Legge, R.L., J.E. Thompson, J.E. Baker, (1982).** Free radical-mediated formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a spin-trap study. *Plant Cell Physiol.* **23(2):** 171-177.
- Lejohn, H.B., R.M. Stevenson, (1973).** Cytokinins and magnesium ions may control the flow of metabolites and calcium ions through fungal cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84:** 1053-60.
- Lieberman, M., L.W. Mapson, (1962).** Inhibition of the evolution of ethylene and the

ripening of fruit by ethylene oxide. *Nature* **196**: 660-661.

- **A.T. Kunishi, (1972)**. Abscisic acid and ethylene production. *Plant Physiol.* **47**: supp. 2.
 - **(1975)**. Biosynthesis and regulatory control of ethylene in fruit ripening. A review. *Physiol. Veg.* **13**: 489-499.
 - **(1979)**. Biosynthesis and action of ethylene. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**: 533-591.
- Liu, Y., S.F. Yang, (1983)**. Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. *Planta* **157**: 518-23.
- **N.E. Hoffman, S.F. Yang, (1983)**. Relationship between the malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in mung-bean hypocotyls. *Planta* **158**: 437-441.
 - **L. Su, S.F. Yang, (1984a)**. Stereoselectivity of 1-aminocyclopropanecarboxylate malonyl-transferase toward stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-carboxylic acid. *Arch Biochem. Biophys.* **235**: 319-325.
 - **L. Su, S.F. Yang, (1984b)**. Metabolism of α -aminoisobutyric acid in mungbean hypocotyls in relation to metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **161**: 439-443.
 - **N.E. Hoffman, S.F. Yang, (1985)**. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. *Plant Physiol.* **77**: 407-411.
 - **L. Su, S.F. Yang, (1985)**. Ethylene promotes the capability to malonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruits. *Plant Physiol.* **77**: 891-895.

- Lizada, M.C., S.F. Yang, (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **100**: 140-45.
- Long, S.R., R.M.K. Dale, I.M. Sussex, (1981). Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryogenic tissues of winter oil seed rape to treatment with colchicine. *New Phytol.* **95**: 359-366.
- Loveys, B.R., C.J. Brien, P.E. Kriedemann, (1975). Biosynthesis of abscisic acid under osmotic stress: Studies based on dual labelling technique. *Physiol. Plant.* **33**: 166-170.
- Lürssen, K., K. Naumann, R. Schröder, (1979). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *S. Pflanzenphysiol.* **92**: 285-294.
- MacMillan, J. (1985). Gibberellins: metabolism and function. En: Current topics in plant biochemistry and physiology. (D.D. Randall, ed.) vol. 4, University of Missouri. Columbia Press. Missouri, USA.
- Mansour, R., A. Latché, V. Vaillant, J.C. Pech, M.S. Reid, (1986). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. *Physiol. Plant.* **66**: 495-502.
- Matern, U., C. Feser, W. Heller, (1984). N-Malonyl-transferase from peanut. *Arch Biochem. Biophys.* **235**: 218-227
- Matilla, A.J., G. Nicolás, O. Vicente, J.M. Sierra, (1980). Preformed mRNA in cotyledons of ungerminated seeds of *Cicer arietinum*, L. *Plant Physiol.* **65**: 1128-32.
- G. Nicolas, J.M. Sierra, (1982). Changes in messenger RNA in *Cicer arietinum* L. cotyledons seeds during germination. *Plant. Sci. Letters* **25**: 209-217.

- Mattoo, A.K., M. Lieberman, (1977a).** Evidence that the ethylene-synthetizing enzyme in plants is associated with a cell membrane complex. *Fed. Proc.* **34**: 703.
- **(1977b).** Localization of the ethylene-synthetizing system in apple tissue. *Plant Physiol.* **60**: 794-799.
- Mayer, A.M., I. Marbach, (1981).** Biochemistry of the transition from resting to germination state in seeds. *Progress in Phytochemistry* **7**: 95-136.
- **A. Poljakoff-Mayber, (1975).** The germination of seeds. 2nd Ed. Pergamon Press, Oxford. pp. 192.
 - **A. Poljakoff-Mayber, (1982).** The germination of seeds. 3rd. edn. Pergamon Press, Oxford p. 211.
- Mayne, R.G. H. Kende, (1986).** Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. requirement for membrane integrity. *Planta* **167**: 159-165.
- McKeon, T.A., N.E. Hoffman, S.F. Yang, (1982).** The effect of plant-hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in water-stressed wheat leaves. *Planta* **155**: 437-443.
- **S.F. Yang, (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.
 - **S.F. Yang, (1987).** Biosynthesis and metabolism of ethylene. *Plant Horm. Their Role. Plant Growth Dev.* pp. 94-112.
- McRae, D.G., J.E. Baker, J.E. Thompson, (1982).** Evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant and Cell Physiol.* **23**: 375-383.

McWha, J.A. (1975). Changes in abscisic acid levels in developing grains of wheat (*Triticum aestivum*, L.) J. Exp. Bot. 26: 823-827.

Mei ce, D.W. (1986). Use of embryo lethal mutants to study plant embryo development. En: Oxford Surveys in Plant Molecular and Cell Biology. vol. 3. (B.J. Mifflin, ed.) Oxford, Univ.Press, Oxford. U.K.

Merlo, E., A. Matilla, (1985). Decrease in ribonuclease activity in embryonic axes isolated from chickpea (*Cicer arietinum*, L.) induced by abscisic acid. J. Exp. Bot. 36: 1780-1786.

- L. Romero, A. Matilla, (1986). Effect of exogenous abscisic acid on the ionic content in isolated axes from chickpea (*Cicer arietinum*, L.) seeds. Acta Physiol. Plant. 8: 177-183.

- A. Fernandez, A. Matilla, (1988). Effect of polyamines on growth and RNAase activity induced by ABA in the embryonic axes of chickpea (*Cicer arietinum*, L.) seed. Acta Physiologiae Plantarum vol. 10, nº 1: 17-23.

- A.J. Matilla, (1989). Changes in percentage of germination and solutes leakage induced by polyamines during the germinative process of *Cicer arietinum* L. seeds. Agr. Med 119: 392-398.

Metivier, L., M.T. Paulilo, (1980). The utilization of cotyledonary reserves in *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca. I. Changes in total amyolytic and proteolytic activity and the effect of 6-benzyladenine and GA₃ upon whole seedlings. J. Exp. Bot. 31: 1257-70.

Metzger, J.D., D.K. Sebesta, (1982). Role of endogenous growth regulators in seed dormancy of *Avena fatua*. I. Short chain fatty acids. Plant Physiol. 70: 1480-85.

Michael, G., H. Beringer, (1980). The role of hormones in yield formation. En: Physiological Aspects of Crop Productivity, pp. 85-116. 15th Colloquium Int.

Potash Inst., Bern, Switzerland.

- Milborrow, B.V. (1974).** The chemistry and biochemistry of abscisic acid. En: The chemistry and biochemistry of plant hormones. Recent advances in Phytochemistry (V.C. Runeckles, S. Sondheimer y D.C. Walton, eds.). vol. 7. Oxford Pergamon Press. pp. 57-91.
- **D.R. Robinson, (1973).** Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **24**: 537-548.
- Morgan, P.W., D.L. Ketring, E.M.Jr. Beyer, S.A. Lipe, (1970).** Functions of naturally produced ethylene in abscission, dehiscence and seed germination. *Plant Growth Substances 1970.* (S.J. Carr. ed.) Proc. 7th Intern. Conf. Plant. Growth Substances, pp. 502-509. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg. New York.
- Morris, P.C., D.J. Bowles, (1987).** Control of gene expression during cereal embryo development. En: British Plant Growth Regulator Group. Monograph nº 15.
- Mounler, M.A.Kh., F. Bangerth, V. Story, (1980).** Gibberellin-like substances and indole type auxins in developing grains of normal and high-lysine genotypes of barley. *Physiol. Plant.* **48**: 568-753.
- Mozer, T.M. (1980).** Partial purification and characterization of the mRNA for α amylase from barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **65**: 834-837.
- Munns, R., H. Greenway, G.G. Kirst, 1983.** Halotolerant eukariots. En: EPP, N.S. Springer-Verlag, Berlin, vol. 12 C, pp. 59-135.
- Murr, D.P., S.F. Yang, (1975).** Conversion of 5'-methylthioadenosine to methionine by apple tissue. *Phytochemistry* **14**: 1291-92.
- Murray, D.R. (1984).** Seed Physiology, vol. I y II. Academic Press.

- Naik, B.I., S.k. Srivastava, (1978). Effect of polyamines on tissue permeability. *Phytochemistry* 17: 1185-87.
- Naqui, H.H., G.P. Hanson, (1982). Germination and growth inhibitors in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) chaff and their possible influence in seed dormancy. *Am. J. Bot.* 69: 985-989.
- Narasimhareddy, S.B., P.M. Swamy, (1979). Absciscic acid-like inhibitors and cytokinins in developing seeds of dormant and non-dormant varieties of peanut (*Arachis hypogea*). *J. Exp. Bot.* 30: 37-42.
- Naumann, R.K., K. Dorffing, (1982). Variation of free and conjugated absciscic acid and dihydrophaseic acid levels in ripening barley grains. *Plant Sci. Lett.* 27: 111-117.
- Noor-Saleh, A., T. Hemberg, (1980a). The influence of kinetin on the endogenous content of indoleacetic acid in swelling seeds of *Phaseolus*, *Zea* and *Pinus* and young plant of *Phaseolus*. *Physiol. Plant.* 50: 99-102.
- (1980b). The effect of kinetin on the level of an indoleacetylaspartic acid like substance in germinating seeds and young plants of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 50: 594-599.
- Northcote, D.H. (1987). The action of absciscic and gibberellic acids during castor bean germination. En: British Plant Growth Regulator Group. Monograph n^o 15.
- Owen, J.H. (1988). Role of ABA in a Ca⁺⁺ second messenger system. *Physiol. Plant.* 72: 637-641.
- Parys, E., E. Romanowska, J. Poskuta, (1983). Amylase activities in attached and excised cotyledons and in embryonic axes of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol.* 24: 181-188.

- Payne, P.I., M. Dobrzanska, P.W. Bariow, M.E. Gordon, (1978).** The synthesis of RNA in imbibing seeds of rape (*Brassica napus*) prior to the onset of germination: a biochemical and cytological study. *J. Exp. Bot.* **29**: 77-88.
- Pate, J.S., P.J. Sharkey, O.A.M. Lewis, (1974).** Phloem-bleeding from legume fruits. Technique for study of fruit nutrition. *Planta.* **120**: 229-243.
- Pech, J.C., M. Bouzayen, G. Alibert, A. Latché, (1988).** Subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in plant cells. In H. Clijsters, M. Van Poucke, eds, *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 33-40.
- **E. Dupille, M.A. Pedreño, M. Bouzayen, A. Latché, (1990).** Cellular metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, the ethylene precursor.
- Peiser, G.D., T.T. Wang, N.E. Hoffman, S.F. Yang, H.W. Liu, C.T. Walsh, (1984).** Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8** (1): 3059-63.
- Perl, M. (1978).** Phosphoenol-piruvate-carboxylase activity in cotton and Sorghum seeds and its relation to seedling development. *Planta* **139**: 239-243.
- Pharis, R.P., R.W. King, (1985).** Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 517-568.
- Philosoph-Hadas, S., S. Meir, N. Aharoni, (1985).** Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf discs: enhancement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation. *Physiol. Plant.* **63**: 431-37.
- Pinfield, N.J. (1987).** Seed dormancy: Changing concepts of its regulation. En: *British Plant Growth Regulator Group. Monograph n° 15.*

- Pinta, L. (1973).** Méthodes de référence pour la détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oléagineux*. **28** (2): 87-92.
- Pirrung, M.C. (1983).** Ethylene biosynthesis. 2. Stereochemistry of ripening, stress, and model reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 7207-09.
- Raab, M.M., R.E. Koning, (1987).** Interacting roles of gibberellin and ethylene in collar expansion of *Ipomea nil* (Convolvulaceae). *Am. J. Bot.* **74**(6): 921-927.
- Revilla, M., L. Martín, G. Nicolás, M.E. Legaz, N. Villalobos, (1988).** Effects of high temperature on the variation and transport of endogenous cytokinins during the germination of chickpea seeds. *J. Plant Physiol.* **132**: 223-228.
- Reynolds, T., P.A. Thompson, (1971).** characterization of the high temperature inhibition of germination of lettuce (*Lactuca sativa*). *Physiol. Plant.* **24**: 544-547.
- Riggio-Bevilacqua, L., G. Roti-Michelozzi, G. Serrato, (1984).** Water entry in *Cercis siliquastrum* (leguminosae) seeds. *Nordic J. Bot.* **4**: 675-679.
- Riov, J., S.F. Yang, (1982).** Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. Suppression of 1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiol* **69**: 687-690.
- Roberts, D.R., M.A. Walker, J.E. Thopson, E.B. Dumbroff, (1984).** The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant and Cell Physiol.* **25**: 315-322.
- Roberts, D.R., E.B. Dumbroff, J.E. Thopson, (1986).** Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves - a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Plant* **167**: 395-401.

- Robichaud, C.S., J. Wong, I.M. Sussex, (1980).** Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Develop. Genet.* **1**: 325-330.
- Rodríguez, D., G. Nicolás, A. Matilla, (1982).** Reactivation of nucleic acids synthesis during early germination of *Cicer arietinum*, L. embryonic axis. *Acta Physiologiae Plantarum*, **4**: 97-102.
- **A. Matilla, J.J. Aldasoro, J. Hernández-Nistal, G. Nicolás, (1983).** Germination of *Cicer arietinum* seeds and thiourea-induced phytotoxicity. *Physiol. Plant.* **57**: 267-272.
 - **G. Nicolás, J.J. Aladasoro, J. Hernández-Nistal, M.J. Babiano, A. Matilla, (1985).** Altered development of polysomal RNA activity in chick-pea (*Cicer arietinum* L.) embryonic axes. Effects of abscisic acid and temperature. *Planta* **164**: 517-523.
- Roeder, R.G. (1976).** En: RNA polymerase. Ed. R. Losick, M. Caahmberlin. Cold Spring Harbos Laboratory, New York. pp. 285-329.
- Rogan, P.G., E.W. Simon, (1975).** Root growth and onset of mitosis in germinating *Vicia faba*. *New Phytologist.* **74**: 273-275.
- Ruge, U. (1947).** Unndersuchuggen Uber keimungsfordernde wikkstoffe. *Planta* **35**: 297-318.
- Sakai, T.T., S.S. Cohen, (1976).** Effects of polyamines on the structure and activity of t-RNA. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **17**: 15-42.
- Sakai, T.T., H. Imaseki, (1982).** Effects of the inhibitory protein of ethylene synthesis of ATP levels in mung bean hypocotyl segments. *Plant Cell. Physiol.* **23**: 35-39.
- Sánchez-Calle, I.M., A.J. Matilla, (1987).** Germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris*, L. var. eagle. I. Papel del ácido giberélico sobre la producción de etileno.

Anal. Edafol. Agrobiol. **46**: 1431-39.

- (1989). The alteration by abscisic acid of ethylene production in the germinating *Phaseolus vulgaris*, L. seeds together with the effects of kinetin and the seed coat. Agr. Med. **119**: 18-26.
- M.M. Delgado, M. Bueno, M. Diaz-Miguel, A. Matilla, (1989). The relationships between ethylene production and cell elongation during the initial growth period of chick-pea seeds (*Cicer arietinum*, L.). Physiol. Plant. **76**: 569-74.

Sanders, J.O., A.R. Smith, A.M. Hall, (1986). Ethylene metabolism and action. Physiol. Plant. **66**: 723-726.

- A.R. Smith, M.A. Hall, (1991). Ethylene binding in epicotyls of *Pisum sativum* L. cv. Alaska. Planta **183**: 209-217.

Satoh, S., Y. Esashi, (1980). α -Aminoisobutyric acid: a probable competitive inhibitor of conversion of 1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. Plant. Cell Physiol. **21**: 939-49.

- (1981). D-Amino-acid-stimulated ethylene production: molecular requirements for the stimulation and a possible receptor site. Phytochemistry **20**: 947-49.
- (1984). Identification and content of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating cocklebur seeds. Plant. Cell. Physiol. **25**: 583-587.
- (1986a). Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase of etiolated mung bean hypocotyl segments by its substrate, S-adenosyl-L-methionine. Plant. Cell. Physiol. **27**(2): 285-91.
- S.F. Yang, (1989). Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-amino cyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. Arch Biophys. **271**(1): 107-112.

- Sen, S., P.I. Payne, D.J. Osborne, (1975). Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and their relationship to early protein synthesis. *Biochem. J.* **148**: 381-387.
- Sharkey, T.D., K. Raschke, (1980). Effects of phaseic acid on stomate and the photosynthesis apparatus. *Plant Physiol.* **65**: 291-297.
- Sheridan, W.F., M.G. Neuffer, (1982). Maize developmental mutants. *J. Heredity* **70**: 318-329.
- Silvertown, J.W. (1981). Micro-spatial heterogeneity and seedling demography in species-rich grassland. *New Phytol.* **88**: 117-128.
- Simon, E.W. (1981). Membrane changes underlying post-harvest deterioration in quality. Long Ashton Symp. 7th, 247- 252.
- Simon, E., Rajaharum, (1972). Leakage during seed germination. *J. Exp. Bot.* **23**: 239-243.
- Sisler, E.C. (1977). Ethylene activity of some π -acceptor compounds. *Tobacco Science* **21**: 43-45.
- (1982). Ethylene-binding properties of a Triton X-100 extract of mung bean sprouts. *J. Plant Growth Regul.* **1**: 211-18.
 - R. Goren, (1981). Ethylene binding - the basis for hormone action in plants? *What's New in Plant Physiology* **12**: 37-40.
 - S.F. Yang, (1984). Anti-ethylene effects of *cis*-2-butene and cyclic olefins. *Phytochemistry* **23**: 2765-68.
- Slocum, R.D., R. Kaur-Sawhney, A.W. Galston, (1984). The physiology and biochemis

try of polyamines in plants. Arch. Biochem. Biophys. **235**: 283-303.

Smith, H. (1970). Phytochrome and photomorphogenesis in plants. Nature **227**: 665-668.

Smith, D.L. (1973). Nucleic acid, protein, and starch synthesis in developing cotyledons of *Pisum arvense* L. Ann. Bot. **37**: 795-804.

Smith, A.R., M.A. Hall, (1984). Mechanism of ethylene action. Pl. Growth Regulation **2**: 151-165.

- **M.A. Hall, (1985).** Ethylene binding. En: Ethylene in Plant Development. (J.A. Roberts and G. Tucker, eds) pp. 101-116. Butterworths, London.

- **D.E. Evans, P.G. Smith, M.A. Hall, (1985).** Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L. En: Ethylene in Plant Development. (J.A. Roberts and G. Tucker, eds) pp. 139-145. Butterworths, London.

Smith, P.G., M.A. Venis, M.A. Hall, (1985). Oxidation of ethylene by cotyledon extracts from *Vicia faba* L. Cofactor requirements and kinetics. Planta **163**: 97-104.

Sondheimer, E., E.C. Galson, E. Tinelli, D.C. Walton, (1974). The metabolism of hormones during seed germination and dormancy. IV. The metabolism of (S)-2-¹⁴C-abscisic acid in ash seed. Plant Physiol. **54**: 803-808.

Spencer, M., A.O. Olson, (1965). Ethylene production and lipid mobilization during germination of castor beans. Nature (London). **205**: 699-700.

Srivastava, S.K., T.A. Smith, (1982). The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. Phytochemistry. **21**: 997-1008.

- **V. Praksh, B.I. Naik, (1977).** Regulation of diamine oxidase activity in

- germinating pea seeds. *Phytochemistry* **20**: 1477-80.
- Stewart, R.R.C., A.M.M. Berrie, (1979).** Effect of temperature on the short chain fatty acid-induced inhibition of lettuce seed germination. *Plant Physiol.* **63**: 61-62.
- Stinissen, H.M., W.J. Peumans, E. DeLanghe, (1984).** Abscisic acid promotes lecithin biosynthesis in developing and germinating rice embryos. *Plant. Cell. Rep.* **3**: 5-59.
- Su, L.Y., Y. Liu, S.Y. Yang, (1985).** Relationship between 1-aminocyclo-propane-carboxylate-malonyltransferase and D-amino acid malonyltransferase. *Phytochemistry* **24**: 1141-45.
- **T. McKeon, G. Grierson, M. Cantwell, S.F. Yang, (1984).** Development of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid synthase and polygalacturonase activities during the maturation and ripening of tomato fruits. *Hort Science* **19**: 576-578.
- Suttle, J.C. (1981).** Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry.* **30**: 1477.
- Tabor, C.W., H. Tabor, (1976).** 1,4-Diaminobutane (Putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 285-306.
- **(1984).** Polyamines. *Ann. Rev. Biochemistry.* **53**: 749-790.
- Thimann, K.V. (1977).** En: *The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination.* (A.A. Khan ed.) Elsevier/North-Holland. Biomedical Press.
- Tong, C.B.s., K. C. Gross, (1990).** Stimulation of ethylene production by a cell wall component from nature green tomato fruit. *Physiol. Plant.* **80**: 500-506.

- Trewavas, A.J. (1982).** Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiol. Plant.* **55:** 60-72.
- Vacha, G.A., R.B. Harvey, (1927).** The use of ethylene, propylene, and similar compounds in breaking the rest periods of tubers, bulbs, cuttings and seeds. *Plant Physiol.* **2:** 187-194.
- Vallade, J., A. Cornu, S. Essad, J. Alabouvette, (1978).** Niveaux de DNA dans les noyaux zygotiques chez le *Petunia hybrida* hort. *Bull. Soc. Bot. France Actual. Bot.* **125:** 253-258.
- Van Loon, L.C., J.J.H. Fontaine, (1984).** Accumulation of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in ethylene-synthesizing tobacco leaves. *Plant Growth. Regul.* **2:** 227-234.
- Vaughan, G.T., B.V. Milborrow, (1984).** The resolution HPLC of RS-(2-14C) Me 1', 4'-cis-diol of abscisic acid and the metabolism of (-)-R- and (+)-S-abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **35:** 110-120.
- Vázquez-Yánes, C., H. Smith, (1982).** Phytochrome control of seed germination in the tropical rain forest pioneer trees *Cecropia obtusifolia* and *Piper auritum* and its ecological significance. *New Phytol.* **92:** 477-485.
- Veluthambi, K., B.H. Poovaiah, (1984).** Polyamines stimulated phosphorylation of proteins from corn (*Zea mays*, L.) coleoptiles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122:** 1374-1380.
- Venis, M.A. (1984).** Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity. *Planta* **162:** 85-88.
- Vinkler, C., A. Apelbaum, (1985).** Ethylene formation in plant mitochondria. Dependence on the transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid across the membrane. *Physiol. Plant.* **63:** 387-392.

Walbot, V. (1978). Control mechanisms for plant embryogeny. En: Dormancy and Developmental Arrest. (M. Cltter, ed.) Academic Press, N.Y. pp. 113-166.

- L.S.III. Dure, (1976). Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. VII. Characterization of the cotton genome. J. Mol. Biol. 101: 503-536.

Wallsgrave, R.M., P.J. Lea, B.J. Milfin, (1983). Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. Plant Physiol. 71: 780-784.

Walton, D.C. (1977). Abscisic acid and seed germination. En: The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination. (A.A. Khan ed.) Elsevier-North-Holland Biomedical Press.

- (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 453-489.

- (1980/81). Does ABA play a role in seed germination. Israel J. Bot. 29: 168-180.

Wang, S.Y., D.O. Adams, M. Lieberman, (1982). Recycling of 5'-methylthioadenosine ribose carbon atoms into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production. Plant Physiol. 70: 117-121.

Williams, R.D., R.E. Hoagland, (1982). The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. Weed Sci. 30: 206-212.

Winther, M., L. Stevens, (1979). Polyamines stimulation of "in vivo" rate of macromolecular synthesis in putrescine auxotrophic of *A. nidulans*. FEBS Lett. 85: 229-232.

Wright, S.T.C. (1980). The effect of plant growth regulator treatments on the levels of ethylene emanating from excised turgid and wilted wheat leaves. Planta 148:381-

- Wolf, B. (1982).** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Commun. in soil. Plant Anal.* **13**: 1035-1059.
- Wool, C.K. (1991).** Ethylene receptors in higher plants. *British Society for Plant Growth Regulation* **1**: 13-14.
- Yang, S.F., N.E. Hoffmann, (1984).** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-89.
- **N.E. Hoffman, T. McKeon, J. Riov, C.H. Kao, K.H. Yung, (1982).** Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis. En: PF Wareing, ed, *plant growth substances* 1982. Academic Press, London, pp. 239-248.
- Yang, A., S.F. Yang, (1977).** Methionine metabolism in apple tissue. Implication of 5-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* **60**: 892-896.
- Yeung, E.C., I.M. Sussex, (1979).** Embryology of *Phaseolus coccineus*: the suspensor and the growth of the embryoproper in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.* **91**: 423-433.
- Yoshii, H., H. Imaseki, (1981).** Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. *Plant and Cell Physiol.* **22**: 369-379.
- **H. Imaseki, (1982).** Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by ethylene. *Plant and Cell Physiol.* **23**: 639-649.
- **A. Watanabe, H. Imaseki, (1980).** Biosynthesis of auxin-induced ethylene in mung bean hypocotyls. *Plant Cell. Physiol.* **21**: 279-291.

- Yu, Y.B., D.O. Adams, S.F. Yang, (1979). 1-Aminocyclopropane-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. Arch Biochem. Biophys. **198**: 280-286.
- S.F. Yang, (1979). Auxin-induced ethylene production and its inhibition by amino ethoxyvinylglycine and cobalt ion. Plant Physiol. **64**: 1074-77.
- Yung, D.H., S.F. Yang, F. Schlenk, (1982). Methionine synthesis from 5-methylthio ribose in apple tissue. Biochem. Biophys., Res. Comm. **104**: 771-777.
- Zeevart, J.A.D. (1980). Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites in excised blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. Plant Physiol. **66**: 672-678.
- Zhu, S., R. Shen, X. Tang, (1980). Studies on the developmental biology of embryo genesis in higher plants. III. Kinetic changes of nucleic acids and protein during embryogenesis of wheat (*Triticum vulgare* L.). Acta Bot. Sinica **22**: 122-126.
- Zimmerman, R.H., M. Lieberman, O.C. Broome, (1977). Inhibitory effect of a rhizobium toxin analog on bud growth after release from dormancy. Plant Physiol. **59**: 58-160.