



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

— DON JUAN DE DIOS PEREZ JIMENEZ; PROFESOR Y
SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE -
LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.-

Núm. 479

C E R T I F I C O: Que la presente -
Tesis Doctoral corresponde a la
presentada en ésta Facultad por -
por D^a Encarnacion Merlo Calvente
y que fue calificada con Apto "Cum
Laude" el dia 14 de Enero de 1.988
por el Tribunal correspondiente, y
que fue aprobado en Comisión de -
Doctorado celebrada el dia 12 de -
Noviembre de 1.987, siendo el Titu
lo de la Tesis: "Efecto del Acido
Abscisico (ABA) sobre el crecimien
to y desarrollo de semillas de gar
banzo (Cicer arietinum L.)".

Y para que conste expido la presente
certificacion con el V^a.B^o. del Il^{mo}. Sr.
Decano en Granada a diez y siete de Mayo -
de mil novecientos ochenta y nueve.

V^o.B^o.
EL DECANO,

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 27 ABR. 1990

SALIDA NUM. 479

Esta Tesis fue defendida por la Licenciada Dña. MA ENCARNACION MERLO CALVENTE para optar al título de Doctor en Ciencias (Sección Biológicas), el día 22 de Enero de 1988 ante el Tribunal constituido por:

Presidente: Dra. Dña. Carmen Lluch Plá

Secretario: Dr. D. Ignacio Zarra Cameselle

Vocales: Dr. D. Gregorio Nicolás Rodrigo

Dr. D. Ricardo Sánchez Tamés

Dr. D. Juan Segura García del Río.

Habiendo obtenido la calificación de APTO "cum laude".

Universidad de Granada - Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Vegetal



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

GRANADA

N.º Documento 615037678

N.º Copia 16271944

«Efecto del Ácido Abscísico (ABA)
sobre el crecimiento y desarrollo
de semillas de Cicer arietinum L»

M.^a Encarna Merlo Calvente

TESIS DOCTORAL

Granada, 1987

Este Trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada y ha sido financiado por la C.A.I.C.Y.T. (Proyecto 84/1203).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados a los siguientes Congresos y Reuniones Científicas: VI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (Valencia, 1985). XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica (Zaragoza, 1986); VII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (Oviedo, 1987); XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica (Málaga, 1987)

*EFFECTO DEL ACIDO ABSCISICO (ABA) SOBRE EL CRECIMIENTO Y
DESARROLLO DE SEMILLAS DE Cicer arietinum L.*

*Memoria que presenta la Licenciada
en Ciencias Biológicas Ma Encarnación
Merlo Calvente para aspirar al grado
de Doctor.*

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ma Encarnación Merlo Calvente', written in a cursive style.

Fdo.: Ma Encarnación Merlo Calvente

ANGEL MATILLA CARRO, CATEDRATICO DE BIOLOGIA
VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICO: Que la presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo mi dirección, por la licenciada Da Ma Encarna Merlo Calvente, y que cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y, para que así conste, firmo el presente en Granada a 18 de Diciembre de mil novecientos ochenta y siete.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a circular scribble. The signature appears to read 'Angel Matilla Carro'.

Fdo.: Angel Matilla Carro

Quiero dar las gracias, en primer lugar, al Dr. Angel J. Matilla Carro, Catedrático de Biología Vegetal de la Universidad de Granada y Director de esta Tesis Doctoral, por haberme introducido en el apasionante campo que es la investigación científica, a través de este trabajo. Por otro lado, quiero agradecerle sus enseñanzas técnicas y humanísticas, así como su amistad y su colaboración en todo momento.

También quiero dar las gracias a Federico García, del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por su desinteresada ayuda en la realización de la electroforesis y autorradiografía. Al Departamento de Medicina Preventiva y Social de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, por el uso de las ultracentrífugas para la obtención de polisomas. Al Departamento de Radiología y Fisioterapia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por la medida de los viales. Y, al Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de esta Universidad por las facilidades concedidas en la utilización de sus aparatos y materiales.

Mi más sincero agradecimiento a Manolo, a Isabel Sánchez, a Inmaculada, a Pili y a los demás compañeros del antiguo Dpto. de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias por su amistad que ha hecho más agradable mi estancia en el Dpto., y, especialmente, a Luis Romero por su ayuda en la mineralización de las muestras.

Y, a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han tenido que ver con la realización de esta Memoria, especialmente a Juan y a Jose, muchas gracias.

A Juan

A mis padres

A B R E V I A T U R A S

- ABA: Acido abscísico
- ABAGE: Ester glucosa del ácido abscísico
- ABAGS: Ester glucosa del ácido abscísico en forma piranósica
- ABAH: Forma no disociada de la molécula de ácido abscísico
- Ac₂Mg: Acetato magnésico
- AF: Acido faseico
- ADF: Acido dihidrofaseico
- ADFGS: Ester glucosa del Acido dihidrofaseico
- ADN: Acido desoxirribonucleico
- AIA: Acido indolacético
- AMV: Acido mevalónico
- ANA: Acido naftalenacético
- ARN: Acido ribonucleico
- ARNm: Acido ribonucleico mensajero
- ARN-poli (A): Acido ribonucleico mensajero poliadenilado
- ARNr: Acido ribonucleico ribosómico
- ARNt: Acido ribonucleico transferente
- ATC: Acido tricloroacético
- ATP: Adenosin trifosfato
- ATPasa: Enzima hidrolítica del ATP
- A₂₆₀: Absorción a 260 nm
- A₂₈₀: Absorción a 280 nm
- Cald: Caldmodulina
- CD: Cadaverina
- CH: Cicloheximida

Cols.: Colaboradores
CPM: Cuentas por minuto
d: daltons
DO: Densidad óptica
 Δ DO: Incremento densidad óptica
DSS: Dodecil sulfato sódico
DTT: Ditioneitol
EDTA: Etilen-diaminotetra-acético
EGTA: Etilenglicol-bis-(B-aminoacilester)-N,N,N',N'-tetra acético
Epi-ADF: Epímero del ácido dihidroflavono
FC: Fusicoccina
FPP: Farnesil pirofosfato
FU: Fluoruracilo
GA(s): Giberelinas
GA₃: Ácido giberélico
GTP: Guanosin trifosfato
h: Horas
HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
Kd: Kilodaltons
mA: Miliamperios
Malato-DH: Malato deshidrogenasa
MeABA: Éster metílico del ABA
min.: minutos
mS: Milisegundos
NADPH: Nicotinamida-adenil-dinucleótido-fosfato reducido
ORD: Espectro de dispersión rotatoria

PAs: Poliaminas
PEP-Casa: Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEG: Polietilenglicol
Pi: Fosfato inorgánico
pnPP: Para-nitro-fenilfosfato
POPOP: 1,4-bis-2,4-metil-5-fenil-oxazolil-benceno
PPO: 2,5-dimetiloxazol
RNasa: Ribonucleasa
rpm: Revoluciones por minuto
RuDPCasa: Ribulosa difosfato carboxilasa
S: Coeficiente de sedimentación
SP: Espermina
SPD: Espermidina
t: Tiempo
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TRIS: Hidroximetil aminometano
TU: Tiourea
UT: Unidades totales
 μ C: Microcurios
v: Velocidad
VMT: Virus del mosaico del tabaco

INDICE

INTRODUCCION

1. PAPEL DEL ABA EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS EUCARIOTAS	1
1.1. <u>Introducción</u>	2
1.2. <u>Generalidades de las fitohormonas</u>	4
1.3. <u>Los receptores hormonales en plantas</u>	5
1.4. <u>El ácido abscísico (ABA)</u>	9
1.4.1. Características generales	9
1.4.2. Biosíntesis en plantas superiores	13
1.4.3. Lugares de biosíntesis	16
1.4.4. Control de la biosíntesis	17
1.4.5. Metabolismo del ABA y su localización ...	20
1.5. <u>Fisiología del ácido abscísico</u>	27
1.5.1. Transporte iónico y propiedades del plas- malema	27
1.5.2. Estrés hídrico	36
1.5.3. Acción sobre la expresión génica	44
1.6. <u>Mecanismo de acción del ABA durante la germinación de semillas</u>	49
1.6.1. Características de la germinación	49
1.6.2. El ABA y el desarrollo de la semilla	55
1.6.3. Relaciones con la dormición y germinación	66
1.6.4. Efecto sobre actividades enzimáticas	77
1.6.4.1. RIBONUCLEASAS	77
1.6.4.2. FOSFATASAS	87

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	95
------------------------------------	----

MATERIAL Y METODOS

3.1. <u>Material biológico empleado</u>	98
3.2. <u>Siembra y germinación</u>	98
3.2.1. Siembra de ejes embrionarios	98
3.2.2. Siembra de semillas enteras	99
3.3. <u>Determinación del peso fresco</u>	100
3.4. <u>Determinación del peso seco y porcentaje en agua.</u>	100
3.5. <u>Mineralización y determinación de elementos minerales</u>	101
3.6. <u>Valoración de la actividad ribonucleásica</u>	103
3.6.1. Obtención del sobrenadante	103
3.6.2. Fundamento de la reacción	104
3.6.3. Reacción enzimática	104
3.6.4. Definición de actividad ribonucleásica ..	105
3.6.5. Efecto del pH	105
3.6.6. Efecto de la temperatura	105
3.6.7. Concentración de sobrenadante	105
3.6.8. Empleo de diferentes sustratos	106
3.6.9. Diálisis	106
3.7. <u>Valoración de la actividad fosfatasa ácida</u>	107
3.7.1. Obtención del sobrenadante	107
3.7.2. Fundamento de la reacción	107
3.7.3. Reacción enzimática	108
3.7.4. Concentración de sustrato	108
3.7.5. Efecto del pH	108

3.7.6.	Efecto de la temperatura	109
3.7.7.	Efecto del tiempo de reacción	109
3.7.8.	Efecto de la concentración de p-nitro- fenil-fosfato	109
3.7.9.	Efecto del calcio	110
3.7.9.1.	EN EXTRACTO DIALIZADO	110
3.7.9.2.	EN EXTRACTO SIN DIALIZAR	110
3.7.10.	Definición de actividad fosfatásica	110
3.8.	<u>Valoración de proteínas totales</u>	111
3.9.	<u>Valoración de aminoácidos</u>	112
3.10.	<u>Valoración de azúcares</u>	113
3.11.	<u>Medida de la conductividad</u>	113
3.12.	<u>Obtención de polisomas</u>	115
3.13.	<u>Extracción y fraccionamiento del ARN (poly A)</u> ...	116
3.13.1.	ARN polisomal	116
3.13.1.1.	ARN-poly (A ⁺)	117
3.13.1.2.	ARN-poly (A ⁻)	119
3.13.2.	Cuantificación de ARN-poly (A ⁺)	119
3.14.	<u>Sistema de traducción derivado de germen de trigo</u>	119
3.14.1.	Preparación del germen de trigo	119
3.14.2.	Ensayo de traducción	121
3.14.3.	Traducción de ARNm	122
3.15.	<u>Identificación de los productos sintetizados "in vitro"</u>	122
3.15.1.	Electroforesis unidimensional	122
3.15.1.1.	PREPARACION DE LAS MUESTRAS ...	122
3.15.1.2.	PREPARACION DE LOS GELES	123
3.15.1.3.	ELECTROFORESIS	124

3.15.1.4. AUTORRADIOGRAFIA	125
----------------------------------	-----

RESULTADOS

4.1. <u>Efecto del ácido abscísico sobre el crecimiento y desarrollo</u>	130
4.1.1. Crecimiento de ejes embrionarios	130
4.1.2. Contenido en agua	131
4.1.3. Contenido endógeno de iones en ejes embrionarios	134
4.1.3.a. CONTENIDO EN POTASIO (K^+)	134
4.1.3.b. CONTENIDO EN POTASIO EN EL MEDIO DE INCUBACION	137
4.1.3.c. CONTENIDO ENDOGENO DE Ca^{++} , Na^+ , Mg^{++} Y Mn^{++}	137
4.1.4. Efecto de poliaminas sobre el crecimiento inducido por ABA	140
4.1.4.a. EFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL CRECIMIENTO	140
4.1.4.b. EFECTO DE POLIAMINAS + ABA SOBRE EL CRECIMIENTO	145
4.1.4.c. EFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBRE EL CONTENIDO IONICO EN EJES EMBRIONARIOS DE SEMILLAS ENTERAS	145
4.2. <u>Efecto del ácido abscísico sobre la actividad ribonucleásica</u>	151
4.2.1. Características de la actividad RNásica .	158

4.2.2.	Efecto del ABA sobre la actividad RNásica en ejes aislados	161
4.2.3.	Efecto de las poliaminas sobre la actividad RNásica soluble	170
4.2.3.a.	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE POLIAMINAS	170
4.2.3.b.	POSIBLES ACCIONES DE LAS POLIAMINAS	170
4.2.3.c.	EFFECTOS DE LAS POLIAMINAS + CH.	173
4.2.4.	Efecto del ABA + poliaminas sobre la RNasa	173
4.2.5.	Actividad RNásica en semilla entera: efecto de PAs	176
4.3.	<u>Efecto del ABA sobre la actividad fosfatasa ácida</u>	180
4.3.1.	Propiedades bioquímicas de la fosfatasa ácida	180
4.3.2.	Efecto del calcio	182
4.3.3.	Efecto del Pi sobre la actividad fosfatasa "in vitro"	185
4.3.4.	Fosfatasa ácida y expresión génica	187
4.3.5.	Variaciones en fósforo durante la germinación	189
4.3.6.	Actividad fosfatásica durante la germinación	189
4.3.7.	El ácido abscísico y la fosfatasa ácida .	191
4.3.8.	Poliaminas y fosfatasa ácida	194
4.3.9.	Efecto del ácido abscísico y poliaminas, añadidas conjuntamente, sobre la actividad fosfatasa ácida	194

4.4.	<u>Permeabilidad celular</u>	197
4.4.1.	Poliaminas y germinación	197
4.4.2.	Efecto de poliaminas sobre la conductividad	199
4.4.3.	Contenido de aminoácidos en el medio	201
4.4.3.1.	EFECTO DEL ACIDO ABSCISICO	201
4.4.3.2.	EFECTO DE LAS POLIAMINAS	201
4.4.4.	Contenido de azúcares en el medio	201
4.4.4.1.	EFECTO DEL ACIDO ABSCISICO	204
4.4.4.2.	EFECTO DE POLIAMINAS	204
4.4.5.	Contenido en polipéptidos en el medio ...	204
4.4.6.	Efecto del ABA sobre la conductividad ...	209
4.5.	<u>Efecto del ABA sobre la síntesis proteica "in vitro"</u>	211
4.5.1.	Variaciones de ARN polisomal	211
4.5.2.	Extracción y cuantificación de ARN-poly (A ⁺)	213
4.5.3.	Actividad biológica del ARNm (poly A ⁺) ..	213
	DISCUSION	221
	CONCLUSIONES	236
	BIBLIOGRAFIA	240

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. PAPEL DEL ABA EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS EUCARIOTICAS

1.1. Introducción

En el desarrollo de las plantas eucarióticas, se pueden considerar tres niveles:

1) Crecimiento celular: son todos aquellos cambios cuantitativos que tengan lugar a nivel celular. Estos cambios se producen por medio de dos procesos, el de elongación celular que es el crecimiento de la célula en un sentido, y el de división celular.

2) Diferenciación celular: Las células evolucionan de determinada forma y se agrupan formando los tejidos. Este proceso ocurre simultáneamente con el crecimiento celular.

3) Desarrollo: Es el crecimiento y la diferenciación, pero abarcando un órgano o un organismo completo.

Estos procesos, aparentemente tan sencillos, son de una gran complejidad y además, de ellos depende la vida vegetal en la Tierra. Esto explica la gran importancia que siempre ha tenido el estudio de aquellos factores que puedan controlar los procesos de crecimiento y desarrollo. Sin embargo, en la actualidad, los conocimientos que se tienen sobre el tema son más bien escasos.

¿Cómo se realiza el control de los procesos de crecimiento y desarrollo?

En términos bioquímicos, lo que determina aquello que va a ocurrir en una célula, es la presencia o ausencia de determinados enzimas específicos, dependiendo de distintos factores. Por un lado, la diferenciación se puede considerar como una expresión diferencial de los genes. Por otro lado, no todos los procesos morfogénéticos van a estar controlados genéticamente. Por ejemplo, algunos procesos se controlan por activación o inactivación de enzimas ya existentes, regulación de tipo alostérico, etc.

Los procesos morfogénéticos dependen también, en gran medida de los factores ambientales, sobre todo de la luz y de la temperatura.

Se sabe que las hormonas vegetales están implicadas en la regulación de estos procesos. Su actuación puede ocurrir sobre la proteínosíntesis del enzima, desde la autoduplicación y transcripción del ADN, hasta la traducción del ARNm, formación de polisomas, etc. O, controlando la actividad del enzima. Parece ser, por lo que se conoce hasta el momento, que actúan principalmente sobre el ADN y sobre la permeabilidad de las membranas.

En última instancia, los factores ambientales son los que controlan la formación de las hormonas y a través de ellas, los procesos morfogénéticos.

Actualmente, se conocen varios grupos de hormonas vegetales naturales. Se clasifican en promotoras e inhibidoras. Entre las primeras se incluyen auxinas, giberelinas y citoquininas. La hormona típicamente inhibidora es el ABA, aunque últimamente se tiende a pensar en ella como un regulador del crecimiento, ya que

según los lugares de actuación y las condiciones, promueve o inhibe determinado proceso. Otra hormona de este tipo es el etileno que se encuentra en estado gaseoso en la planta.

1.2. Generalidades de las fitohormonas

Como hemos expresado anteriormente, las sustancias reguladoras del crecimiento (hormonas vegetales) juegan un papel muy importante en el desarrollo de las plantas, afectando a gran cantidad de procesos morfogénéticos, todos ellos muy significativos a lo largo de la vida de la especie en cuestión. Aunque su estudio se inició hace más de 50 años y, en la última década, se ha avanzado mucho, todavía no se puede decir que exista un mecanismo de acción conocido para una fitohormona concreta, ni siquiera para la auxina, la hormona que más se ha estudiado por sus implicaciones en el crecimiento celular. A esto se debe añadir que todavía no se ha aclarado cómo las sustancias reguladoras del crecimiento afectan al desarrollo de la planta puesto que, si bien, algunos investigadores opinan que los cambios en la concentración hormonal es lo más importante (CLELAND, 1983), otros sostienen que lo principal es la sensibilidad que tenga el tejido frente a una fitohormona concreta (TREWAVAS, 1983). Existe un tercer grupo de investigadores que piensan que las fitohormonas no son las responsables de ciertos procesos del desarrollo de la planta, particularmente aquellas respuestas muy rápidas (< 300 ns) a estímulos ambientales, lo que inicia una **tercera dimensión en el control del desarrollo de las plantas**, según calificación de los

autores FIRN y DIGBY (1984).

Nos referiremos en este Trabajo a una fitohormona a la que, en la actualidad, se dedica gran atención ya que afecta a muchos procesos fisiológicos, todos ellos de gran importancia en el desarrollo de la planta y que, en 1968 ADDICOTT nombró como ácido abscísico (ABA). Aunque el descubrimiento de esta fitohormona está relacionado con el reposo y la abscisión, se ha demostrado que es un regulador del crecimiento con un papel importante en gran número de procesos de la fisiología de la planta.

1.3. Los receptores hormonales en plantas

La actividad de cada hormona vegetal viene determinada por su estructura y por la estereoespecificidad de la molécula. Por ello, es razonable pensar que cada molécula posea un receptor que la reconozca y como consecuencia de esta unión se produzca el mecanismo de acción de la sustancia reguladora de crecimiento considerada. De este modo, sería lógico el comprender la existencia de diferencias entre las hormonas y sus análogos, que a veces son tan sutiles.

Las hormonas en general, tanto animales como vegetales, ejercen efectos fisiológicos o bioquímicos que son específicos para cada caso. Así, las moléculas hormonales deben de ser reconocidas por la célula y discriminadas de alguna manera de otros compuestos. Los receptores pueden ser los responsables de este reconocimiento; pero, así como en animales el problema está relativamente claro, en plantas, aunque han sido identificados para la mayoría de las fitohormonas lugares de unión ("binding

sites"), en ningún caso esta unión es la respuesta primaria del mecanismo de acción. En otras palabras, no se ha comprobado que estos lugares de unión sean los verdaderos receptores, los cuales podrían estar implicados en el control de la sensibilidad del tejido afectado.

TREWAVAS (1982) sugiere que las fitohormonas actúan modificando el plasmalema, ya sea en su estructura o en su función, con un receptor implicado en el proceso; pero modificaciones similares pueden realizarlas otras sustancias o estímulos. En realidad, esta hipótesis puede ser válida si tenemos en cuenta lo que sucede con la auxina, fitohormona que ha sido, por las razones apuntadas anteriormente, ampliamente estudiada. Así, se sabe que en coleóptilos de maíz, la localización del mayor número de lugares de unión se encuentra en el retículo endoplasmático, el cual bombea H^+ , incluidos en vesículas que son desprendidas en el entorno de la pared celular (RAY, 1977) causando el crecimiento ácido (RAYLE y CLELAND, 1970). Sin embargo, la toxina fúngica fusicoccina puede causar una respuesta similar, también por una estimulación del flujo de H^+ debido a una ATPasa localizada en el plasmalema (MARRE, 1979). Parece obvio que dos compuestos pueden causar idéntica respuesta, aunque por diferentes mecanismos. Ahora bien, la presencia para la auxina de tres lugares de unión relacionados con las membranas y uno con el citoplasma, respecto a uno sólo para la fusicoccina, nos lleva a pensar que la auxina regula el desarrollo morfogénético, cosa que la fusicoccina no puede, obviamente, realizar.

Quizás en este momento sea obligatorio preguntarse qué factores pueden regular la sensibilidad del tejido a la fitohormona: ¿es la concentración de receptores? o ¿es la propia hormona la que regula la concentración de los receptores como sucede en muchos sistemas de mamíferos?. R. STARLING ha publicado que la concentración de lugares de unión para el ANA en callo de tabaco aumenta 10v. si se incrementa 1000v. la concentración de ANA en el medio de cultivo. TREWAVAS demostró que la aplicación de 2,4-D a tejidos de alcachofa produce un aumento del número de sitios de unión ("binding") en estos tejidos (TREWAVAS, 1980). Recientemente, se ha demostrado que, si se incuban raíces de avena con AIA, incrementa el número de lugares de unión de alta afinidad para este compuesto; sin embargo, este aumento puede impedirse utilizando un tratamiento con cicloheximida, lo que parece indicar que la auxina eleva la síntesis o la actividad de sus propios lugares de unión (BHATACHARYA y BISVAS, 1982).

El carácter proteico de los receptores que parece demostrar el Prof. BISVAS todavía no está claro en el mundo vegetal, aunque debido a que el primer lugar de acción de algunas fitohormonas son las membranas, parece lógico pensar en su carácter proteico.

Centrándonos sobre los receptores del ABA, debemos asumir que la célula vegetal sensible a esta fitohormona posee receptores capaces de responder a esta sustancia reguladora del crecimiento. Sin embargo, todavía no se conocen. Los estudios han comenzado a cobrar importancia debido a la participación del ABA en el proceso de apertura y cierre de estomas en el que el ABA exógeno induce en un tiempo muy corto el cierre del ostiolo,

lo que parece indicar que la fitohormona alcanza pronto el lugar de acción. En el año 1978 HOCKING y cols. fueron capaces de detectar lugares de unión saturables de ^3H -ABA en fracciones membranosas de hojas de *Vicia faba*; en principio, esto parece indicar que es una adsorción específica del ABA por parte de la célula sensible a él (target tissue). Este equipo investigador llega a la conclusión de que existen dos lugares de unión en la célula.

HORNBERG y WEILER (1984) han encontrado, localizadas en el plasmalema de las células guarda de *Vicia faba*, proteínas específicas de alta afinidad al ABA, que presentan las características de los receptores del inhibidor. Además, ASTLE y RUBERY (1985) han confirmado la existencia de dos formas de transporte del ABA, en cultivos celulares en suspensión de *Phaseolus coccineus*: una forma mediada por un transportador saturable y un transporte por difusión pasiva (no saturable), debido a que la forma no disociada del ABA (ABAH) es soluble en la fracción lipídica de la membrana.

En la actualidad se conocen dos tipos de respuestas del tejido vegetal al ABA añadido exógenamente: una respuesta rápida, por la que en pocos minutos se consume el efecto de la fitohormona; y una respuesta lenta, cuya acción se detecta después de varias horas e incluso días. Si analizamos detenidamente el porqué de la primera respuesta, de la que el ejemplo más conocido es el transporte de K^+ en las células guarda, llegamos a la conclusión de que están implicados procesos de membrana, ya que, en tan corto espacio de tiempo, no se puede realizar síntesis de ácidos nucleicos o proteínas. Sin embargo,

parece más razonable pensar esto en el segundo tipo de respuesta cuyo ejemplo más conocido es el proceso de abscisión y senescencia de la hoja. A lo que debemos añadir que la toxina FC puede revertir las respuestas rápidas del ABA, pero no las lentas (GALLI y cols., 1979).

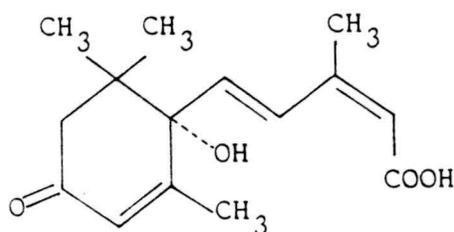
1.4. El ácido abscísico (ABA)

1.4.1. **Características generales**

La presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento se conoce desde hace mucho, pero no empezaron a ser bien estudiadas hasta que BENNET-CLARK y cols. encontraron las auxinas A y B. TAMBIAH y KEFFORD (1952) cromatografiaron la fracción ácida de extractos alcohólicos de distintas plantas y de fragmentos de coleóptilos de avena, encontrando una banda donde existía un acelerador del crecimiento, y otra con una potente actividad inhibidora del crecimiento que fue llamada inhibidor β (BENNET-CLARK Y KEFFORD, 1953).

A partir de aquí, y durante la década de los 50, se estudió bioquímica y fisiológicamente este β -inhibidor. ROBINSON y WAREING (1964) encontraron un inhibidor en yemas durmientes de *Acer pseudoplatanus* y *Betula pendula*, cuya cantidad estaba correlacionada con el vigor de la dormancia de la yema. Este inhibidor al que llamaron "dormina" fue aislado de hojas de sicomoro por CORNFORTH y cols. (1965). Por otra parte, se había podido aislar un acelerador de la abscisión llamado "abscisina II" (OKHUMA y cols., 1963). Comparando los espectros de

resonancia magnética de ambos compuestos se llegó a la conclusión de que eran la misma sustancia. La abscisina II que fue llamada ácido abscísico (ABA) fue sintetizada en 1965 por CORNFORTH y cols. (CORNFORTH y cols., 1965). La molécula ópticamente activa (+)-(s)-ABA presenta la estructura:



(+)-2-cis-ABA

También se vió que el ABA jugaba un importante papel en gran número de procesos fisiológicos que tienen lugar en la planta. Por ejemplo, su descubrimiento estuvo relacionado con la entrada en reposo de las yemas de plantas leñosas y con la abscisión de las cápsulas de algodón. Así mismo, se ha visto que es un potente inhibidor de la apertura estomática (MITTELHEUSER y VAN STEVENICNCK, 1969), y que su contenido aumenta rápidamente en hojas sometidas a un moderado estrés hídrico (WRIGHT, 1969).

Aunque no se ha encontrado una relación directa entre el estado fisiológico de una planta y el contenido de ABA, sí se conoce algo respecto a los efectos de esta hormona en el crecimiento.

Cuando el ABA se aplica a órganos en crecimiento, se observa una acción inhibidora del mismo. Su presencia, parece actuar como

un débil freno del crecimiento normal (MILBORROW, 1974a; WALTON, 1980). El papel del ABA sobre la inhibición correlativa es incierto (DÖRFFLING, 1976), ya que aunque está presente en las yemas laterales inhibidas, no se encuentra variación en su contenido cuando dichas yemas están libres de la dominancia apical (WHITE y MANSFIELD, 1977). Además, algunos autores sugieren que el ABA puede tener efectos promotores en el crecimiento de las yemas laterales, bajo ciertas condiciones.

Hay pocos experimentos en los que el ABA actúe como promotor del crecimiento. Entre ellos, la estimulación del desarrollo de semillas partenocárpicas, arraigamiento de cortes, crecimiento de callos de soja en presencia de quinetina, y la elongación de hipocótilos de pepino y de raíces excindidas de algunos tipos de guisantes. McWHA y JACKSON (1976), han sugerido que este efecto estimulador del ABA es más frecuente si se aplica a muy bajas concentraciones (10^{-9} M).

Sin embargo, cuando se aplica ABA a órganos sin crecimiento, se encuentra que inhibe la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, afecta a las membranas, a la cantidad de otras fitohormonas presentes, y puede inducir cambios degenerativos como la abscisión y la senescencia.

También hace tiempo que se conoce la presencia de sustancias inhibitoras, formadas en respuesta a la gravedad y a la luz en la raíz. Por ejemplo, WILKINS y WAIN (1974) demostraron que el ABA está presente en raíz de *Zea mays*, pero sólo después de un tratamiento con luz; éste es necesario para que se produzca una respuesta geotrópica. PILET (1970), al aplicar ABA exógeno, que

inhibe la elongación de la raíz, a raíces mantenidas en posición horizontal, encontró que el inhibidor se movía basipétalmente y que daba lugar a una respuesta geotrópica positiva.

Como su nombre indica, el ABA fue aislado originariamente como una sustancia aceleradora de la abscisión (OHKUMA y cols., 1965), aunque en otros trabajos se ha visto que tiene poca acción sobre plantas intactas. Este efecto se encontró por primera vez en cápsulas de algodón, aunque posteriormente se han encontrado respuestas al ABA similares en otras plantas.

Así mismo, se ha sugerido que el ABA está implicado en la inducción y el mantenimiento de la dormancia. Esta sugerencia se basó en que los tubérculos durmientes de patata y las yemas en reposo de árboles de hoja caduca, contenían más ABA que los que germinaban y crecían. Además, las citoquininas y las giberelinas, que antagonizaban la acción del ABA en muchos ensayos, rompían la dormancia. Actualmente se piensa que el ABA tiene una importante función en los fenómenos de dormancia, pero como componente necesario de un sistema y no como desencadenante directo de la misma. El papel del ABA en el caso de dormancia de semillas está mejor establecido que para las yemas, pero la correlación ABA-dormición tampoco es exacta (WAREING y SAUNDERS, 1971).

Por otro lado, se sabe que la aplicación de ABA en frutos tiene poco efecto, excepto en el caso de la maduración del grano de uva (COOMBE y HALE, 1973), aunque el tejido del fruto maduro es una fuente de ABA. En cuanto a la semilla, el ABA está presente en cantidades medianamente constantes en el desarrollo de la misma, aunque se ha detectado una pequeña elevación,

seguida de una caída en el contenido de ABA a la mitad del desarrollo, con una amplia elevación final en la semilla madura (DAVIS y ADDICOTT, 1972).

Los descubrimientos de que el ABA se acumulaba en hojas de plantas mesofíticas sometidas a estrés hídrico (WRIGHT, 1969) y de que el ABA exógeno, aplicado a hojas intactas o a fragmentos epidérmicos aislados, puede iniciar el proceso de cierre de los estomas (HORTON, 1971; LITTLE, 1968), indujo a elaborar la hipótesis de que el ABA está implicado en la regulación de la apertura estomática en plantas con estrés hídrico (JONES y MANSFIELD, 1970; WRIGHT, 1969).

Por otra parte, parece ser que el ABA protege a las plantas de la toxicidad y las hace más resistentes al daño.

1.4.2. **Biosíntesis en plantas superiores**

Hay diversos factores que dificultan el estudio de la biosíntesis del ABA. Al igual que ocurre con otros reguladores del crecimiento en plantas, el ABA está presente en los tejidos vegetales, a muy bajas concentraciones (20-1000 ng/g peso fresco, lo que equivale a 10^{-7} — 5×10^{-6} M), en hojas marchitas. Por consiguiente, las concentraciones de los intermediarios son todavía más bajas. El descubrimiento en 1977 del hongo Deuteromycete **Cercospora rosicola**, que produce grandes cantidades de ABA (más de 60 mg/l) y de otros intermediarios, como metabolitos secundarios (ASSANTE y cols., 1977), ha provisto a los investigadores de un excelente medio para estudiar la ruta biosintética del ABA, aunque los conocimientos que se tienen

hasta el momento, no son totalmente extrapolables a plantas superiores.

Otro importante problema que se encuentra al estudiar la biosíntesis del ABA, es conocer la fase del desarrollo exacta en la que se sintetiza este regulador del crecimiento.

La estructura química del ABA, sugiere que es un sexquiterpeno, derivado del precursor general de todos los terpenoides, un compuesto de 6C llamado ácido mevalónico (AMV). La ruta biosintética del ABA parece ser distinta en hongos y plantas superiores. En estas últimas, se han propuesto dos rutas para la biosíntesis del ABA a partir del AMV:

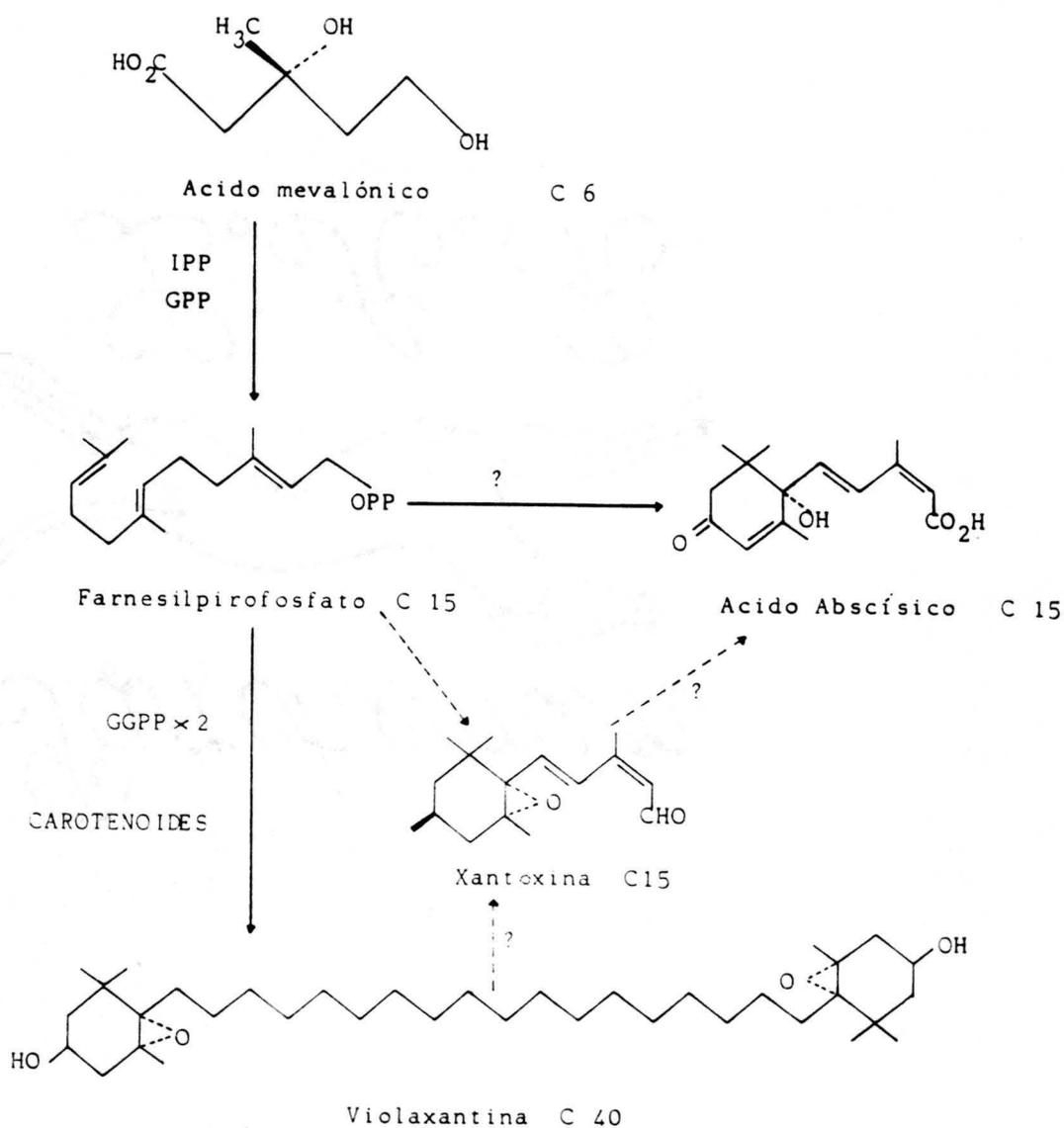
1) Ruta directa "C15": El ABA se formaría directamente a partir de un precursor de 15C, el farnesilpirofosfato (FPP).

2) Ruta indirecta "C40": Implica la existencia de un intermediario de 40C, la violaxantina (NEILL y cols., 1984).

Se han llevado a cabo muchos trabajos para tratar de determinar cuál es la vía de biosíntesis "in vivo" del ABA, en plantas superiores. Se han encontrado algunas evidencias a favor de cada una de las vías sin que, hasta el momento, se puedan dar conclusiones definitivas.

ROBINSON (1969), utilizando fitoeno (precursor de los carotenoides) marcado con ^{14}C y ^3H -AMV, encontraba que el ^{14}C sólo aparecía en el β -caroteno formado, mientras que el ^3H aparecía tanto en el β -caroteno como en el ABA, lo que evidenciaba que la biosíntesis del ABA se llevaba a cabo vía directa por la ruta C15. FIRN y cols. (1972) y BEARDER (1980), llevaron a cabo distintas observaciones que les permitieron sugerir que, "in vivo", la oxidación de la violaxantina podría dar lugar a

xantoxina y, presumiblemente, a ABA. Hay otras evidencias a favor de la ruta indirecta. En este sentido están los trabajos llevados a cabo con inhibidores de la biosíntesis de carotenos, fluridona (FONG y cols., 1983) y norflurazona (QUARRIE y LISTER, 1984; HENSON, 1984). Estos compuestos, aplicados a plantas, inhiben tanto la síntesis de carotenos como de ABA.



Esquema I. Ruta biosintética del Acido Abscísico: Vías C 15 y C 40 (NEILL y col., 1984).

1.4.3. Lugares de biosíntesis

El ABA se ha detectado en todas las plantas investigadas, tanto Angiospermas como Gimnospermas y en algunos Pteridófitos, y en todos los tejidos. Pero su presencia en ellos, no debe hacer pensar que se hayan sintetizado allí.

Así, en la hoja parece llevarse a cabo biosíntesis de ABA, ya que se ha visto que los niveles de este aumentan cuando las hojas se marchitan. Por otras parte, tanto en tallos como en yemas aisladas y en raíces (KNOX, 1982; WALTON y cols., 1976), los niveles de ABA aumentan en respuesta al estrés.

En varios tejidos como semillas, raíces, hojas y tallos, se ha podido demostrar la incorporación de AMV marcado en el ABA (MILBORROW y ROBINSON, 1973). Esto parece indicar que son diversos los lugares de síntesis del ABA, dentro de la planta.

El tejido epidérmico, por los datos que se conocen hasta el momento, parece que es incapaz de sintetizar ABA. Por ejemplo, LOVEYS (1977) comprobó que, epidermis aislada de *Vicia faba* antes del estrés osmótico, no respondía a éste aumentando los niveles de ABA, mientras que, si la epidermis se separa del mesófilo después del estrés, presentaba un aumento en la cantidad del inhibidor. Hay experimentos parecidos en *Commelina communis* (DÖRFFLING y cols., 1980), etc.

Sin embargo, esto podría deberse también a que durante el proceso de aislamiento de la epidermis, se produzcan daños en las células, o a que se requiera algún factor o factores mesofílicos para la síntesis del ABA. Además, en algunas experiencias semejantes sí se ha conseguido sintetizar ABA.

En cuanto al lugar de síntesis dentro de la célula, hay distintas hipótesis. Así, según MILBORROW (1974b), la biosíntesis del ABA debe tener lugar dentro del cloroplasto (o leucoplasto, en tejido no fotosintético), de lo que obtuvo evidencias, utilizando AMV marcado. Así mismo, combinando cromatografía de gas-espectrofotometría de masas, se ha podido localizar al ABA en cloroplastos de guisante (RAILTON y cols., 1974). Aunque esto no indica que, necesariamente, se haya producido en ellos. Por el contrario, podría haber entrado en el cloroplasto ayudado por el gradiente de pH entre el citoplasma y el estroma del cloroplasto. En algunos casos se ha encontrado que la envuelta del cloroplasto es impermeable al AMV, o si es permeable, no puede usarlo.

Actualmente, la hipótesis más aceptada es que el ABA se formaría en el cloroplasto, a partir del isopentenil pirofosfato que es un producto intermediario clave, en la síntesis de los terpenos. Este se formaría en el citoplasma y entraría en los plastidios antes de su conversión en terpenos de mayor tamaño.

1.4.4. Control de la biosíntesis

A pesar de la abundancia de trabajos que estudian la biosíntesis del ABA, como hemos visto anteriormente, aún no se pueden hacer hipótesis firmes al respecto. Algo parecido ocurre con el conocimiento de los mecanismos de control que regulan el proceso biosintético del ABA: sólo se tienen algunos datos al respecto.

En principio se pensaba que la transición de días largos a

días cortos, podía inducir cambios en los niveles de ABA y dirigir la dormancia de las yemas. Pero, en trabajos recientes, no se ha conseguido correlacionar los niveles de ABA con la duración del día (WALTON, 1980).

También puede haber variación en los niveles de ABA según el estadio fisiológico de la planta, sin que se conozca como se lleva a cabo la regulación de este proceso.

Se han conseguido mutantes vivíparos de centeno que germinan precozmente en la espiga y que contienen bajos niveles de ABA (SMITH y cols., 1978). Estos mutantes constituyen un material adecuado para el estudio de la biosíntesis del ABA. El mejor ejemplo de que un factor ambiental afecta a la síntesis del ABA lo aportaron HIRON y WRIGHT (1973). Comprobaron que el estrés hídrico inducía un aumento de los niveles de ABA en hojas y tallos, aunque no tenía este efecto en frutos, lo que les hizo pensar que debían existir diferentes mecanismos reguladores en los distintos tejidos. Otros autores han demostrado que debe existir un umbral inicial de potencial hídrico (Ψ) para que se inicie la síntesis de ABA (WALTON y cols., 1977).

Posteriormente, PIERCE y RASCHKE (1980) presentaron evidencias de que la clave para que se dispare la síntesis del ABA, está en la disminución del turgor. En especial, al hallar que en hojas sometidas a condiciones de estrés, el potencial hídrico necesario para inducir la síntesis de ácido abscísico era más bajo que en las hojas control. Las hojas sometidas a estrés incrementan su potencial osmótico, por la producción de solutos, con el resultado de que pueden mantener disminuido su turgor a valores más bajos del potencial hídrico. Más recientemente, se

ha sugerido que la disminución de la presión "per se" no puede ser el desencadenante de la producción de ABA (ACKERSON y RADIN, 1983). Sin embargo, no se sabe cómo estos estímulos se traducen en el aumento de la producción del ABA. Aunque, aparentemente, el ABA producido como consecuencia del estrés, procede de síntesis "de novo".

Otra forma de control de la producción de ABA parece ser el elevado nivel que éste alcanza, durante el estrés hídrico. Según MILBORROW (1978), la alta concentración del ABA opera como un inhibidor "feedback" negativo, impidiendo su posterior síntesis. Pudo comprobarse, que sometiendo brotes de tomate tratados con ABA exógeno a condiciones de estrés, los niveles del ABA endógeno no aumentaban. Por tanto, dedujo que el ABA exógeno había inhibido la síntesis posterior de nuevo ABA. Sin embargo, en otros experimentos anteriores (MILBORROW, 1974c), se ha comprobado que al aplicar ABA 2×10^{-4} M a preparaciones de cloroplastos, se estimula la síntesis de ABA a partir de AMV marcado.

HARRISON y WALTON (1975) piensan que una proporción alta entre síntesis y metabolismo, conduce a un constante aumento de los niveles de ABA.

La síntesis de ABA se detiene rápidamente cuando cesa el estrés hídrico, pero no se sabe cómo la restauración del turgor se transforma en una reducción de la actividad biosintética.

1.4.5. **Metabolismo del ABA y su localización**

El gran interés que ha despertado en los últimos años el estudio del ABA, se ha extendido también a su metabolismo.

Se puede considerar que en el metabolismo del ácido abscísico están implicados dos mecanismos: inactivación de la hormona activa (por destrucción de la misma o por enmascaramiento de una función esencial), y por la modificación de las propiedades hidrofílicas para hacerla altamente polar (lo que puede ocurrir por combinación de la molécula con un residuo glucosil o similar).

El metabolismo del ácido abscísico libre es un balance continuo entre su biosíntesis y su degradación. La degradación del ABA ocurre, como en las demás hormonas vegetales, por dos procesos: oxidación y conjugación. La conjugación consiste, según SEMBDNER y cols. (1972), en la formación de un enlace covalente especial, de tipo glucósido o ester, entre la hormona y otra molécula como, por ejemplo, un monosacárido o un aminoácido. También pueden formarse enlaces no covalentes con otras moléculas. Estos procesos dan lugar a la formación de isómeros y enantiómeros del ABA.

Los primeros experimentos sobre el tema los realizó MILBORROW (1967), aplicando (+)-[2-¹⁴C]ABA a segmentos de peciolo de haba y de sicomoro. Después de doce horas en contacto con el tejido, se detectaron tres compuestos marcados en un extracto con metanol: un compuesto neutro soluble en éter, otro compuesto insoluble en éter y altamente polar y, un tercer compuesto ácido, soluble en éter y algo más polar que el ABA. Se han encontrado

compuestos similares en brotes de tomate tratados con ABA marcado (MILBORROW, 1970).

El compuesto polar, soluble en agua, se identificó como (+)-abscisil- β -D-glucopiranosido (ABAGE), habiendo sido encontrado con anterioridad en frutos de *Lupinus luteus*, actuando como un inhibidor (KOSHIMIZU y cols., 1968).

El compuesto neutro era un metil ester ABA (MILBORROW, 1971) y se consideró como un artefacto producido por la extracción por metanolisis, en solución neutra o básica, del ABAGE (MILBORROW y MALLABY, 1975). También se pueden formar compuestos de este tipo a partir de conjugados del ABA, por un proceso de metanolisis.

El tercer compuesto marcado, formado en brotes de tomate, fue aislado como un sólido cristalino, con un espectro rotatorio de dispersión óptica (ORD) similar al del ABA, pero es un 6'-hidroximetil-ABA (MILBORROW, 1969). Este compuesto se isomeriza por un tratamiento con diazometano, dando lugar a ácido faseico (AF). El AF había sido aislado, previamente, por McMILLAN y cols. (1960) de semillas de haba. Posteriormente se descubrió un conjugado del 6'-hidroximetil-ABA, el 3'-hidroxi-3-metil-glutaril hidroxil-ABA (HIRAI y cols., 1978).

Se ha comprobado la presencia del 6'-hidroximetil-ABA en numerosas especies vegetales y, también, que el AF es un metabolito natural del ABA, que normalmente es reducido a ácido dihidrofaseico en plantas. La presencia de estos metabolitos fue puesta de manifiesto por WALTON y SONDHEIMER (1972) al aplicar ABA marcado a ejes excindidos de haba y comprobar que se formaba AF y ADF. El ADF era el producto de desactivación del ABA más abundante. Otro compuesto que se forma de manera natural en

brotos de haba es un epímero del ADF: el epi-ADF. Tanto el AF, ADF y epi-ADF, pueden formarse también como conjugados básicos lábiles (ZEEVAART y MILBORROW, 1976).

Aunque el ADF sea la forma de desactivación del ABA más abundante, no es el último metabolito de éste. MILBORROW y VAUGHAN (1982), así como HIRAI y KOSHIMIZU (1983), han demostrado recientemente la presencia del ADF-4'-O- β -D-glucopiranosido (ADFGS), en brotes de tomate y, probablemente, también sea el compuesto que caracterizó parcialmente SETTER y cols. (1981) en hojas y vainas de soja.

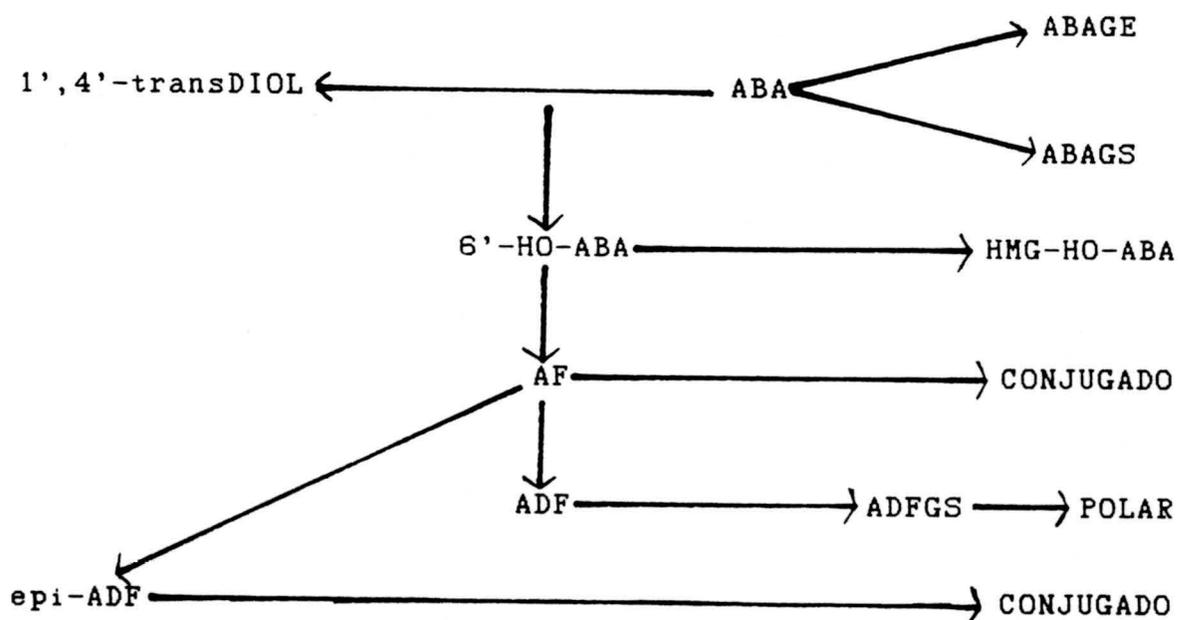
El aumento del contenido de ABA libre en extractos obtenidos de plantas, a los que sigue una hidrólisis alcalina, ha sido utilizado como una técnica para medir el llamado ABA conjugado, pero existe el peligro de que se piense que todos los conjugados son ABAGE.

Estudiando el metabolismo del ABA, a largo plazo, en semillas de manzana (MILBORROW y VAUGHAN, 1979) y el efecto del tipo de luz sobre el metabolismo del ABA (LOVEYS, 1979), se ha obtenido el compuesto 1'-O-ácido abscísico- β -D-glucopiranosido (ABAGS) (LOVEYS y MILBORROW, 1981). El ABAGE se produce en la naturaleza y es el metabolito más abundante del (+)-[2-¹⁴C] ABA en muchas plantas.

Se han descrito numerosos compuestos naturales, relacionados estructuralmente con el ABA, aunque no hay razones para afirmar que sean productos del metabolismo del ABA. Así, por ejemplo, MARTIN y cols. (1977) han demostrado la existencia del ácido hidroxifaseico u oxodihidrofaseico en semillas de pera; HOAD y

GASKIN (1980), han encontrado 2-transABA y ADF en exudados del floema del coco. Otro compuesto que se ha descrito como un metabolito del ABA es el 1',4'-trans-diol del ABA (MILBORROW, 1983). Sin embargo, no se ha podido probar, hasta el momento, que estos compuestos se formen naturalmente durante la desactivación del ABA.

En resumen, el patrón general que describe el metabolismo del ABA, sugiere que esta hormona es inicialmente oxidada a la forma 6'-hidroximetil-ABA y posteriormente se isomeriza en AF. El AF es reducido a ADF y epi-ADF, mientras que la combinación del ABA con glucosa forma ABAGE y ABAGS. Todos los metabolitos acidófilos son sometidos a un proceso de conjugación en el que puede ser liberado un grupo ácido, por una hidrólisis básica (ZEEVAART y MILBORROW, 1976), o ácida (MILBORROW y VAUGHAN, 1982). Las formas conjugadas se formarían porque son más estables que las formas acídicas, más sensibles estas últimas a la luz, enzimas, etc., y con una vida media muy corta. Se puede representar este patrón general por medio del siguiente esquema:



GUILLARD y WALTON (1976) han demostrado que el enzima que degrada el ABA a AF es una hidroxilasa (monooxigenasa dependiente de NADPH y de gran afinidad por O₂) que se encuentra asociada a membranas, es inhibida por CO y tiene alta especificidad por el sustrato [(+)-ABA]. El enzima que degrada el AF a ADF es soluble. Esto parece indicar que la degradación del ABA tiene lugar en el citoplasma celular.

En cuanto a los lugares donde se lleva a cabo el metabolismo del ABA, parece que ocurre en todas las partes de la planta, e incluso en el xilema y el floema. Sin embargo, como hemos apuntado en otras ocasiones, la presencia del ABA y de sus metabolitos en un órgano determinado, no demuestra que la síntesis y el metabolismo del mismo, se produzcan en él.

Se han hecho numerosos estudios sobre el metabolismo del ABA en partes aisladas de la planta. Por ejemplo, parece ser que el ABA es metabolizado en raíz de plantas de haba (WALTON y cols., 1976), ya que se han encontrado AF, ADF y otros metabolitos polares del ABA.

En semillas, ha sido muy estudiado este metabolismo, debido a la influencia del ABA sobre la dormancia de las mismas. Así, los altos niveles iniciales de ABA en grano de trigo, previenen la germinación precoz (KING, 1976). La disminución de los niveles de ABA y la maduración del grano de trigo están asociados con un aumento de los metabolitos del ABA, principalmente AF, ADF y otros compuestos polares (KING, 1979).

También se han encontrado metabolitos del ABA en semillas de lechuga (McWHA y HILLMAN, 1973), *Vigna unguiculata* (ADESOMUJO y cols., 1980), guisante (McMILLAN y cols., 1960), *Robinia* (HIRAI y

cols., 1978), altramuz (KOSHIMIZU y cols., 1968), **Echinocystis lobata** (WALTON y cols., 1976) y cebada (DASHEK y cols., 1979).

Parece ser que el ABA está compartimentalizado en la planta entera. A este respecto, DAIE y cols. (1984) propusieron que la presencia del inhibidor o de sus metabolitos es distinta según el tejido sea formador o almacenador de ABA. En los tejidos formadores existe, preferentemente, síntesis "de novo" de la hormona, y una cierta conjugación de ABA. Sin embargo, en los tejidos almacenadores tiene mayor importancia el catabolismo.

La mayor actividad, tanto en la síntesis como en la degradación del ABA, parece ocurrir en las hojas, debido al importante papel de éste como regulador de la conductancia estomática (HIRON y WRIGHT, 1973; ASPINALL, 1980). El mecanismo de control de los estomas responde a los cambios en el potencial hídrico. La respuesta de los estomas en un periodo de estrés hídrico puede depender de un agotamiento del ABA por su metabolismo o por su secuestro a un sitio inactivo (CUMMINS, 1973; RASCHKE, 1975). Como el sitio de acción del control estomático debe ser la epidermis y, principalmente, las células guarda, es lógico pensar que aquí exista un metabolismo activo del ABA. Sin embargo, experimentalmente se ha encontrado que el metabolismo existente en el resto de la hoja es mayor que el de la epidermis. El lugar de la hoja donde el metabolismo del ABA parece mayor, es el mesófilo. Y, concretamente, el citoplasma de las células mesofilicas.

Aunque, casi el 80% del ABA total de la hoja se almacena en el cloroplasto y, desde aquí, se distribuye a los distintos

compartimentos celulares, según los gradientes de pH entre el citoplasma y el estroma del cloroplasto, ya que el ABAH (no disociado) atraviesa las membranas por difusión (BRAY y ZEEVAART, 1986). Sin embargo, en éste orgánulo no se produce metabolismo del ABA

El metabolismo de una sustancia con actividad biológica, usualmente se considera como un mecanismo de inactivación. Sin embargo, por la semejanza estructural entre el ABA y sus metabolitos inmediatos, se espera que estos tengan alguna actividad biológica residual. Se han determinado los requerimientos estructurales necesarios para ello (MILBORROW, 1974a, 1978). Se sabe que es necesario el grupo carboxil del ABA, así como la presencia de enlaces 2-cis y 4-trans en el extremo de la cadena dienoica.

En Bacterias, tanto la síntesis como la degradación del ABA son distintas. Por ejemplo, HASEGAWA y cols. (1984) han encontrado, en *Corynebacterium*, como producto de la degradación del ABA, un compuesto llamada dehidrovomifoliol que no se ha visto en plantas.

1.5. Fisiología del ácido abscísico

1.5.1. **Transporte iónico y propiedades del plasmalema**

En los últimos años se han realizado muchos trabajos experimentales para demostrar que la comprensión del mecanismo de acción de las fitohormonas pasa por el conocimiento de las alteraciones que producen en las membranas celulares; sobre todo a raíz del descubrimiento de que, en ellas, aparecían lugares de unión para algunas sustancias de carácter hormonal. Con ABA, se han realizado algunos trabajos, que apuntan a que uno de sus lugares de acción sean también las membranas celulares. Recientemente, incluso, se ha llegado a relacionar el incremento de la permeabilidad, en respuesta al ABA, con un componente membranoso: la fosfatidiletanolamina.

Aunque el conocimiento de la membrana plasmática de los vegetales es muy incompleto, de la información disponible se pueden deducir tres funciones principales:

1. Transporte. La membrana plasmática está altamente especializada en el transporte de gran variedad de sustancias hacia el interior de la célula y, de ésta, al exterior.

2. Recepción y traducción de señales. Recibe señales hormonales y del medio, que traduce en respuestas químicas y fisiológicas.

3. Síntesis de microfibrillas de pared celular. Dirige y controla tanto la síntesis como el ensamblaje de las microfibrillas que van a formar la pared celular vegetal.

En cuanto al transporte, la membrana debe mantener y/o

establecer un gradiente de material celular entre el interior y el exterior, impidiendo la pérdida pasiva de metabolitos, así como la entrada de una amplia variedad de sustancias del medio. El conocimiento actual de la estructura de la membrana plasmática indica que es la más apropiada para esta función.

La bioquímica del transporte a través de la membrana en plantas, no se conoce en profundidad. Quizás, de lo que se tiene más información es del bombeo activo de iones inorgánicos. Este debe jugar un papel fundamental en la fisiología de la célula vegetal (MacROBIE, 1977). El transporte de iones tiene una gran importancia por dos razones:

1^a. Es necesario para establecer y mantener el entorno iónico apropiado para el metabolismo celular. Esto incluye, además del transporte de nutrientes minerales esenciales, el transporte de protones, implicado en la regulación del pH citoplasmático y en la formación de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

2^a. La acumulación en la célula de iones en alta concentración (respecto a la del medio), provoca un potencial osmótico bajo, requerido para el crecimiento celular y otras respuestas de la planta relacionadas con la turgencia, como el movimiento de las hojas y de los estomas. Por ello, la regulación del transporte iónico, permite controlar muchas características celulares, como el entorno iónico, el pH, las propiedades eléctricas y los niveles de crecimiento, todas ellas de gran importancia en la forma y función de la célula.

Por lo que se refiere a la recepción de señales, la membrana recibe señales tanto hormonales como del medio,

relacionadas con la iniciación de los procesos de crecimiento, la diferenciación y otros aspectos del metabolismo vegetal. Por ejemplo, parece demostrado que, la iniciación de respuestas promovidas por el fitocromo, se debe a que la proteína en forma activa se une a la membrana y esta unión es la señal o estímulo. No se sabe bien qué es lo que ocurre a continuación, pero están implicados cambios en la permeabilidad y/o en las propiedades eléctricas de la membrana (MARMÈ, 1977). Parece posible que el fitocromo regule varias características del transporte en la membrana plasmática y, que los cambios en las funciones de ésta, traduzcan la señal del medio -calidad de luz- en una respuesta fisiológica. En cuanto a la recepción de señales hormonales, la acción de las auxinas en el alargamiento celular, es un ejemplo. Se ha sugerido, que para algunas respuestas la auxina se une a la membrana plasmática para iniciar la acción hormonal. Se activa en la membrana la bomba de protones que acidifica el medio. Esta acidificación provoca relajamiento en la pared celular, lo que permite que la célula crezca. Hay sin embargo, ciertas evidencias que indican que el primer sitio de unión de la auxina es el retículo endoplasmático (ANDERSON y RAY, 1978), siendo la función de la membrana plasmática tomar parte en la acción de la hormona en la inducción del alargamiento celular, y no la de actuar como sitio receptor de la misma. Otro ejemplo, es el aumento del calcio citoplasmático debido a que alguna señal modifica propiedades de la membrana, lo que provoca cambios en la permeabilidad al calcio, disminución de la actividad de la bomba de este ión, que se encuentra en la membrana plasmática (MARMÈ y

DIETER, 1983) y/o liberación el calcio ligado (DIETER, 1984).

Por otro lado, el comienzo de la imbibición de las semillas viables, está acompañado por la salida de gases, iones y sustancias orgánicas como ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos, a través de la membrana mitocondrial, y no se completa hasta varias horas después del comienzo de la toma de agua. Este fenómeno, se debe en parte, a la sensibilidad de las células al agua, lo que provoca que durante la imbibición estén sometidas a estrés (HEGARTHY y ROSS, 1980/81).

La situación puede revertir con el tiempo; las membranas se reestructuran, hasta alcanzar una configuración estable, bien físicamente, bien por algún mecanismo enzimático de reparación, que es más rápido a temperaturas relativamente altas (VILLIERS, 1974).

Parece ser que la desorganización de las membranas tiene lugar durante el último periodo de la formación de la semilla, cuando ésta empieza a deshidratarse. Estudios de difracción de rayos X y análisis térmicos (LUZZATTI y HUSSON, 1962; LADBROOKE y col., 1968), revelan que con niveles de agua inferiores al 20% la bicapa lipídica es inestable, formándose estructuras hexagonales. Basándose en estos resultados, SIMON (1981) postula que durante este periodo, las membranas celulares de las semillas se desorganizan. Esta desorganización puede deberse a la ruptura de las membranas por colapso celular, formándose grandes discontinuidades en la bicapa lipídica, o bien a que los cambios que se han inducido durante la desecación, no son perfectamente corregidos por una posterior hidratación.

La pérdida de sustancias de la semilla, en los primeros

momentos de la imbibición, puede provocar deficiencias en la germinación; así, la pérdida de azúcares representa una disminución de los sustratos respiratorios, lo que podría impedir que la semilla alcanzase los niveles energéticos necesarios para germinar. Además, se ha observado que la disminución de los electrolitos tiene una correlación negativa con la capacidad de germinación en el campo.

Esta salida de sustancias desde la semilla al medio parece ser parcialmente selectiva. En *Lotus corniculatus*, donde la estructura de la membrana permanece lamelar y no hexagonal, incluso con niveles de agua del 5%, durante dos horas de hidratación, se pierde el 32% del potasio, aproximadamente el 18% del fosfato y aminoácidos, pero sólo un 14% de proteínas solubles y un 8% del contenido en azúcares (MACKERSIE y STINTON, 1980).

Una imbibición rápida, conlleva la reconstitución espontánea de la configuración de bicapa, una vez que se alcanza el grado de hidratación crítico, pero los componentes de la membrana pueden ser desplazados por el flujo rápido de agua hacia el interior (BEWLEY y BLACK, 1982). Hasta que este desplazamiento sea revertido (bien por deformación espontánea, bien por un mecanismo de reparación molecular) se estará produciendo pérdida, y, cuanto mayor sea el tiempo que tarde en completarse esta reconstitución, mayor será la pérdida de sustancias, con el consiguiente riesgo para la germinación y posterior crecimiento de la plántula. La reconstitución de las membranas debe ocurrir, por tanto, antes que la mayoría de los demás procesos germinativos (MAYER y SHAIN, 1974).

MAYER y MARBACH (1981) propusieron que las membranas eran los sensores de los cambios de temperatura en la germinación de las semillas. Posteriormente, comprobaron que la salida de sustancias al medio varía con la misma (MARBACH y MAYER, 1985).

Desde otro punto de vista, tampoco es conveniente para las semillas la pérdida de solutos durante la hidratación, ya que, en el suelo, pueden estimular la germinación y el crecimiento de patógenos fúngicos o microbianos (SCHROTH y COOK, 1964) que pueden interferir con la germinación y desarrollo de la plántula.

También parece indiscutible que las respuestas rápidas deben estar relacionadas con procesos llevados a cabo en las membranas; por ejemplo, el cierre estomático. En respuesta a condiciones de estrés hídrico, las células estomáticas pierden solutos osmóticamente activos y, por tanto, la presión de turgencia sufre un descenso. En este proceso interviene el ABA acelerando la salida de K^+ , ión osmóticamente activo, aunque no se sabe mediante qué mecanismo (BRADFORD y HSIAO, 1982). A este respecto, algunos autores opinan que el estrés lo que induce es una alteración en el gradiente de distribución del ABA en la célula del mesófilo (máxima concentración en el cloroplasto y mínima en la vacuola). Según otros autores, este gradiente se debería a una alteración en la permeabilidad de las membranas del cloroplasto, donde se sintetiza, en mayor grado, el ABA, y a una subsiguiente salida hacia las células guarda. Además, RASCHKE (1982) demostró que, bajo ciertas condiciones de estrés hídrico y en la epidermis de la hoja, la concentración de ABA es muy baja en comparación con la existente en el mesófilo. Esto lleva a la hipótesis de que hay una aceleración del transporte apoplástico de la hormona

hacia la célula estomática. Una vez que la concentración de ABA en las células guarda es suficiente (aproximadamente 8.9 pmol/cc), el estoma se cierra al instante o al cabo de pocos segundos. La reversibilidad del acto también es casi automática, cuando desaparecen las condiciones que provocaron el estrés, ya que disminuye la concentración de ABA libre por aumento en su conjugación o en su metabolismo (RASCHKE, 1979).

Actualmente, se acepta que existe un mecanismo electronegativo de expulsión de protones localizado en el plasmalema y dependiente de energía. Este bombeo de protones hacia las células epidérmicas es retrasado o inhibido por ABA, al igual que la entrada de K^+ (Rb^+). La FC revierte este proceso de apertura del ostiolo, lo que sugiere que el ABA altera la funcionalidad de la ATPasa, mediante un mecanismo no conocido. Pero no se sabe cómo se provoca el intercambio H^+/K^+ inducido por FC. SERRANO (1984) propone que, o bien es un intercambio electroneutro (H^+/K^+) acoplado directamente, o es un bombeo de protones, de forma que el gradiente electroquímico producido permita, indirectamente, la entrada de K^+ a través de un transportador no acoplado. El propio SERRANO, al reemplazar el K^+ por cationes lipofílicos permeables pasivamente, logra que penetren éstos en presencia de FC, como respuesta a la salida activa de H^+ , sin que exista una entrada subsecuente de K^+ ; esto hace que la segunda hipótesis pueda ser la real.

En definitiva, aunque el ABA parece afectar de forma casi inmediata a la bomba de protones, los pasos intermedios para esta acción se desconocen. Son, quizás, estos pasos lo más importante

del mecanismo de acción del ABA a nivel de las membranas biológicas.

Respecto al transporte iónico, hay que decir que está afectado por ABA, sobre todo en raíces, donde ha sido más estudiado. Su capacidad de promover o inhibir el transporte depende, entre otras razones, de la especie y de las condiciones de crecimiento. Así, en raíces de **Phaseolus vulgaris** lo estimula (VAN STEVENICK y KARMOKER, 1978), mientras que en raíces de remolacha (VAN STEVENICK, 1972) y maíz (SHANER y cols., 1975) lo inhiben. Sin embargo, existen pocos datos acerca del papel del ABA sobre otros iones distintos a H^+ , K^+ y Cl^- .

En las semillas, son transportadas importantes cantidades de iones desde los cotiledones o el endospermo hacia el eje embrionario, durante la germinación. Estos elementos minerales se acumulan en la semilla durante el proceso de maduración. Y son transportados hacia el eje, ya desde el comienzo de la germinación, especialmente el potasio por su gran importancia en los procesos osmóticos y de transporte en las células.

Los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , parece ser que se acumulan en las fitinas (sales de calcio y magnesio del mioinositol hexafosfato). Su movilización y utilización en el embrión parecen más lentas que las del potasio, y su contenido menor (SUTCLIFFE, 1980). Las necesidades de calcio y magnesio ^{en} este, están relacionadas con la actividad de enzimas dependientes de dichos iones, con la síntesis de clorofila (Mg^{2+}), con la formación de paredes celulares (Ca^{2+}) y con la respuesta a estímulos externos (Ca^{2+}).

El potasio, como se ha visto anteriormente, es indispensable para el mantenimiento del potencial osmótico y del intercambio

H^+/K^+ en el plasmalema (MARRÉ, 1979).

En las primeras horas de la germinación, hay gran pérdida de cationes (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) al medio (COCUCCI y COCUCCI, 1977; MULLET y CONSIDINE, 1980; HERNÁNDEZ-NISTAL y cols., 1983). Al cabo de cierto tiempo, el potasio prácticamente no se detecta; en *Cicer arietinum*, a las 36 horas del comienzo de la imbibición, se ha recuperado el 60% del K^+ excretado inicialmente (HERNÁNDEZ-NISTAL y cols., 1983), por la actuación de una ATPasa de membrana, siendo la activación de ésta, el suceso clave en la regulación de la germinación. Como se indica más arriba, la bomba de protones activada transforma la energía de los enlaces fosfato en energía metabólica (SERRANO, 1984) y excreta protones al exterior de la célula. Esto lleva al relajamiento de la pared celular y a la alcalinización del citoplasma, lo que aumenta la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa que forma malato. La unión de éste con el potasio y, su paso a las vacuolas, provocan un potencial osmótico más negativo y, por tanto, el aumento de la turgencia celular por la toma de agua. Esto permite el crecimiento de la célula.

El gradiente de protones dirige la toma de tres tipos de nutrientes (MITCHEL, 1974). El potencial de membrana y el gradiente de pH pueden conducir al cotransporte de aminoácidos neutros y azúcares con H^+ . El cotransporte de aniones como Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , y aminoácidos aniónicos con H^+ , puede ser dirigido por el gradiente de pH, o por éste y el potencial de membrana que depende del balance estequiométrico H^+ /sustrato. La toma electroforética de cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+), y aminoácidos catiónicos, es conducida por el potencial de membrana

pero existe la posibilidad de que sean cotransportados con H^+ , en cuyo caso está implicado también el gradiente de pH. En plantas superiores, la activación de la bomba de protones por las sustancias reguladoras del crecimiento, podría explicar la capacidad de los tejidos en crecimiento para extraer nutrientes de otras partes de la planta (LÜETTGE y HIGINBOTHAM, 1979).

Después de lo dicho respecto al efecto del ABA sobre el movimiento de ciertos cationes, se puede sugerir que esta fitohormona afecta a las funciones del plasmalema, la barrera más importante de entrada de iones en la célula vegetal. No se descarta, por otra parte, que el ABA pueda modificar específicamente algún mecanismo relacionado con el transporte iónico que precisa de "transportadores".

1.5.2. **Estrés hídrico**

Cuando se someten las plantas a condiciones de estrés, como falta de agua, salinidad o inundación, sus niveles endógenos de hormonas sufren cambios rápidos e importantes. El aspecto más interesante del estudio de estos fenómenos es la posibilidad de que la regulación hormonal esté envuelta en el control del potencial hídrico y en la permeabilidad de las membranas, en plantas, así como en el control del déficit hídrico.

Si comparamos las respuestas al estrés hídrico de una amplia variedad de géneros, vemos que son muy similares. Esto se debe a que se trataría de especies del grupo ecológico de las mesofitas. Este grupo, excepto las xerofitas, no poseen adaptaciones anatómicas especiales que le permitan sobrevivir en

condiciones extremas de estrés hídrico. Cuentan con controlar la pérdida de agua, regulando la apertura de sus estomas, debilitando la resistencia de sus raíces y sacrificando las hojas viejas.

Se sabe que el estrés hídrico o déficit hídrico ocurre en plantas, cuando sus células y tejidos están por debajo del nivel de turgencia. Esta situación se alcanza cuando la transpiración en la superficie de la planta, excede a la cantidad de agua absorbida por las raíces.

El estrés hídrico puede variar gradualmente, desde una pequeña bajada del potencial hídrico, no detectable a simple vista, debido al marchitamiento rápido de mediodía que se produce cuando el tiempo es caluroso, al marchitamiento permanente y a la muerte por desecación. A lo largo del tallo hay diferentes niveles de déficit hídrico y de potencial hídrico. Así mismo, hay varias etapas del crecimiento asociadas con diferencias en su "habilidad" al competir por el agua. Las hojas jóvenes y los frutos son, usualmente, más susceptibles que las hojas viejas y, éstas son las primeras que entran en senescencia, cuando las plantas están sometidas a estrés hídrico severo. Se han estudiado las fluctuaciones del potencial hídrico de hojas (Ψ_{hoja}) de plantas de pimienta expuesta a sequía (que es función de la turgencia de las células de la misma), en relación al potencial hídrico del suelo (Ψ_{suelo}), encontrándose fluctuaciones diurnas en el potencial hídrico de la hoja. Esto se debe a que la hoja es más turgente, durante los periodos de oscuridad que en los de luz, debido al cierre de los estomas y a la disminución de la

transpiración, al anochecer. Hay gran número de plantas que reducen el contenido de agua del suelo hasta niveles próximos al punto de marchitez permanente. El valor de este punto de marchitez permanente, depende del tipo de suelo, aunque el Ψ_{suelo} en el punto de marchitez, está comprendido entre -10 y -20 bares.

La pérdida de turgor celular que acompaña al estrés hídrico, es uno de los factores responsables del "disparo" de los cambios en el balance hormonal de la planta. Estos cambios, al promover el cierre de los estomas, reducir la resistencia de la raíz, inducir la senescencia de la hoja, etc., ayudan a disminuir y aliviar los efectos producidos por dicho estrés.

Como hemos dicho, durante el estrés hídrico se modifican los niveles hormonales en plantas. Por ejemplo, disminuyen los niveles de citoquininas y giberelinas, aumenta la biosíntesis de etileno, afecta a los niveles de auxinas e induce la acumulación del ABA. Las plantas al marchitarse, acumulan rápidamente ABA en sus raíces. Este descubrimiento se hizo de forma fortuita, al estudiar la posible existencia, en hojas excindidas de trigo (*Triticum aestivum*), de un inhibidor del crecimiento inducido por la luz. Se encontró un omnipresente inhibidor- β que después se identificaría como ABA. Posteriormente, se comprobó que el aumento en el nivel de inhibidor era estimulado por el déficit hídrico de la hoja.

Otros experimentos establecieron que la cantidad de inhibidor acumulado en las hojas de trigo, también dependía del periodo en las condiciones de sequía, de la temperatura y del grado de déficit hídrico de la hoja.

Hay evidencias de que la producción de ABA en respuesta a la falta de agua, no se restringe a las hojas excindidas, sino que también ocurre en yemas. Raíces estresadas osmóticamente por ClNa, manitol (MIZRAHI y cols., 1970) y polietilenglicol (WRIGHT, 1978), aumentan los niveles de ABA en raíces de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y plantas de trigo, respectivamente. El primer efecto observado al añadir ClNa al medio nutritivo fue el aumento del déficit hídrico de la hoja. Y, éste, probablemente, era el estímulo iniciador del aumento del contenido de ABA en hojas de tabaco.

Se han encontrado más evidencias al respecto en caña de azúcar, guisante, tomate, aguacate, etc. Sin embargo, plantas por debajo de los musgos, evolutivamente hablando, no tienen esta posibilidad. Esto es lógico ya que los musgos parecen ser un punto de transición en la evolución de las plantas.

Por otra parte, sería de gran interés saber si hay un umbral de potencial hídrico de la hoja que inicie la acumulación de ABA. A este respecto, ZABADAL (1974), sugirió que el potencial hídrico de la hoja podría ser el detonante de la biosíntesis de ABA. Trabajando con *Ambrosia artemisiifolia* y *A. trifida*, sometidas a condiciones de desecación, encontró que el sistema de acumulación del ABA es "activado" por un rango crítico de potencial hídrico de la hoja, comprendido entre -10 a -12 bares. Se han encontrado resultados similares en abeto Douglas (BLAKE y FERRELL, 1979) y *Euonymus* (HEMPHILL y TUKEY, 1975).

Sin embargo, hay otros muchos resultados en favor de la interpretación de que se produce un aumento gradual de la cantidad de ABA, conforme disminuye el potencial hídrico de la

hoja, hasta cierto valor óptimo. Parece ser que el potencial hídrico que inicia la acumulación de ABA varía de unas especies a otras.

En general, el ABA debe empezar a acumularse en plantas (por ejemplo por una biosíntesis mayor que el metabolismo), cuando el potencial hídrico de la hoja disminuye -2 bares con respecto al potencial hídrico diurno normal.

El aumento del ABA en respuesta al estrés hídrico, puede deberse, más probablemente, a que se induzca su biosíntesis a partir del ácido mevalónico, que a la liberación de formas ligadas (p.e. ester glucosa, MILBORROW y NODDLE, 1970).

En la mayor parte de los casos, el nivel de ABA ligado es relativamente pequeño, en comparación con el ABA libre. Sólo se ha encontrado un aumento del nivel de la forma ligada bajo condiciones de estrés hídrico frecuente, o durante un breve periodo después de la mejora de plantas sometidas a sequía.

Cuando no se le suministra agua a plantas de tomate, hay un rápido incremento del ABA en las 24 horas previas a la aparición de los síntomas de marchitez. Sin embargo, al establecerse ésta, disminuían los niveles de ABA. Esto puede deberse al daño que sufre la hoja como consecuencia del aumento del estrés o a un déficit hídrico óptimo en la hoja para la acumulación del ABA, que ocurriría antes o próxima al punto de marchitez visual. En todo caso, la disminución de la acumulación de ABA puede ser explicada en términos de un sistema "feedback" negativo. MILBORROW y NODDLE (1970), nutrieron hojas de trigo turgentes con (2-¹⁴C)diol racémico del ABA, y dedujeron que el exceso de ABA,

formado a partir de los dioles, operaba como una onda "feedback" negativa que paraba supropia síntesis.

MILBORROW (1974a) propuso tres mecanismos distintos, operantes en el síndrome ABA-estrés: a) una rápida síntesis del ABA, cuyo "disparo" se evita por marchitamiento; b) un mensaje de "stop", cuando se forma suficiente ABA y c) el comienzo de la destrucción o cese de la síntesis rápida del ABA cuando se recupera el turgor.

El proceso de acumulación del ABA en plantas sometidas a estrés hídrico, pero este proceso se revierte, tan pronto como el estrés disminuye. La longitud del periodo de restablecimiento, necesario para restaurar los niveles de ABA al nivel anterior al estrés, es proporcional al nivel final de ABA, alcanzado como resultado del estrés hídrico impuesto. Y, probablemente, también está influido por la temperatura, humedad, daño causado en la raíz por el estrés, etc., así como otros factores no conocidos.

El ABA es metabolizado, en plantas, hacia ester glucosa o vía ácido faseico y dihidrofaseico. HIRON y WRIGHT (1973) han visto que había conversión del ABA libre (aprox. 50%) a la forma ligada y, posteriormente, ésta también disminuía. El ABA libre que quedaba, era metabolizado vía ácido faseico. Se ha comprobado que estos procesos ocurren realmente en vid, cerezo, etc., al final del periodo de dormición invernal, cuando descienden las condiciones de estrés hídrico en ramas, al aumentar la savia en primavera (WRIGHT, 1975).

Sin embargo, en guisantes, la mayor parte del ABA era metabolizado, primero a ácido faseico y después a ácido dihidrofaseico y, el aumento del ABA ligado, durante el periodo

de restablecimiento, no era significativo.

Se ha estudiado el síndrome de ABA-estrés en hojas y raíces de plantas superiores, del grupo ecológico de las mesofitas. Pero, hay otros órganos de la planta, y también, otras especies de hidrófitas y xerófitas que son capaces, en mayor o menor grado, de responder al estrés. En general, las raíces no pueden alcanzar niveles de ABA tan altos como las hojas y tallos, frente al estrés, ya que estos son capaces de sintetizar ABA (WALTON y cols., 1976). En ápices los niveles de ABA son más altos que en hojas. Esto puede ser debido a que los valores existentes son expresados en base al peso fresco, en lugar de por célula o por peso seco. El ABA también puede inhibir el cambio de actividad, durante el estrés hídrico (LITTLE, 1975).

Las especies acuáticas, que crecen enteramente sumergidas, contienen valores muy bajos de ABA control y aumenta sólomente 1.7 veces con la falta de agua, aunque esto varía según la parte de la planta de que se trate. Así, en la roseta aérea, se alcanza un aumento de 6 veces. Esto se explica porque las hojas aéreas están expuestas a este tipo de estrés. Todas las especies higrófitas muestran aumentos del ABA de 5 veces, en sequía, lo que sugiere una limitada confianza en el sistema ABA-estrés, en este grupo ecológico. Las especies xerofíticas, que están estructuralmente adaptadas a la sequía, presentan aumentos del ABA de sólo 4 veces después del desecamiento.

En plantas sometidas a estrés hídrico, se ha intentado determinar si el ABA se forma en el propio órgano, o es transportado desde otras regiones de la planta. HOAD (1973)

determinó los niveles de ABA, en respuesta al estrés, en varias partes de las plantas de ricino (**Ricinus communis**). Con los resultados obtenidos concluyó que, por ejemplo, el aumento en el nivel de ABA encontrado en ápices, probablemente se debía al ABA transportado desde las hojas maduras más que a su producción "in situ". Estas conclusiones están apoyadas por los resultados de HOCKING y cols. (1972), que aplicaron (2-¹⁴C)ABA, en un bloque de agar, a una hoja primaria de 15 días de plantas enanas de judía, durante 24 horas y, encontraron que la radiactividad estaba distribuída por toda la planta, con la excepción de la hoja primaria opuesta. Con estos resultados y con los de otros autores se vió que, una vez que el ABA llega al punto de crecimiento apical, ya no se mueve. Por otro lado, no se puede concluir, que el ¹⁴C encontrado en los puntos de crecimiento, indique la presencia de ABA libre, sino que, el ABA que se acumula en las hojas como consecuencia del déficit hídrico de la misma, se puede transportar desde otras regiones de la planta, en crecimiento.

Puesto que el ABA es un potente inhibidor del crecimiento, puede tener efecto en la inducción del estado de dormición temporal que se produce durante el estrés hídrico. Este efecto puede ser intensificado por el cierre de los estomas, inducido por el ABA remanente en hojas.

¿Por qué se acumula ABA durante el estrés hídrico?. Todos los enzimas necesarios para sintetizar ABA desde el ácido mevalónico, residen en los cloroplastos o leucoplastos de las células vegetales (MILBORROW, 1974b; RAILTON y cols., 1974) y, de aquí, migra a otras partes de la planta (LOVEYS, 1977). Se ha demostrado que el ABA se sintetiza a partir de mevalonato, en

condiciones de estrés, y que se acumula rápidamente en los tejidos (MILBOROW y NODDLE, 1970). Por tanto, la acumulación de ABA puede deberse a que: 1) el ABA puede ser sintetizado mucho más rápido de lo normal, y más rápido de lo que su metabolismo es capaz de degradarlo ; o, 2) la degradación del ABA es disminuída o inhibida durante el estrés.

Los resultados de HARRISON y WALTON (1975), parecen favorecer la primera hipótesis ya que han demostrado que, tanto la síntesis de ABA como su metabolismo a ácido faseico y dihidrofaseico, aumentan rápidamente en las hojas de plantas enanas de judía, sometidas a estrés, pero la cantidad de síntesis del ABA es mucho más grande que su metabolismo. Sin embargo, los resultados de otros autores están más de acuerdo con la segunda proposición.

1.4.3. **Acción sobre la expresión génica**

Los efectos fisiológicos del ABA sobre la síntesis de ADN están poco estudiados, existiendo resultados poco aclaratorios para esbozar una forma de actuación determinada. Experimentos con fluorodeoxiuridina, un inhibidor de la síntesis de ADN, indica que la inhibición de esta síntesis debe conducir a la supresión de la división celular de plántulas de rábano (STEWART y SMITH, 1972). Por tanto, es posible que los efectos del ABA en la síntesis del ADN y en la división celular estén relacionados. Sin embargo, no está claro si es la inhibición, por ABA, de la síntesis de ADN la que causa la disminución de la división celular o viceversa.

En segundo lugar, el ABA afecta a la actividad codificante de la cromatina y a la síntesis de ARN.

Los datos obtenidos no demuestran que el ABA afecte directamente a esta actividad en la cromatina aislada del tejido vegetal. Pero, añadiendo ABA al medio de homogenización, PEARSON y WAREING (1969), observaron que la transcripción "in vitro" dirigida por la cromatina aislada, era significativamente menor. La posible interpretación de estos resultados, es que el ABA reacciona con un factor, que puede estar asociado con la cromatina, o localizado en alguna otra parte de la célula, y que se pierde durante la separación de la misma. Por tanto, el ABA no puede afectar directamente a la actividad de la cromatina aislada, sino que, como se ha observado, en entrenudos de guisante enano tratados con GA (JOHRI y VARNER, 1968), y en hipocótilos de soja tratados con auxinas (HARDIN y cols., 1972), requiere un cofactor desconocido que alteraría la actividad codificante de la cromatina aislada. No se ha intentado aislar ni identificar este cofactor. Algo similar ocurre en el estudio de las hormonas animales.

En guisante, se han llevado a cabo otros trabajos relacionados con el efecto del ABA en la actividad de la cromatina, y se ha encontrado que, tratando con ABA los embriones intactos no durmientes, se reducía la capacidad transcripcional de la cromatina aislada (KHAN, 1972). Puesto que la dormición está asociada con la reducción de la actividad de la cromatina (TUAN y BENNER, 1969), se puede pensar que la mayor parte de los eventos bioquímicos, probablemente, también estén relacionados con el efecto regulador del ABA en la dormición.

Se han visto pocas evidencias sobre el efecto del ABA en el enzima responsable de la transcripción, la ARN polimerasa. El tratamiento coleóptilos de maíz con ABA, reduce la actividad de este enzima (BEX, 1972a) y, también disminuye, indirectamente, la cantidad de transcripción (BEX, 1972b). Hay, al menos, tres ARN polimerasas en tejidos vegetales (DUDA, 1976) de las que sólo la ARN polimerasa II es la responsable de la síntesis de ARNm.

La ARN polimerasa aislada por BEX no está asociada con la cromatina (soluble), por tanto, probablemente sea la ARN polimerasa II.

El ABA tiene importantes efectos inhibidores en la síntesis de ARNr y ARNt, en numerosos sistemas vegetales, incluyendo hojas de cebada (POULSON y BEEVERS, 1970), coleóptilos de maíz (BEX, 1972b) y hojas de rábano (WAREING y cols., 1968). También induce senescencia en hojas de rábano, y reduce el crecimiento en ejes de judía. No obstante, el tratamiento de los tejidos con 5-fluor-uracilo, un potente inhibidor de la síntesis de ARNr y ARNt, no imita los efectos fisiológicos del ABA descritos antes. Esto indica que no es suficiente una simple inhibición del ABA sobre el ARNr y el ARNt, para mostrar los efectos fisiológicos del inhibidor, o que estos dos procesos (inhibición de ARNr y ARNt e inducción de la senescencia), no están totalmente relacionados.

Dos técnicas recientes han ampliado el campo de conocimiento sobre el efecto de los reguladores vegetales del crecimiento, en el metabolismo del mRNA: 1^o, el descubrimiento de que la mayor parte del ARNm, contiene una región poli(A), y 2^o, la buena traducción del ARNm en extractos libres de células. En capas de

aleurona de cebada aisladas, ZWAR y JACOBSEN (1972) han observado que el ABA puede revertir la síntesis de ARN polidiserso (ARNm), inducida por GA_3 .

Estos trabajos fueron confirmados por los de HO y VARNER (1974), al encontrar que el ABA podía inhibir la síntesis de poly(A)-ARN inducida por GA_3 . Asimismo, HIGGINS y cols. (1976) y MOZER (1980) observaron, en un sistema de traducción "in vitro", empleando germen de trigo, que el ABA puede reducir parcialmente los niveles del mARN para la α -amilasa inducida por GA_3 .

Los niveles de mARN pueden estar regulados por una serie de etapas de un procesamiento post-transcripcional, como la unión del ARNm a precursores nucleares, poliadenilación y formación de "cap". Pero no hay evidencias al respecto.

En semillas de garbanzo, el ABA reduce la síntesis de ARN-poli(A), aunque su capacidad de traducción "in vitro" es similar a la obtenida a partir de ARN-poli(A) en condiciones normales (RODRIGUEZ y cols., 1985).

En relación directa con los ácidos nucleicos, está la síntesis de proteínas, que también está afectada por el ABA.

Hay muchas evidencias que sugieren que el ABA es capaz de regular la formación de distintos enzimas (proteínas) en tejidos vegetales. Por ejemplo, la PEPCasa, malato-DH y RuDPCasa en la fotosíntesis; invertasa y α -amilasa en el metabolismo de carbohidratos; peptidasa y transaminasa en el metabolismo del nitrógeno; fosforil-citidil colina y fosforil-gliceril colina transferasa en el metabolismo de los lípidos; peroxidasa y fenilalanina-amonio liasa en el metabolismo de productos

secundarios; la ribonucleasa y la fosfatasa ácida en hojas o frutos senescentes; y las proteínas de almacenamiento en la embriogénesis. Sin embargo, no se ha visto que, en plantas superiores, haya una regulación directa de la actividad enzimática, sino que parece actuar a otros niveles de regulación. Probablemente, con un efecto de supresión, de la que se han descrito algunos casos (por ejemplo, la supresión de la síntesis de α -amilasa en capas de aleurona de cebada), o induciendo la síntesis de nuevas proteínas, probablemente a nivel transcripcional. Por ejemplo, HO (1982) ha identificado una proteína inducida por ABA en capas de aleurona de cebada.

1.6. Mecanismo de acción del ABA durante la germinación de semillas

1.6.1. **Características de la germinación**

Las plantas superiores son capaces de asegurar su perpetuidad mediante la semilla. Esta se desprende de la planta madre y se transforma en un nuevo individuo por el proceso de la germinación. Por tanto, la semilla es el método que usan las espermatofitas para la perpetuación de la especie (BEWLEY y BLACK, 1978).

Las células de casi todas las semillas están adaptadas a sobrevivir en condiciones de deshidratación. En este estado de sequedad (menos del 10% de agua), los embriones permanecen inactivos, pero poseen orgánulos funcionales y macromoléculas citoplasmáticas como medio de subsistencia (HEGARTY, 1978), (MAYER y POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

En determinado momento de la vida de la planta tiene lugar una etapa llamada embriogénesis en la que se desarrollan una serie de procesos de fertilización y diferenciación encaminados a la formación de la semilla. Con la excepción de algunos casos de apomixis, el desarrollo de las semillas comienza inmediatamente después de la fertilización del óvulo. En las Gimnospermas, la ovocélula se sitúa dentro del gametofito femenino donde tiene lugar la fertilización por su unión con un gameto móvil liberado del tubo polínico. El desarrollo posterior del cigoto implica, en primer lugar, la formación de varios núcleos libres, alrededor de los cuales se constituyen las

paredes celulares, formando el proembrión. Posteriormente hay una serie de divisiones celulares que dan lugar a las células embrionales y al suspensor, órgano de vital importancia para la nutrición del embrión. Cuando éste está formado, la porción central del gametofito femenino se transforma en una cavidad hacia la que es empujado el embrión por la elongación del suspensor. En las partes persistentes del gametofito femenino se depositan carbohidratos, proteínas y lípidos de reserva que serán utilizados durante la germinación de la semilla.

La embriogénesis en Angiospermas es algo distinta. Se inicia con una doble fertilización en el saco embrionario: uno de los gametos masculinos, liberados del tubo polínico, se une a la ovocélula, formándose el cigoto diploide que suele entrar en reposo. El otro núcleo espermático se une a los núcleos polares, dando lugar a una célula triploide que, por sucesivas divisiones, constituye el endospermo.

Tras la primera división del cigoto se originan dos células, la célula basal y la célula distal. En las dicotiledóneas la célula basal se transforma en el suspensor y la distal en el embrión. En la monocotiledóneas, la célula basal se va a diferenciar en la célula terminal del suspensor; el embrión y las otras células del suspensor se forman a partir de la célula distal.

El saco embrionario está rodeado por la nucela y envuelto por el tegumento, y se une a la placenta del ovario por el funículo. Después de la doble fertilización, se desarrollan los tejidos circundantes y el endospermo, que se dispone rodeando al embrión. La cubierta seminal se produce por la diferenciación de

los tegumentos.

Por último, se produce la desecación del óvulo por pérdida de agua, quedando la semilla rodeada por la cubierta esclerificada y protectora (DENFFER, 1986).

La embriogénesis es una fase de preparación de la semilla para la germinación. Esto hace que durante este periodo exista un acopio de nutrientes, ya que se sintetizan grandes cantidades de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Existe un predominio del anabolismo. Sin embargo, durante la germinación ocurre todo lo contrario, pues se inicia la actividad de enzimas hidrolíticos para degradar los materiales de reserva y nutrir al embrión.

Aunque, durante la germinación existe un predominio del catabolismo, también se produce síntesis de nuevas moléculas (ácidos nucleicos, entre otras).

El fenómeno de la embriogénesis no está acompañado de división celular, pero sí de una activación/desactivación génica en el ADN.

Virginia WALBOT y cols., trabajando con leguminosas, demostraron que durante la embriogénesis se sintetizan todas las especies de ARN que actúan luego en la síntesis de proteínas, en las primeras fases de la germinación.

Existen datos experimentales que indican que la síntesis "de novo" del ARN se produce incluso antes de la acumulación de proteínas de reserva. La síntesis proteica en las primeras fases de la germinación se lleva a cabo con los ribosomas no degradados durante la germinación.

Al estudiar la desecación de semillas de *Vicia faba* L. BOULTER encontró que la división celular cesa a partir de los 35 días de desecación; pero el ADN y el ARN siguen aumentando hasta los 50 días. Esto explicaría la existencia de células poliploides por un mecanismo de ampliación génica o endoreduplicación. En estas células, con dotación cromosómica superior a la normal, habría una mayor síntesis de moléculas de ARN y, por tanto, de proteínas estructurales y de reserva.

Una vez formado el embrión, como anteriormente se ha descrito (embriogénesis), va a sufrir una serie de procesos sincrónicos hasta originar una nueva planta. El conjunto de fenómenos físico-químicos, bioquímicos y de morfogénesis que esto conlleva, se denomina germinación.

Una semilla madura se caracteriza por estar en un estado de reposo metabólico, o al menos de actividad no detectable, que se ve favorecido por el bajo contenido en agua. La semilla, en contacto con el agua, duplica su peso (*Cicer arietinum* pasa, en doce horas, del 8-9% al 68% de agua) (RODRIGUEZ y cols., 1983) y, automáticamente, reanuda la respiración .

Se considera que la germinación se inicia con la toma de agua por la semilla o imbibición, a continuación hay una hidratación de orgánulos, seguida de una división y extensión celular que se continúa con la emergencia física del embrión y morfogénesis hasta completar la plántula. Así pues, se considera que la germinación finaliza cuando surge una plántula capaz de sobrevivir por sí sola y transformarse en una planta adulta.

En muchas semillas los cotiledones y el ápice caulinar emergen cuando el hipocótilo se alarga, como resultado de un

crecimiento intercalar; este tipo de germinación se denomina epígea. En otras plantas, los cotiledones, que contienen las sustancias de reserva, permanecen dentro de la testa y bajo el suelo y el hipocótilo apenas si se alarga; este tipo de germinación se llama hipogea.

Durante el periodo de imbibición se inicia la síntesis de proteínas y de ARN (CHEUNG y SUHADOLNIK, 1979); paralelamente, los materiales almacenados durante la formación de la semilla, entran a formar parte de las rutas metabólicas. Se ha observado que el tiempo requerido para la iniciación de la síntesis de proteínas es menor que el empleado por la célula para la síntesis en el núcleo, maduración y transporte hasta el citoplasma de los ribosomas. Por tanto, para gran parte de la síntesis inicial de proteínas se utilizan ribosomas preexistentes en la semilla seca (SPIEGEL y MARCUS, 1975).

Algunos componentes de vida corta de las células hidratadas, deben ser sintetizados en periodos pregerminativos o durante la misma germinación.

Progresivamente, se van sustituyendo las moléculas de ARNm preexistentes por otras idénticas y, además, van apareciendo nuevas especies de ARNm, a partir de genes que se activan durante el proceso germinativo, que codifican a proteínas específicas, en su mayor parte hidrolíticas, relacionadas con la germinación. En capas de aleurona de cereales y en cotiledones de leguminosas, se han detectado varias ribonucleasas cuya función es la de degradar el ARN en nucleótidos que serán transportados al embrión para la síntesis de ARNs propios. Sin embargo, tanto en cebada

como en *Pisum sativum*, se ha demostrado que los nucleótidos que llegan al embrión, no son suficientes para mantener su crecimiento, lo que hace suponer que en los embriones existe síntesis de nucleótidos, utilizando, probablemente, el nitrógeno de las reservas proteicas.

Parece aceptable que la replicación del ADN sea un fenómeno relativamente tardío en la germinación, 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 las mismas.

En la naturaleza, la formación de la semilla no siempre va seguida de la germinación de la misma, aunque sea viable. Por ejemplo, hay gran número de sustancias capaces de inhibir la germinación. Algunos de estos compuestos son tóxicos para la vida del organismo y, a concentraciones elevadas, provocan la muerte de la semilla. Hay otras sustancias de gran interés que inhiben la germinación, pero sin dañar irreversiblemente a la semilla.

Los inhibidores pueden ser de varios tipos:

- Inhibidores osmóticos. Son sustancias capaces de producir una elevada presión osmótica en el medio de germinación de la semilla. Por ejemplo, azúcares, sales orgánicas, etc. Esta inhibición es reversible ya que si se sustituye esta solución por agua, la semilla puede germinar.

- Inhibidores metabólicos. Serán todas las sustancias que interfieran en el metabolismo normal de la semilla, por ejemplo, los inhibidores de la respiración como el cianuro, dinitrofenol, azida, etc. O, aquellas que afecten a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas como el 5-fluor-uracilo que inhibe la

síntesis de ARNr y ARNt (KEY y cols., 1972); la α -amanitina que inhibe la síntesis de ARNm (JENDRISACK y GUILFOYLE, 1978), etc.

- Inhibidores fisiológicos, el más importante de los cuales es el ABA, ya que se ha comprobado que existe relación entre sus niveles y la incapacidad de germinar (MILBORROW, 1974a).

Además de las sustancias inhibidoras hay un proceso natural que puede impedir o retrasar la germinación. Se trata de la dormición. Esta hace que, semillas consideradas viables, no germinen aunque se encuentren en condiciones favorables para ello. Las semillas en dormición, mediante tratamientos especiales pueden germinar.

Según NIKOLAEVA (1977), se pueden distinguir dos tipos de dormición: dormición orgánica o primaria, debida a características intrínsecas de la propia semilla y dormición secundaria, conceptos que se aclararán posteriormente.

1.6.2. El ABA y el desarrollo de la semilla

El ABA fue descubierto primeramente como una sustancia que aceleraba la abscisión de las hojas (OHKUMA y cols., 1963), la dormición en yemas de árboles (ROBINSON y WAREING, 1964) y la pérdida de la flor, en algunas especies vegetales (CORNFORTH y cols., 1966). Posteriormente, se han encontrado evidencias que indican que el ABA también es uno de los más importantes factores fisiológicos que regulan la dormancia y la germinación de la semilla. Primeramente, porque el ABA está presente en todos los tejidos esenciales de la planta. Además, los frutos en maduración y las semillas constituyen una importante fuente de esta

hormona. En segundo lugar, porque la rotura de la dormición de la semilla, a veces, está precedida por una disminución del nivel de ABA. Tercero, el ABA aplicado exógenamente, usualmente tiene un importante efecto inhibitor en la germinación de la semilla. Y, cuarto, los mutantes genéticos que no producen ABA o no responden a él son, a menudo, vivíparos.

Como un regulador del crecimiento de plantas, el ABA tiende a activar aquellos procesos que conducen al desarrollo de la dormancia de la semilla e inhibe los que están asociados con la germinación de la misma.

El único caso natural que puede ser similar a los diseñados, es cuando las semillas germinan bajo condiciones de estrés hídrico, ya que éste induce un aumento significativo en los niveles del ABA endógeno. Hay dos alternativas principales para llevar a cabo estos estudios: investigar la germinación precoz de los embriones, cuyo ABA ha sido extraído por lavado. Y, el uso de mutantes vivíparos que existen en gran número en la Naturaleza. Algunos de ellos no producen ABA y parecen carecer de dormición y, sólo pueden germinar cuando están en la planta madre.

El ABA actúa sobre distintos procesos fisiológicos durante la germinación de la semilla. Usualmente, tiene efectos importantes, tanto en tejidos de origen embrionario: raíces, coleóptilos y cotiledones, como en tejidos no embrionarios (el endospermo). Aunque los dos tipos de tejidos son parte integral de las semillas en germinación, sus respuestas al ABA no están relacionadas necesariamente. La cinética de los efectos del ABA

en los tejidos embrionarios es, a menudo, diferente de la de tejidos no embrionarios.

El efecto común del ABA en el tejido embrionario es, o una lenta inhibición del crecimiento, o ningún efecto. Hay estudios al respecto en tejidos embrionarios de distinta procedencia. Así, el embrión de trigo es un buen sistema para el estudio de la germinación de la semilla, por la gran cantidad de embriones viables que pueden ser aislados fácilmente. Los cambios bioquímicos asociados con el comienzo de la germinación, como reactivación de la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos y formación de ATP, han sido bien caracterizados (RODAWAY y MARCUS, 1980). El nivel de ABA comienza a aumentar hacia la mitad del periodo de desarrollo y, disminuye cuando las semillas están maduras y preparadas para la germinación (KING, 1976).

También hay un sistema de estudio en embriones de haba y algodón. Este último sistema presenta varias ventajas: que los embriones pueden ser cultivados en las primeras etapas del desarrollo y que los embriones inmaduros pueden germinar precozmente, después de la extracción de los inhibidores endógenos de la germinación como el ABA. Leon DURE y cols. han estudiado extensamente la embriogénesis y la germinación, en semillas de algodón. La embriogénesis puede dividirse en tres fases que podrían ser aplicables a otras semillas:

- En la primera tiene lugar la síntesis rápida de ADN y la división celular. Se mantienen las conexiones vasculares entre la semilla en desarrollo y la planta madre. Parece probable que hormonas vegetales del tipo auxina o citoquinina, regulen el crecimiento del embrión.

- En la segunda fase del desarrollo, la síntesis de ADN y la división celular cesan y, se sintetizan proteínas de reserva y otras específicas, propias de la semilla madura. También se sintetizan algunos mensajeros específicos de la germinación, siendo su traducción inhibida por ABA, cuyo nivel aumenta marcadamente en esta fase. Por tanto, la función del ABA es prevenir el viviparismo que podría llevar a la muerte de la semilla. Los embriones en esta fase del desarrollo, separados de la planta madre, pueden germinar precozmente si se elimina el ABA. Esta hormona, añadida después del lavado, bloquea de forma efectiva la germinación, lo que indica que es el principal, si no el único, inhibidor de la germinación "in situ".

- La última fase del desarrollo de la semilla es el proceso de desecación. Los niveles de ABA disminuyen en esta fase y las semillas están preparadas para germinar, sin necesidad de tratamientos especiales.

Todos estos datos han dirigido los trabajos sobre el estudio de los efectos del ABA, en semillas inmaduras, a numerosos procesos, principalmente:

1) La maduración de la semilla, prevención de la precocidad de la germinación e inducción de la dormición (por ejemplo, "detención" del desarrollo).

2) La abscisión y senescencia de semillas y frutos y las respuestas de otras partes de la planta, inducidas por la semilla.

3) El crecimiento de la semilla, incluyendo los efectos en la tasa y duración del crecimiento y la composición de las sustancias de reserva de la misma.

En relación a la presencia del ABA en semillas inmaduras, se sabe que los niveles de éste aumentan durante el desarrollo de la misma. En algunos casos, la acumulación alcanza el máximo, al final de la deposición de materia seca, generalmente paralela al aumento de peso seco de la semilla (trigo y guisante).

Generalmente, hay un pequeño transporte de ABA desde la semilla inmadura hacia la semilla seca. No se conoce la extensión de este transporte, que está influido por el aumento de los niveles de ABA, como se ha encontrado en semillas que crecen bajo condiciones restrictivas de temperatura, nutrición o disponibilidad de agua. Por otra parte, la rapidez de la disminución del ABA puede depender de la pérdida de agua por la semilla, al madurar.

El contenido total de ABA depende de la entrada de éste al tejido, del intercambio y del "pool" medido en el mismo. Las máximas concentraciones de ABA, encontradas en semillas, oscilan desde 10^{-4} M, en soja, a 5×10^{-7} M en cereales. En semillas inmaduras de legumbres, la concentración y el contenido total de ABA son más altos que en cereales. Lo mismo ocurre con los metabolitos del ABA, en semillas secas maduras de legumbres y cereales. En éstas también existe ABA ligado con un comportamiento similar al libre.

Parece ser que las diferencias en los contenidos de ABA son hereditarias. Por ejemplo, el contenido de ABA en líneas isogámicas de tomate, está controlado por un gen.

También pueden tener importancia, las condiciones ambientales, sobre el contenido hormonal de la semilla. Por ejemplo, el estrés hídrico, durante el desarrollo de semillas de

altramuz y cebada, induce un aumento de los niveles de ABA.

Como se ha dicho anteriormente, al encontrar el continuo aumento del contenido del ABA, durante el desarrollo de la semilla, y su rápido descenso al madurar ésta, se han estimulado los estudios acerca del papel de dicho inhibidor en el control del desarrollo. Los primeros trabajos sobre el cambio en el contenido de ABA, en tallos de algodón en desarrollo (ADDICOTT y LYON, 1969; DAVIS y ADDICOTT, 1972), implican al ABA en el control de la geminación de embriones inmaduros y en la senescencia y abscisión de tallos. Las evidencias recopiladas por estos autores, en gran número de fuentes, indicaban que la semilla inmadura germinaba, realmente, cuando procedía de tallos que contenían poco ABA. Sin embargo, la germinabilidad era menor en semillas viejas, procedentes de frutos maduros, con niveles más altos de ABA.

Los autores anteriores, también examinaron la relación entre ABA, germinación de semillas inmaduras de algodón y la producción de los enzimas formados en la germinación normal. Y, han sugerido que los mensajeros para estos enzimas son producidos durante la embriogénesis, pero que el ABA bloquea su subsecuente traducción, hasta la madurez. Esta posible acción del ABA aplicado, a nivel molecular, fue considerada una evidencia para asignar un papel al ABA endógeno en el control de la germinación precoz.

Pero, en trabajos posteriores (RADIN y TRELEASE, 1976), dudaron acerca del uso de los inhibidores de la transcripción empleados por DURE y cols. Por otra parte, la correlación entre ABA endógeno y respuesta de la semilla, no ha sido examinada adecuadamente, en algodón.

IHLE y DURE (1972) indicaron que el ABA era transportado hacia la semilla, donde tenía un importante papel regulador, en el metabolismo inicial. Sin embargo, éste no se ha visto apoyado por experimentos posteriores. A pesar de la necesidad de un nuevo examen de los datos encontrados en algodón, hay algunas evidencias, en otros sistemas, de cambios dependientes del tiempo en el control de la síntesis de otras proteínas y enzimas por ABA. Hay dos ejemplos al respecto, la producción del enzima α -amilasa durante el desarrollo de los granos de cereal y la síntesis de proteínas de reserva en haba.

SUSSEX y DALE (1979), pusieron de manifiesto que la aplicación de ABA a cotiledones inmaduros de haba, favorecía la síntesis de una proteína de reserva específica. Normalmente, esta proteína específica se acumulaba en la semilla intacta, al mismo tiempo que aumentaba el contenido de ABA en la misma, por lo que pensaron que el aumento de esta hormona en cotiledones de haba, regulaba la síntesis de proteínas de reserva.

Se ha intentado encontrar una relación entre el ABA, en semillas de cereales, y el control de la producción del enzima α -amilasa. Es bien conocida la inhibición por este inhibidor, de la síntesis de α -amilasa inducida por GA_3 , en el endospermo de los granos maduros en germinación (HO, 1982). La cuestión está en comprobar si existe una relación continuada, a través del periodo de desarrollo del grano. Hay evidencias acerca de este aspecto ya que, a medida que desciende el contenido de ABA, y con la desecación del grano de cereal al madurar, es más posible la producción de α -amilasa inducida por GA_3 . La desecación prematura del grano inmaduro, no sólo produce inducción de la producción de

α -amilasa, en respuesta a la GA_3 (EVANS y cols., 1975; KING, 1976; KING y GALE, 1980), sino que también se produce un aumento de la degradación del ABA aplicado (KING 1979) y la pérdida en el contenido de ABA endógeno del grano (KING, 1976).

Se ha sugerido que la pérdida de agua induce cambios sutiles en la membrana, que pueden ser esenciales para que las células de la capa de aleurona, respondan a la adición de GA_3 . Pero, la desecación no es el único requerimiento, sino que hay otros cambios evidentes en el crecimiento del grano y, en la pérdida de agua de éste, lo que incluye el secuestro de compuestos claves como fosfato, que puede influir en la utilización del ATP (WILLIAMS, 1970; WALBOT, 1971).

El nivel de sacarosa y otros sustratos, también pueden disminuir. Estos cambios pueden ser los responsables de la alteración de la sensibilidad a las giberelinas después del desecamiento.

Aunque la disminución en el contenido en ABA en el grano seco, parece correlacionada con el aumento de la sensibilidad a la inducción por GA_3 de la α -amilasa, no es cierto que las variaciones del ABA, actualmente controle esta respuesta.

En la semilla madura, la aplicación de ABA, puede inhibir la germinación. Hay evidencias directas acerca del papel del ABA en la prevención de la germinación precoz de semillas inmaduras, en la correlación inversa entre el contenido en ABA de la semilla y la germinación que se ha encontrado, por ejemplo, en guisante, soja, trigo, cebada y haba.

Pero, la mayor parte de la semilla de haba es degradado en

la etapa tardía del desarrollo, antes del comienzo de la germinación (VAN ONCKEKEN y cols., 1981). Una forma de evitar esta complicación puede ser, someter, prematuramente, a la semilla a distintos "niveles de secado" y, así, establecer semillas que contengan distintos niveles de ABA. En estos experimentos, la germinabilidad del embrión, así como la inducción de α -amilasa, están correlacionadas inversamente con el contenido de ABA.

Otra evidencia del papel del ABA en la prevención de la germinación precoz, se ha obtenido al estudiar mutantes vivíparos de maíz. No se sabe si el contenido de ABA disminuye en las semillas inmaduras de mutantes de *Arabidopsis thaliana* aisladas por KOORNNEEF y cols. (1982), cuya germinación es insensible al ABA, o en los mutantes de cebada con amilasa sensible al ABA, (con poco inhibidor en sus semillas maduras).

Los estudios con embriones aislados, también aportan información sobre el papel del ABA en la prevención de la germinación precoz. En embriones jóvenes (de 5 días ó menos), algunos autores han encontrado que el crecimiento normal en cultivos, sólo es posible en presencia de ABA. En ausencia de éste, el desarrollo es aberrante y se produce la germinación precoz de la semilla. Cerca de la madurez, puede haber un periodo breve de quiescencia o dormición, como se ha visto en trigo y algodón. Pueden resaltarse dos aspectos de la aparición de dormición en embriones: 1^o, puesto que el embrión joven puede germinar completamente (por ejemplo, el trigo), entonces, la dormición presente en los embriones maduros, no es la que está implicada en la inmadurez. Y, 2^o, la dormición reside en el

embrión aislado. Por tanto, no está impuesta por barreras físicas a la germinación. La causa de esto y la de la imposición de la dormición, así como su pérdida al madurar, están correlacionadas con el aumento y disminución del ABA, por lo que es posible que éste sea el encargado de impedir la germinación precoz.

También deben influir otros compuestos en la regulación química de la germinación, en contra o en concierto con el ABA. Comparando el desarrollo de dos especies, BERRIE y cols. (1979), concluyeron que la pérdida de la dormición no estaba relacionada con los cambios en los niveles de ABA, sino con el contenido de ácidos grasos volátiles; en tomate, se debería a la existencia de solutos osmóticamente activos y al nivel de ABA, etc.

Por otra parte, como ya se ha dicho antes, en algunos frutos en desarrollo y en semillas, hay correlación entre la acumulación de materia seca y su contenido en ABA. Por ejemplo, en grano de uva, se ha encontrado correlación entre el contenido de ABA y el de azúcar. HSU (1979) demostró que el contenido en ABA de las semillas de dos cultivos de habas, aumentaban por un patrón bifásico, paralelo al crecimiento, también bifásico, de estas semillas. Sin embargo, esto es infrecuente. El ABA influye en la distribución de los asimilados en trigo. A su vez, DEWDNEY y McWHA (1979) encontraron que el ABA inyectado al grano en maduración causa un rápido aumento (< 10.5 h) de los asimilados fotosintéticos en el pedúnculo. Pero, estos datos no se pueden considerar como una base adecuada que permita afirmar que el ABA promueve el transporte de asimilados hacia la semilla, aunque se ha comprobado que aumenta la entrada de materia seca.

En contraste con las evidencias acerca del ABA como promotor

del crecimiento de semillas y de la entrada de asimilados en las mismas, hay muchos trabajos sobre la carencia de efectos y sobre una inhibición del crecimiento. En espigas cortadas de trigo, cultivadas en solución de sacarosa y en oscuridad, se produce un rápido crecimiento. Sin embargo, la adición de ABA al medio, no tiene efecto promotor en el crecimiento del grano, durante un periodo de cinco días. De hecho a las dosis requeridas para aumentar los niveles endógenos de ABA, el crecimiento del grano era inhibido.

En cebada, el ABA aplicado reduce el crecimiento del grano (WAGNER, 1974), pero no se sabe si actúa directamente sobre él o indirectamente, en la provisión de asimilados por las hojas y por la fotosíntesis en la espiga.

En cuanto a la actuación bioquímica del ABA en la semilla y en otros tejidos, hay básicamente dos tipos de respuesta, cuando son tratados con el inhibidor:

1) Una respuesta muy rápida que tarda pocos minutos en expresarse; usualmente menos de una hora para una acción completa. Por ejemplo, el efecto del ABA en los procesos relacionados con la membrana, como el transporte de K^+ en las células guarda (alteración de la permeabilidad). La rapidez de esta respuesta indica que el ABA, probablemente, no induce ninguna alteración en la síntesis de proteínas y/o ácidos nucleicos.

2) Una respuesta lenta, que usualmente tarda horas e incluso días en expresarse. Por ejemplo, la inducción de dormición en semillas y yemas, la formación de la capa de

abscisión del fruto y la regulación de la senescencia de la hoja. Todas estas respuestas están relacionadas con la diferenciación celular y, de esta forma, dependen de la síntesis de nuevas proteínas y de ácidos nucleicos.

Pero, ¿tienen lugar estos dos tipos de acción del ABA en la germinación de semillas?. GALLI y cols. (1979), observaron que el ABA a 10^{-5} M inhibía completamente la emergencia de la radícula de semillas de *Haplopappus gracilis*, y este efecto no era revertido con efectividad por fusicoccina, una toxina fúngica que promueve el intercambio H^+/K^+ en membranas vegetales. En todo caso, la FC tiene efecto limitado en la reversión de la inhibición del ABA sobre el crecimiento postgerminativo. El ABA, en esta etapa tardía de la germinación, inhibe la síntesis de ADN como se ha demostrado por la incorporación de 3H -timidina en los núcleos, y la FC no puede revertir esta inhibición. Por tanto, estos autores han sugerido que hay dos mecanismos diferentes por los que el ABA puede inhibir la germinación en *H. gracilis*: un mecanismo que interfiere con el intercambio de K^+ a nivel de la membrana celular, que es revertido por FC, y otro mecanismo que influye en la síntesis de ácidos nucleicos y que no es afectado por FC.

1.6.3. Relaciones con la dormición y germinación

La germinación y la dormición son dos procesos de gran importancia para el desarrollo y propagación de las especies vegetales.

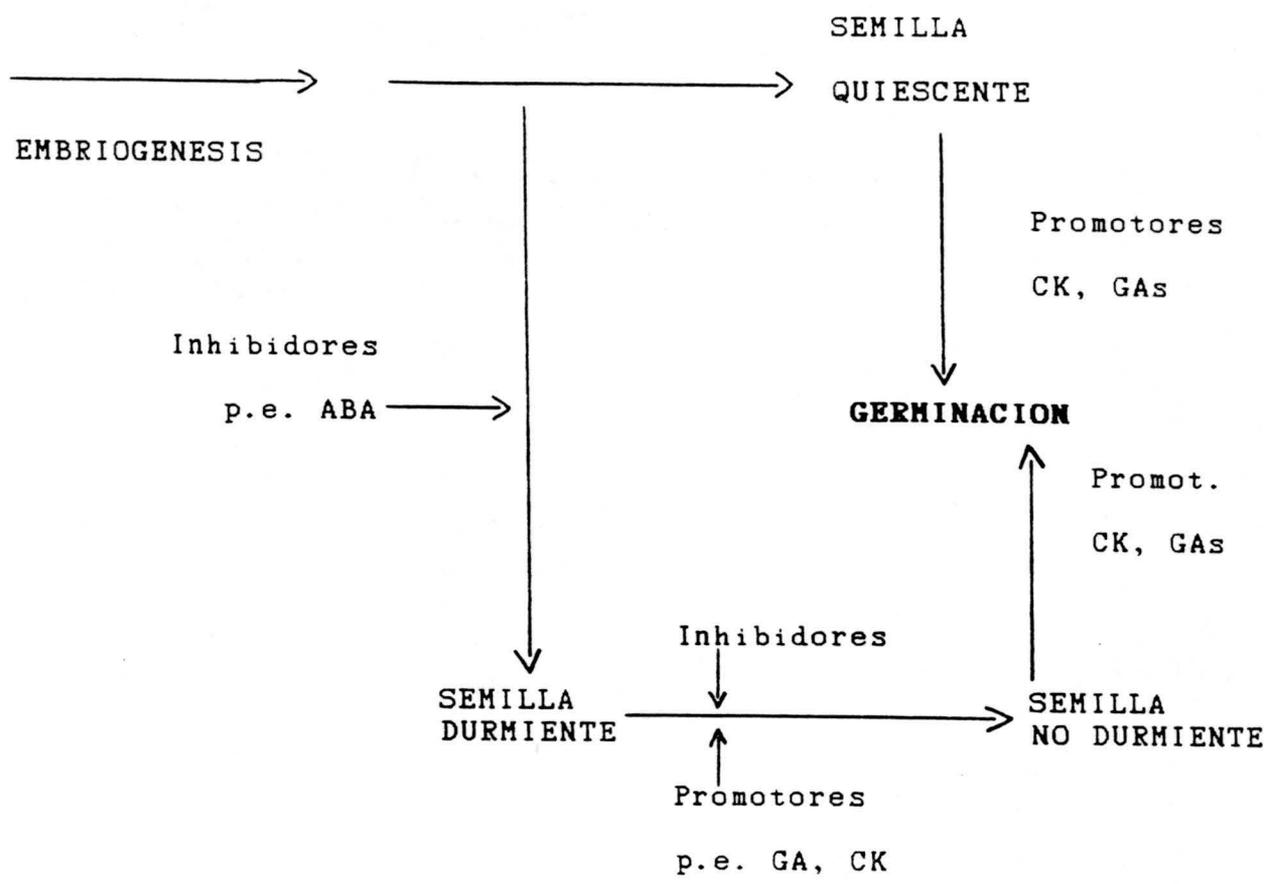
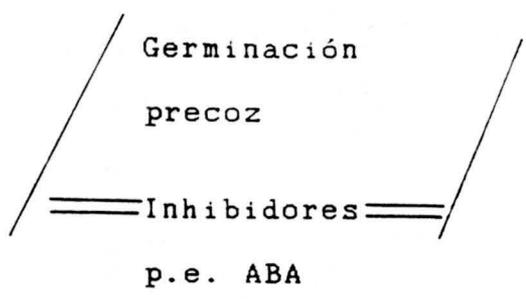
El desarrollo de la semilla comienza inmediatamente después

de la fertilización del óvulo y, por un proceso de maduración, da lugar a la semilla fértil y preparada para germinar. Esto ocurre de forma general. Pero la semilla también puede entrar en dormición. Como se había citado anteriormente, según NIKOLAEVA (1977) se pueden distinguir dos tipos de dormición:

- Dormición orgánica, también llamada primaria. Se debe a características intrínsecas de la propia semilla. Puede estar provocada por diversas causas como, inmadurez del embrión, impermeabilidad de la cubierta seminal al agua o a los gases, resistencia mecánica al desarrollo del embrión, requerimientos especiales de luz y temperatura, o presencia de sustancias inhibitoras de la germinación.

- Reposo o dormición secundaria. La presentan las semillas que son capaces de germinar perfectamente en condiciones favorables, pero que, por cualquier causa, pierden esta capacidad para germinar. La dormición secundaria se puede desarrollar espontáneamente debido a cambios internos en la semilla o, si las semillas tienen todas las condiciones óptimas para germinar, excepto una, que podría ser la luz, la temperatura o la concentración de CO_2 . En estas condiciones, se producen cambios metabólicos que pueden afectar a la permeabilidad, al fitocromo, a la relación entre inhibidores y activadores, etc.

Los procesos de maduración, germinación y dormición de la semilla, están controlados por los reguladores del crecimiento, principalmente citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, como puede verse en el siguiente esquema:



Durante el desarrollo de la semilla hay inhibidores que limitan el crecimiento del embrión o la germinación. Si la inhibición no se produce, el embrión germina precozmente, cuando la semilla está todavía en la planta madre. Para evitar la germinación precoz, la planta posee un sistema inhibitor. Así, en algodón, el agente que mantiene reprimido el crecimiento del embrión es el ABA.

En este sentido, poco después del descubrimiento del ABA,

empezaron a realizarse experimentos para relacionarlo con la regulación de la germinación y dormición. Estos estudios se apoyaron en su demostrada presencia en semillas (ADDICOTT y LYON, 1969), en su actuación, en ciertos casos, como inhibidor del crecimiento y, quizás, debido a su probable relación con la entrada en dormición de yemas. Por tanto, fue a partir de los años sesenta cuando se iniciaron los estudios del posible papel de esta fitohormona en los procesos de embriogénesis, maduración y germinación de las semillas, destacando sobre todo los trabajos realizados en semillas de algodón.

Hay un gran peligro en la interpretación de los resultados de experimentos en los que se usan concentraciones muy altas (no fisiológicas) del regulador. Por tanto, aunque los descubrimientos no pueden ser desdeñados, deben tratarse con precaución.

Aunque, plantas y semillas responden a las aplicaciones de reguladores del crecimiento, tanto naturales como sintéticos, es relativamente fácil analizar el ABA en tejidos vegetales y hay mucha información sobre las cantidades endógenas de éste, en diferentes órganos y en distintos periodos del desarrollo, no es posible correlacionar el estado fisiológico de una semilla con su contenido hormonal, por ejemplo de giberelinas (BLACK, 1980/81) y ABA (WALTON, 1980/81).

La germinación de la mayoría de las semillas no durmientes se inhibe con ABA exógeno, al igual que el crecimiento de los ejes embrionarios aislados. La concentración inhibidora varía dependiendo de la especie. Por ejemplo, *Lactuca sativa* es sensible a concentraciones de 3 μM , mientras que *Acer*

pseudoplatanus lo es a 40 μ M. En realidad, no se sabe si estas distintas respuestas se deben a una diferencia de permeabilidad frente a la sustancia reguladora o a una sensibilidad específica, por parte del órgano o tejido, al ABA. En algunos casos, la inhibición puede ser revertida por citoquininas, etileno o fusicoccina (GALLI y cols., 1979).

El ABA inhibe ciertos enzimas asociados con la germinación. Por ejemplo, la endo- β -mananasa en lechuga, aunque la reducción de la actividad enzimática podría ser debida a la reducción de la germinación y no a la acción directa del ABA (HALMER y cols., 1976). Según MILBORROW (1974), el ABA exógeno puede inhibir la germinación de semillas no durmientes, afectando a los procesos de transcripción o traducción. En este sentido, HIGGINS y cols. (1976) han demostrado que el ABA inhibe la producción de α -amilasa en capas de aleurona de cebada inducida por giberelinas, actuando principalmente sobre el procesos de transcripción.

El ABA, aplicado exógenamente, también afecta al movimiento de protones y del potasio en semillas en germinación, inhibiendo la salida de protones y el intercambio de potasio en semillas de **Raphanus sativus**, **Zea mays**, etc. Esta inhibición puede ser revertida por fusicoccina (FC) (LADO y col., 1975; COCUCCI & COCUCCI, 1977; BALLARIN-DENTI & COCUCCI, 1979; GALLI y cols., 1979). Según estos autores, la inhibición del ABA sobre células en expansión, en las primeras etapas de la germinación, es reversible por FC. En las fases más tardías, el ABA actuaría sobre los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, con un efecto no revertido por FC.

De los resultados obtenidos por una serie de investigadores y por nosotros mismos, parece deducirse que el ABA impide una toma de agua normal por parte de los tejidos de la semilla, debido a su acción sobre la bomba de protones; esto impide que el eje embrionario pueda romper la cubierta seminal y, por tanto, la germinación (considerando ésta como emergencia radicular). Es decir, el ABA afectaría a la permeabilidad de las membranas de las semillas afectadas.

El papel que pueda jugar el ABA residual u otro que pudiera sintetizarse durante la imbibición, todavía no se conoce, aunque hay algunos estudios al respecto. En este sentido, se sabe que el contenido de ABA endógeno aumenta durante el proceso de maduración de la semilla, alcanzando la mayor concentración cuando el peso seco incrementa rápidamente. Se ignora aún si este aumento se debe a la síntesis "de novo" del regulador, a partir del mevalonato, o a un aporte de la fitohormona, de forma conjugada, desde otras partes de la planta.

Hay algunos datos que sugieren que es la síntesis la que predomina. En este sentido, DURE (1975) ha propuesto que, en algodón, el ABA se forma en el óvulo y posteriormente es trasladado al embrión donde lleva a cabo sus funciones.

Como ya se ha indicado, durante el proceso de embriogénesis se sintetizan grandes cantidades de ácidos nucleicos y proteínas, fundamentales en la germinación. Por otra parte, se sabe que el ABA alcanza altas concentraciones durante dicho proceso. Estos hechos han inducido a ciertos autores a intentar relacionar al ABA con los procesos de traducción y transcripción.

Según Dure, durante el proceso de maduración de la semilla el ABA estaría bloqueando la expresión de ciertos ARNms que codificarían proteínas de gran importancia germinativa, y sólo permitirían su traducción cuando la semilla se encontrara en condiciones óptimas de germinación. Por tanto, el papel del ABA consistiría en evitar la germinación precoz de la semilla inmadura o dicha germinación cuando la semilla esté frente a condiciones adversas. Pero, como ya se apuntó anteriormente, no se puede afirmar taxativamente que sea el ABA el que impida la traducción de los ARNms ya que también podría deberse a algún factor inherente al propio ARNm.

Un proceso clave controlado por los reguladores del crecimiento, es la **dormición**. Esta es un estado especial de inactividad, durante un tiempo determinado, en el que la actividad metabólica está inhibida de forma reversible.

La dormición se produce frente a condiciones, tanto internas como ambientales, específicas. Se puede presentar en distintos órganos y partes del vegetal, aunque tiene mayor importancia la producida en yemas y semillas. En el caso de la semilla, la dormición es la posibilidad de mantener la viabilidad cuando la actividad metabólica esté restringida y el crecimiento no sea observable (BERRIE, 1975).

En este sentido se podría decir que, si la dormición no existiera, debería ser inventada ya que es un mecanismo que permite la supervivencia de la planta, en condiciones adversas, reduciendo al mínimo posible la actividad metabólica. En semillas, esto se consigue por desecación o manteniendo el

metabolismo en niveles muy bajos. En yemas, este estado se puede inducir exponiendo la planta a días cortos (verano tardío y otoño). El crecimiento de los brotes se detiene antes de la caída de la hoja y, sólo cuando el órgano durmiente reciba la información de que las condiciones climáticas son las adecuadas, volverá a crecer.

En la inducción y mantenimiento de la dormición, parece tener gran importancia el ABA. En semillas durmientes, se ha observado una concentración endógena de ABA mayor que en las no durmientes. Podría ser que el mantenimiento de altas concentraciones de ABA, durante el proceso de maduración de la semilla, indujera dicho estado. Sin embargo, no se puede afirmar nada de manera evidente. A este respecto, algunos trabajos con tratamientos de ABA, han demostrado que se puede reproducir dormición en embriones en que ésta haya sido rota previamente. Por ejemplo en *Taxus baccata* (LE PAGE-DEGIVRY, 1973). Según KARSEN, en esta dormición secundaria, el efecto del ABA probablemente no es específico. Este estado de reposo puede ser conservado, al menos en melocotón, manzana, caña de azúcar y sicomoro, aún cuando la concentración del inhibidor disminuya en la semilla. El ABA está envuelto en el comienzo y mantenimiento de la dormición, pero su continua presencia es claramente innecesaria, ya que este estado se mantiene aún después de que se pierda el inhibidor. Parece que se rompe por un aumento en los niveles de promotores endógenos como giberelinas y/o citoquininas más que por la disminución del inhibidor.

Por otra parte, el proceso de estratificación, aplicado a semillas durmientes, hace que la concentración de ABA descienda y

que éstas aumenten su capacidad germinativa. Sin embargo, no siempre existe una correlación entre la disminución en el contenido de ABA y la salida de la dormición, lo que complica el significado de la fitohormona en su relación con otras etapas en el desarrollo de la semilla. No obstante, experimentos recientes con mutantes de **Arabidopsis thaliana**, deficientes en ABA, han permitido probar el papel de la hormona en la inducción de la dormición primaria. Estos mutantes tienen una gran transpiración y carecen de dormición en sus semillas, siendo un único gen el responsable de tales respuestas. La dormición sólo se desarrolla si existe ABA añadido exógenamente en el eje embrionario (KARSSSEN y cols., 1983; KOORNNEFF y cols., 1982). El empleo de mutantes deficientes en ABA abre una puerta de gran importancia para el estudio de esta fitohormona; su empleo comenzó hace relativamente pocos años (McDANIEL y cols., 1977; ROBICHAUD y cols., 1980) y, en la actualidad, los usan varios investigadores como una herramienta más de trabajo en la Fisiología de las fitohormonas, ya que, entre otras causas, **A. thaliana** posee un genoma muy corte, fácil de estudiar.

En el año 1979, el prof. SCHOPFER y sus colaboradores publicaron un trabajo que refleja claramente uno de los probables papeles del ABA en la dormición. En semillas de **Sinapis alba**, esta fitohormona, añadida exógenamente, impide la emergencia radicular y provoca una inducción de la dormición, la cual se evita cuando el ABA se elimina del medio, volviendo la semilla a tomar agua con normalidad y continuando el proceso germinativo. Sin embargo, las semillas que eran preincubadas con agua, perdían

la sensibilidad al ABA y no entraban en dormición, si previamente no se sometían a una desecación suave. Estos investigadores concluyeron que: "la acción primaria del ABA en la inhibición de la germinación es controlar la toma de agua por el eje embrionario más que controlar la síntesis de ADN, ARN y proteínas" (SCHOPFER y cols., 1979).

Según algunos autores (REYNOLDS y THOMPSON, 1971; ALDASORO y cols., 1981), la efectividad del ABA como inhibidor puede aumentar con la temperatura, mientras que el nivel de ABA "per se", no debe ser un factor importante. Lo que se ha comprobado en experimentos con ABA exógeno, mientras que con ABA endógeno no está bien estudiado. Este fenómeno está relacionado con el proceso de termodormición: a temperaturas ligeramente altas, ciertas semillas no son capaces de germinar. Esto, probablemente, no se deba al aumento de los niveles de ABA con la elevación de la temperatura. Ejes embrionarios aislados de *Cicer arietinum*, incubados en agua, crecen normalmente a 30°C; cuando se añade ABA a concentraciones bajas (25 µM), a 25°C (temperatura óptima de crecimiento) apenas tiene efecto, pero a 30°C se produce una notable inhibición del crecimiento. Sin embargo, BALBOA-ZAVALA y DENNIS (1977), encontraron que, semillas de manzana sometidas a 5-20°C no presentan grandes diferencias en la disminución del contenido de ABA, mientras que la dormancia sólo se rompe a 5°C.

Se puede concluir que la reducción del contenido en ABA en semillas, no es suficiente para romper la dormición, sino que esto se debería al balance entre este inhibidor y otras hormonas como citoquininas y giberelinas.

BRAUN y KHAN (1975) y BERRIE y ROBERTSON (1976) han indicado

que la aparente correlación entre los niveles de ABA y la germinabilidad, varía con el tipo de semilla estudiado. Por otra parte, la sensibilidad al ABA cambia según las circunstancias; por ejemplo, las semillas germinadas en ausencia de ABA hasta la emergencia radicular, son insensibles al inhibidor si se lo administramos con posterioridad (GALLI y cols., 1980). Esto se podría explicar con los estudios realizados por BEX (1972) en semillas de lechuga, que han permitido que en su proceso de germinación se puedan distinguir tres estadios de crecimiento:

- Un primer estadio en el que tiene lugar la extensión de la radícula, produciendo la rotura sólo de la testa externa.

- En una segunda etapa, la radícula inicia su elongación, sin que llegue a romper completamente la testa interna ni el endospermo.

- Un tercer estadio, en el que aparece la radícula desnuda.

Cuando a las semillas se les administra ABA exógeno, casi todas son capaces de pasar al estadio 2 y muy pocas al 3. Utilizando ^{14}C -ABA se ha deducido que el inhibidor, que puede entrar fácilmente a través de la cubierta seminal, no afecta a la fase inicial de la elongación celular, sino que estará implicado en posteriores procesos del crecimiento (BLACK, 1983).

Además, en tejidos diferentes, el ABA puede causar efectos totalmente opuestos debido, probablemente, a las diferentes características del sistema bioquímico relacionado con el receptor hormonal, lo que estaría de acuerdo con el modelo propuesto por TREWAVAS, en el que las respuestas de la células vegetales a las diferentes fitohormonas, no son rígidas sino plásticas (TREWAVAS, 1979).

1.6.4. Efecto sobre actividades enzimáticas

1.6.4.1. RIBONUCLEASAS

Es probable que la regulación del metabolismo del ARN sea importante durante el desarrollo y, particularmente, en la germinación.

Los ácidos nucleicos son moléculas que necesitan reponerse durante el proceso germinativo, debido a su agotamiento en las primeras etapas de la germinación y, su demostrada relación con la síntesis proteica existente. CHEUNG (1979) demuestra, por primera vez, que durante los minutos iniciales de la germinación, hay síntesis "de novo" de ARN. Parece que no hay duda en aceptar que la replicación del ADN es un fenómeno tardío en la germinación, iniciándose después de que tenga lugar una considerable síntesis de proteínas (CHEN y OSBORNE, 1970; REJMAN, 1971; etc.).

VILLIERS (1974), coincide en proponer que durante los primeros momentos de la germinación hay fenómenos de reparación nuclear y citoplasmática, durante la cual, la síntesis de proteínas, lípidos y membranas restaura la integridad celular, previamente alterada. Se conocen estos procesos en animales; sin embargo, en semillas no hay evidencias directas al respecto.

Hay abundantes datos sobre la síntesis "de novo" de ARN en los primeros momentos de la germinación (CHEUNG, 1979). No está del todo claro el orden, si existe, de la síntesis de los distintos ARNs y sus precursores, tanto en semillas enteras como en embriones.

En la semilla seca no hay síntesis apreciable de proteínas

y, normalmente, no existen polisomas, aunque sí se ha detectado la presencia de ribosomas (MARCUS y cols., 1973; FOUNTAIN y BEWLEY, 1973) y ARNm (PAYNE, 1976). Durante la imbibición, estos ribosomas se unen al ARNm y, en presencia de otros componentes citoplasmáticos preexistentes (factores de iniciación y elongación, ARNt, aminoácidos, ATP, GTP, aminoacil-ARNt, sintetasas, etc.) comienzan la síntesis de proteínas.

La síntesis proteica es un proceso muy temprano en la germinación, comenzando en los primeros momentos de la imbibición (MARCUS y cols., 1975), pero no está muy claro que esta síntesis inicial de proteínas se haga totalmente a expensas del material preexistente. Hay distintas opiniones al respecto, pero parece ser que existen evidencias razonables de que los componentes del complejo de síntesis proteica están almacenados en la semilla seca madura, y parecen estar en cantidades suficientes, al menos para que comience la síntesis de proteínas.

El metabolismo del ARN está regulado por las ribonucleasas. Las moléculas de ARN son estables bajo condiciones fisiológicas y pueden romperse "in vivo" sólo por una hidrólisis enzimática, lo que hace posible su metabolismo y el proceso de la nueva síntesis de ARN, tan importante en la germinación de las semillas.

Esto hace que el conocimiento de los enzimas que degradan el ARN sea importante, no sólo para la propia semilla, sino para conocer los numerosos procesos de regulación y de desarrollo en los que este ácido nucleico está implicado.

Existe gran número de enzimas que rompen el ARN con un modo de acción muy variable por lo que siempre ha sido difícil proponer una nomenclatura correcta y lógica. Sin embargo, podemos

dividir las en endo y exonucleasas, según ataquen enlaces diester internos o terminales de la cadena nucleotídica.

Algunos de estos enzimas pueden atacar enlaces del ARN o de ADN indistintamente, tal es el caso de la endonucleasa S_1 de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.30.1.) (VOGT. V.M., 1973). Otros enzimas son específicos de cada tipo de ácido nucleico.

Las ribonucleasas han sido estudiadas desde tres puntos de vista: a) propiedades enzimológicas, incluyendo su modo de acción; b) posible uso en estudios de la estructura del ARN; c) función fisiológica. Pero, sólo los puntos a) y c) pueden considerarse bien estudiados.

WILSON (1975), publicó una revisión muy completa acerca de las características y problemas relacionados con las enzimas nucleotídicas de plantas.

En plantas se encuentran, al menos, tres familias de enzimas, cada una de las cuales ha sido bien caracterizada: RNasa endonucleasa y exonucleasa con un sustrato específico, modo de acción, localización, pH, peso molecular, etc. determinados para cada una de ellas.

- Ribonucleasa: soluble, modo de acción endonucleotídico y una preferencia muy marcada por los enlaces diester adyacentes a guanina; su producto final son nucleótidos-3' aunque los primeros productos (intermediarios) sean 2'-3' ciclo nucleótidos.

- Endonucleasa: está ligada y rompe tanto ARN como ADN (preferentemente ADN de cadena sencilla); preferencia por enlaces fosfodiester adyacentes a adenina; el producto final son nucleótidos-5'.

- Exonucleasa: es soluble, rompe ARN y ADN (con preferencia

sobre ADN de doble banda) de forma exonucleotídica y produce nucleótidos-5'. Alto peso molecular (100.000).

Los tres tipos de familias de nucleasas han sido descritos en gran variedad de plantas: haba (PIETRZAK y cols., 1980); *Petunia* (PLISCHKE y HESS, 1980); trigo (KROEKER y cols., 1975); *Chlorella* (BROWN y MARSHALL, 1977), etc.

Según su localización subcelular se pueden diferenciar en:

- Solubles. Aunque con grandes diferencias individuales, la mayor parte (80-90%) de la actividad nucleotídica en extractos crudos puede valorarse en la fracción soluble. Sin embargo, el término "soluble" no es del todo exacto.

- Ligados. La actividad total de un enzima nucleotídico en extractos vegetales se reparte, normalmente, en la fracción soluble y en la particulada. El mayor interés, por supuesto, está en saber la naturaleza de los orgánulos celulares implicados. Desgraciadamente, en la actualidad, esto no está muy claro en plantas ya que, en los pocos casos en que lo parece, el orgánulo no estaba suficientemente caracterizado, aunque hay algunos datos, por ejemplo en:

-**Núcleo**. El procesamiento del ARN en el núcleo es conocido desde hace varios años, pero se sabe poco acerca de las nucleasas que lo llevan a cabo en plantas. Así, LYNDON (1966) encontró una actividad residual muy baja (4%) en núcleos de guisante, mientras que BORUCKA-MANKIEWICZ y SZARKOWSKI (1977) consiguieron purificar una nucleasa en los de centeno, aunque con poca certeza de la pureza del núcleo. SRIVASTAVA (1971), purificó una nucleasa unida a cromatina de ceada.

-Cloroplastos. Estos contienen enzimas nucleotídicos para procesar el ARNm y ARNr, pero existe poca bibliografía acerca de ellas, debido principalmente a pérdidas enzimáticas en el aislamiento del cloroplasto. Actualmente, se usa como herramienta de trabajo el protoplasto y, recientemente, se ha encontrado una RNasa en *Anacystis nidulans*, una cianobacteria, que puede existir también en plantas superiores (SCHMAN y cols., 1979).

-Ribosomas. Todas las preparaciones ribosomales contienen enzimas nucleotídicos, en niveles bajos, medios o altos (WYEN y FARKAS, 1971). Sin embargo, la pureza de las preparaciones no es clara, por lo que no podemos afirmar que haya actividad nucleásica unida a ribosomas. Lo que parece evidente es que enzimas de características diferentes, están unidas con distinta firmeza a ribosomas, en preparaciones puras de estos (RIJVEN, 1978; ACTON, 1974).

En resumen, aunque existen muchos datos de la existencia, en plantas, de enzimas unidos a ribosomas con propiedades únicas, ésta no ha sido probada convenientemente.

-Mitocondrias. En la actualidad, existen pocos resultados que demuestren claramente la existencia, en plantas, de enzimas nucleotídicos en sus mitocondrias, a pesar de que WILSON (1971) publicase datos acerca de una "RNasa II" en una preparación mitocondrial no altamente purificada.

-Lisosomas. Son orgánulos rodeados por una doble membrana, que poseen abundantes enzimas hidrolíticos. MATILE (1978) cree que es más apropiado hablar de "compartimentos líticos" que de lisosomas, ya que dentro de este término se suelen englobar, en plantas, a las vacuolas, esferosomas y granos de aleurona. El

mismo MATILE (1978) describe RNasas en una amplia variedad de plantas, con localización vacuolar, mientras que BOYER y KENDE (1979) lo ratifican, usando cloroplastos. VAN DER WILDER y cols. (1980) encontraron RNasas en vacuolas purificadas de cotiledones de haba.

Sin embargo, no se sabe si esta actividad relativamente alta de RNasa en vacuola (en ciertos casos el 80% del total celular) es de características semejantes a la RNasa soluble anteriormente descrita.

Pero, ¿qué influencia tienen las nucleasas sobre la germinación de semillas?. A este respecto, se sabe que los tejidos de reserva de semillas, en particular los cotiledones de las leguminosas, contienen cantidades considerables de ARN almacenado (PAYNE, 1976; MATILLA y cols., 1980). Los productos metabólicos pueden ser usados totalmente después de la hidrólisis para la síntesis de nuevos ácidos nucleicos en los órganos de crecimiento rápido (BEEVERS y GUERNSEY, 1966). Debido a que la actividad RNásica aumenta durante la germinación, en los cotiledones de semillas de leguminosas (BARKER y cols., 1974), así como en los tejidos de reserva de granos de cereales (SUTCLIFFE y BASET, 1973), a menudo ha sido admitida la idea de que el metabolismo del ARN y el incremento en el nivel de RNasa en los órganos de reserva, están correlacionados. Pero, este presupuesto no siempre es cierto, como es el caso de los cereales (INGLE y HAGEMAN, 1960), extendiéndose a monocotiledóneas y dicotiledóneas, en general (BRYANT y cols., 1976).

Así, en gran cantidad de semillas en germinación, la

actividad RNásica puede aumentar simultáneamente con el incremento en ARN; tal es el caso de los ejes embrionarios (TAKAIWA y TANIFUJI, 1978).

Por tanto, parece claro que hay una correlación inversa entre ARN y RNasa en tejidos de reserva y, una correlación directa en órganos de crecimiento.

La actividad RNásica aumenta normalmente durante el desarrollo de la semilla. Sin embargo, puede suceder que exista un descenso en las últimas etapas de éste, debido preferentemente a los fenómenos de acumulación de ácidos nucleicos, previa a la maduración de la semilla.

Las nucleasas están influenciadas por el medio ambiente. Precisamente, quizás la respuesta más uniforme de una célula vegetal a una variación del medio, sea el incremento de la actividad nucleásica. Tal es el caso de fenómenos relacionados con el "stress" (hídrico, calor, frotamiento, osmótico, ataque de parásitos, etc.).

La rotura de hojas, frutos, tejidos de almacenamiento, etc., produce un incremento rápido en la actividad enzimática degradativa de ARN; en ciertos casos, en un periodo entre 1-2 horas después del tratamiento (SACHER y cols., 1975; PITT y GALPIN, 1971). Estas respuestas no parecen estar confinadas a ningún grupo taxonómico en particular y parecen estar provocadas por el daño mecánico, puesto que al recuperarse de éste, la actividad nucleásica se restaura. Esta variación nada tiene que ver con la que ocurre en la fase de envejecimiento normal de la planta (UDVARDY y FARKAS, 1972).

Resultados recientes parecen apuntar a que la actividad

nucleásica está relacionada con el número de células afectadas, desde las que el estímulo es translocado a células vecinas. Pero, el factor que provoca este estímulo todavía no se ha identificado aunque, etileno y ABA pueden estar implicados, máxime sabiendo que las citoquininas, antagonistas conocidos del ABA, revierten el incremento de la actividad RNásica provocado por daño (HODGE y SACHER, 1975). Las actividades nucleásicas en respuesta al daño en los tejidos son, en su mayoría, sintetizadas "de novo" (VARIAN y SACHER, 1978).

Ante la escasez de agua, la célula responde, normalmente, con un aumento de la actividad RNásica (YI y TODD, 1979). Esta respuesta quizás sea debida a un aumento endógeno de ABA.

Así mismo, el "stress osmótico", debido a concentraciones altas, es el principal factor que induce un aumento en la actividad RNásica, aunque estos enzimas no sean sintetizados "de novo".

GALSTON y cols. (1978) encontraron que, en protoplastos aislados, la actividad nucleásica se incrementa, pero que puede ser mantenida a unos niveles bajos por adición de aminoácidos dibásicos o poliaminas, lo que ensancha enormemente el campo de investigación.

Otro aspecto a tratar es el control de la actividad RNásica. Hay varias formas de controlar dicha actividad:

- Un control genético. Aunque se han hecho muy pocos trabajos acerca de la genética de los enzimas nucleotídicos de plantas, siendo el estudio pionero el realizado en maíz, concretamente en la mutación "opaca-2" que reduce la síntesis de zeína e incrementa los niveles de RNasa. Sin embargo, no se han

estudiado las características de este enzima (WILSON y ALEXANDER, 1967; WILSON, 1980), aunque los patrones electroforéticos en el tipo salvaje y "opaca-2" son idénticos.

- Un control hormonal. Hay también muy pocos datos convincentes del efecto "in vitro" de sustancias reguladoras de crecimiento de plantas sobre los enzimas que degradan el ARN. Normalmente, o no se ha encontrado efecto, o éste es muy pequeño.

Por otra parte, "in vivo" hay gran cantidad de datos muy positivos. Por ejemplo, la benciladenina, una citoquinina, hace aumentar el nivel de RNasa en hojas intactas (NAITO y cols., 1979) y el ácido abscísico, un inhibidor natural del crecimiento, incrementa el nivel de RNasa en diferentes tejidos vegetales (DE LEO y SACHER, 1971; WYEN y cols., 1972). La respuesta del tejido a la hormona exógena va a depender de la concentración aplicada, así como de los niveles endógenos de la sustancia reguladora del crecimiento.

La manera que tienen las hormonas para regular los niveles de RNasa es todavía desconocida, pero se supone que la vida media de estos enzimas inducidos, es corta (SACHER y DE LEO, 1977) y que su síntesis está regulada a nivel de transcripción.

La gran cantidad de bibliografía referente a la síntesis de ARN en plantas, contrasta con la escasez de literatura en relación a la degradación de éste. De ahí que se precisen grandes esfuerzos para intentar esclarecer y comprender porqué y cómo se rompen las moléculas de ácido ribonucleico en las diferentes etapas del desarrollo de la planta.

Anteriormente se han esbozado que en los tejidos de

almacenamiento de las semillas, el nivel de ARN desciende durante el periodo germinativo, aunque esto no es óbice para que exista cierta intensidad de síntesis; tal es el caso de *Cicer arietinum* L. (MATILLA y cols., 1982). Esta disminución lleva consigo un incremento en la actividad RNásica responsable, probablemente, e la degradación de este sustrato (MATILLA y NICOLAS, 1983).

En la actualidad, el material de trabajo más empleado es el eje embrionario en el que se inician de forma masiva, ya en el comienzo de la germinación, una síntesis proteica y una acumulación paralelas. El ARNm materno y el de nueva síntesis tienen un papel importante en estos procesos (CAERS y cols., 1979). Es probable, sin embargo, que el mARN almacenado durante la embriogénesis, en su mayor parte poliadenilado, sea degradado durante los primeros instantes de la germinación (DELSENY y cols., 1977).

Se ha especulado mucho acerca de cuales son los productos del metabolismo del ARN que son reutilizados en otros tejidos para la síntesis de ARN. Sin embargo, en determinados ejes embrionarios, la síntesis "de novo" de nucleótidos es más importante que el aprovechamiento de los que se obtienen mediante la degradación del ARN.

El metabolismo y la acumulación de ARN, en plantas, está bajo control hormonal, y resulta afectado por las sustancias reguladoras del crecimiento; tanto a nivel transcripcional como de traducción (MOZER, 1980). Probablemente, es un control sobre la actividad ARN polimerasa, el que tiene una mayor significación en este punto.

1.6.4.2. FOSFATASAS

Antes de entrar de lleno en el estudio de la actividad fosfatasa conviene aclarar algo acerca del metabolismo de la fitina y del fósforo, sustratos del enzima.

La fitina es la sal de calcio y de magnesio del ácido fítico que, a su vez, es el éster hexafosfórico del inositol. Abunda básicamente en el tejido de sostén de plantas superiores. Sin embargo, la presencia de fitina en semillas es sorprendente. Si bien en un principio se pensaba que la fitina se formaba en la embriogénesis, recientemente se demostró que los enzimas implicados en su síntesis existen en la semilla seca y que su síntesis se desencadena en el proceso germinativo.

Al mismo tiempo que se estudiaba el metabolismo de la fitina se elucubró sobre el papel de aquella en servir de almacén de energía. Así, MAYER (1973) describe una serie de experimentos en los que parece dudar de la existencia de la reacción de transfosforilación. Sin embargo, hay evidencias adicionales sobre la posibilidad de que la fitina sea un donador de fosfato.

En semillas, el inicio de la formación de ATP está poco clara; pero también es cierto que la fitasa aumenta de actividad en periodos relativamente tardíos en **Phaseolus** y otras leguminosas (GIBBINS y NORRIS, 1963a y 1963b; GUARDIOLA y SUTCLIFFE, 1971).

La actividad fitásica es reprimida por fosfato inorgánico (MANDAL y cols., 1972) por lo que parece claro que controla directa o indirectamente la caída de fitina.

Por lo que respecta a la actividad fitásica, existen pocos

hechos claros. Pues, si bien en trigo parece que su actividad depende de la síntesis "de novo" de proteínas (MANDAL y BISWAS, 1970), en lechuga (MEYER y cols., 1971) esta actividad no es inhibida por cicloheximida por lo que la reactivación del enzima "preexistente" parece claro.

El sistema fitina-fitasa parece, sin embargo, ser de gran importancia, pues si bien la fitasa aparece en periodos tardíos de la germinación, este sistema funcionaría como donador de fosfato cuando la semilla no tiene de donde obtenerlo. WILLIAMS (1970) niega esta posibilidad.

El fosfato liberado por la fitina se encuentra, como se ha dicho, bastante tarde, pero sin embargo las fosfatasas abundan en semillas secas e incrementan rápidamente durante la germinación. Por lo que es muy probable que el fósforo inorgánico esté presente ya en los primeros estadios de la germinación, no por la degradación de la fitina, sino por la acción de las fosfatasas ácidas y alcalinas.

En cuanto a las fosfatasas ácidas (ortofosfórico monoéster fosforohidrolasa; EC 3.1.3.2.) se pueden definir como enzimas que catalizan la hidrólisis de una gran variedad de ésteres fosfato y tienen un pH óptimo cercano a 6.0 (más bajo).

Descubiertas en glóbulos rojos por MARTLAND (1924). Son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y muy poco específicas. En general, es un enzima que existe en pequeñas cantidades, son muy inestables en solución diluida, y están sometidas a una desnaturalización superficial en estado puro. Estas propiedades y el hecho de que existan bajo múltiples formas, hacen que su aislamiento sea dificultoso.

Debido a los problemas citados, la función de las fosfatasas ácidas está muy poco clara. Entre sus posibles funciones se encuentra la de proporcionar fosfato inorgánico para el metabolismo excretor. Asimismo, se ha descrito a las fosfatasas ácidas implicadas en los procesos reproductores de mamíferos. Un posible papel de la fosfatasa ácida de la próstata del hombre puede que implique la desfosforilación de ésteres para liberar fructosa que sirva de energía para el espermatozoide. En plantas, la actividad fosfatásica ácida es importante en semillas en donde a menudo incrementa durante el proceso germinativo, en relación con la movilización del fósforo (MACKO y cols., 1967).

Al igual que sucede en animales, es muy poco específica, pudiendo hidrolizar varios ésteres fosfato de multitud de sustratos: p-nitrofenil fosfato, fosfoenolpiruvato, b-glicerofosfato, pirofosfato, fenil fosfato, etc.

Como se ha indicado, las fosfatasas constituyen un grupo de enzimas hidrolíticas que catalizan la degradación de los ésteres fosfato, liberando ácido fosfórico y un alcohol. En los microorganismos, son capaces de actuar sobre un amplio número de sustratos diferentes de estructura relacionada, lo cual les permite el uso de los fosfatos orgánicos como fuente alternativa de fósforo.

Las fosfatasas se han estudiado principalmente en bacterias, hongos, levaduras y myxobacterias. En *E. coli* es donde está mejor estudiada la fosfatasa alcalina. Dicho enzima, en su forma activa es un dímero localizado en el espacio periplásmico (REID y WILSON 1971). Pueden presentar tres formas diferentes por: su extremo aminoterminal, su contenido en arginina, magnesio y fósforo y en

su tasa de actividad y afinidad por distintos sustratos.

La síntesis de la fosfatasa alcalina se inicia sobre los polirribosomas unidos a la cara interna de la membrana plasmática (MICHAELIS y cols., 1983), por el extremo aminoterminal que porta una secuencia hidrófoba necesaria para la secreción del monómero al periplasma, la cual se elimina posteriormente por una proteasa (CHEN y cols., 1985). En el periplasma, los monómeros son procesados por otra proteasa y, en la dimerización, se produce un plegamiento de las subunidades, unión al cofactor y unión final de los monómeros (PRATT, 1980).

Pseudomonas aeruginosa presenta una fosfatasa alcalina inducible bajo condiciones de limitación de fosfato. Se encuentra en el periplasma y ligada al lipopolisacárido, siendo secretada con éste, en condiciones ligeramente alcalinas (INGRAM y cols., 1973).

En **Salmonella typhimurium** existe una diferenciación entre las estirpes rugosas, que presentan fosfatasa alcalina en el periplasma y en la superficie celular, y las estirpes lisas en las que sólo aparece en el periplasma; debido a la distinta composición del lipopolisacárido.

En el **G. vibrio** se han encontrado formas represibles de fosfatasa alcalina, de localización periplásmica. Parece jugar un papel en la toxicidad del microorganismo, hecho que no está totalmente demostrado (ROY y cols., 1982).

En tres especies de bacterias deslizantes del género **Capnocytophaga** se han descrito fosfatasas ácida y alcalina de tipo constitutivo. Parecen jugar algún papel en los procesos periodontales que producen estos microorganismos (POIRIER y HALT,

1983).

En las cianobacterias está muy extendida la actividad fosfatasa (DUBOIS y cols., 1984), con formas constitutivas e inducibles, localizadas en el periplasma.

En bacterias Gram positivas se ha estudiado mas intensamente en **Bacillus licheniformis**, localizadas en la pared, en la membrana citoplasmática y en el citoplasma. También existe actividad fosfatasa en otros, como por ejemplo: **Stafilococcus aureus**, **Micrococcus sodonensis** y especies de los géneros **Actinomyces**, **Lactobacillus** y **Streptococcus**.

Ciertos hongos y levaduras, por ejemplo **Neurospora crassa** presentan tres tipos de fosfatasa; una forma ácida represible y dos formas alcalinas; una represible, regulada por la presencia en el medio de diferentes ácidos orgánicos; y otra constitutiva. Presenta Zn como cofactor.

N. crassa tiene un complejo mecanismo regulador de enzimas, pudiendo utilizar fuentes alternativas de nitrógeno y fósforo. En ausencia de fósforo, al menos tres genes (**nuc-1**, **nuc-2** y **preg**) permiten la inducción de las fosfatasas represibles, de nucleasas y nucleotidasas (LINDBERG y DRUCKER, 1984).

Se ha comprobado la existencia de una fosfatasa ácida inducible, distinta a la anterior, por la limitación de fósforo y nitrógeno, siendo especialmente activa sobre ARN, relacionándose, por esto, con una RNasa extracelular que es inducida por una limitación de fósforo y nitrógeno.

En general, la mayoría de las levaduras presentan dos fosfatasas inespecíficas, una ácida y otra alcalina. La

naturaleza de ambas es glucoproteica, con distinta localización, la forma alcalina se sitúa en vacuolas citoplasmáticas y la forma ácida en la superficie celular o se segrega al medio (ONISCHI y cols., 1979).

En **Saccharomyces cerevisiae** se han encontrado formas inducibles y constitutivas con actividades ácidas y alcalinas.

En mixobacterias, como para el resto de microorganismos, el fósforo es un nutriente esencial, teniendo siempre un requerimiento mínimo del mismo.

Los datos existentes sobre la influencia del fosfato en los ciclos celulares de mixobacterias, son escasos y contradictorios.

En **M. xanthus**, el fósforo inorgánico estimula la germinación inducida por glicerol de mixosporas, proponiéndose a este ión como la señal natural para la germinación sincrónica. Las mixosporas de los cuerpos fructificantes no responden a esta señal.

La autólisis, se ve estimulada por el fosfato en distintas mixobacterias. Sin embargo, durante los procesos de fructificación de **M. xanthus**, no se ve estimulada por el fosfato (WIREMAN y DWORKIN, 1977).

Se ha demostrado en **M. coralloides**, que la adición de altas concentraciones de fosfato al medio de cultivo, inhibe la fuerte actividad autolítica e induce la diferenciación de formas esféricas a partir de los bacilos vegetativos (Fernández-Vivas y cols., 1984). En **Sigmatella erecta**, altas concentraciones de fosfato, inhiben la autólisis.

M. xanthus presenta actividad fosfatasa ácida y alcalina, localizándose en la membrana plasmática y en el espacio

periplásmico. La actividad se presenta tanto en mixosporas como en formas vegetativas.

En cuanto a los posibles aspectos ecológicos, las fosfatasas en muchos casos, son enzimas extracelulares que contribuyen a la degradación de detritus orgánicos con liberación de ortofosfato.

Los microorganismos del suelo dependen de la actividad de sus enzimas extracelulares para obtener sus nutrientes del medio, por lo que deben asegurarla (COHEN, 1980).

El control por parte del fosfato de la producción de metabolitos secundarios (alcaloides, giberelinas y diversos antibióticos) de importancia en la competencia en el suelo, y de exoenzimas que aseguran los nutrientes, son hechos que pueden tener un valor adaptativo frente a la presión de selección ejercida sobre los microorganismos del suelo.



PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Hace aproximadamente ocho años que hemos iniciado trabajos de investigación referentes al mecanismo de acción del ABA durante el crecimiento y desarrollo de plantas superiores. El material vegetal empleado fueron las semillas de leguminosas (**Cicer arietinum** L) de gran importancia agrícola y económica en España; el proceso estudiado, la germinación.

Fruto de tales estudios han sido los resultados que han demostrado que el ABA es una fitohormona que retrasa y reduce el porcentaje de germinación. Su efecto es contrarrestado por fusicoccina y tiourea, sustancias que activan la bomba de protones y aceleran el intercambio H^+/K^+ . Así mismo, el ABA reduce la toma activa de glucosa y acelera la absorción activa y pasiva de K^+ (^{86}Rb). La expresión génica también se modifica en presencia de ABA, como lo demuestran los datos de incorporación de 3H -leucina, 3H -timidina y 3H -uridina en material insoluble en ácido tricloroacético, así como las alteraciones provocadas en la síntesis "in vitro" de proteínas. Estos resultados y otros más han sido publicados previamente en revistas de la especialidad.

Con vistas a profundizar en el mecanismo de acción del ABA, se solicitó un Proyecto de la Comisión Asesora para sufragar la Investigación generada, Proyecto concedido en el año 1984.

El material empleado fueron los ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo: órganos más sencillos que el cotiledón y la semilla entera, ya que su metabolismo es básicamente catabólico, tendente al crecimiento por mitosis y elongación del mismo, no confluyendo procesos de degradación y de transporte

desde el cotiledón al eje, lo que complicaría más el abordaje del problema.

Básicamente y en resumen, se plantearon los siguientes apartados en esta Memoria:

(1) Actividad de la Ribonucleasa soluble

- control génico
- control por el potencial hídrico
- modificaciones por poliaminas
- control por ABA

(2) Actividad fosfatasa ácida

- control génico
- control por el eje radicular
- control por Pi
- control por ABA
- control por poliaminas

(3) Acción del ABA en el contenido iónico

(4) Acción del ABA sobre la expresión génica

- aislamiento de ARNm
- síntesis de proteínas "in vitro"
- caracterización autorradiográfica

De los resultados aquí obtenidos demostramos que el ABA regula estas dos actividades enzimáticas de gran importancia en el metabolismo de ARN y fósforo, probablemente por un control en el nivel de agua (Ψ) y expresión génica. Asimismo, el ABA induce la síntesis de un ARNm que codifica a un polipéptido de un peso molecular aproximado a 32 Kd que incrementa conforme lo hace la concentración de fitohormona añadida al medio; un muy probable inhibidor del crecimiento y desarrollo.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

3.1. Material biológico empleado

Para la realización del presente trabajo se emplearon semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L., familia Leguminosae) seleccionadas por homogeneidad de tamaño, y correspondientes a la cosecha de 1984. Su almacenamiento y conservación se llevó a cabo a 4° C en oscuridad, hasta su utilización.

Las semillas no han sido sometidas a ningún tratamiento previo.

3.2. Siembra y germinación

3.2.1. **Siembra de ejes embrionarios**

Las semillas, una vez lavadas suficientemente con agua estéril, son puestas a imbibir durante un periodo de seis horas en agua estéril, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurrido este periodo de imbibición, los ejes embrionarios son separados manualmente en una cámara de flujo laminar, lavados con abundante agua, también estéril, secados superficialmente y pesados hasta alcanzar la cantidad de material necesaria para cada experiencia: 500 mg de partida para el estudio de distintas actividades enzimáticas y otros factores en relación con el aporte externo de ABA y poliaminas; así como para experimentos de conductividad. Y, 10 gr para el aislamiento de polisomas y extracción de ARN.

Según la cantidad de material utilizado, se emplearon placas de Petri (500 mg) o bandejas de plástico (10 gr). Las placas de

Petri eran esterilizadas en estufa a 100°C durante 3-5 horas, conteniendo papel de filtro lavado al ácido y vuelto a lavar por nosotros, a fin de eliminar la presencia, en el papel, de elementos minerales, que podrían alterar los resultados.

Las bandejas de plástico han sido lavadas con alcohol. En su interior se coloca un cristal de tamaño adecuado envuelto en papel de filtro sobre el que se depositan los ejes. La bandeja se cubrió con otro cristal. Tanto cristales como papel de filtro son esterilizados como se ha dicho anteriormente para las placas Petri.

En los dos casos expuestos, el papel de filtro es humedecido con agua, o bien con las soluciones requeridas para cada experimento (5 ml ó 50 ml respectivamente).

Para la germinación, se depositan en una estufa a la temperatura constante de 25°C, con una humedad relativa del 70% y en oscuridad, durante determinado tiempo (6, 18, 24 y 48 horas).

3.2.2. **Siembra de semillas enteras**

Se siembran 30 semillas enteras (después de haberlas lavado con abundante agua estéril, pesado y secado), en placas Petri grandes con 35 ml del tratamiento correspondiente, al que se añade cloranfenicol (5 µl/ml).

Por otra parte, se siembran 50 semillas enteras, lavadas como las anteriores, en bandejas de plástico de la forma descrita para el caso de siembra de ejes embrionarios, pero humedeciendo el papel con más agua o solución (125-200 ml) según los casos.

El crecimiento de las semillas se llevó a cabo como en el

caso de los ejes embrionarios.

Una vez transcurrido el tiempo requerido, se recogen las semillas, que son nuevamente lavadas, secadas y pesadas. Así mismo, el líquido sobrante en la bandeja se recoge y, tras haber medido su volumen, se guarda a -15°C hasta su utilización.

A continuación se procede a separar manualmente, en una cámara estéril, los ejes embrionarios de los cotiledones, eliminando la cubierta. Una vez separados son lavados, secados, pesados y guardados en congelador, separadamente, para su posterior utilización.

Se considera que una semilla está germinada, cuando el eje embrionario ha roto la cubierta seminal. Este parámetro se expresa en %.

3.3. Determinación del peso fresco

Los ejes recogidos de la incubación, se lavan con abundante agua estéril, se secan cuidadosamente y se pesan con el fin de determinar el peso fresco inducido por los distintos tratamientos. En cultivos de semillas enteras, se calcula el peso fresco de los ejes y cotiledones por su separación física. A partir de estos datos se calcula el peso fresco por unidad, contando el número de ejes o cotiledones de que se ha partido.

3.4. Determinación del peso seco y porcentaje de agua

Los ejes utilizados en la determinación del peso fresco, se introducen en recipientes de papel de filtro y se llevan a una estufa a 70°C , hasta que el peso sea constante (durante 24-48

horas). Transcurrido este tiempo, el material se introduce en desecadores, a fin de evitar que durante el proceso de enfriamiento, tomen agua de nuevo.

Una vez fríos, se pesan, considerando este dato como el peso seco, siendo la diferencia con el de partida el contenido en agua, cuyo porcentaje se calculó por la expresión:

$$\frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

3.5. Mineralización y determinación de elementos minerales

Una vez obtenidos los ejes embrionarios de distintos periodos de crecimiento y bajo diferentes tratamientos con ABA, poliaminas..., se introducen en una estufa con corriente de aire forzado a una temperatura de 60^o-70^oC durante de 16-24 horas (STEYN, 1959). Discurrido este tiempo se pulverizan y el polvo se introduce en vasos de vidrio. Estos se colocan en una estufa a 70^oC durante 16 horas; después, las muestras se enfrían en un desecador, comenzando a continuación el proceso de mineralización por "vía seca". El método fue descrito por PINTA (1978).

Se pesan 100 mg de polvo y se depositan en crisoles de cuarzo que se introducen en el horno de mufla, elevando la temperatura gradualmente hasta 450^oC durante 4 horas y se estabiliza a esa temperatura durante 2 horas más. Finalmente, se desconecta el horno y se deja enfriar. A las cenizas se les añade 1-2 ml de agua destilada y 1 ml de HCl concentrado.

Posteriormente, los crisoles se colocan sobre una placa calefactora hasta la aparición de vapores. A continuación se hace pasar sobre papel de filtro sin cenizas, recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 ml.

A partir de esta solución se determinaron los siguientes elementos:

- potasio y sodio, por fotometría de llama (Lachica y cols, 1973).

- calcio, magnesio y manganeso: la determinación se realiza directamente sobre una dilución del mineralizado. En el caso del calcio se efectúa una dilución con O_3La_2 para evitar interferencias (LACHICA y cols., 1973). Los elementos se determinaron 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.

Cuando fue necesario cuantificar elementos minerales en el agua de crecimiento de los ejes embrionarios, se procedió a realizar la dilución apropiada de ésta y, a medir según se ha descrito anteriormente.

El fósforo, tanto soluble como total, se ha medido por "vía húmeda" (GONZALEZ y BAEZ, 1978). El método se basa en la medida colorimétrica obtenida a partir del complejo fosfomolibdico utilizando amidol-sulfito como reductor. Para medir el fósforo total y soluble, hay que preparar las muestras (tanto ejes embrionarios como cotiledones) de la siguiente forma. (1) En cuanto al fósforo soluble, se ponen en un recipiente adecuado 0.5 g de material seco, al cual se le añaden 35 ml de extractante (HCl, 1N). Se mantiene en agitador "vuelta a vuelta" durante 20

minutos, al cabo de los cuales, se filtra con papel Albet n^o 240 y se recogen 20 ml en un kjendal. A continuación se procede a mineralizar con ácido sulfúrico concentrado (5 ml), se calienta en rampas de mineralización unos diez minutos, después de los cuales se deja enfriar y se le añade agua oxigenada hasta obtener el mineralizado. Este se vierte en un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua destilada. De ahí, se toma una alícuota de 2 ml y se le añaden : 2 ml de reactivo Morgan, 2 ml de molibdato amónico, 2 ml de la solución de amidol. La lectura fotométrica se realiza transcurrida hora y media o dos horas, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 820-830 nm.

(2) Para el fósforo total, a 0.25 gr de muestra seca, se le añade sulfúrico concentrado directamente y después se procede como para el fósforo soluble, pero utilizando solamente 1 ml del mineralizado en lugar de 2.

3.6. Valoración de la actividad ribonucleásica

3.6.1. **Obtención del sobrenadante**

Al material de partida, ya sean ejes embrionarios o cotiledones, se le añaden 2 volúmenes de tampón (w/v) tris-ClH 50 mM, pH=7.5, en un mortero previamente enfriado en baño de hielo y se muelen vigorosamente.

El homogenado se centrifuga durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC-5B (rotor 4.25) a 0^o-4^o C y a 30.000 x g, usando de forma inmediata el sobrenadante así obtenido como extracto crudo. Si la determinación se realiza con

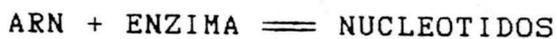
posterioridad, el sobrenadante se congela rápidamente a -70° C sin pérdida aparente de actividad.

Para valorar la actividad RNásica se sigue el método de MATILLA y NICOLÁS (1983) con modificaciones.

3.6.2. **Fundamento de la reacción**

Con esta reacción se pretende valorar la actividad ribonucleásica, cuya función consiste en hidrolizar enlaces específicos en la cadena de ARN, obteniéndose nucleótidos libres. Estos pueden ser medidos a 260 nm, longitud de onda en la que absorben la mayoría de dichos nucleótidos, cuando tienen libres sus grupos activos.

Esquemáticamente, se podría escribir:



3.6.3. **Reacción enzimática**

La reacción tiene un volumen final de 200 μ l y lleva los siguientes componentes:

Tampón fosfato-sódico 200 mM, pH=6.0	50 μ l
Sobrenadante	50 μ l
ARN altamente polimerizado (4 mg/ml)	10 μ l
Agua estéril	90 μ l

Se incuba a 37° C durante 60 min. en baño termostaticado. Pasado este tiempo, se paraliza la reacción con 50 μ l de acetato de uranilo al 0.75% en ClO_4H , dejándose precipitar 90-120 min. en cámara fría al cabo de los cuales se centrifuga en una centrifuga de mesa durante 5-10 min. a 10.000 x g. El sobrenadante así obtenido, se diluye convenientemente y se mide su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP1.700. La reacción

control se realiza en las mismas condiciones, pero sin añadirle sustrato.

3.6.4. **Definición de actividad ribonucleásica**

Una unidad de actividad RNásica se definió como, la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.1 en la absorbancia a 260 nm, comparado con un control sin sustrato. La actividad específica se expresa como actividad por miligramo de proteína .

3.6.5. **Efecto del pH**

Para establecer el pH óptimo del sobrenadante para el funcionamiento del enzima, se ha llevado a cabo la reacción bajo distinto rango de tampones:

- tampón fosfato potásico-ác. cítrico pH 3.0
- tampón fosfato potásico-ác. cítrico pH 4.0
- tampón acetato sódico-ác. cítrico pH 5.0
- tampón monosódico-bisódico (fosfato) pH 6.0
- tampón monosódico-bisódico (fosfato) pH 7.0
- tampón tris-clorhídrico pH 8.0
- tampón tris-clorhídrico pH 9.0

3.6.6. **Efecto de la temperatura**

Una vez obtenido el pH óptimo, se incubó la mezcla de reacción a diferentes temperaturas a fin de conocer la temperatura óptima "in vitro" del enzima.

El rango de temperatura empleado oscila entre 0° C y 70°.

3.6.7. **Concentración de sobrenadante**

Igualmente, se ha optimizado la concentración de sobrenadante en la reacción, utilizando entre 0.25 y 3.5 mg de proteínas.

3.6.8. Empleo de diferentes sustratos

Con el fin de estudiar las diferentes afinidades del extracto enzimático por el sustrato, se han empleado los ARN que se citan: ARN altamente polimerizado (BDH Chemicals Ltd.); ARNt tipo V de Sigma; ARN de levadura tipo XI, Sigma y ARNm de garbanzo obtenido según MATILLA y cols. (1980).

3.6.9. Diálisis

Para completar el estudio sobre el contenido iónico se ha llevado a cabo la diálisis del sobrenadante obtenido a partir de ejes embrionarios crecidos en presencia de agua (control), ABA 10 μM y ABA 50 μM respectivamente. Dicho sobrenadante se obtuvo moliendo los embriones en tampón tris-ClH, pH 7.0, 50 mM (w/4v) y centrifugando a 15.000 rpm durante 30 min.; después se introdujo en una tripa de diálisis que se mantuvo, en un vaso de precipitación con el mismo tampón usado para moler, en agitación constante y en cámara fría a 4^o C durante 24 horas. Se recogieron alicuotas del sobrenadante dializado.

El sedimento se redisolvió con 5 ml de Triton X-100 al 1% en tampón tris-ClH. Se agitó y se volvió a centrifugar.

También se recogieron alicuotas del sobrenadante sin dializar.

Tanto el sobrenadante dializado, el sin dializar y el obtenido al redissolver el precipitado, se utilizaron para valorar el efecto de distintos factores sobre la actividad RNásica (efecto del calcio exógeno, poliaminas, etc.).

3.7. Valoración de la actividad fosfatasa ácida

3.7.1. **Obtención del sobrenadante**

Utilizamos cotiledones y ejes embrionarios obtenidos en los distintos tratamientos.

En un mortero, enfriado en baño de hielo, se muelen 1 cotiledón ó 5 ejes a los que se añade 1 ml de tampón Fosfato-Na 0.1 M, pH 7.0 que contiene Tritón X-100 al 1% (o tampón acetato-Na, 0.125 M, pH 5.0), hasta conseguir una total homogenización.

Este homogenado se centrifuga durante 15 min., a 10.000 rpm en una centrífuga Sorval RC-5B (rotor 4.25) , a 4^o C.

Al sobrenadante se le añade Polivinil pirrolidona 0.6% (w/v) en estado granular, y se mantiene en agitación durante 30 min. en baño de hielo, al cabo de los cuales se vuelve a centrifugar a 10.000 rpm durante 15 minutos.

El enzima así obtenido, se utiliza como extracto crudo, de forma inmediata.

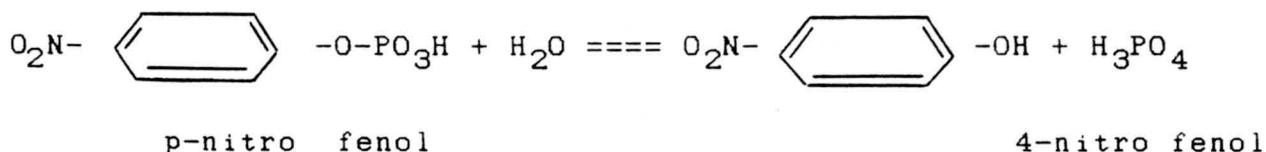
Si se utiliza tampón acetato-Na pH 5.0 (1:2), basta con moler, centrifugar 20 min. a 15.000 rpm y ya se puede usar el sobrenadante para medir la actividad enzimática.

Para valorar la actividad fosfatasa ácida se sigue el método descrito por WALTER y SCHÜTT (1935) con modificaciones.

3.7.2. **Fundamento de la reacción**

Básicamente, la determinación de la fosfatasa ácida consiste en valorar el aumento de color que se produce cuando el sustrato artificial p-nitro fenil fosfato, se pone en contacto con un sobrenadante cuya fosfatasa endógena queremos medir, y que libera

4-nitrofenol, que es un compuesto coloreado.



3.7.3. Reacción enzimática

La mezcla reactiva se prepara en tubos de ensayo, en las siguientes proporciones:

- tampón acetato-Na, 0.125 M, pH 5.0 0.8 ml
- p-nitro fenil fosfato 0.03 M 0.2 ml
- enzima 25 µl

Posteriormente se incuba a 28° C en un baño termostaticado durante 7 minutos. Para parar la reacción se añade 1 ml de NaOH 0.5 M, lo que da lugar a la aparición de un color amarillo que puede medirse en un espectrofotómetro Bausch and Lomb-Spectronic-88 a 400 nm.

3.7.4. Concentración de sustrato

Se lleva a cabo la reacción como se ha explicado anteriormente, pero utilizando distinta concentración de sustrato (1.5, 6.0 mM de p-nitrofenil fosfato).

3.7.5. Efecto del pH

Se utiliza distinto rango de pH para optimizar las condiciones del medio donde debe actuar la fosfatasa. Estos tampones son:

- tampón Acetato-Na 125 mM	pH 6.0
- " " " "	pH 5.5
- " " " "	pH 5.0
- " " " "	pH 4.5
- " " " "	pH 4.0

3.7.6. Efecto de la temperatura

Otro de los parámetros a optimizar es la temperatura. Para ello, se incubó la mezcla de reacción a temperaturas que oscilan entre 10° C y 40° C y se toma como temperatura óptima "in vitro" la que permita el mejor funcionamiento del enzima.

3.7.7. Efecto del tiempo de reacción

Un extracto crudo obtenido a partir de cotiledones de semillas germinadas 24 horas en agua, se utilizó como fuente de enzima para estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad fosfatásica. Para ello se ha valorado la actividad enzimática como se describe anteriormente, pero utilizando tiempos de incubación de 1, 3, 5 y 7 minutos respectivamente.

3.7.8. Efecto de la concentración de p-nitro-fenil-fosfato

Se estudió el efecto de diversas concentraciones de p-NPP en la velocidad de reacción. La reacción es básicamente la descrita en apartados anteriores, pero variando las concentraciones de sustrato entre 0 y 9 mM y el tiempo de incubación entre 1 y 7 minutos.

3.7.9. **Efecto del calcio**

3.7.9.1. **EN EXTRACTO DIALIZADO**

Se maceran 30 cotiledones en 30 ml de tampón acetato-Na 125 mM, pH=5.0, en un mortero enfriado en baño de hielo. El homogenado se centrifuga a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se dializa tal como se hizo en el apartado 3.6.7. para el estudio de la actividad RNásica.

Para valorar el efecto del calcio sobre la actividad fosfatásica en extracto dializado, se utiliza Cl_2Ca 5 mM en tampón acetato-Na 125 mM pH=5.0 en cantidades crecientes: 0, 80, 200, 400, 600, 800 y 1000 μl , a fin de obtener una concentración final de Ca^{2+} de 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM .

3.7.9.2. **EN EXTRACTO SIN DIALIZAR**

Asímismo, se estudió el efecto del calcio sobre la actividad fosfatásica en extracto crudo sin dializar. A partir de sobrenadantes no dializados de tratamientos con agua y ABA 50 μM y, partiendo de Cl_2Ca 10 mM, se han utilizado 0, 20, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 μl para obtener concentraciones finales de 0.0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mM respectivamente.

3.7.10. **Definición de actividad fosfatásica**

La unidad de actividad fosfatásica, la definimos como el incremento por minuto de 0.01 en la densidad óptica, a 400 nm, respecto al control sin enzima. La actividad específica la expresamos como $\Delta\text{DO}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times \text{Fd}}{p \times d \times v}$$

Siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ = incremento de densidad óptica por minuto

Fd = factor de dilución del extracto

p = mg de proteína por ml del extracto sin diluir

d = espesor de la cubeta (1cm)

v = volumen de la alícuota del extracto.

3.8. Valoración de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales en el extracto crudo, se ha utilizado el método de LOWRY y cols. (1953). Los reactivos utilizados son:

- a) Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 N.
- b) Sulfato cúprico al 0.5% en tartrato sódico al 1%.
- c) 50 ml de (a) + 1 ml de (b).
- d) Reactivo de Folin-Ciocalteu al 50% en agua.

Preparamos un tubo de ensayo con 0.6 ml de agua desionizada y 10 μl del sobrenadante problema. A esta solución le añadimos 3 ml del reactivo (c), se espera 15 minutos en oscuridad y se adicionan 0.3 ml del reactivo (d), se agita suavemente y se deja reposar 20 minutos más a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo se mide la absorbancia a 500 nm y se compara con una concentración conocida de seroalbúmina bovina, que usamos en todas las reacciones como control interno.

La determinación de las proteínas totales, se realiza por la fórmula:

$$\text{mg prot. total} = \frac{\text{DO}(\text{test}) \times 4 \times V}{\text{DO}(\text{control})}$$

3.9. Valoración de aminoácidos

La valoración de aminoácidos se ha realizado por el método del **reactivo de ninhidrina** (MOORE y STEIN, 1954). Este reactivo se prepara disolviendo 400 mg de cloruro de estaño en 250 ml de tampón citrato 200 mM, pH=5.0 (ajustando el pH con ácido cítrico). A esto se le añaden 10 gr de ninhidrina disueltos, a su vez, en 250 ml de etilenglicolmonometileter.

La reacción se lleva a cabo de la siguiente forma:

0.1 ml de muestra + 1.5 ml de reactivo

↓ 20 minutos a 100°C

↓ sumergir los tubos en agua fría

↓ añadir 1.6 ml de propanol al 50%

↓ esperar 10 minutos

↓ leer a 570 nm

El blanco es una reacción del mismo tipo, pero que no lleva ninguna muestra.

En cada experiencia va incluido un control endógeno, utilizado como patrón. En este caso se han utilizado 2 µl de glicocola (10 mg/ml), en cada experiencia.

3.10. Valoración de azúcares

La valoración de los azúcares se ha realizado en el medio de incubación, siguiendo el **método del fenol sulfúrico** de DUBOIS y cols. (1956).

Se precisan los siguientes reactivos:

- ácido sulfúrico concentrado (96%).
- solución acuosa de fenol al 5%.

La reacción tiene lugar de la siguiente forma:

(25 µl de muestra + 175 µl de agua) + 0.2 ml de fenol al 5%

agitar



añadir 1.0 ml de sulfúrico concentrado

(añadido de golpe)



agitar y mantener 30
minutos a temperatura
ambiente

leer a 490 nm

El blanco utilizado es del mismo tipo que el visto anteriormente. La muestra patrón consiste en glucosa 5 mg/ml, de la cual se ponen 10 µl en la reacción.

3.11. Medida de la conductividad

Se ha medido la conductividad en el medio de germinación de semillas enteras crecidas durante 6, 12, 24 y 48 horas en presencia de agua (control) y poliaminas (espermina, espermidina

y cadaverina) en distintas concentraciones (0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mM).

Por otra parte, se ha intentado conocer la cinética de la conductividad en el tiempo, frente al ABA. Para ello, se ha utilizado 1 gr de ejes embrionarios crecidos durante 24 h en agua destilada. Este material se introduce en un tubo de 25 ml de capacidad y se añaden 5 ml de agua o de distintas concentraciones de ABA (entre 5 y 50 μ M). La conductividad se ha medido a lo largo de 7-8 horas, mediante una célula de conductividad de la casa Crison, durante las cuales, se ha mantenido una temperatura fija de 25°C y una agitación constante. La experiencia se ha llevado a cabo en oscuridad.

3.12. Obtención de polisomas

Como material de partida se utilizaron aproximadamente 10 gr de ejes embrionarios sometidos a los diferentes tratamientos con ABA, estudiados en este trabajo.

Todo el material de vidrio utilizado en la extracción fue previamente esterilizado en estufa a 100°C durante 3 horas. Así mismo, las soluciones empleadas se esterilizaron en autoclave o fueron filtradas para evitar la contaminación. El material de plástico utilizado fue tratado con bentonita, para su esterilización.

Todas las manipulaciones se llevaron a cabo a 4°C y en baño de hielo.

Para la obtención del sedimento de polisomas se molieron los ejes en mortero, con 4 volúmenes (4 ml/gr) de un tampón Tris-HCl 200 mM pH 8.5, que contenía: sacarosa (libre de RNasas) 200 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 50 mM y DTT 5 mM. Se completó la homogenización con ayuda de un "poter". El homogenado obtenido se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min, para eliminar almidón, paredes y restos celulares. Se recoge el sobrenadante y se le añade 1 ml de Nonidet-P40 al 10%, por cada 10 ml de sobrenadante. Se mantiene en agitación suave durante 10-15 minutos para separar los polisomas ligados a membranas y después se centrifuga a 15.000 rpm durante 20 minutos, para que sedimente la fracción membranosa.

El sobrenadante obtenido se introduce en tubos de una ultracentrífuga, en los que previamente se han puesto 2 ml de un colchón de sacarosa compuesto por un tampón Tris-HCl 40 mM pH 8.5

que contiene sacarosa 1.5 M, KCl 20 mM y $MgCl_2$ 10 mM. Se centrifuga durante 3 horas a $200.000 \times g$ (45.000 rpm) y a $4^{\circ}C$ en una ultracentrífuga IEC/B-60, rotor SB-405.

El sedimento de polisomas se resuspendió en 4 ml de un tampón Tris-HCl 100 mM pH 9.0 que contenía EDTA 5 mM, SDS al 1% y NaCl 100 mM.

3.13. Extracción y fraccionamiento de ARN (poly A)

3.13.1. **ARN polisomal**

A la suspensión de polisomas obtenida en el apartado anterior se le añadieron 2 volúmenes de fenol-cloroformo (1:1) (el fenol al 70%) y se mantuvo en agitación y baño de hielo durante 30 min. Después se centrifugó 10 min a 12.000 rpm en una centrífuga Sorval RC-5, rotor 4.25 y se recogió la fase acuosa. A la fase fenólica se le añadió 1 ml del tampón utilizado para resuspender los polisomas, se agitó bien y después de unos minutos se volvió a centrifugar y a extraer la fase acuosa, como se explica anteriormente. De aquí se vuelve a obtener otra fase acuosa, que se recoge, y una fase fenólica que se descarta.

A la fase acuosa obtenida en los dos procesos anteriores se le añaden 2 ml de fenol-cloroformo y se vuelve a centrifugar. Se recoge la fase acuosa resultante y se le añaden unas gotas de acetato sódico, hasta una concentración final 0.2 M. A continuación se le añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ARN polisomal, libre ya de proteínas. Este precipitado se almacena en congelador, a $-20^{\circ}C$, durante al menos 12 horas.

El precipitado obtenido se centrifugó, en centrífuga de mesa, durante 15 min. Después se lavó sucesivamente con etanol al 70%, etanol absoluto y eter (centrifugándose 5 min después de cada lavado). Por último, se secó en corriente de nitrógeno.

3.13.1.1. ARN-poly (A⁺)

Se siguió básicamente el **método de AVIV y LEDER** (1982).

El ARN polisomal obtenido según el apartado anterior, se disolvió en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 que contenía KCl 500 mM (4-6 ml). Se centrifugó unos minutos y se midió su absorción a 260, 235 y 280 nm, antes de introducirlo en una columna de oligo (dT)-celulosa. La oligo (dT)-celulosa (tipo 3) fue suministrada por Collaborative Research, Inc., con una eficiencia de aproximadamente 96%, y una retención de poly(A) de 114.7 A₂₆₀/g. Se montó en una columna de 1 cm de diámetro y 10 cm de longitud, previamente lavada con bentonita para prevenir la acción de las RNasas y con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 para eliminar materiales extraños que pudieran eluir con el mARN. Posteriormente se equilibró con tampón salino Tris-HCl 10 mM pH 7.6 más KCl 0.5 M y se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Una vez preparada la columna, la muestra se deposita cuidadosamente en la parte superior, procurando que su entrada sea muy lenta, quedando el ARNm-poly(A⁺) retenido en la columna. Esta operación se repite dos veces para asegurar la máxima retención del ARN-poly(A⁺). A continuación, se lava exhaustivamente con el tampón salino hasta que la A₂₆₀ que eluye de la columna sea próxima a cero.

Para conseguir que el ARN-poly(A⁺) se separe de la columna, se lava ésta con el mismo tampón, pero sin sal, y se recogen varias fracciones de 10, 20-30 y 10 gotas, etc., según los casos. Se mide su densidad óptica a 260 nm y se recoge la fracción o fracciones que presenten los valores más altos. A esta fracción se le añade unas gotas de acetato sódico, hasta una concentración 0.2 M y se precipita con etanol absoluto frío. Una vez precipitado el ARN-poly(A⁺) obtenido, se lava de la siguiente forma:

- 1.- Centrifugar a 5.000-6.000 rpm de 10 a 15 minutos.
- 2.- Descartar el sobrenadante (alcohol).
- 3.- Añadir unas gotas de etanol al 70%.
- 4.- Repetir 1 y 2.
- 5.- Añadir una gotas de etanol absoluto.
- 6.- Repetir 1 y 2.
- 7.- Añadir una gotas de eter-etílico.
- 8.- Repetir 1 y 2.
- 9.- Repetir 7 y 8.
- 10.- Desecar en corriente de nitrógeno o desecador.
- 11.- Disolver en agua estéril (25-50 µl).
- 12.- Cuantificar ARN (A₂₆₀ nm), proteínas (A₂₈₀ nm) y azúcares (A₂₃₅ nm). Para ello, diluir 4 µl de la solución de ARNm en 600 µl de agua.

Una vez disuelto el ARN-poly(A⁺), se almacena a -40°C hasta el momento de ser utilizado.

3.13.1.2. ARN-poly(A⁻)

El material no retenido en la columna de oligo (dT)-celulosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol y se siguió el mismo proceso de lavado, secado y almacenamiento ya descrito para el ARN-poly(A⁺), pero utilizando entre 200 y 600 µl para disolverlo, según los casos. Así mismo, para medir la absorción se han realizado mayores diluciones (entre 2 y 4 µl diluidos entre 600 y 1.500 µl de agua, respectivamente).

3.13.2. Cuantificación de ARN-poly(A⁺)

La cuantificación del ARN, tanto poly(A⁺) como poly(A⁻), se realiza midiendo su absorbancia a 260 nm, y asumiendo que 1 A₂₆₀ equivale a 40 µg de mARN.

3.14. Sistema de traducción derivado de germen de trigo

3.14.1. Preparación del germen de trigo

El material necesario para los ensayos de traducción se obtiene a partir de germen de trigo según el **método de ROBERTS y PATERSON** (1973) con ligeras modificaciones.

Para la preparación del germen de trigo hay que usar una columna de Sephadex G-25. Para ello, se pesan 25 gr de Sephadex G-25 -200, se le añaden aproximadamente 150 ml del tampón con que se va a eluir la muestra. Se hincha hirviendo durante una hora a 100°C y agitando suavemente de vez en cuando. Después se deja sedimentar el gel y se retira la capa superior turbia por decantación. Se repite toda la operación varias veces hasta que

el sobrenadante sea claro. A continuación, se le extrae el aire en un kitasato conectado a una bomba de vacío.

El gel se introduce con cuidado para que no entre aire en una columna de cristal de 750 X 70 cm y a continuación se equilibra con el tampón de elución de la muestra antes mencionado. Para preparar la muestra se procede como se explica a continuación:

Se muelen 6 gr de germen de trigo en mortero, con arena fina lavada, y con 12 ml de un tampón Hepes 20 mM, pH 7.6 que contenga ClK 100 mM acetato magnésico 1 mM, Cl_2Ca 2 mM y β -mercaptoetanol 6 mM, durante 1-2 minutos (más 3 ml para lavar el mortero). El homogenado se centrifuga a 14.000 rpm (23.000 x g), durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se filtra a través de una columna de Sephadex G-25 fino que había sido previamente equilibrada con tampón Hepes 20 mM, pH 7.6 que, a su vez, contenía ClK 120 mM, acetato magnésico 5 mM y β -mercaptoetanol 6 mM, siendo este tampón utilizado también para eluir la muestra. Se recogen 30 fracciones de aproximadamente 20 gotas (a una velocidad de flujo de 14 gotas/min). Se mide su absorbancia a 260 y 280 nm (Fig. 3.1) y se eligen solamente las más concentradas (9-25 fracciones) Las fracciones elegidas se mezclan, obteniéndose un volumen total de 6.5 ml y se les añade 44 μ l de creatina quinasa (6 mg/ml) para que su concentración final sea de 40 μ g/ml). De este volumen total se han hecho 62 alícuotas de 100 μ l y se han almacenado en nitrógeno líquido, donde pueden conservarse hasta más de seis meses sin pérdida de actividad.

3.14.2. Ensayo de traducción

Para estudiar la traducción en un sistema "in vitro", se ha montado un ensayo con un volumen final de 25 μ l que debe contener, ATP 1mM, GTP 26 μ M, creatina fosfato 8 mM, DTT 2 mM, Hepes 25 mM, espermina 70 μ M y una mezcla de todos los aminoácidos (20 μ M), excepto aquellos que se utilizan como precursores radiactivos, que en este caso son ^3H -leucina o ^{35}S -metionina, dependiendo del tipo de experimento. También debe contener, para su funcionamiento ClK 80 mM (Fig. I) y Ac_2Mg 2 mM (Fig. II), según hemos comprobado. Así mismo, se ha determinado la cantidad de extracto de germen de trigo (Fig. III) y la de ARNm que deben ir en el ensayo para optimizar la síntesis "in vitro" de proteínas.

En todos los ensayos se preparó una muestra sin ARNm como control de traducción endógena.

La reacción se incuba durante 60 minutos a 25 $^{\circ}$ C en un baño termostatzado. Pasado este tiempo, se para la reacción en hielo (así mismo, toda la reacción debe prepararse en baño de hielo) y se precipita con ATC 10%, se calienta 15 min a 90 $^{\circ}$ C para solubilizar el aminoacil-ARNt y, a continuación, se filtran en filtros Whatman GF/C, lavando con ATC 5% y secando en estufa a 80 $^{\circ}$ C durante 1 h. La radiactividad retenida se determinó con un líquido de centelleo para sólidos compuesto por 3.5 gr de PPO, 50 mg de POPOP y 1.000 ml de tolueno, midiendo en un espectrofotómetro de centelleo líquido BECKMAN.

3.14.3. Traducción de ARNm

El ensayo se ha llevado a cabo como se expone en el apartado anterior. Las cantidades ensayadas oscilaron entre 0.1 y 0.5 μg de ARN-poly(A⁺) en los 25 μl . Y, entre 1.0 y 7.0 μg en los 25 μl para el ARN-poly(A⁻).

3.15. Identificación de los productos sintetizados "in vitro"

Para identificar los productos sintetizados "in vitro" en el sistema derivado de germen de trigo, se emplea una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS según el método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones.

3.15.1. **Electroforesis unidimensional**

3.15.1.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para preparar las muestras se lleva a cabo un ensayo de traducción de los ARNm correspondientes, en las mismas condiciones descritas en el apartado 3.14., con la diferencia de que la mezcla de aminoácidos utilizada no contiene metionina, sino que ésta es suministrada como marcador radiactivo ³⁵S-metionina en la relación 5 $\mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ de ensayo.

Después de la incubación de la reacción, se midió la radiactividad incorporada en alícuotas de 2 μl tal como se explica en el apartado 3.14.2. y al resto (23 μl), se le añadió un volumen de un tampón de ruptura, con unas concentraciones finales de Tris-ClH 0.5 M, DSS al 10% y glicerol al 87%, por cada

3 volúmenes de muestra. La misión de este tampón es darle una carga neta a las proteínas y romper los agregados que existan en las muestras.

Las muestras así tratadas se calientan 2-3 min a 90°C y después se enfrían. A continuación, se les añaden 4 µl de una mezcla indicadora, que tiene que ser preparada en el momento, compuesta por β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.05% como marcador de la electroforesis. Una vez preparadas todas las muestras, se utilizó la misma cantidad de cada una de ellas (11 µl) en la autorradiografía, que contenían entre 14.000 y 90.000 cpm. Como marcadores de peso molecular se utilizaron patrones proteicos comerciales (Pharmacia Fine Chemicals) constituidos por fosforilasa B de 94.000 daltons, albúmina bovina de 67.000 d, ovoalbúmina de 43.000 d, anhidrasa carbónica de 30.000 d, inhibidor de tripsina de 20.100 d y α-lactoalbúmina de 14.400 daltons, los cuales se trataron como las muestras.

3.15.1.2. PREPARACION DE LOS GELES

Para la preparación de los geles y posterior electroforesis, se utilizó un equipo BIO-RAD (Protean 16 cm).

Se prepararon dos tipos de gel, un gel separador compuesto por acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 0.27%, Tris-ClH 373 mM pH 8.8, DSS 0.1%, TEMED 0.025% y persulfato amónico 0.037%. La preparación de este gel se hizo en un quitasato conectado a una bomba de vacío para desairear. Posteriormente se dejó polimerizar varias horas en el recipiente adecuado, con una fina capa de agua en el lugar en que estaba expuesto al aire, para

evitar su desecación.

Una vez polimerizado, se retira el agua y, encima del gel separador, se coloca un gel espaciador (gel "stacking") donde se colocan los pocillos en que después irá la muestra, y que está compuesto por acrilamida al 3%, bis-acrilamida 0.08%, Tris-ClH 125 mM pH 6.8, DSS 0.1%, TEMED 0.1% y persulfato amónico al 0.03%. Este gel polimeriza en una hora, aproximadamente. El tampón de corrido utilizado fue el descrito por LAEMMLI (1970), formado por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y DSS al 1% y con un pH final de 8.3.

3.15.1.3. ELECTROFORESIS

Una vez colocadas las muestras en los pocillos correspondientes del gel, se conecta la cubeta de electroforesis a una fuente de alimentación LKB (2103) y se corre a 70 mA hasta que el frente formado por el marcador azul de bromofenol, llegue al final del gel. En ese momento, se apaga la fuente de alimentación y se recupera el gel.

A continuación se procede a la tinción del gel. Para ello se utiliza una solución de teñido compuesta por azul de Coomassie G-250 0.25% en metanol-ácido acético-agua (5:1:5), en la que se mantiene el gel durante, al menos una hora, en baño termostatzado a 37°C y con agitación constante.

Seguidamente, se procede al lavado y destinción del gel, introduciéndolo en una solución metanol al 50% y ácido acético al 7% durante dos horas, en las mismas condiciones que para su tinción. Durante este periodo se realizan, al menos, seis

cambios de la solución de lavado.

De la solución de lavado, se pasa el gel a una solución de fijación (ác. acético al 10%), en la que se mantiene durante 6-8 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.

Una vez sacado el gel del fijador, se procede a su secado. Se recubre con papel Wattman 3 mm Chr por una de sus caras y se hace ligera presión para eliminar el exceso de líquido. En la otra cara se coloca un plástico fino. Por último, se deja en un desecador bajo presión de vacío durante dos horas.

3.15.1.4. AUTORRADIOGRAFIA

Para llevar a cabo la autorradiografía, se expone una película radiográfica KODAK-X-OMAT al gel, durante 6-8 días, dentro de una "caja negra" y a -70°C . Posteriormente, se revela la película por el método normal para fotografía, pero usando el revelador radiográfico KODAK LX24 y el fijador fotográfico KODAK AL4.

Los perfiles densitométricos se han obtenido con un microdensitómetro digital Optronix (Mod. P-1700).

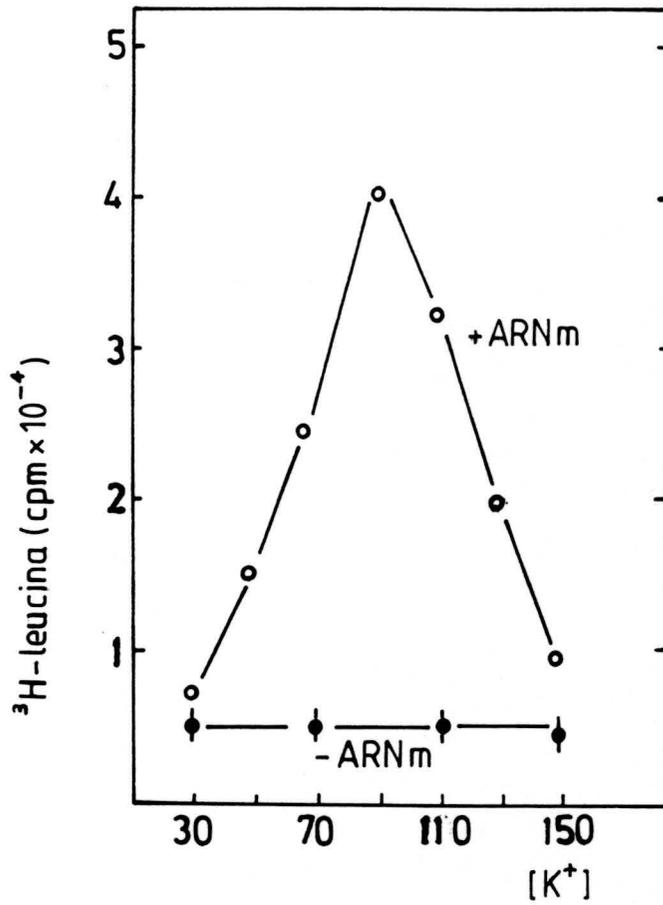


FIGURA I. Traducción de ARN "mensajero" en el sistema "in vitro" de germen de trigo: concentración óptima de K^+ .

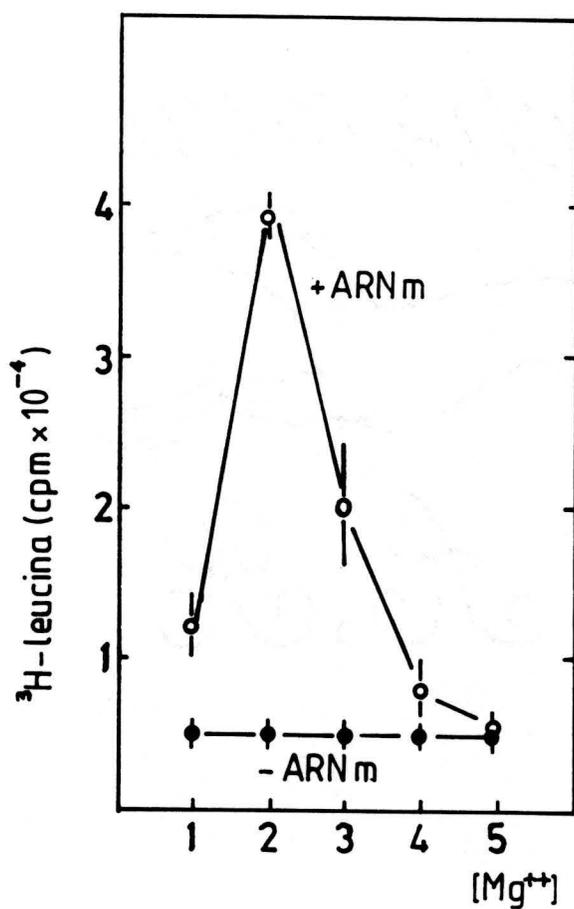


FIGURA II. Traducción de ARN "mensajero" en el sistema "in vitro" de germen de trigo: concentración óptima de Mg^{++} .

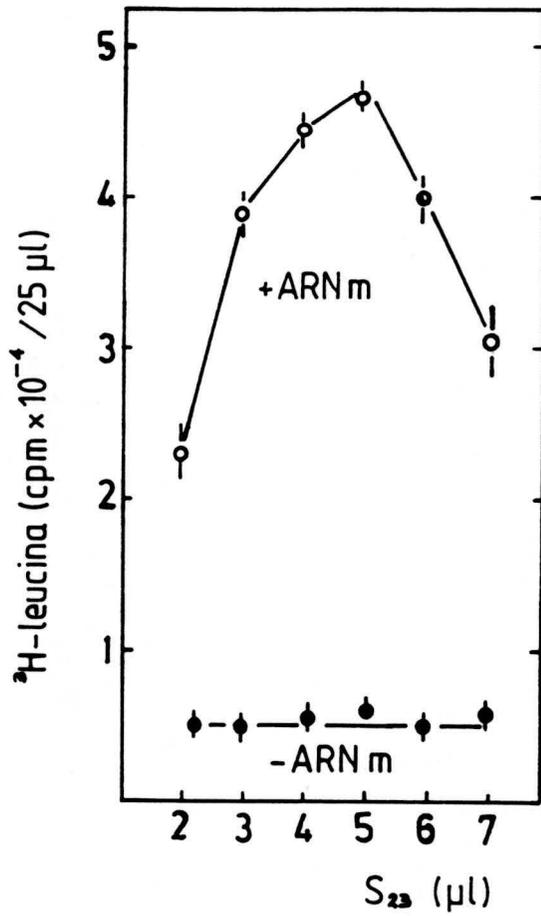


FIGURA III. Traducción de ARN "mensajero" en el sistema "in vitro" de germen de trigo: concentración óptima de germen.

RESULTADOS

RESULTADOS

Para el presente trabajo de investigación se emplearon ejes aislados de semillas de **Cicer arietinum** L. Este material vegetal se aisló, manualmente, en cámara de flujo laminar una vez que las semillas se hubieron imbibido durante seis horas en agua estéril y oscuridad absoluta. El empleo y la elección del eje embrionario fue como consecuencia de ser un material que proporciona un buen sistema experimental para el estudio de los parámetros que en esta Memoria se abordan, ya que posee un crecimiento inicial que depende en casi toda su extensión de la elongación celular; así mismo, y ya en etapas posteriores se produce la mitosis y puede ser empleado igualmente, bien en el estudio de la acción de las diferentes fitohormonas objeto de estudio, bien en procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo.

4.1. Efecto del ácido abscísico sobre el crecimiento y desarrollo

4.1.1. **Crecimiento de ejes embrionarios**

Los ejes embrionarios se colocaron en presencia de concentraciones de ácido abscísico que oscilaban entre 5 y 50 μM procediéndose a valorar el crecimiento del tejido en base a la medida de su peso fresco a lo largo de 48 horas de incubación. Los resultados se expresan en la figura 1A juntamente con las desviaciones estándar resultantes de al menos 8-10 repeticiones. El peso fresco, expresado como miligramos por órgano vegetal, incrementa en el control de forma lineal hasta las 24 horas, a

partir de las que se hace más lento probablemente como consecuencia de la falta de aporte nutritivo exógeno añadido al medio, y por supuesto debido a que es un órgano aislado que no posee "fuente" suministradora de materiales de reserva como pueden ser el cotiledón o endospermo. En ejes de trigo, JENDRISAK (1981), entre otros investigadores, obtiene cinéticas de crecimiento muy similares a las nuestras.

La presencia de ABA en el medio de incubación reduce el crecimiento conforme la concentración de la fitohormona incrementa en la solución acuosa. Concentraciones de ABA que oscilan entre 5 y 10 μM provocan una reducción del crecimiento a las 48 de incubación del 8 y 13% respectivamente, efecto que se acentúa más entre 18-24 horas debido a que es en este periodo cuando la cinética de crecimiento es lineal. Sin embargo, concentraciones de ABA de 25 y 50 μM reducen el peso fresco de forma muy apreciable no produciéndose a 50 μM , apenas elongación del eje embrionario.

4.1.2. Contenido en agua

Los resultados del contenido en agua, que se exponen en la figura 1B, corroboran los anteriormente comentados, obteniéndose unos perfiles en respuesta a la adición de ABA exógeno muy similares a los de la figura 1A. Todo ello nos sugiere las implicaciones de osmóticos en el compartimento vacuolar que desencadenan la toma de agua.

Estamos pues en presencia de un proceso que, básicamente es de toma de agua ya que el incremento en peso seco durante el periodo estudiado varía muy poco (Tabla I).

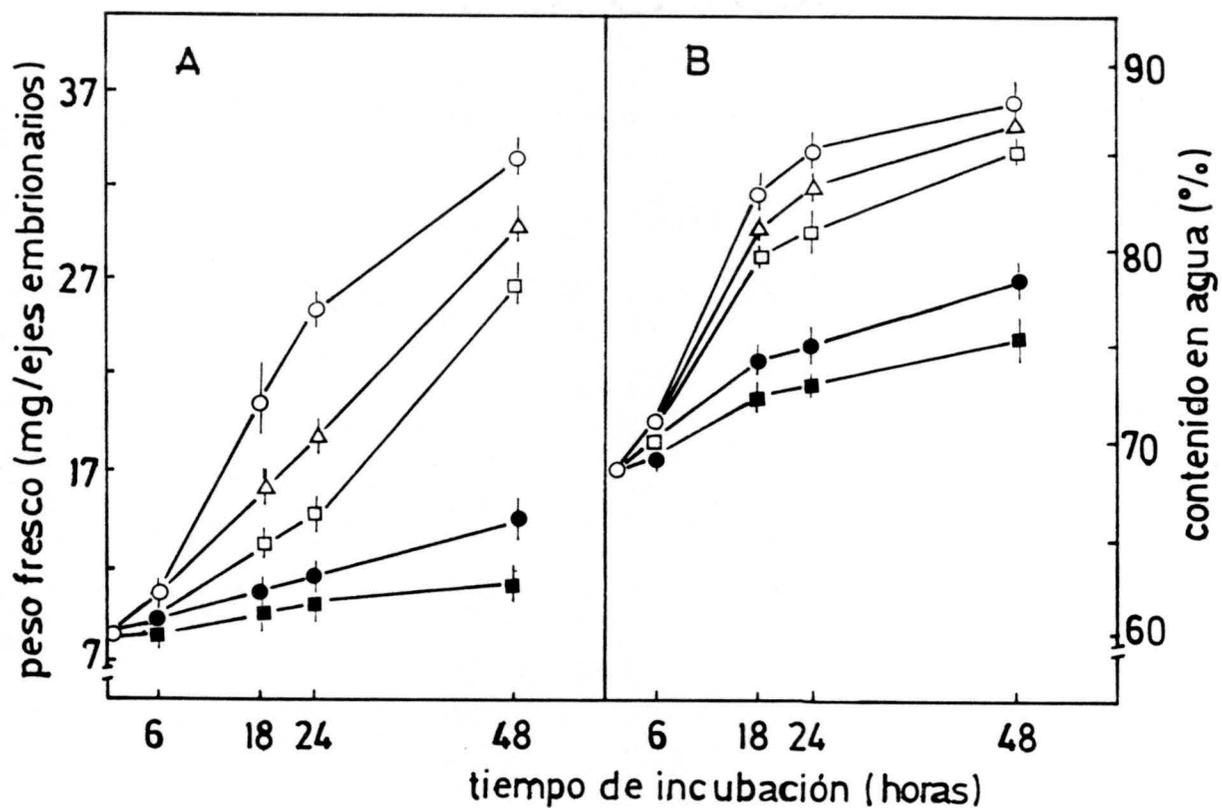


FIGURA 1. Efecto del ácido abscísico exógeno sobre el incremento en peso fresco (A) y contenido en agua (B) (expresado en porcentaje respecto al peso seco), en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Los datos son la media de 5-6 experimentos con el error estándar. Control (○—○), ABA 5 μM (△—△), 10 μM (□—□), 25 μM (●—●) y 50 μM (■—■).

TABLA I. Variación de peso seco expresado como mg/eje en respuesta a las concentraciones de ABA exógeno que se especifican.

Horas	ABA (μM)				
	Agua	5	10	25	50
6	2.83 \pm 0.02	2.90 \pm 0.01	2.85 \pm 0.02	2.95 \pm 0.01	2.85 \pm 0.015
24	2.40 \pm 0.03	2.50 \pm 0.03	2.50 \pm 0.04	2.60 \pm 0.02	2.60 \pm 0.020

El peso seco de los ejes embrionarios no germinados ($t=0$) es de 3.05 \pm 0.08 mg/eje.

4.1.3. Contenido endógeno de iones en ejes embrionarios

Como consecuencia de los resultados antes descritos, estamos en presencia de un proceso de toma de agua, regulado entre otros factores por el ABA exógeno añadido. Por ello hemos cuantificado los cationes que mayor incidencia tienen en la toma de agua en la célula vegetal en general y en el eje embrionario en particular. Tal es el caso del potasio (K^+), catión osmóticamente activo (malato-potásico) cuyas implicaciones en la elongación celular están ampliamente estudiadas ya no sólo en la célula vegetal como ente autónomo sino también en órganos y aparatos como es el caso del aparato estomático. Asimismo, hemos cuantificado calcio (Ca^{++}), sodio (Na^+), magnesio (Mg^{++}) y manganeso (Mn^{++}) por ser los más abundantes en ejes embrionarios y en el material de reserva de semillas de garbanzo (HERNANDEZ-NISTAL y cols., 1983). Hierro y boro también han sido cuantificados pero por no tener una especial incidencia en el trabajo que nos ocupa, no los presentamos.

4.1.3.a. CONTENIDO EN POTASIO (K^+)

El potasio, expresado en microgramos por eje, incrementa en el control conforme avanza el periodo de incubación estudiado, descendiendo sus niveles endógenos de forma paralela a como lo hace el incremento de ABA en el medio de incubación (Fig. 2). La similitud de los resultados de la figura 1A-B con la variación de potasio en respuesta a ABA exógeno confirma la relación existente entre la toma de agua y los niveles del catión osmótico; relación que guarda una correlación del 0.947% (Fig. 3).

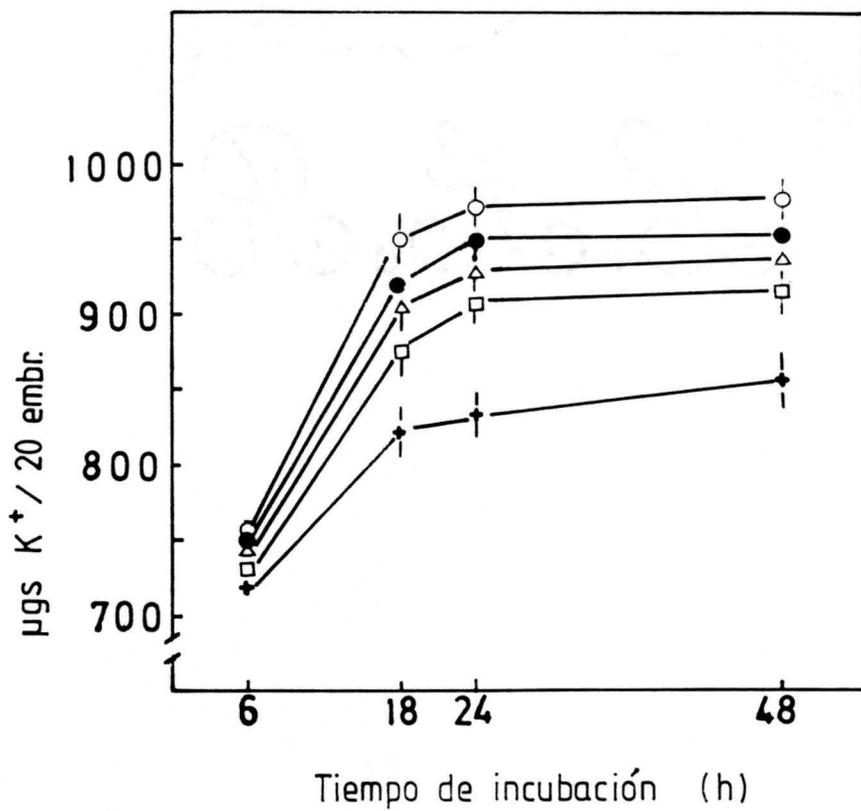


FIGURA 2. Contenido endógeno de potasio en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo en respuesta a diferentes concentraciones exógenas de ácido abscísico. Control (o—o), ABA 5µM (●—●), 10 µM (Δ—Δ), 25 µM (□—□) y 50 µM (+—+) Media de 3-4 experimentos con la desviación estándar.

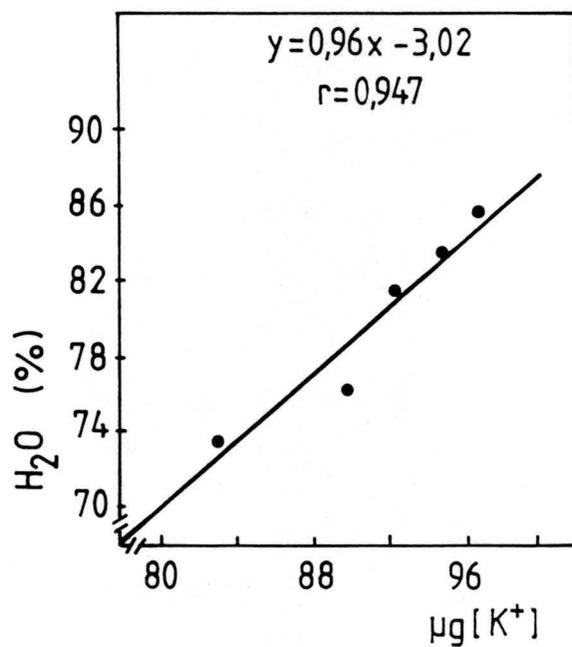


FIGURA 3. Ecuación de regresión entre el porcentaje en agua y la concentración de potasio. Cada punto es la media de tres valores.

4.1.3.b. CONTENIDO EN POTASIO EN EL MEDIO DE INCUBACION

Los ejes embrionarios aislados contienen, como se demostró previamente (Fig. 2), cantidades crecientes de potasio conforme avanza el periodo de crecimiento. Estos niveles de potasio pueden proceder, bien del que el tejido tiene ligado y almacenado, bien del medio de incubación al que van a parar gran cantidad de iones con motivo de los procesos de reestructuración de las membranas que tiene lugar durante los periodos iniciales del desarrollo.

En la figura 4, se expresan los resultados del contenido en potasio del medio, referidos a diez órganos. La concentración más elevada se observa durante las primeras 6 horas de crecimiento, momento en que los procesos de reestructuración son más importantes; a partir de este instante, el descenso es relativamente constante coincidiendo de forma inversa a como aumenta el K^+ endógeno (Fig. 2). Esta disminución de K^+ en el medio a medida que progresa el crecimiento está afectada por la presencia de ABA, siendo más patente este efecto entre las 12-24 horas momento en el que el crecimiento es lineal (Fig. 1A).

4.1.3.c. CONTENIDO ENDOGENO DE Ca^{++} , Na^+ , Mg^{++} y Mn^{++}

El calcio (Ca^{++}) es un catión muy abundante en ejes embrionarios de semillas de garbanzo, pero los datos obtenidos (Fig. 5) nos hacen pensar que su movilización es mucho más lenta que en el caso del potasio. Así, el ABA exógeno afecta de manera sensible a sus niveles a partir de las 18 horas, momento en que la fitohormona tiene un efecto muy patente. Los niveles de potasio respecto a los de calcio oscilan entre 2.0-2.5 veces.

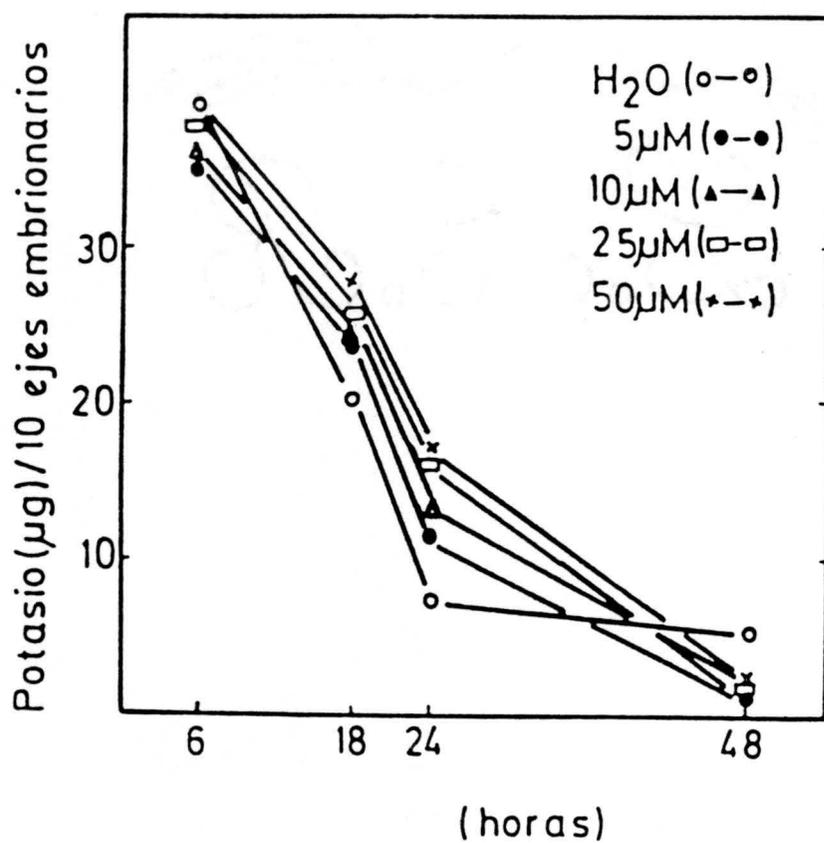


FIGURA 4. Efecto de varias concentraciones de ABA sobre el nivel de **potasio** en el medio de incubación durante el crecimiento de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo.

Control (○—○), ABA 5µM (●—●), 10 µM (▲—▲), 25 µM (□—□) y 50 µM (×—×). Los datos son la media de 2-3 experimentos y el error estándar de 5-6%.

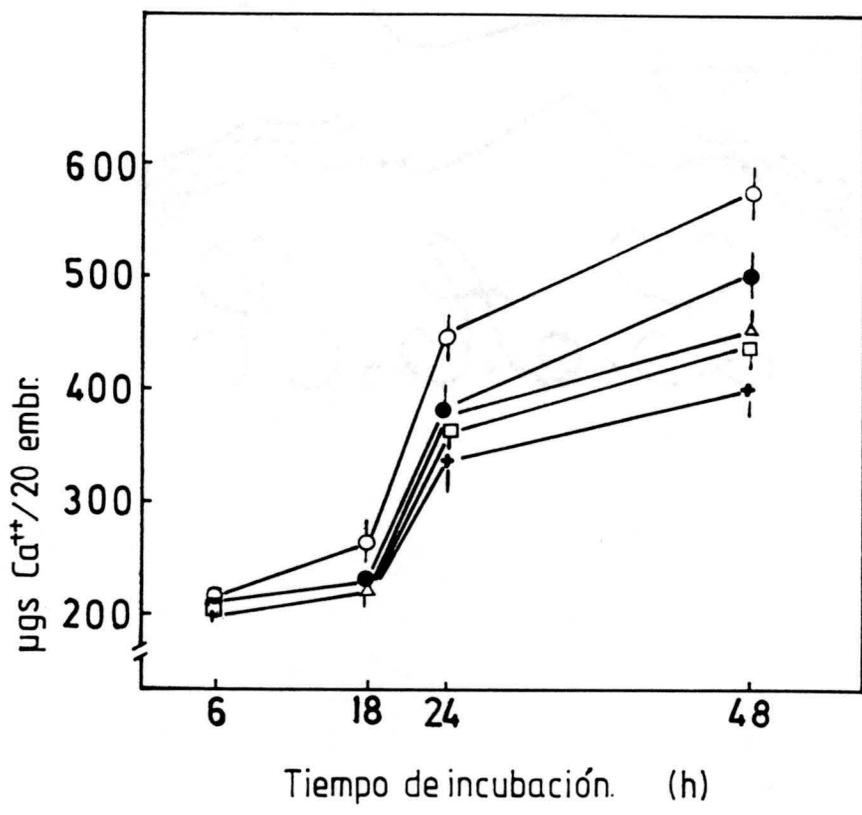


FIGURA 5. Efecto de diferentes concentraciones de ABA exógeno sobre los niveles endógenos de **calcio** en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo.

Control (o—o), ABA 5µM (●—●), 10 µM (Δ—Δ), 25 µM (□—□) y 50 µM (+—+). Los datos son la media de 3-4 experimentos con el error estándar.

El contenido endógeno de sodio (Na^+) en el eje radicular es, aproximadamente, entre 3-5 veces menor que el de calcio y potasio respectivamente, teniendo una fluctuación, a lo largo del periodo estudiado muy similar al calcio, aunque el efecto del ABA, también tardío, es más acusado que en el caso de aquel (Fig. 6).

Los niveles de magnesio (Mg^{++}) y manganeso (Mn^{++}) son relativamente bajos, como era de esperar ya que su incidencia en el metabolismo, aunque importante, requiere una concentración muy baja (Figs. 7 y 8).

4.1.4. Efecto de poliaminas sobre el crecimiento inducido por ABA

Aunque el metabolismo de poliaminas está relativamente bien conocido en plantas superiores, no sucede lo mismo con los efectos fisiológicos inducidos por ellas. A fin de iniciar un estudio que intente contribuir al esclarecimiento de estos aspectos, se han incubado ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo con tres poliaminas: cadaverina (di-amina), espermidina (tri-amina) y espermina (tetra-amina) a unas concentraciones que oscilan entre 0.1 y 10 mM.

4.1.4.a. EFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL CRECIMIENTO

Las tres poliaminas empleadas afectan al crecimiento en función del tipo de amina presente y de su concentración exógena (Fig. 9). Así, mientras que concentraciones <1.0 mM tienen una ligera acción estimuladora, aquellas que son >1.0 mM lo reducen en función del número de grupos amino que contenga la molécula.

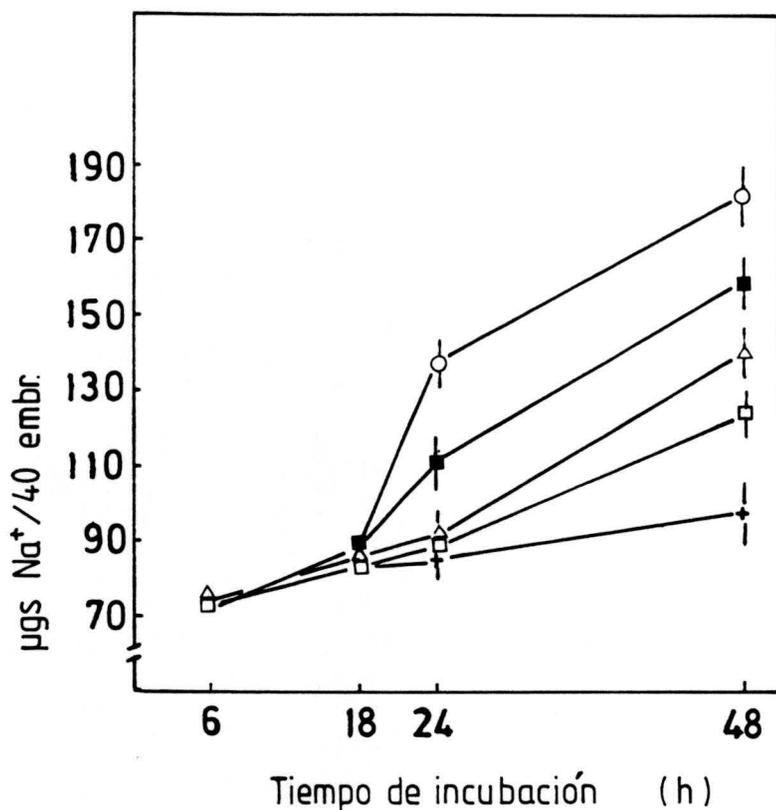


FIGURA 6. Efecto de varias concentraciones de ABA exógeno sobre el contenido endógeno de **sodio** en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo.

Control (o—o), ABA 5µM (■—■), 10 µM (Δ—Δ), 25 µM (□—□) y 50 µM (+—+). Los datos son la media de 3-4 experimentos con el error estándar.

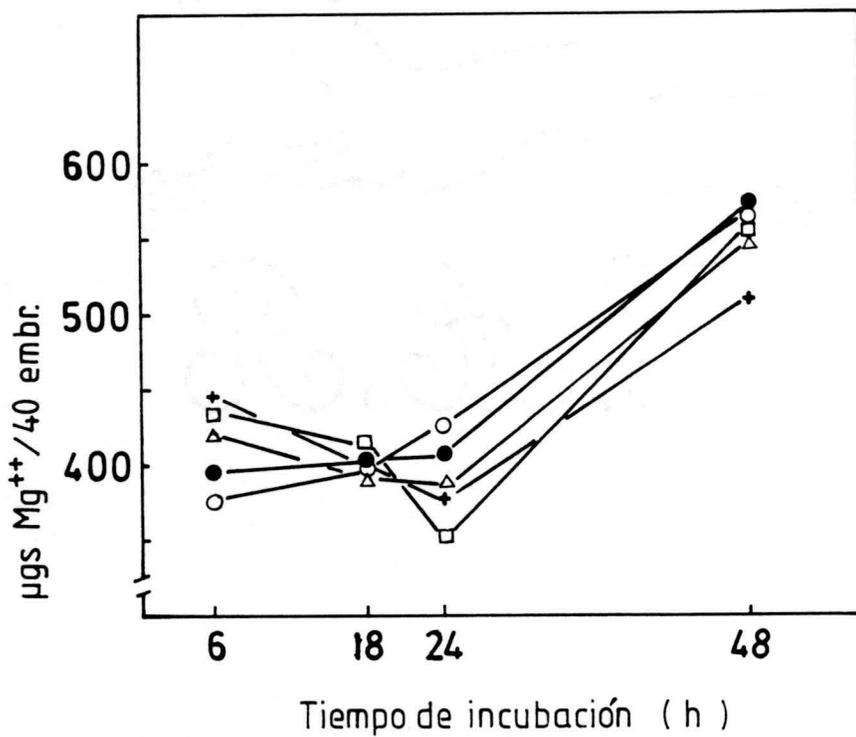


FIGURA 7. Efecto de varias concentraciones de ABA exógeno sobre el contenido endógeno de **magnesio** en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Control (o—o), ABA 5µM (●—●), 10 µM (Δ—Δ), 25 µM (□—□) y 50 µM (+—+). Los datos son la media de 3-4 experimentos con un error estándar de 2-3%.

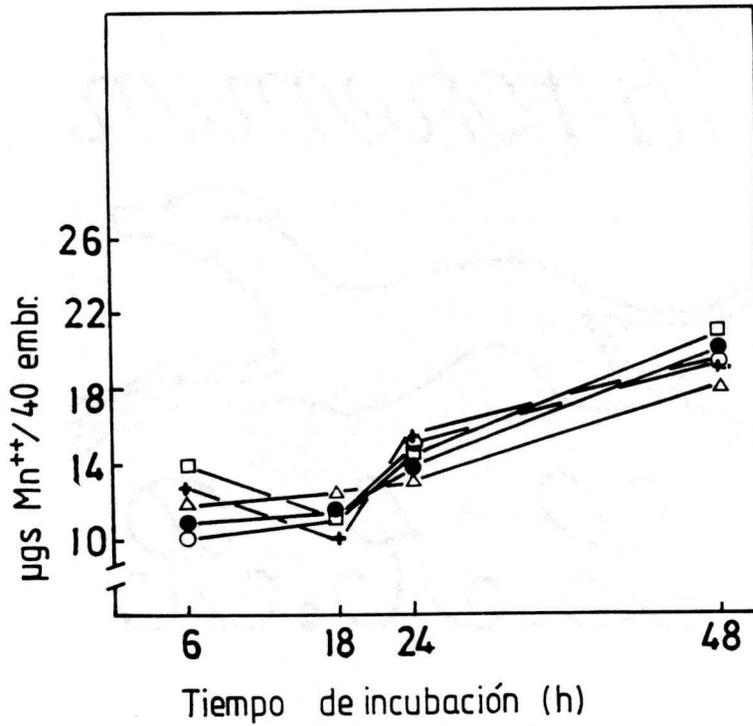


FIGURA 8. Efecto de varias concentraciones de ABA exógeno sobre los niveles endógenos de **manganeso** en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Control (o—o), ABA 5µM (●—●), 10 µM (Δ—Δ), 25 µM (□—□) y 50 µM (+—+). Los datos son la media de 3-4 experimentos con un error estándar de 2-3%.

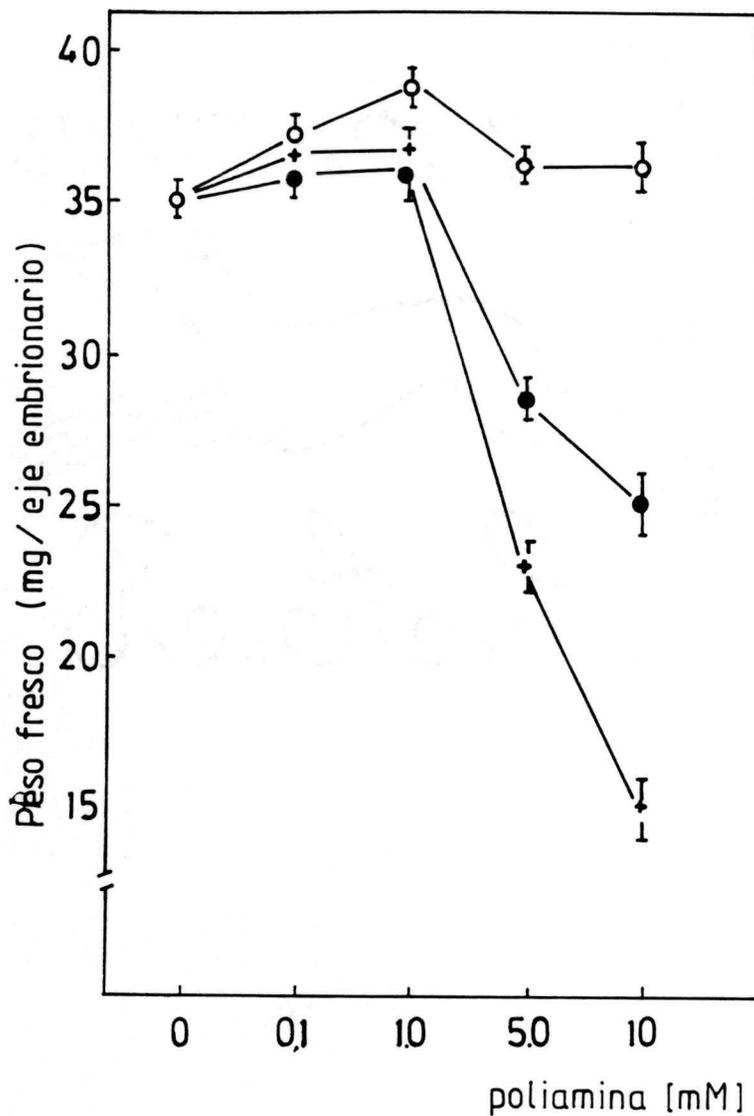


FIGURA 9. Efecto de la presencia, en el medio de incubación, de espermina (+—+), espermidina (●—●) y cadaverina (o—o) sobre el peso fresco de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, incubados 48 horas. Media de 4-5 experimentos con la desviación estándar.

4.1.4.b. EFECTO DE POLIAMINAS + ABA SOBRE EL CRECIMIENTO

El ABA ya hemos visto que reduce el crecimiento en función de su concentración exógena (Fig. 1A). Las poliaminas sólo son capaces de revertir la inhibición del crecimiento provocada por ABA cuando ambas sustancias están presentes a bajas concentraciones (ABA 10 μ M + poliamina 0.1 mM) (Fig. 10). Los resultados expuestos hacen pensar que la acción del ABA sobre los mecanismos de crecimiento priman sobre los que puedan inducir las poliaminas, o bien que ambas sustancias tengan un mecanismo de acción diferente por lo que al crecimiento se refiere.

4.1.4.c. EFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBRE EL CONTENIDO IONICO EN EJES EMBRIONARIOS DE SEMILLAS ENTERAS

Para estudiar el efecto de las poliaminas sobre el crecimiento, entendiéndolo éste como aumento irreversible de volumen provocado por la elongación celular y por la actividad mitótica, se han empleado ejes embrionarios de semillas de garbanzo, aislados a las 6 horas de imbibición (*Cicer arietinum* L.). Una vez obtenido este material, se pusieron a crecer en presencia de agua o en concentraciones de poliaminas que oscilaron entre 0.1-10 mM durante un periodo de tiempo mínimo de 12 horas y máximo de 48 horas.

La cinética de crecimiento de los ejes embrionarios aislados puede observarse en las figuras 11A, 12A y 13A. En presencia de agua, a las 24 y 48 horas, el crecimiento es de 138.8% y 188.5% respecto al observado a 12 horas. Cuando en el medio existen

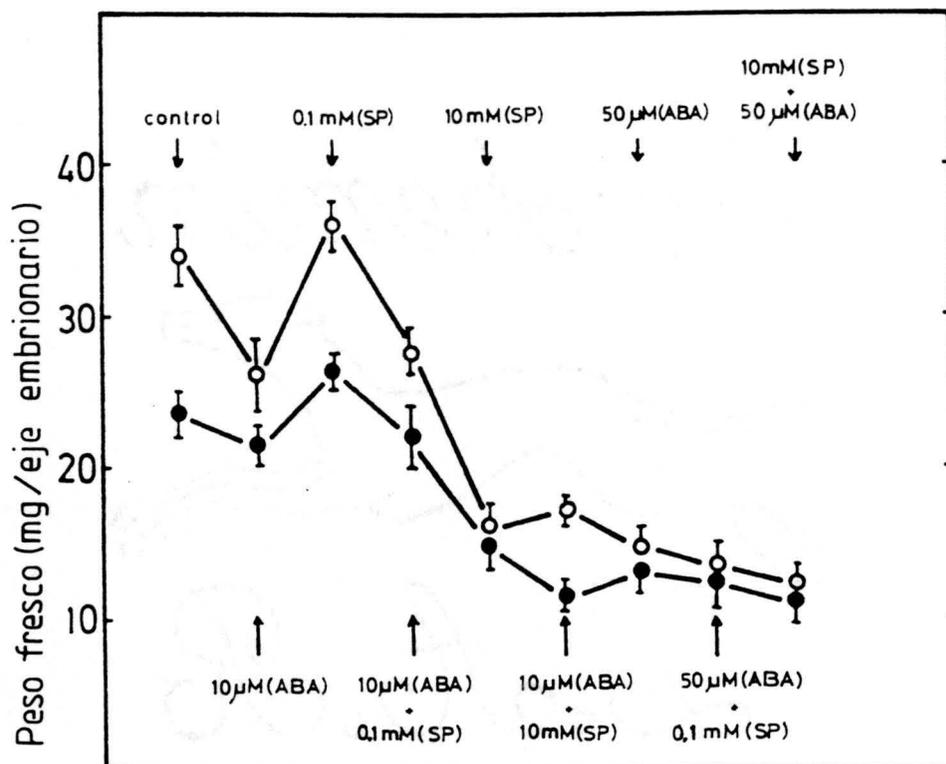


FIGURA 10. Efecto del ácido abscísico, espermina y mezcla de ambas sustancias, a las concentraciones que se indican, sobre el crecimiento de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, incubados durante 24 (●—●) y 48 horas (○—○). Los resultados son la media de 3-4 experimentos con la desviación estándar.

poliaminas, el crecimiento se ve afectado en función del tipo de amina y de la concentración exógena aplicada. Así, en presencia de **espermina** (tetraamina) (Fig. 11A), el crecimiento inducido es ligeramente menor que en presencia de **espermidina** (Fig. 12A) y de **cadaverina** (Fig. 13A).

Si analizamos el efecto de las distintas concentraciones de estas tres poliaminas sobre el crecimiento observamos que, si bien 0.1 y 1.0 mM tienen cierto efecto estimulador y 5.0-10.0 mM, claramente inhibitor, ambos fenómenos son menos acentuados conforme desciende el número de grupos amino en la molécula.

Paralelamente a las medidas de crecimiento ya reseñadas, se ha calculado el porcentaje en agua por diferencia de pesada entre el peso fresco y el peso seco (24-48 horas, 60°C). Los resultados se observan en las figuras 11B, 12B y 13B, para cada poliamina respectivamente. Al igual que sucedía con el crecimiento, las poliaminas afectan al contenido en agua del eje radicular; éste aumenta un 8.8% respecto al observado a 12 horas debido al predominio de procesos de elongación gobernados por el potencial hídrico, mientras que a 48 horas sólo aumenta un 13.9% debido a que alternan los procesos de elongación con los de mitosis.

Por otra parte, se han valorado los cationes potasio (K^+) y sodio (Na^+) en respuesta a la adición exógena de cadaverina (CD), espermidina (SPD) y espermina (SP) en ejes embrionarios aislados de semillas enteras crecidas en presencia de poliaminas.

ESPERMINA.

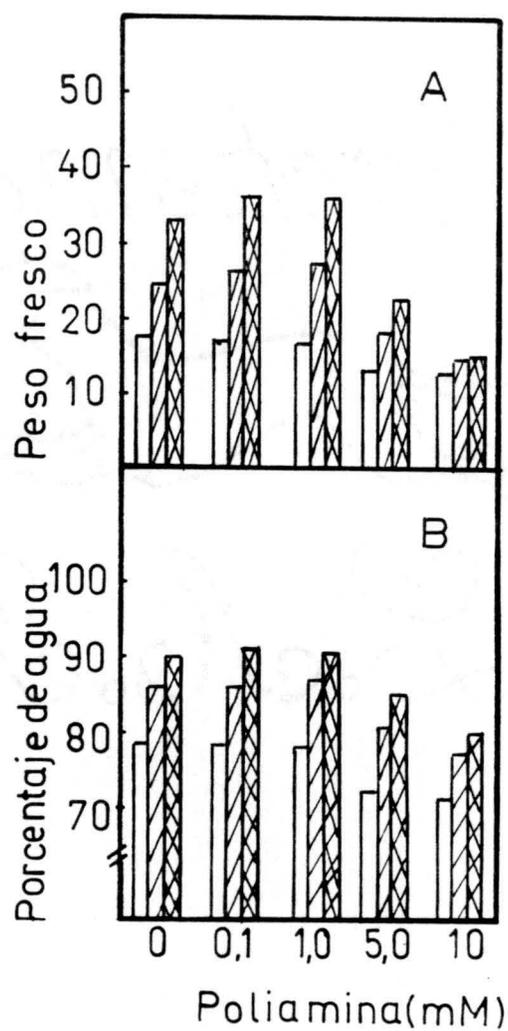


FIGURA 11. Efecto de la **espermina**, a las concentraciones indicadas, sobre el peso fresco (**A**) y contenido en agua (**B**) en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, germinados durante 12 horas (□), 24 horas (▨) y 48 horas (▩), respectivamente. Los datos son la media de 4-5 experimentos con un error estándar entre 2-4%.

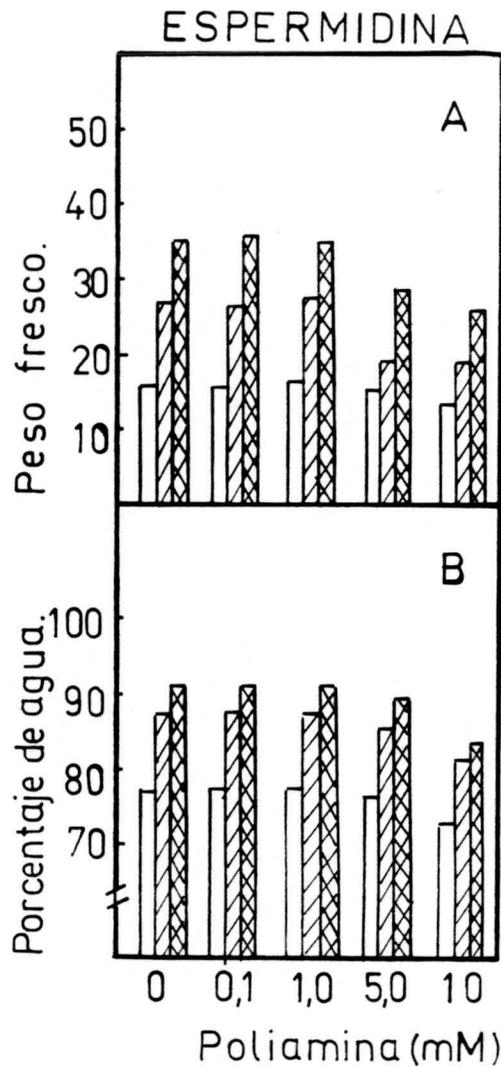


FIGURA 12. Efecto de la **espermidina**, a las concentraciones indicadas, sobre el peso fresco (A) y contenido en agua (B) en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, germinados durante 12 horas (□), 24 horas (▨) y 48 horas (▩), respectivamente. Los datos son la media de 4-5 experimentos con un error estándar entre 3-4%.

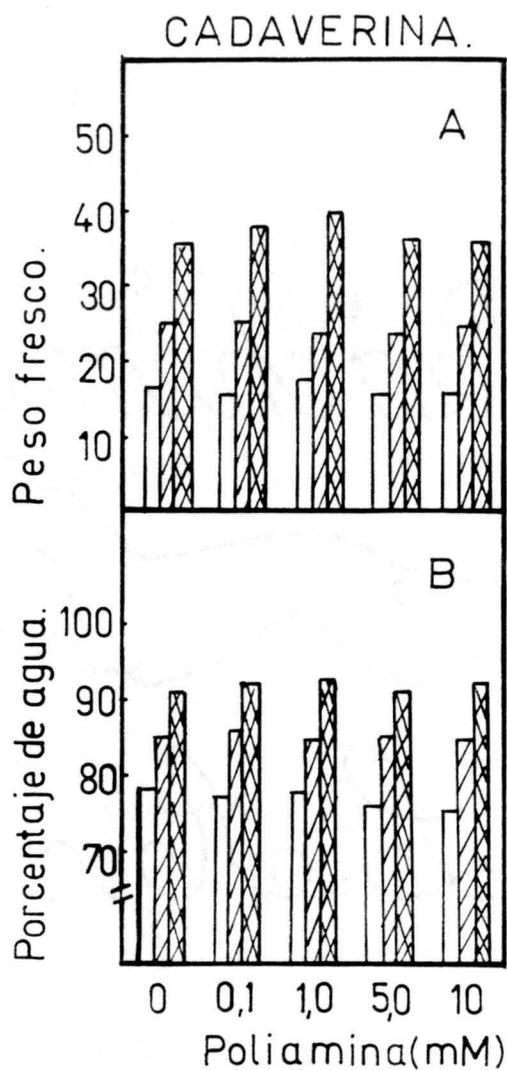


FIGURA 13. Efecto de la **cadaverina**, a las concentraciones indicadas, sobre el peso fresco (A) y contenido en agua (B) en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo, germinados durante 12 horas (▭), 24 horas (▨) y 48 horas (▩), respectivamente. Los datos son la media de 4-5 experimentos con un error estándar entre 1-5%.

* **potasio** (K^+). La cadaverina, que tiene poca relevancia sobre la inducción del crecimiento, tampoco afecta sustancialmente al contenido en potasio en el tiempo de incubación estudiado (48 horas) y a las concentraciones añadidas (Fig. 14).

La espermidina, a concentraciones <0.1 mM no modifica los niveles de potasio; sin embargo concentraciones >0.1 mM lo disminuyen ostensiblemente conforme avanza el crecimiento (Fig. 15).

La espermina, mantiene niveles elevados de potasio en el eje embrionario a concentraciones <1.0 mM, provocando un marcado descenso a concentraciones mayores (Fig. 16).

* **Sodio** (Na^+). Las poliaminas añadidas, siguen las mismas pautas respecto a la acumulación de sodio que en el caso descrito para potasio (Figs. 17, 18 y 19).

4.2. Efecto del ácido abscísico sobre la actividad ribonucleásica

El ABA tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de plantas superiores, actuando en función del órgano a estudiar así como del estado fisiológico del mismo. Su acción sobre ciertas actividades enzimáticas está descrita aunque el hecho de que sean las hojas el material más estudiado, limita bastante la generalización de sus efectos.

Se estudia en esta Memoria la acción que tiene el ABA sobre la actividad RNásica soluble en ejes embrionarios y en el tejido de reserva de semillas de garbanzo y en respuesta a tratamientos diferentes de ABA tales como las poliaminas.

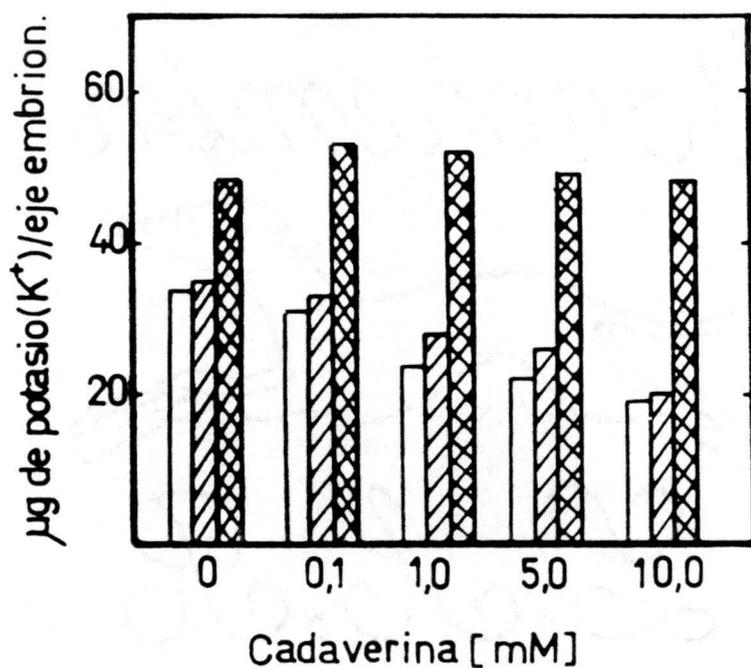
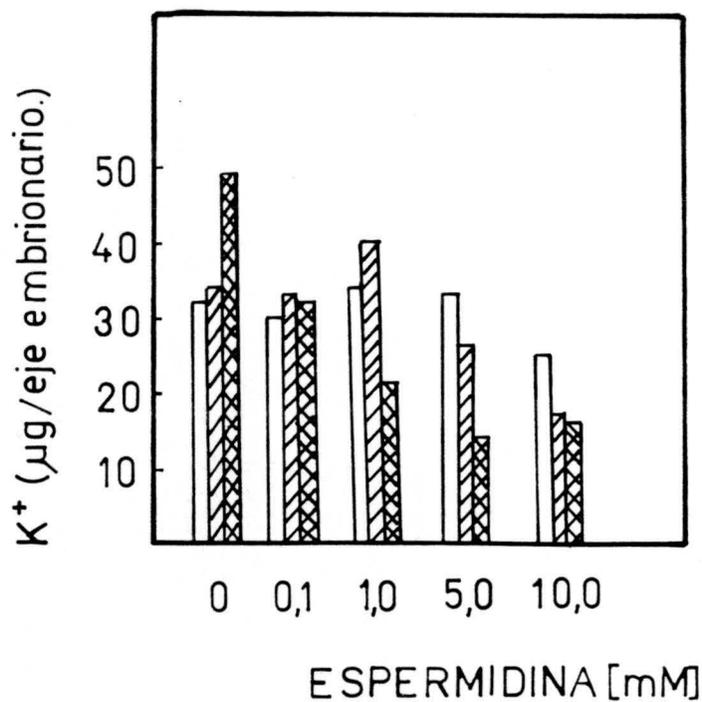
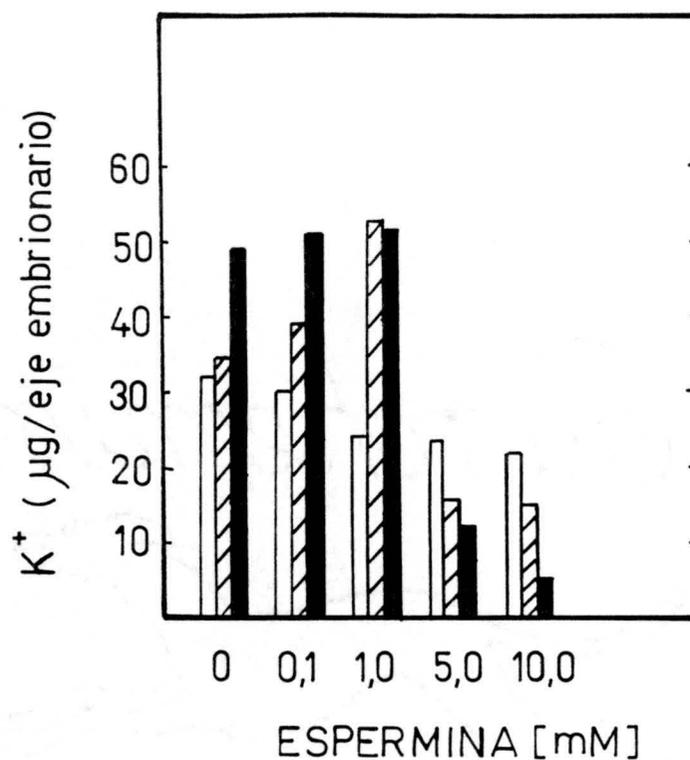


FIGURA 14. Efecto de la **cadaverina** a las concentraciones indicadas sobre el contenido endógeno de potasio (K^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 3-4%.



2
FIGURA 15. Efecto de la **espermidina** a las concentraciones indicadas sobre el contenido endógeno de potasio (K^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 2-3%.



3
FIGURA 16. Efecto de la **espermina** a las concentraciones indicadas sobre el contenido endógeno de potasio (K^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 2-5%.

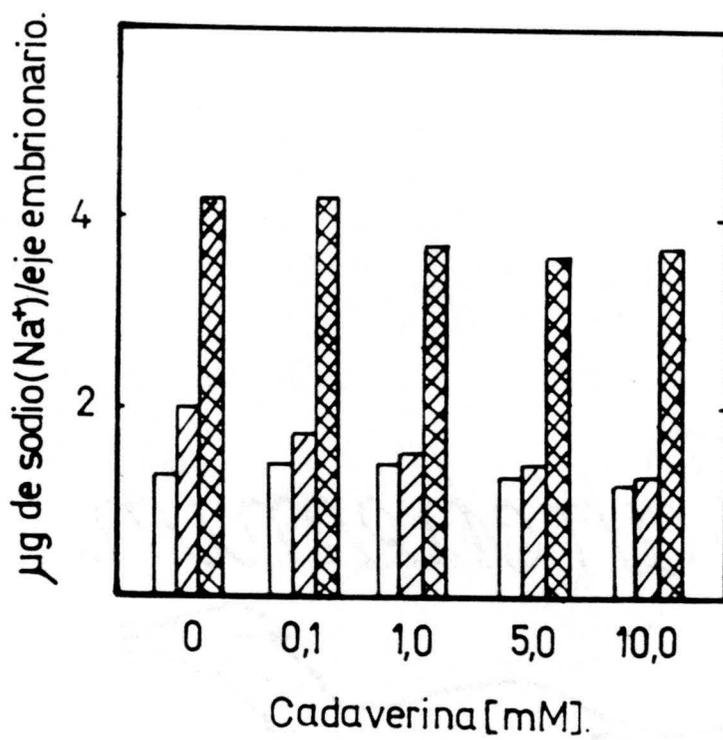


FIGURA 17. Efecto de la cadaverina sobre el contenido endógeno de sodio (Na^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 2-4%.

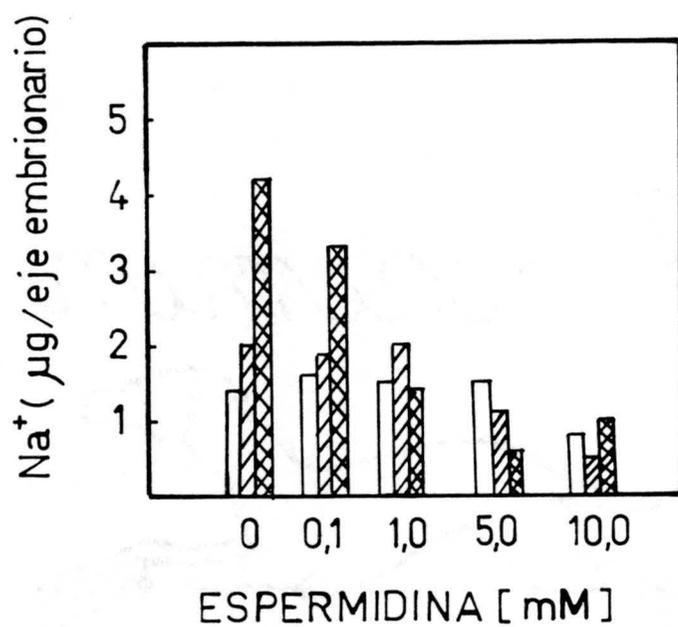


FIGURA 18. Efecto de la **espermidina** sobre el contenido endógeno de sodio (Na^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 3-5%.

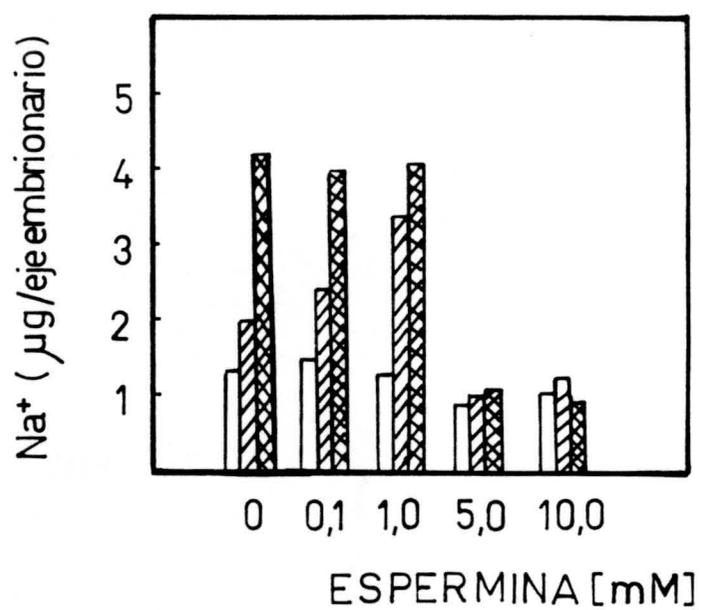


FIGURA 19. Efecto de la **espermina** sobre el contenido endógeno de sodio (Na^+) en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. Media de 4-5 experimentos con un error estándar de 3-6%.

4.2.1. Características de la actividad RNásica

El sobrenadante de 30.000 x g obtenido tal y como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos, tiene un pH óptimo de 6.0 tanto en presencia como en ausencia de ABA (Fig. 20). Este óptimo es relativamente amplio ya que valores entre 5-6 apenas modifican la actividad RNásica en el extracto crudo.

La actividad enzimática es lineal entre 0.252.0 mg de proteína contenida en la mezcla de reacción, saturándose el sistema para valores superiores (Fig. 21A). Se empleó un volumen de sobrenadante de 50-100 μ l según el caso. La ausencia de un posible inhibidor de la RNasa en el extracto crudo se demostró por la linealidad observada, así como mediante experimentos mezcla.

La afinidad por el sustrato fue ensayada en base al empleo de cuatro ARNs de diferentes características: ARNm-poly(A) obtenido de semillas de garbanzo como se describe en Materiales y Métodos (3.14), ARN altamente polimerizado (BDH), ARN de levadura (tipo XI Sigma) y ARNt (Sigma tipo V) (Fig. 21B).

La actividad RNásica incrementa linealmente a medida que la concentración de sustrato en la reacción es mayor. Sin embargo la pendiente de la recta obtenida en respuesta a cantidades crecientes de ARN es diferente según el tipo de éste. Así, la mayor afinidad la posee el ARNm, seguido del altamente polimerizado, ARN total de levadura y ARNt. Esto indica que la mayor o menor afinidad del sobrenadante enzimático depende del grado de polimerización del sustrato. El sustrato empleado en todas las valoraciones fue ARN altamente polimerizado (BDH

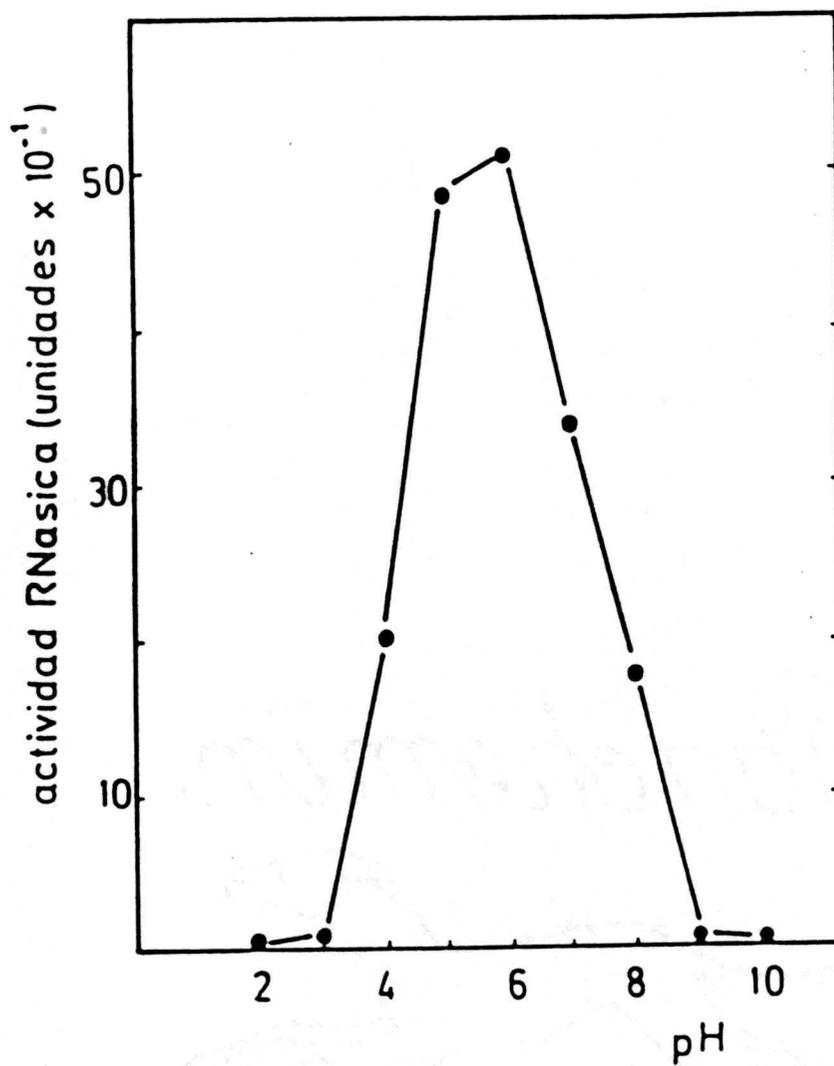


FIGURA 20. Actividad ribonucleásica soluble de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo: dependencia de pH.

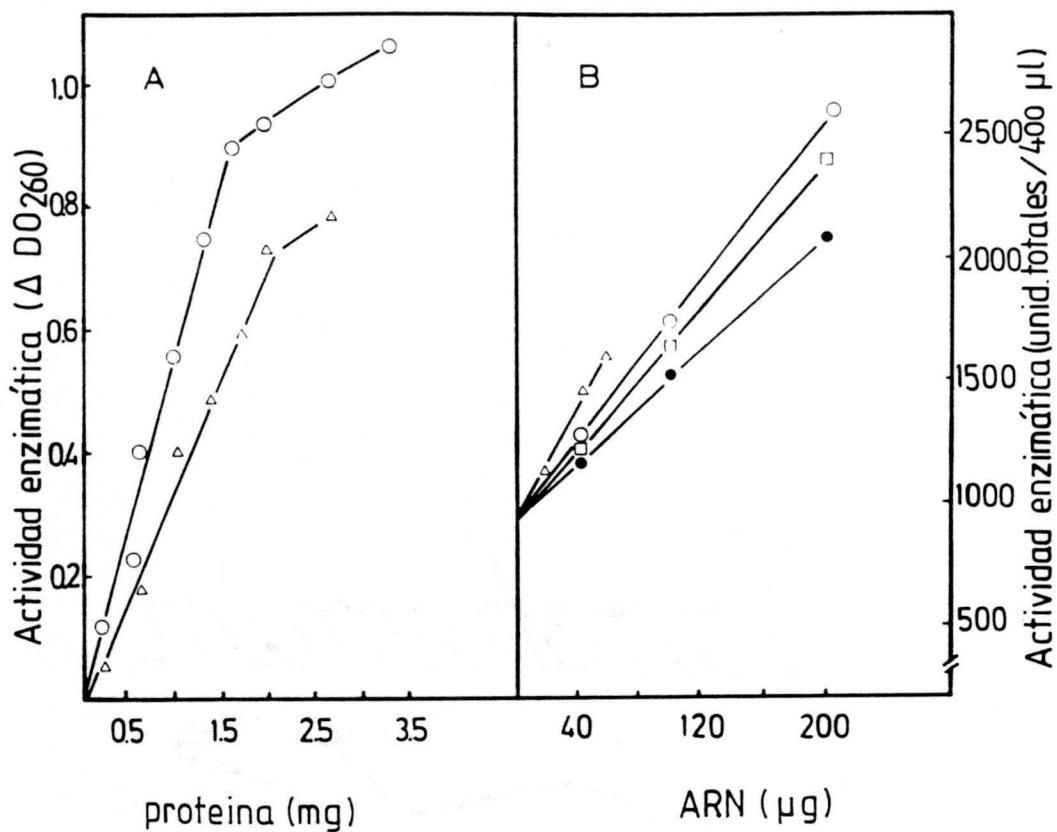


FIGURA 21. Actividad ribonucleásica soluble en ejes embrionarios de semillas de garbanzo. (A) Efecto de la concentración de proteína en el sobrenadante obtenido a partir de ejes incubados 24 horas en agua (o—o) ó ABA 10 µM (Δ—Δ). (B) Afinidad por el sustrato: ARN altamente polimerizado (o—o), ARN-poly(A⁺) (Δ—Δ), ARN de levadura (□—□) y ARNt (●—●).

Chemicals Ltd.).

En la figura 22 se detallan los datos de actividad RNásica en extractos dializados y sin dializar, así como la actividad presente en el sedimento 30S. La actividad RNásica aumenta linealmente en sobrenadantes dializados y sin dializar conforme añadimos cantidades crecientes de extracto enzimático; se observa, sin embargo que se ha perdido algún factor dializable que afecta a la RNasa, ya que el extracto dializado tiene aproximadamente un 15% menos de actividad que el no dializado (Fig. 22A).

En el sedimento (tratado con triton-X-100 al 0.1%) queda un resto de actividad que también es lineal conforme incrementamos la concentración de extracto. Sin embargo, esta actividad es un 1-5% del total y podría deberse a la RNasa ligada a membranas.

Respecto a la actividad específica de este experimento, los resultados concuerdan con lo que anteriormente hemos comentado (Fig. 22B).

4.2.2. **Efecto del ABA sobre la actividad RNásica en ejes aislados**

La actividad RNásica soluble fue cuantificada a lo largo de un periodo de crecimiento de 2 días en presencia o ausencia de ABA (5 μ M-50 μ M).

Como puede observarse en la figura 23A la RNasa, expresada en unidades por gramo de peso fresco evoluciona linealmente durante las primeras 24 horas de crecimiento. Este incremento se modifica negativamente en presencia de cantidades crecientes de

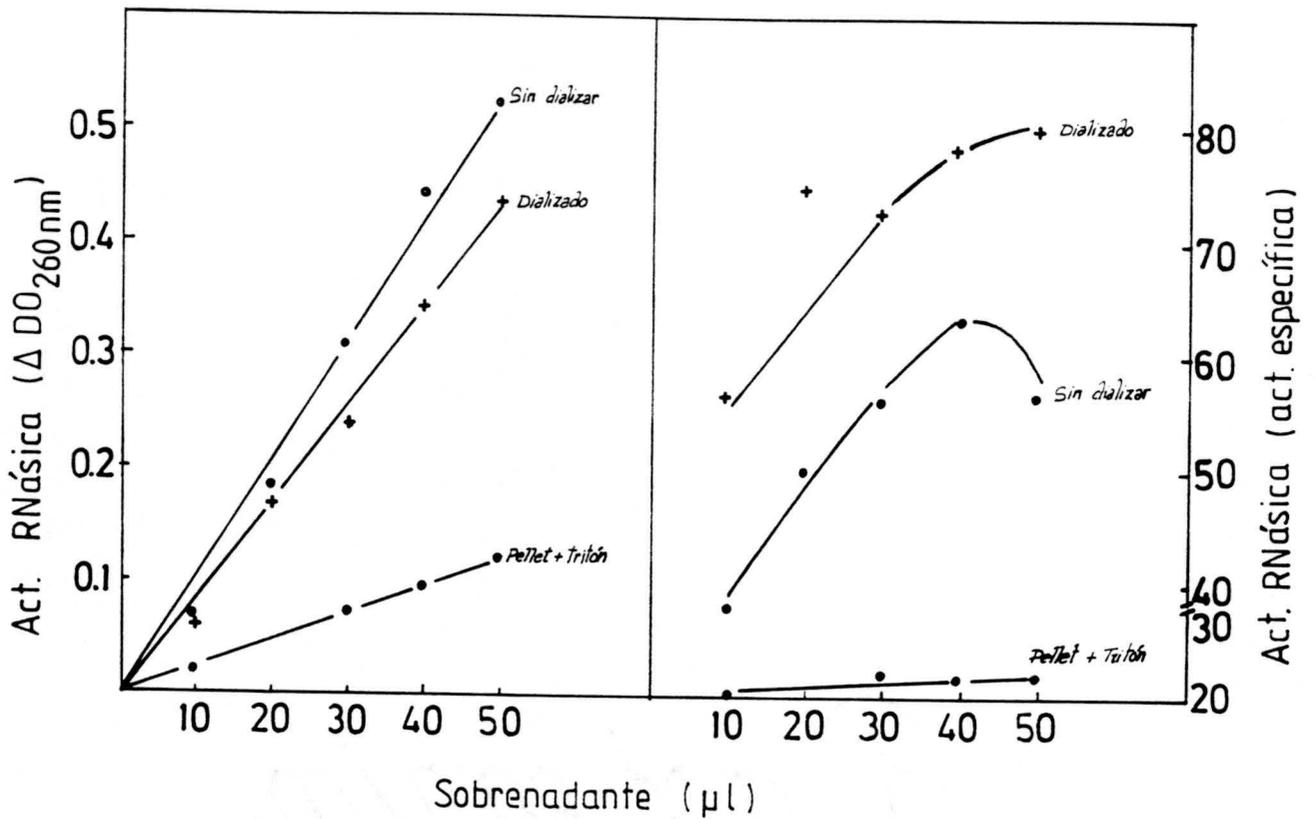


FIGURA 22. Actividad RNásica soluble en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo. Sobrenadantes obtenidos a partir de ejes incubados en agua durante 24 horas, fueron dializados frente al tampón de extracción y como se detalla en Materiales y Métodos. La actividad RNásica en extractos dializados (+—+) y sin dializar (o—o) fue cuantificada y expresada como unidades (A) o como actividad específica (B).

ABA alcanzándose a 50 μM una reducción próxima al 50%. El mismo razonamiento podemos hacer si expresamos la actividad RNásica como actividad específica (Fig. 23B).

La actividad específica de sobrenadantes tratados con 10 μM ABA ó con 50 μM ABA mezclados con extractos no tratados (control) es aproximadamente un 96-98% de los valores esperados medidos separadamente. Esto apunta a que el ABA no produce la aparición de inhibidores de RNasa (datos no mostrados) y por tanto otro(s) factor(es) inducen el descenso de la actividad enzimática en ejes embrionarios de garbanzo.

"In vitro" el ABA a concentraciones 1, 5, 10 ó 20 μM no altera la actividad enzimática lo que descarta que exista una interacción más o menos directa con el enzima (datos no mostrados).

a.- La presencia de cicloheximida (20 $\mu\text{g/ml}$) en el medio de incubación reduce entre un 70-80% la actividad RNásica, tanto en ausencia (control) como en presencia de ABA 10 μM (Fig. 24A-B). Es de resaltar que incluso en periodos muy tempranos de incubación se detecta esta reducción, lo que indica una gran dependencia de la síntesis proteica tanto en presencia como en ausencia de ABA.

Por lo que respecta al crecimiento, la cicloheximida disminuye entre un 40-50% este parámetro cuando ABA 10 μM está presente, lo que también confirma que esta fitohormona afecta mayoritariamente a otros factores que no están directamente relacionados con la síntesis proteica (Tabla II). Uno de estos factores es su acción sobre el intercambio H^+/K^+ .

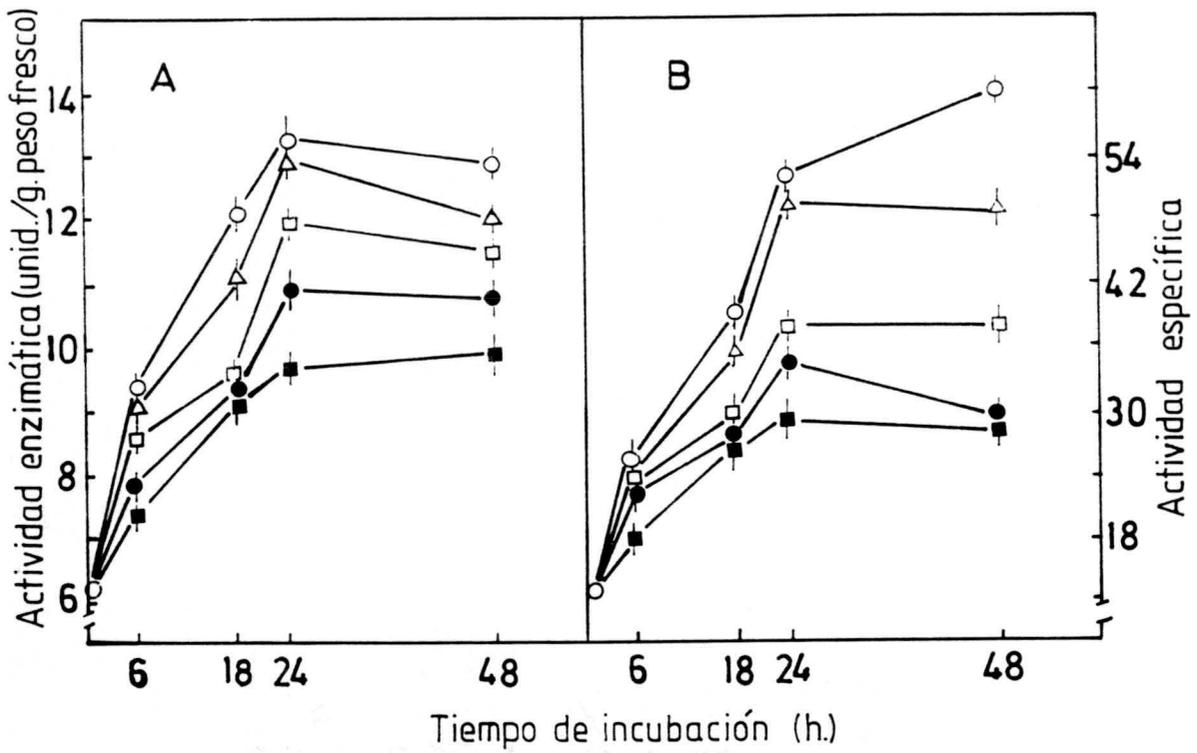


FIGURA 23. Actividad RNásica soluble expresada como unidades por gramo de peso fresco (A) o como actividad específica (B) en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* incubados en agua (○—○), ABA 5 μM (△—△), 10 μM (□—□), 25 μM (●—●) y 50 μM (■—■). Los datos son la media de 5-6 repeticiones con el error estándar.

TABLA II. Efecto del ABA (10 μ M) y cicloheximida (50 μ g/ml) sobre el incremento en peso fresco de ejes embrionarios, incubados durante los tiempos indicados. Los resultados se expresan en mg/eje embrionario y son la media de 2-3 experimentos.

Horas	6	18	24	48
H ₂ O	10.3 \pm 0.1	14.5 \pm 0.3	16.4 \pm 0.4	19.4 \pm 0.3
ABA	9.9 \pm 0.2	11.4 \pm 0.2	11.9 \pm 0.1	16.8 \pm 0.4
CH	9.8 \pm 0.1	9.9 \pm 0.1	10.5 \pm 0.2	9.1 \pm 0.2
ABA + CH	9.7 \pm 0.1	9.9 \pm 0.1	10.3 \pm 0.2	9.1 \pm 0.1

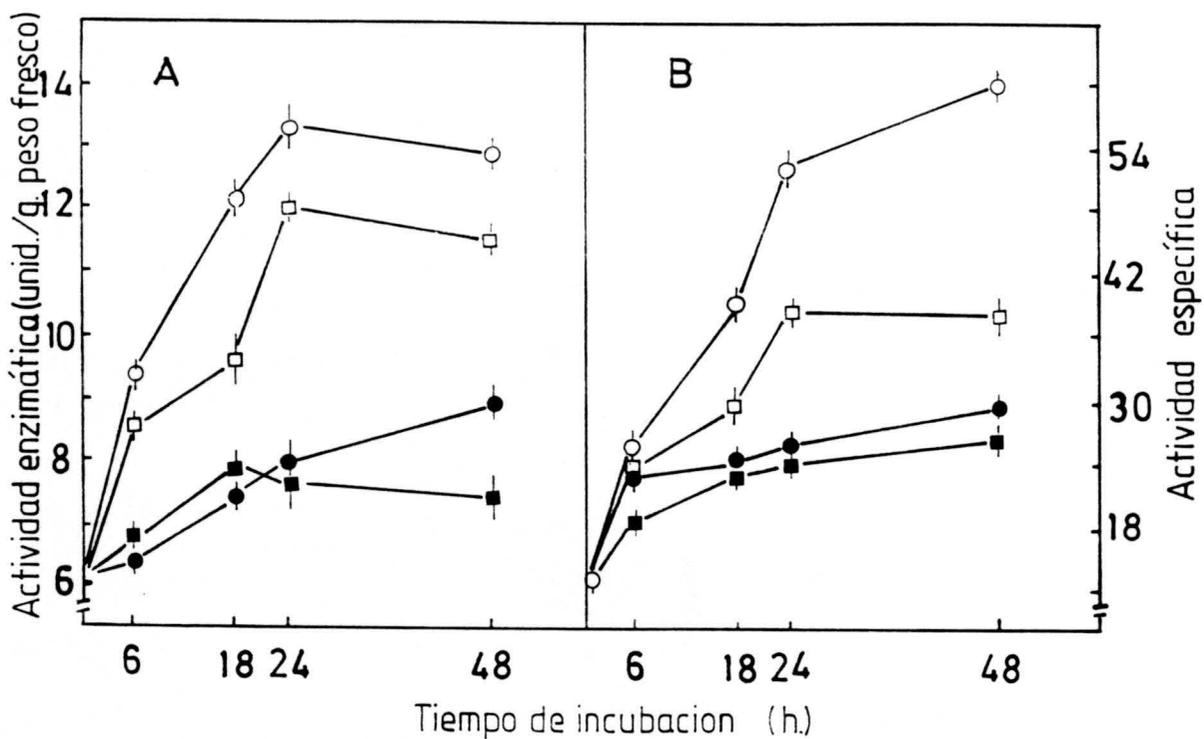


FIGURA 24. Actividad RNásica soluble expresada como unidades por gramo de peso fresco (A) o como actividad específica (B) en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* incubados el tiempo indicado en presencia de: agua (○—○), cicloheximida (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (□—□), ABA (10 μM) (●—●) y ABA + CH (■—■). Datos media de 4-5 experimentos con el error estándar.

b.- En la Tabla III aparecen los resultados de la actividad RNásica en presencia de dos inhibidores de la síntesis de ARN: 5-FU y α -amanitina inhibidores preferenciales de la síntesis de ARNr y ARNm en plantas. La α -amanitina (1 μ g/ml) reduce la actividad RNásica en un 20% respecto al control, y un 50% respecto a la valorada en presencia de ABA 10 μ M. El 5-FU 2 mM sin embargo, reduce la actividad tanto en presencia como en ausencia de ABA 10 μ M en aproximadamente un 20%. Estos datos apuntan a que el desarrollo de la actividad RNásica, cuando la toma de agua está reducida por ABA, es más sensible a la transcripción de ARNm que a la de ARNr. En general y a la vista de estos resultados y de los anteriormente reseñados podemos decir que la RNasa está sometida a un control a nivel de transcripción y traducción, tanto en presencia como en ausencia de ABA.

c.- Si en el medio de incubación existe una sustancia como la tiourea (50 mM) capaz de acelerar la hidratación del tejido, la RNasa alcanza valores próximos al control (agua). Sin embargo la presencia de un osmótico como el PEG 4.000 que reduce la hidratación, los valores obtenidos para la actividad enzimática son similares a los obtenidos con ABA 10 μ M (Tabla IV). Por tanto el potencial hídrico es uno de los factores que en ejes embrionarios de semillas de garbanzo parece controlar la actividad RNásica.

TABLA III. Actividad RNásica soluble en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*: efecto de la α -amanitina (1.0 $\mu\text{g/ml}$) y 5-FU (2 mM) sobre la inducción de la RNasa. Los ejes embrionarios fueron incubados 24 horas en las condiciones indicadas.

Tratamiento	Actividad RNasa	
	Activ. específica	(% control)
Control	49.60 \pm 1.5	100.00
ABA (10 μM)	42.43 \pm 2.8	85.60
α -Amanitina	39.75 \pm 1.6	80.20
5-FU	40.44 \pm 2.1	81.50
ABA + α -amanitina	20.82 \pm 1.5	42.10
ABA + 5-FU	32.58 \pm 3.4	65.70

TABLA IV. Actividad RNásica soluble en ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*: efecto de la tiourea (50 mM) y polietilenglicol 4000 (100 mM) sobre la inducción de la actividad RNásica. Los ejes fueron incubados de cero a 18 horas en agua, aislados nuevamente e incubados desde las 18 a las 48 horas en las condiciones descritas. Los resultados son la media de 3 experimentos con la desviación estándar.

Tratamiento	Actividad ribonucleasa		
	Unidades totales (UT)	UT/gr peso fresco	Actividad específica
Agua (0-18 h)	1564±10.0	1400±11.0	47.4±2.5
Agua (18-48 h)	1819± 8.0	1260± 7.5	52.8±1.0
PEG	915± 7.0	1130± 9.0	32.2±1.3
TU	1174±12.0	1300±12.0	46.2±3.4
ABA (10 µM)	1243± 8.0	1150± 8.4	39.0±3.5

4.2.3. Efecto de las poliaminas sobre la actividad RNásica soluble

Para estudiar el posible efecto de las poliaminas sobre la actividad enzimática se incubaron ejes embrionarios aislados con las diferentes aminos tal y como se describió en Materiales y Métodos.

4.2.3.a. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE POLIAMINAS

"In vivo", la actividad RNásica es afectada por poliaminas dependiendo de su concentración exógena (Tabla V). Así, concentraciones de espermidina entre 0.1-1.0 mM tienen valores próximos al control; la espermina sin embargo a concentraciones de 0.1 mM incrementa su actividad respecto al control (11%). Concentraciones superiores a 1.0 mM disminuyen la actividad enzimática en mayor grado según la poliamina sea más rica en grupos $-NH_3$.

4.2.3.b. POSIBLES ACCIONES DE LAS POLIAMINAS

Una de las posibles acciones de las poliaminas quizás sea la de preservar ciertos sustratos de su degradación. Cuando el ARN, sustrato de la ribonucleasa, se preincuba con diferentes concentraciones de poliaminas antes de iniciarse la reacción enzimática, se observa que el sustrato es degradado con una intensidad mucho menor que si no es preincubado (Fig. 25). En general, la acción "in vitro" de las poliaminas es muy parecida, por lo que a la actividad RNásica se refiere, a la que tienen "in vivo", pues concentraciones bajas aceleran la actividad, mientras

TABLA V. Efecto "in vivo" de varias concentraciones de poliaminas sobre la actividad RNasa de ejes embrionarios aislados

mM	Actividad RNasa relativa	
	SP	SPD
0	100	100
0.1	111	101
1.0	86	104
5.0	53	86
10.0	36	75

Las poliaminas se añadían al sustrato (ARN yeast) inmediatamente después de la adición del enzima.

El valor que corresponde al control es 300.

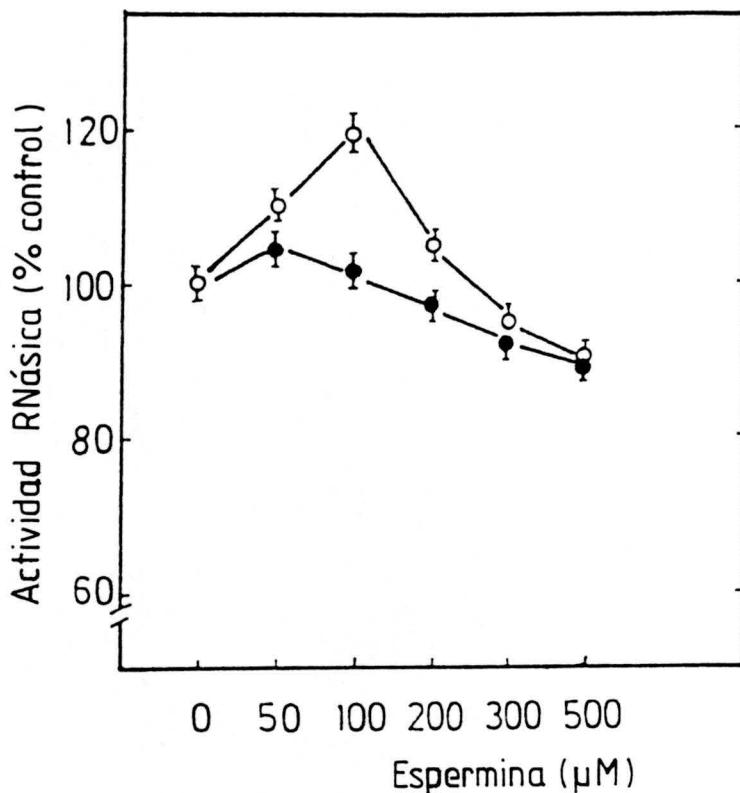


FIGURA 25. Efecto de distintas concentraciones de espermina sobre la actividad RNasa en ejes embrionarios aislados. Se incubaron volúmenes apropiados de la poliamina (5 mM) con ARN (40 µg) a 37°C durante 15 minutos antes de la adición del enzima (●—●). Los círculos abiertos corresponden a ARN (200 µg/ml de reacción) no preincubado (○—○). Los datos corresponden a 3-4 repeticiones y las barras verticales indican el error estándar.

que superiores a 0.2 mM la disminuyen (Fig. 25).

4.2.3.c. EFECTOS DE LAS POLIAMINAS + CH

La actividad RNásica "in vivo" disminuye cuando en el medio de incubación añadimos cicloheximida (50 µg/ml) (Fig. 24). La presencia de este inhibidor de la síntesis proteica juntamente con poliaminas también reduce la actividad enzimática (Tabla VI). Concretamente espermina (0.1 mM) + CH reduce la RNasa un 52% respecto a espermina (0.1 mM) y un 49% respecto al control con agua. La espermina (10 mM) que reduce la RNasa (Tabla V) ve disminuída esta actividad cuando se le adiciona CH, en un 43% y un 71% respecto al control con agua. Esta gran reducción se debe, probablemente, al efecto sumatorio de la poliamina conjuntamente con la CH.

4.2.4. Efecto del ácido abscísico + poliaminas sobre La RNasa

A fin de estudiar si concentraciones de poliaminas que revierten ligeramente el efecto inhibidor del ABA sobre el crecimiento, también influían en la actividad RNásica, se incubaron ejes embrionarios aislados, en presencia de diversas concentraciones de ABA (10 y 50 µM) así como de espermina (0.1 y 10 mM) y se valoró la actividad RNásica (Fig. 26). La poliamina sólo revierte el efecto inhibidor del ABA cuando ambas sustancias están presentes a bajas concentraciones (10 µM ABA + 0.1 mM PA). Sin embargo, cuando las concentraciones son altas se provoca una disminución en la actividad RNásica superior a la valorada en presencia de ABA. Estos resultados eran esperados ya que tanto

TABLA VI. Efecto de la cicloheximida (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad RNasa "in vivo" inducida por espermina. Los ejes embrionarios aislados eran incubados durante 48 horas en las condiciones indicadas. Los datos son media de 3-4 experimentos.

Tratamiento	Actividad específica de la RNasa (unidades)
Control	300 \pm 15.0
Control \pm CH	211 \pm 8.5
Espermina (0.1 mM)	320 \pm 6.2
Espermina (0.1 mM) \pm CH	153 \pm 20.0
Espermina (5.0 mM)	154 \pm 16.7
Espermina (5.0 mM) \pm CH	89 \pm 15.3

La actividad específica inicial (unidades) del control ($t=0$) era 60 ± 5 .

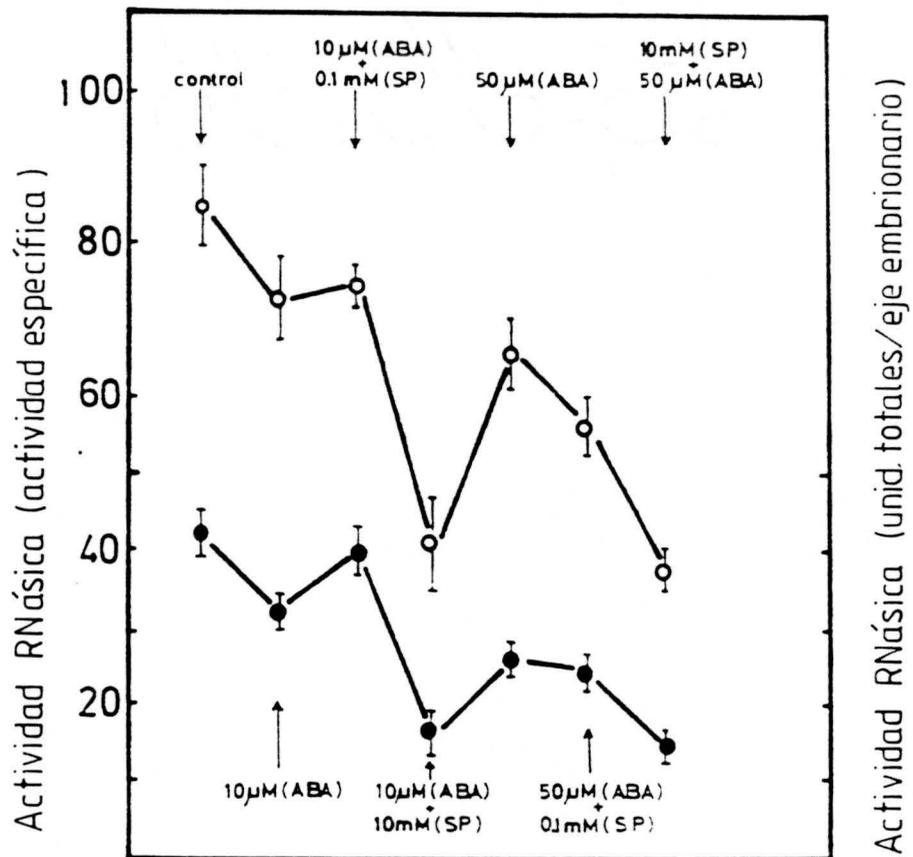


FIGURA 26. Actividad RNásica soluble en ejes aislados de semillas de *Cicer arietinum* incubados en las condiciones indicadas durante 24 horas y expresados como unidades de actividad por eje (●—●) o actividad específica (o—o). Media de 2-3 experimentos con la desviación estándar.

ABA como poliaminas, a altas concentraciones, reducen de forma notable la actividad enzimática respecto al control (Fig. 23 y Tabla V). Además, el ABA es el que controla básicamente la RNasa, ya que afecta a la toma de agua que es, de alguna manera, la que regula esta actividad como previamente hemos demostrado en otro apartado de esta memoria (Tabla IV).

4.2.5. **Actividad RNásica en semilla entera: efecto de PAs**

Cotiledones

En la figura 27, se expresan los valores obtenidos una vez calculada la actividad RNásica soluble en el tejido de reserva durante la germinación de semillas de garbanzo en presencia de espermina y espermidina.

Ambas poliaminas no inducen valores significativamente distintos de actividad enzimática, por lo que la gráfica se ha referido a los dos tratamientos. La gran cantidad de proteínas existente en el cotiledón ha dificultado enormemente la valoración de la actividad específica en el extracto crudo por lo que los resultados son expresados como $DO(260\text{ nm})/3$ semillas (6 cotiledones) que refleja también las implicaciones fisiológicas de este enzima.

La actividad RNásica evoluciona durante la germinación en forma de un incremento paulatino de aproximadamente 12 veces en el control (agua). La presencia de poliaminas en el medio alteran este incremento, aunque su evolución con el tiempo sea paralela al control. Espermina y espermidina 0.1 y 1.0 mM incrementan los valores enzimáticos en todo el proceso germinativo estudiado,

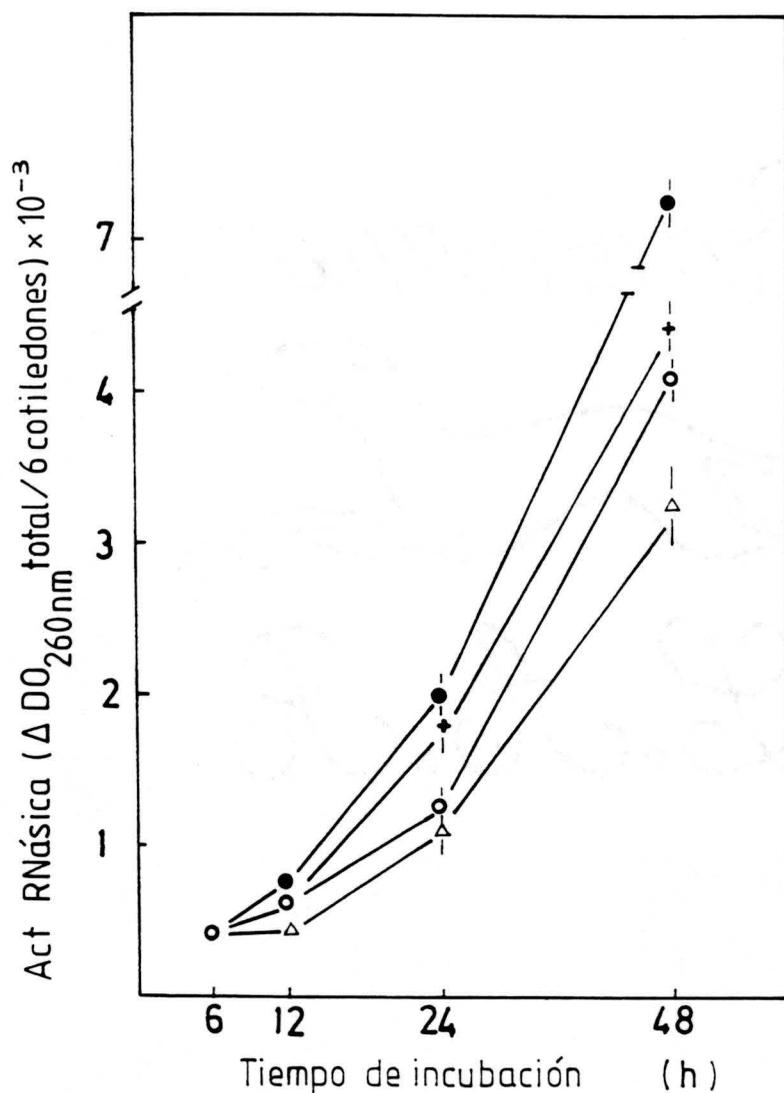


FIGURA 27. Actividad RNásica soluble en cotiledones de semillas de garbanzo germinadas, durante el periodo de tiempo indicado, en **espermina** o **espermidina** 0.1 mM (●—●), 1.0 mM (+—+) ó 10 mM (Δ—Δ). Control (o—o). Los resultados son la media de 5-7 experimentos con desviación estándar.

mientras que poliaminas a 10 mM tienen valores inferiores al control. Las diferencias más claras se observan entre 24-48 horas de germinación cuando la actividad degradativa del cotiledón está en pleno desarrollo y ha completado casi totalmente la toma de agua.

Eje radicular.

En este órgano ha sido relativamente más sencillo el valorar la actividad enzimática y encontrar diferencias entre las dos poliaminas probadas, ya que el porcentaje de germinación es diferente y, por tanto, el crecimiento del eje radicular también es distinto.

Los resultados se expresan en la Tabla VII como $\Delta DO/eje$ así como por actividad específica. La actividad RNásica aumenta en el eje radicular conforme avanza la germinación, alcanzando a las 48 horas valores 10 veces superiores a los obtenidos a las 6 horas [expresado como incremento de $DO(260 \text{ nm})$]; la actividad específica incrementa con el tiempo sólo 6.9 veces debido al aumento paralelo en la síntesis proteica que ocurre en el órgano estudiado.

La presencia de poliaminas en el medio provoca un incremento en la actividad RNásica en el eje radicular respecto al control y en todos los tratamientos estudiados (Tabla VII).

La espermidina induce valores más elevados que la espermina, aunque en algunos periodos de tiempo y concentraciones las diferencias no son estadísticamente significativas.

TABLA VII. Actividad ribonucleásica en ejes embrionarios procedentes de semillas enteras germinadas el tiempo que se indica en presencia de **espermina** (SP) Y **espermidina** (SPD).

	DO(260 nm)/eje		Act. específica	
	SP	SPD	SP	SPD
6 horas				
control	12.5±2.4		4.64±0.2	
0.1 mM	50±1.5	75±1.8	5.1±0.1	7.2±0.2
1.0 mM	25±1.2	40±1.2	4.2±0.2	6.1±0.3
10.0 mM	33±3.4	38±4.1	4.3±0.2	6.5±0.6
12 horas				
control	17.5±1.4		8.50±1.4	
0.1 mM	76±1.5	81±2.3	9.4±0.3	9.8±1.4
1.0 mM	35±2.0	40±3.1	5.2±0.2	5.4±1.2
10.0 mM	40±1.9	20±1.7	4.7±0.6	4.8±0.9
24 horas				
control	42.5±0.6		20.1±0.9	
0.1 mM	93±0.2	104±0.1	12.3±0.7	14.0±0.3
1.0 mM	80±0.3	96±0.3	11.1±0.8	12.4±0.4
10.0 mM	76±0.2	81±0.4	7.1±0.7	7.5±0.6
48 horas				
control	131.0±3.6		32.1±0.8	
0.1 mM	140±1.4	151±2.1	13.2±0.1	14.1±0.7
1.0 mM	85±1.6	87±1.9	12.7±0.3	12.9±0.6
10.0 mM	80±2.0	81±3.0	9.4±0.5	9.6±0.4

4.3. Efecto del ABA sobre la actividad fosfatasa ácida

Las fosfatasas son enzimas que juegan, entre otros papeles, el de producir y transportar fosfato inorgánico, necesario para gran número de reacciones metabólicas. Aunque su importancia es grande, se han realizado muy pocos estudios acerca de sus propiedades fisiológicas; mucho menos en procesos de crecimiento y desarrollo. Aquí se abordan algunas de sus características implicadas en la germinación de *Cicer arietinum* L.

4.3.1. **Propiedades bioquímicas de la fosfatasa ácida**

El sobrenadante de 30.000 x g obtenido en presencia de tampón acetato sódico pH 5.0, se optimizó para la valoración y cuantificación de la actividad fosfatasa ácida. Los resultados se expresan en la figura 28. La actividad enzimática es lineal en función del número de miligramos de proteína añadida a la reacción (Fig. 28A) saturándose a valores superiores a 7-10 mg. Por lo que respecta a la velocidad de reacción, en nuestras condiciones de ensayo, posee una velocidad inicial muy alta con un incremento de 0.5 unidades a 410 nm por minuto, disminuyendo a partir del primer minuto, conservando la linealidad hasta los 7 min (cinética de primer orden)(Fig. 28B). El incremento en la concentración del sustrato artificial para-nitrofenil-fosfato (p-nPP) hasta 3mM, lleva consigo un aumento en la velocidad de la reacción; concentraciones superiores provocan una reducción en la misma (Fig. 28C). El sobrenadante obtenido por nosotros hidroliza el p-nPP con un pH óptimo entre 5.0-5.5 siendo reducida esta hidrólisis de forma muy clara fuera de esos márgenes (Fig. 28D).

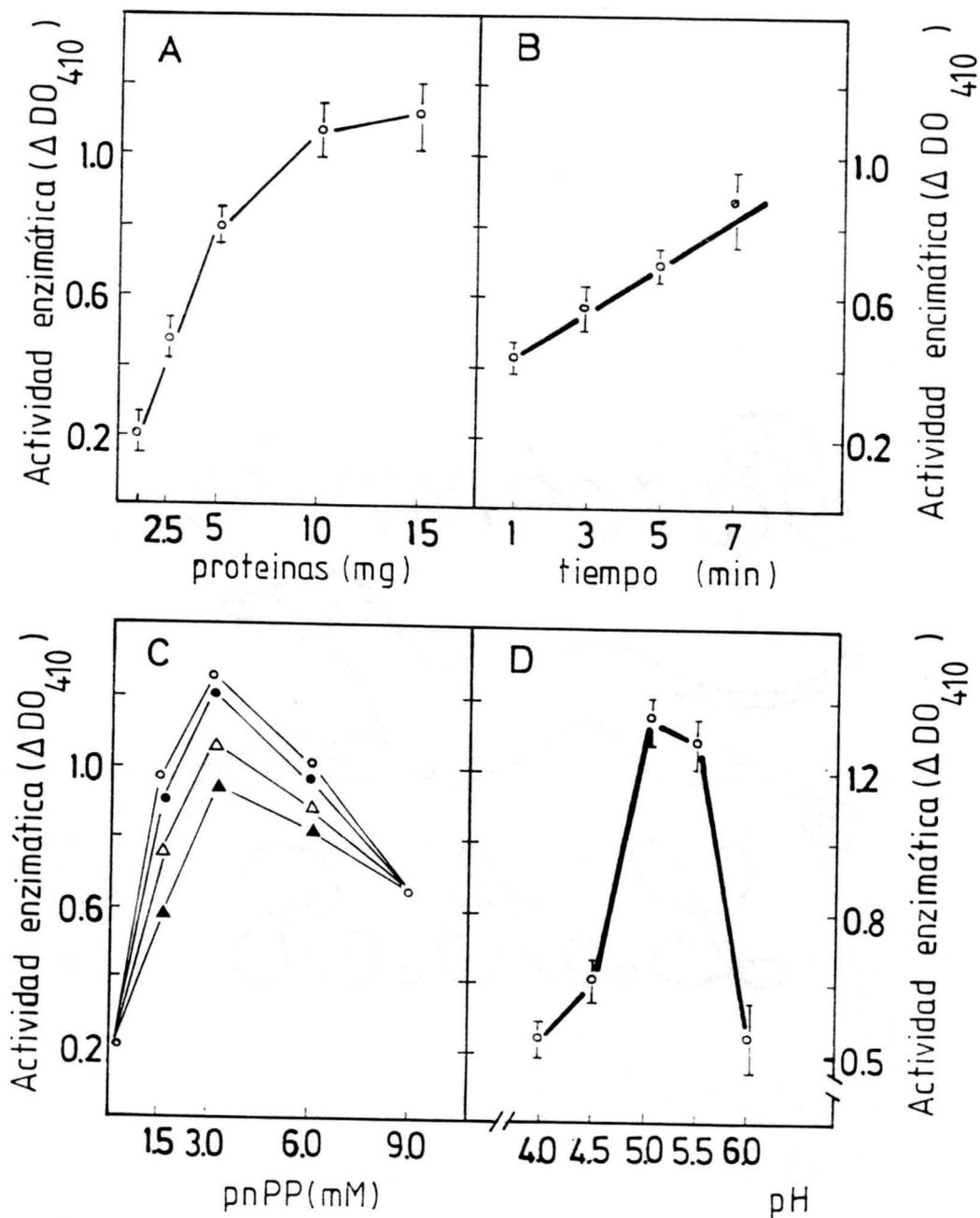


FIGURA 28. Actividad fosfatásica ácida. Los extractos crudos fueron obtenidos de cotiledones de semillas germinadas durante 24 horas en agua. En ellos se determinó la velocidad de reacción en respuesta a concentraciones crecientes de sobrenadante (A), y al tiempo (B), así como la afinidad por el sustrato (p-nitro fenil-fosfato) (C) y dependencia de pH (D). Las barras son la desviación estándar de 2-3 repeticiones.

Temperaturas entre 25 y 40°C incrementan la actividad fosfatásica de forma lineal, obteniéndose a 40°C una actividad "in vitro" cinco veces superior a la valorada entre 10-20°C (Fig. 29). La congelación del extracto crudo a -40°C mantiene la actividad durante varias semanas sin una pérdida aparente de la misma; sin embargo, para nuestros experimentos se ha valorado la actividad instantáneamente. Independientemente de estos resultados, la temperatura empleada por nosotros fue la de 28°C.

Debido a los resultados obtenidos, las condiciones de ensayo de la fosfatasa ácida son: 5 mg de proteína del extracto crudo, p-nPP (3mM), pH 5.2 durante 7 minutos.

El sedimento 30.000 x g no contiene una actividad fosfatásica detectable en nuestras condiciones de ensayo (datos no mostrados).

En la Tabla VIII se expresan los resultados obtenidos al valorar la actividad fosfatasa ácida en sobrenadantes 30S dializados frente al tampón de extracción (ver Materiales y Métodos) durante 24 horas con dos cambios de éste. Si bien la actividad enzimática es lineal a medida que incrementamos la concentración de sobrenadante, las diferencias con el control (sin dializar), aunque existen, no son lo suficientemente altas como para concluir, en este estado de la investigación (extracto crudo) que la dependencia de un factor dializable sea grande.

4.3.2. **Efecto del calcio**

A un sobrenadante dializado tal y como se describe en el apartado anterior, se le añadieron diferentes cantidades de Cl_2Ca para ver que efectos tenía este catión (Ca^{++}) en la actividad "in

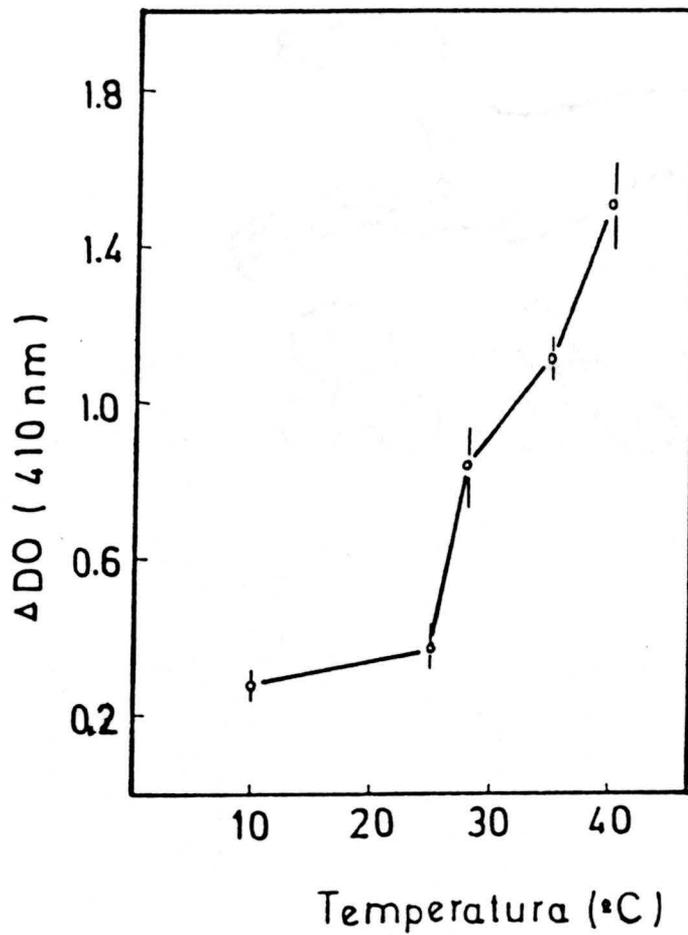
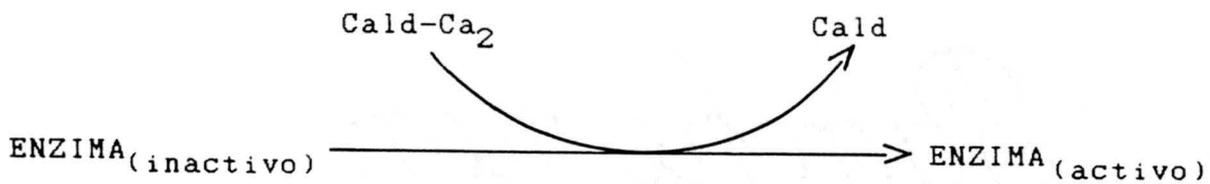


FIGURA 29. Actividad fosfatasa ácida: estabilidad térmica del extracto enzimático. Alícuotas del sobrenadante 30S fueron incubadas en presencia de tampón acetato sódico pH 5.0 y p-nPP (3 mM) e incubadas a las temperaturas indicadas durante 5 min. La actividad enzimática se midió como se señala en Materiales y Mét.

TABLA VIII. Actividad fosfatasa ácida en semillas de *Cicer arietinum*: efecto de la diálisis sobre la velocidad de degradación del p-nitrofenilfosfato. Para valorar la actividad fosfatasa ácida fueron utilizados sobrenadantes 30S extraídos y dializados como se describe en Materiales y Métodos.

Volumen de sobrenadante	Extracto sin dializar	Extracto dializado
50 μ l	0.470	0.405
100 μ l	0.815	0.800
200 μ l	1.305	1.265
300 μ l	1.625	1.500

vitro". Como se observa en la figura 30, este catión divalente afecta a la fosfatasa ácida, obteniéndose a 1 mM una actividad 1.34 veces mayor que el control (sin Ca^{++}). Si pensamos que la abundancia de la fosfatasa ácida en semillas de garbanzo es más bien escasa, podemos aventurar que el Ca^{++} es un firme candidato a ser un efector de esta actividad, lo que tendría una gran connotación fisiológica, sobre todo si pensamos que la calmodulina está muy relacionada con la regulación de ciertas enzimas por el hecho de su unión con calcio.



Sin embargo, la gran variabilidad existente en los experimentos así como la poca estimulación que se produce con calcio exógeno y la escasa acción bloqueante de EDTA y EGTA (datos no mostrados), hacen que sea oportuno realizar experiencias con el enzima más puro, cosa que estamos haciendo actualmente.

4.3.3. Efecto del P_i sobre la actividad fosfatasa "in vitro"

Para evaluar la acción del fosfato inorgánico sobre la actividad enzimática, se añadieron a la mezcla de reacción cantidades crecientes de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (1.5 M para obtener concentraciones finales entre 0-112.5 mM. La actividad fosfatásica en el extracto crudo dializado durante 24 h es inhibida a todas las concentraciones de P_i probadas (Tabla VIII),

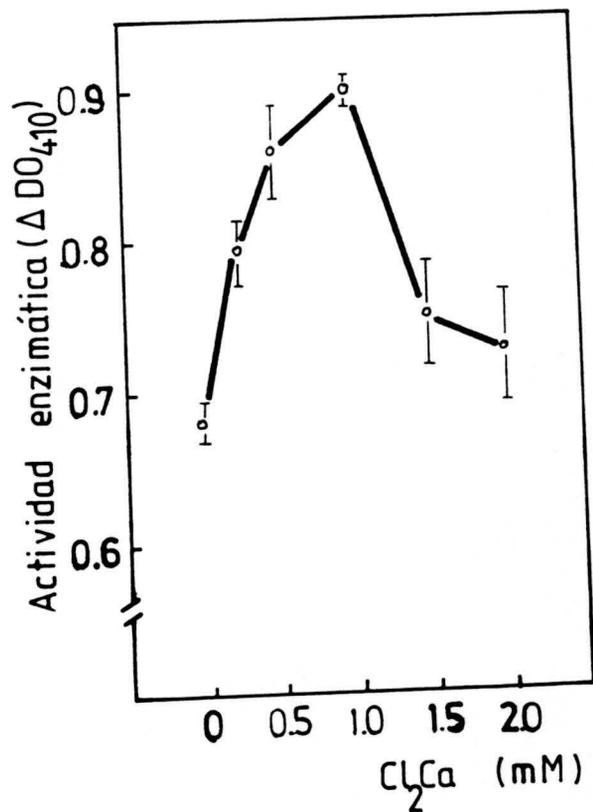


FIGURA 30. Efecto del calcio exógeno sobre la actividad fosfatasa ácida. Extractos crudos dializados fueron suplementados con Cl₂Ca (1 mM) hasta lograr las concentraciones finales que se indican. Las barras verticales son la desviación estándar de 4-5 réplicas.

obteniéndose a 112.5 mM una inhibición en la hidrólisis del sustrato (pnPP) del 36.2%.

Estos resultados apuntan hacia una regulación de la actividad fosfatásica ácida en la semilla por concentraciones endógenas de fosfato.

4.3.4. Fosfatasa ácida y expresión génica

Para estudiar como afecta la traducción y transcripción a la actividad fosfatásica, hemos germinado semillas de garbanzo durante 24 h, al cabo de las cuales, se aislaron sus ejes embrionarios y se incubaron en cicloheximida y 5-fluoruracilo durante 24 horas. Los resultados se expresan en la Tabla IX.

El 5-FU (2 mM) no altera la actividad enzimática; sin embargo, la CH (20 µg/ml) la reduce un 37% respecto al control (H₂O), lo que sugiere una elevada síntesis "de novo" del enzima en este periodo estudiado. La transcripción no parece pues estar directamente implicada.

Ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo (imbibidas 4 horas) e incubadas con los anteriores inhibidores así como con α-amanitina (1 µg/ml) parecen sugerir que la síntesis de ARNm no está implicada en la actividad fosfatásica ácida ya que los valores con 5-FU y CH son similares a los de la Tabla VII, mientras que en presencia de α-amanitina (inhibidor de la ARN-polimerasa-I) de nuevo obtenemos actividades muy similares al control (datos no mostrados).

TABLA IX. Efecto de la cicloheximida (20 µg/ml) y del 5-fluor-uracilo 2.0 mM sobre la actividad fosfatasa ácida.

Los ejes embrionarios aislados eran incubados de cero a 24 h en las condiciones indicadas.

Tratamientos	Actividad fosfatasa ácida	
	a	b
Agua (control)	10.80 ± 0.10	265 ± 7.50
Cicloheximida	6.78 ± 0.25	172 ± 5.40
5-fluor-uracilo	11.40 ± 0.30	265 ± 6.10

a = Unidades totales/gr. de peso fresco ($\times 10^{-3}$)

b = Unidades totales/eje embrionario.

Los resultados expresados son la media de al menos 3-4 experimentos ± el error estándar.

4.3.5. **Variaciones en fósforo durante la germinación**

El fósforo inorgánico total y soluble se cuantificó durante las primeras 48 h de germinación, tanto en el tejido de reserva como en el eje radicular, en semillas germinadas en presencia o ausencia de eje radicular (Fig. 31).

El fósforo total oscila, en semillas germinadas en presencia del eje radicular durante 48 h, entre 17-18 mg/cotiledón; la ausencia de eje embrionario provoca en el cotiledón un descenso de 1.5 mg de fósforo total (Fig. 31A). Sin embargo el fósforo soluble, que aumenta en el tejido de reserva de semillas enteras conforme avanza la germinación, se acumula en este mismo tejido cuando la germinación se realiza en ausencia de eje radicular, alcanzando a las 18, 24 y 48 h valores de 3.5, 4.0 y 2.5 veces respecto del aquel (Fig. 31A).

En el eje embrionario se produce un incremento de 2.5 veces en el contenido de fósforo total entre las 6 y 48 h de germinación; mientras que el fósforo soluble a las 6, 24 y 48 h de germinación es de 3.5, 4.0 y 6.0 veces menor que el total (Fig. 31B).

La presencia del eje radicular origina en el cotiledón una relación media entre el fósforo total y el soluble de 5.56, mientras que en su ausencia esta relación es de 1.5 veces (Fig. 31).

4.3.6. **Actividad fosfatásica durante la germinación**

La figura 32 muestra el desarrollo de la actividad fosfatásica ácida en los diferentes órganos (cotiledón y eje

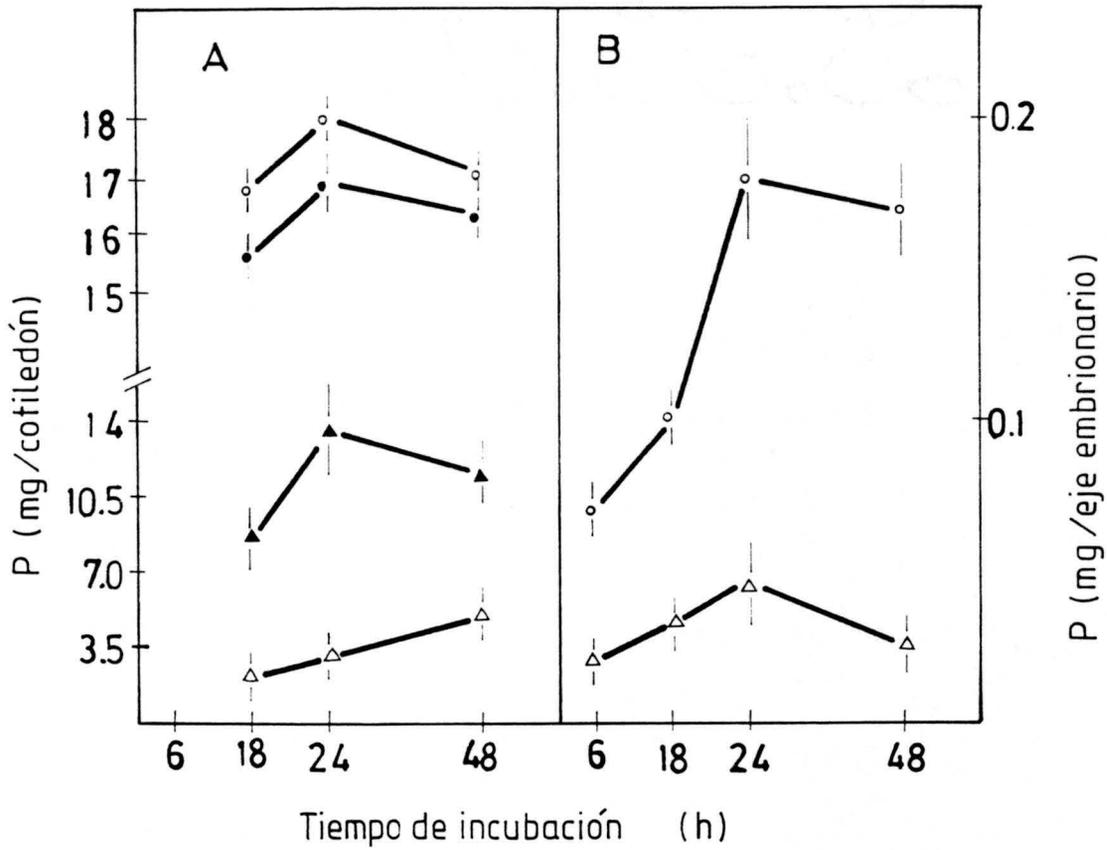


FIGURA 31. Variación en el contenido de fósforo total (círculos) y fósforo soluble (triángulos) durante la germinación de semillas de *Cicer arietinum*. (A) Contenido en P en cotiledones de semillas germinadas con (símbolos abiertos) o sin (cerrados) eje embrionario. (B) Contenido en P en el eje. Las barras son el error estándar de 3-4 repeticiones.

embrionario) de semillas de garbanzo durante las primeras 48 horas de germinación.

En los cotiledones de semillas provistas de eje embrionario, la actividad enzimática alcanza a los 2 y 3 días de germinación, un incremento de 1.5 y 2.4 veces respecto a la valorada a 6 h. Sin embargo, cuando la semilla germina en ausencia de eje embrionario, este incremento disminuye en los cotiledones a 1.3 y 1.5 veces respectivamente. Estos resultados apuntan hacia una influencia del eje radicular en el desarrollo de la actividad enzimática en el tejido de reserva y, como consecuencia de ello, a un control en la disponibilidad del fosfato obtenido por esta vía enzimática.

En el eje radicular, la actividad fosfatásica ácida incrementa en el mismo periodo, conforme avanza el proceso germinativo, obteniéndose a las 48 h valores 5 veces superiores a los cuantificados a 6 horas. Asimismo, en la figura 32 puede observarse que existe un incremento en la relación de actividad enzimática entre el eje y el cotiledón de semillas enteras (0.3, 0.5 y 0.7 veces a las 6, 24 y 48 horas respectivamente).

4.3.7. El ácido abscísico y la fosfatasa ácida

Cuando los ejes embrionarios se incuban durante 24 y 48 horas, respectivamente, en presencia de ABA a concentraciones que oscilan entre 5 y 50 μM , la actividad fosfatasa ácida se altera como puede apreciarse en la Tabla X. Concentraciones crecientes de ABA exógeno inducen una disminución paulatina en la actividad, alcanzando a 10 y 50 μM un descenso respecto al control (agua) de un 17.1 y 34.2% respectivamente a 24 h y un 15.5 y 50% a 48 h.

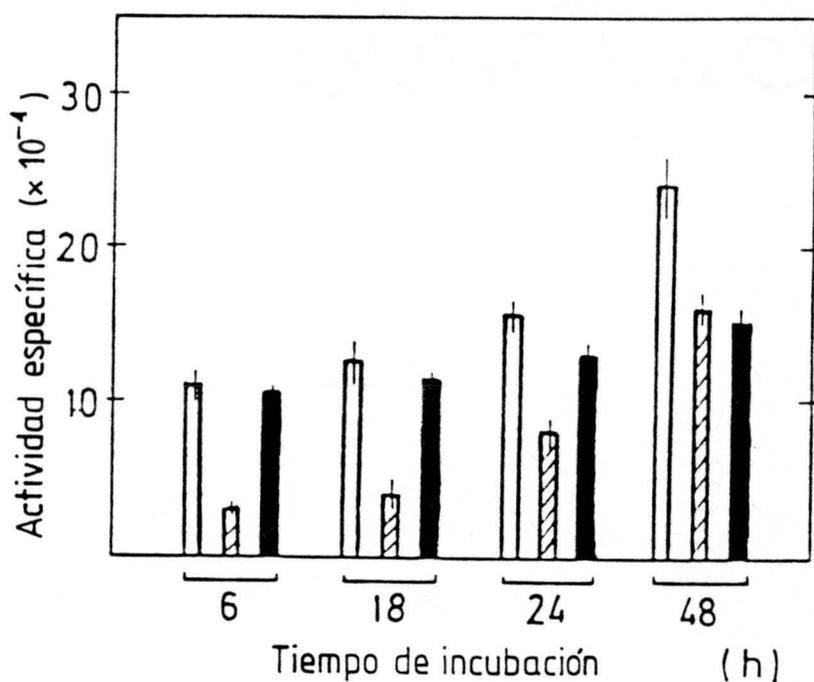


FIGURA 32. Actividad fosfatasa ácida durante la germinación de semillas de *Cicer arietinum* L.: control del eje embrionario. Semillas enteras, imbibidas 6 h., se incubaron con o sin eje embrionario, durante el tiempo que se indica, midiéndose la actividad en cotiledones y ejes. Actividad fosfatásica en: cotiledones de semilla entera (□), en cotiledones de semillas germinadas sin ejes (▨) y en ejes embrionarios (■). Las barras verticales son el error estándar de 2-3 repeticiones.

TABLA X. Actividad fosfatasa ácida en ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo: efecto del ABA exógeno.

Horas	ABA	Actividad fosfatásica (unidades/eje)
24 horas		
	control	193 ± 1.2
	5 µM	190 ± 2.0
	10 µM	160 ± 3.5
	25 µM	149 ± 2.8
	50 µM	127 ± 3.5
48 horas		
	control	226 ± 1.4
	5 µM	211 ± 3.2
	10 µM	200 ± 1.6
	25 µM	190 ± 4.0
	50 µM	113 ± 1.5

Los datos son la media de 2-3 experimentos con la desviación estándar.

4.3.8. **Poliaminas y fosfatasa ácida**

La Tabla XI muestra el efecto que tienen las poliaminas sobre la actividad "in vivo" de la fosfatasa ácida. Ejes aislados se incubaron durante 24 y 48 horas en presencia de espermina, espermidina y cadaverina a concentraciones de 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mM y se calculó la actividad enzimática expresándose como se indica en la leyenda de la Tabla XI, del mismo modo que en la Tabla X. De los resultados que hemos obtenido, podemos concluir que ninguna de las poliaminas usadas, a las concentraciones empleadas, modifican la actividad enzimática en cuestión. Ni tan siquiera concentraciones elevadas (5.0 y 10.0 mM) que modifican sustancialmente los niveles de agua en el tejido.

4.3.9. **Efecto del ácido abscísico y poliaminas, añadidas conjuntamente, sobre la actividad fosfatasa ácida**

El experimento fue similar en todo a los reseñados en las Tablas X y XI, excepto en que el ABA 10 μ M y ABA 50 μ M se le suplementó con espermidina, a idénticas concentraciones que en la Tabla XI. Los resultados, que se exponen en la Tabla XII, refuerzan a los ya comentados en el apartado 4.3.8., puesto que la poliamina añadida al ABA apenas modifica la actividad enzimática que posee el sobrenadante obtenido en presencia únicamente de ABA.

TABLA XI. Actividad fosfatasa ácida en ejes aislados de semillas de garbanzo: efecto de poliaminas exógenas.

Tiempo	Poliamina		
	SP	SPD	CD
<u>24 horas</u>			
Control	^a 193 ± 1.2	193 ± 1.2	193 ± 1.2
0.1 mM	192 ± 3.0	190 ± 4.4	194 ± 4.1
1.0 mM	200 ± 1.7	194 ± 4.2	189 ± 0.9
5.0 mM	193 ± 5.0	194 ± 1.8	190 ± 6.1
10.0 mM	199 ± 3.6	180 ± 3.6	192 ± 4.5
<u>48 horas</u>			
Control	226 ± 1.4	226 ± 1.4	226 ± 1.4
0.1 mM	230 ± 3.1	225 ± 1.6	200 ± 3.0
1.0 mM	229 ± 1.4	224 ± 2.4	224 ± 2.8
5.0 mM	210 ± 4.1	201 ± 1.3	231 ± 1.9
10.0 mM	215 ± 5.1	220 ± 2.0	232 ± 2.4

a: la actividad fosfatasa está expresada como unidades por eje embrionario y cada dato numérico es la media de 2-3 experimentos.

TABLA XII. Actividad fosfatásica en ejes aislados de semillas de garbanzo incubados durante 24 horas en los tratamientos indicados

Tratamiento	Actividad fosfatasa unidades/eje
Control	193 ± 1.2
ABA (10 µM)	160 ± 1.7
SPD(0.1) + ABA(10)	160 ± 1.8
SPD(1.0) + ABA(10)	155 ± 1.5
SPD(5.0) + ABA(10)	160 ± 2.0
SPD (10) + ABA(10)	153 ± 1.4
ABA (50 µM)	139 ± 5.0
SPD(0.1) + ABA(50)	146 ± 4.0
SPD(1.0) + ABA(50)	157 ± 2.8
SPD(5.0) + ABA(50)	141 ± 3.5
SPD (10) + ABA(50)	153 ± 1.0

Los resultados son la media de al menos 2-3 experimentos con la desviación estándar.

4.4. Permeabilidad celular

Uno de los posibles efectos de las poliaminas en el proceso de crecimiento y desarrollo de plantas superiores es modificar la permeabilidad de las membranas biológicas.

Para estudiar la acción sobre este parámetro fisiológico se han incubado semillas de garbanzo en presencia de tres poliaminas (espermina, espermidina y cadaverina). Una vez transcurrido el periodo de tiempo requerido, se midió en el medio la conductividad, así como la concentración de azúcares y aminoácidos.

4.4.1 **Poliaminas y germinación**

La presencia de espermina y espermidina en el medio de germinación alteran la emergencia radicular respecto al control (agua) (Tabla XIII).

Concentraciones de poliaminas que oscilan entre 0.1 y 1.0 mM aceleran la germinación de semillas de garbanzo, mientras que concentraciones superiores (10 mM) inducen valores próximos al control.

Estas modificaciones en el porcentaje de germinación se ven reflejadas en el peso fresco del eje radicular (Tabla XIII) siendo la concentración 1.0 mM la que provoca un crecimiento de este órgano más elevado (166 y 183% en presencia de espermina y espermidina respectivamente, en relación al control con agua).

La presencia de cadaverina en el medio de germinación no dio valores muy fiables ya que la facilidad de contaminación es alta y los resultados no pueden ser representativos.

TABLA XIII. Porcentaje de germinación y crecimiento de ejes embrionarios (mg peso fresco/eje) en presencia de poliaminas. Los resultados son la media de 3-4 experiencias con el error estándar

Tratamiento	Concentración (mM)	Germinación (%)	
		12 H	24 H
Control	---	14±4	69±4 (16.6±0.30)
Espermina	0.1	18±5	78±5 (18.5±0.60)
"	1.0	44±7	91±3 (27.6±0.35)
"	10.0	14±8	48±6 (16.9±0.42)
Espermidina	0.1	38±6	94±6 (29.1±0.80)
"	1.0	25±8	94±1 (30.5±0.75)
"	10.0	18±6	62±2 (14.0±0.25)

En paréntesis, el crecimiento del eje embrionario expresado como mg/eje.

4.4.2. Efecto de poliaminas sobre la conductividad

En semillas enteras germinadas en presencia de poliaminas, la conductividad del medio incrementa a medida que avanza el periodo de crecimiento de la radícula (Tabla XIV). La permeabilidad se acelera por las poliaminas en función de la longitud de su molécula o su contenido en grupos amino (di, tri, tetra-amina).

Si bien las concentraciones relativamente bajas de poliaminas no modifican sustancialmente la salida de iones al medio de germinación, concentraciones entre 1.0 y 10.0 mM alteran esta salida, obteniéndose valores de 1.5 y 4.0 veces respecto al control a las 6 horas de germinación. De las concentraciones de poliamina empleadas es la de 10 mM la que tiene, a lo largo de la germinación, un efecto más evidente. Su acción parece que es dependiente del tipo de amina, ya que corresponde a la espermina los efectos más acusados en la excreción de iones al medio, mientras que la cadaverina es la que lo acelera menos. Estos datos se corresponden con el contenido endógeno de iones que hemos reseñado en el apartado 4.1.4.c.

Asimismo, en la Tabla XIV se puede observar que, en periodos de germinación cortos (6-12 horas), la salida de iones al medio, en presencia de poliaminas, es muy alta, disminuyendo con la germinación. Probablemente esté implicado el proceso de reestructuración de las membranas y las poliaminas aceleren la salida de compuestos cargados, y así mismo faciliten su reabsorción.

74

TABLA XIV. Conductividad (mS/50 semillas): una vez germinadas las semillas, en las condiciones dadas, se midió la conductividad del medio residual, siendo los resultados la media de 3-4 exp.

Tratamiento	Concentración			
	Control	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM
6 horas				
SP	1.64±0.8	1.83±0.8	2.64±0.5	5.59±0.3
SPD	"	2.35±0.5	2.80±0.4	6.90±0.5
CD	"	2.60±0.6	2.03±0.5	4.86±0.7
12 horas				
SP	1.70±0.5	1.75±0.3	2.80±0.2	5.60±0.4
SPD	"	1.70±0.5	2.60±0.6	5.40±0.6
CD	"	1.65±0.3	2.50±0.8	5.06±0.4
24 horas				
SP	1.90±0.5	1.60±0.3	3.03±0.3	5.50±0.1
SPD	"	1.70±0.8	2.80±0.4	4.70±0.5
CD	"	--	--	--
48 horas				
SP	2.43±0.6	2.65±0.5	3.55±0.7	7.25±0.4
SPD	"	--	2.60±0.6	5.09±0.8
CD	"	1.64±0.1	2.80±0.4	3.97±0.7

4.4.3. Contenido de aminoácidos en el medio

Para seguir el estudio del efecto de ABA y poliaminas sobre la permeabilidad celular, se han valorado los aminoácidos en el medio de incubación de ejes aislados.

4.4.3.1. EFECTO DEL ACIDO ABSCISICO

La presencia de ABA en el medio reduce la concentración de aminoácidos en él, obteniéndose a 24 y 48 horas de incubación (Tabla XV), respectivamente, y a 50 μM , unos valores de 4 y 2 veces menor que el control (agua).

4.4.3.2. EFECTO DE LAS POLIAMINAS

Al igual que para el ABA, se midió la concentración de sustancias positivas a la nihidrina en el medio de incubación, en presencia de espermina, espermidina y cadaverina (Tabla XVI).

Si bien bajas concentraciones (0.1 mM) de poliaminas dificultan la salida de aminoácidos al medio, cuando las incrementamos, se produce una gran salida de estas moléculas al medio, alcanzándose entre 5.0-10.0 mM valores del orden de 10 veces el control.

4.4.4. Contenido de azúcares en el medio

Siguiendo idéntica metodología que para aminoácidos (apartado 4.4.3.), se valoraron los azúcares presentes en el medio de germinación y sus alteraciones con el tiempo de incubación y presencia de ABA y poliaminas, respectivamente.

TABLA XV. Efecto del ácido abscísico exógeno sobre la concentración de aminoácidos en el medio de incubación de ejes aislados de semillas de *Cicer arietinum* L.

Compuesto	Concentración	Aa ($\mu\text{g/ml}$ medio)
Control (24 h)	-	20.5 \pm 3.1
ABA	5 μM	10.7 \pm 2.1
	10 μM	10.1 \pm 2.0
	25 μM	7.8 \pm 1.6
	50 μM	5.0 \pm 0.5
Control (48 h)	-	61.8 \pm 5.6
ABA	5 μM	67.4 \pm 5.6
	10 μM	49.4 \pm 5.1
	25 μM	38.2 \pm 1.9
	50 μM	30.4 \pm 0.6

TABLA XVI. Efecto de varias poliaminas sobre la salida de aminoácidos al medio de incubación en ejes radiculares de *Cicer arietinum* L.

Compuesto	Concentración	Aa ($\mu\text{g/ml}$ medio)
Control	-	20.5 \pm 3.1
Espermina	0.1 mM	9.7 \pm 2.4
	1.0 mM	24.8 \pm 5.2
	5.0 mM	263.5 \pm 10.1
	10.0 mM	280.1 \pm 8.4
Espermidina	0.1 mM	9.8 \pm 1.5
	1.0 mM	45.0 \pm 3.8
	5.0 mM	211.0 \pm 11.4
	10.0 mM	218.0 \pm 1.6
Cadaverina	0.1 mM	5.5 \pm 1.2
	1.0 mM	33.1 \pm 5.4
	5.0 mM	244.1 \pm 14.3
	10.0 mM	248.4 \pm 13.6

4.4.4.1. EFECTO DEL ACIDO ABSCISICO

El ABA, a concentraciones entre 5 y 50 μM , induce una disminución en la salida de azúcares respecto al control con agua (Tabla XVII). En nuestro caso, los efectos son muy marcados a las 24 horas de incubación, obteniéndose con ABA 50 μM valores del 39.5% del control. A las 48 horas de incubación, sin embargo, aunque el ABA afecta a la salida de azúcares, no lo hace con tanta intensidad, obteniéndose a 50 μM valores del 49% respecto al control.

Estos resultados y los de la Tabla XV, parecen indicar un efecto del ABA exógeno sobre la permeabilidad de aminoácidos y azúcares.

4.4.4.2. EFECTO DE POLIAMINAS

Se estudia el efecto de la espermina (tetraamina) sobre la salida de azúcares al medio de incubación de ejes aislados y germinados 6, 24 y 48 horas (Tabla XVIII). A diferencia del efecto que ejercen las poliaminas sobre la permeabilidad de aminoácidos, no sucede lo mismo respecto a azúcares, ya que apenas se aprecia alteración alguna en respuesta a la poliamina añadida exógenamente.

Espermidina y cadaverina provocan similares resultados, por lo que se optó por no ponerlos en esta Memoria.

4.4.5. Contenido en polipéptidos en el medio

Semillas de garbanzo germinadas en presencia de poliaminas durante 6, 12, 24 y 48 horas, una vez utilizadas para las

TABLA XVII. Efecto del ABA exógeno sobre la concentración de azúcares en el medio de incubación de ejes aislados de semillas de *Cicer arietinum* L.

Horas	Concentración	Azúcares ($\mu\text{g/ml}$)
24	control	581.1 \pm 6.4
	5 μM	485.4 \pm 5.8
	10 μM	405.5 \pm 11.8
	25 μM	289.7 \pm 10.5
	50 μM	229.5 \pm 5.8
48	control	618.0 \pm 12.4
	5 μM	508.0 \pm 14.9
	10 μM	494.4 \pm 5.8
	25 μM	382.5 \pm 7.3
	50 μM	302.4 \pm 6.4

TABLA XVIII. Efecto de la espermina sobre la salida de azúcares al medio de incubación de semillas de *Cicer arietinum* L. durante la germinación.

Horas	Concentración	Azúcares ($\mu\text{g/ml}$)
6	control	837.1 \pm 10.8
	0.1 mM	903.2 \pm 15.4
	1.0 mM	764.7 \pm 8.6
	10.0 mM	788.7 \pm 20.4
24	control	581.1 \pm 20.8
	0.1 mM	517.0 \pm 15.6
	1.0 mM	620.9 \pm 20.4
	10.0 mM	671.4 \pm 35.8
48	control	618.0 \pm 8.9
	0.1 mM	835.5 \pm 30.4
	1.0 mM	834.2 \pm 25.8
	10.0 mM	556.1 \pm 16.2

determinaciones ya descritas (RNasa, fosfatasa, porcentaje de germinación, etc...), se utilizó el medio de germinación para valorar su contenido en polipéptidos mediante un método de Folin (Tabla XIX).

Durante el proceso germinativo se produce una salida de péptidos al medio, que incrementa durante el proceso (2.5 veces superior a 48 horas que a 6 horas); esta salida se supone relacionada con los procesos que induce la germinación (salida de iones, moléculas y reestructuración de membranas, en general), ya que pensamos que estamos analizando el medio y una serie de parámetros, en periodos cortos de germinación, que es cuando estos procesos se efectúan con gran intensidad. Al igual que ocurre con otros factores estudiados en el medio, el periodo que va entre 6-12 horas es cuando se produce una mayor salida, ralentizándose ésta posteriormente.

La presencia de poliaminas en el medio de germinación, no sólo modifica el porcentaje de germinación (Tabla XIII), sino que también altera el contenido de polipéptidos (Tabla XIX), siendo éste más acentuado a medida que la concentración de la amina es mayor; así como, según tengamos germinando más tiempo la semilla. Si bien el contenido en polipéptidos se incrementa con el periodo de germinación y presencia de poliaminas, no se observó ningún efecto particularmente reseñable al estudiar el proceso en función del tipo de amina añadida, lo que puede indicar una acción poco específica en la permeabilidad celular en relación a estas moléculas.

TABLA XIX. Contenido total de proteínas (mg) en el medio de germinación de semillas enteras germinadas durante el tiempo que se indica. Los valores son expresados en porcentaje respecto al control

	<u>SP</u>	<u>SPD</u>	<u>CD</u>
6 horas			
Control	3.34	3.34	3.34
0.1 mM	102.9 %	113.5 %	98.4 %
1.0 mM	138.0 %	158.6 %	113.7 %
10.0 mM	150.4 %	204.5 %	300.9 %
12 horas			
Control	5.08	5.08	5.08
0.1 mM	87.0 %	96.8 %	82.0 %
1.0 mM	123.0 %	200.3 %	131.0 %
10.0 mM	131.2 %	215.1 %	847.0 %
24 horas			
Control	6.70	6.70	----
0.1 mM	90.4 %	128.5 %	----
1.0 mM	161.3 %	130.4 %	----
10.0 mM	202.4 %	152.6 %	----
48 horas			
Control	8.36	8.36	8.36
0.1 mM	115.2 %	106.6 %	126.0 %
1.0 mM	166.4 %	133.0 %	154.0 %
10.0 mM	----	----	448.0 %

4.4.6. Efecto del ABA sobre la conductividad

Ejes embrionarios de semillas de garbanzo aislados a las 24 horas, fueron introducidos en un medio que contenía diversas concentraciones de ABA. En el interior del tubo de ensayo, que siempre se mantuvo recubierto por papel de aluminio, se colocó un electrodo para medir la conductividad del medio desde el instante inicial de incubación.

La cinética de salida en agua se expone en la figura 33; en ella se observa que durante las primeras 3 horas de incubación la velocidad es relativamente lenta; sin embargo, pasado este tiempo y hasta las 6 horas, la velocidad es lineal con una pendiente mucho mayor que en la primera fase.

En presencia de concentraciones de ABA entre 5 y 50 μM no hemos obtenido resultados repetitivos, ni tan siquiera con una pauta determinada. Sea como fuere, las diferencias observadas entre los diversos tratamientos no parecen indicar, en este estado de la investigación, que el ABA exógeno afecte de forma rápida a la permeabilidad celular, sugiriendo que se deba producir la síntesis de algún factor que acelere o afecte a proteínas transportadoras o a la propia membrana, modificando sus propiedades físicas.

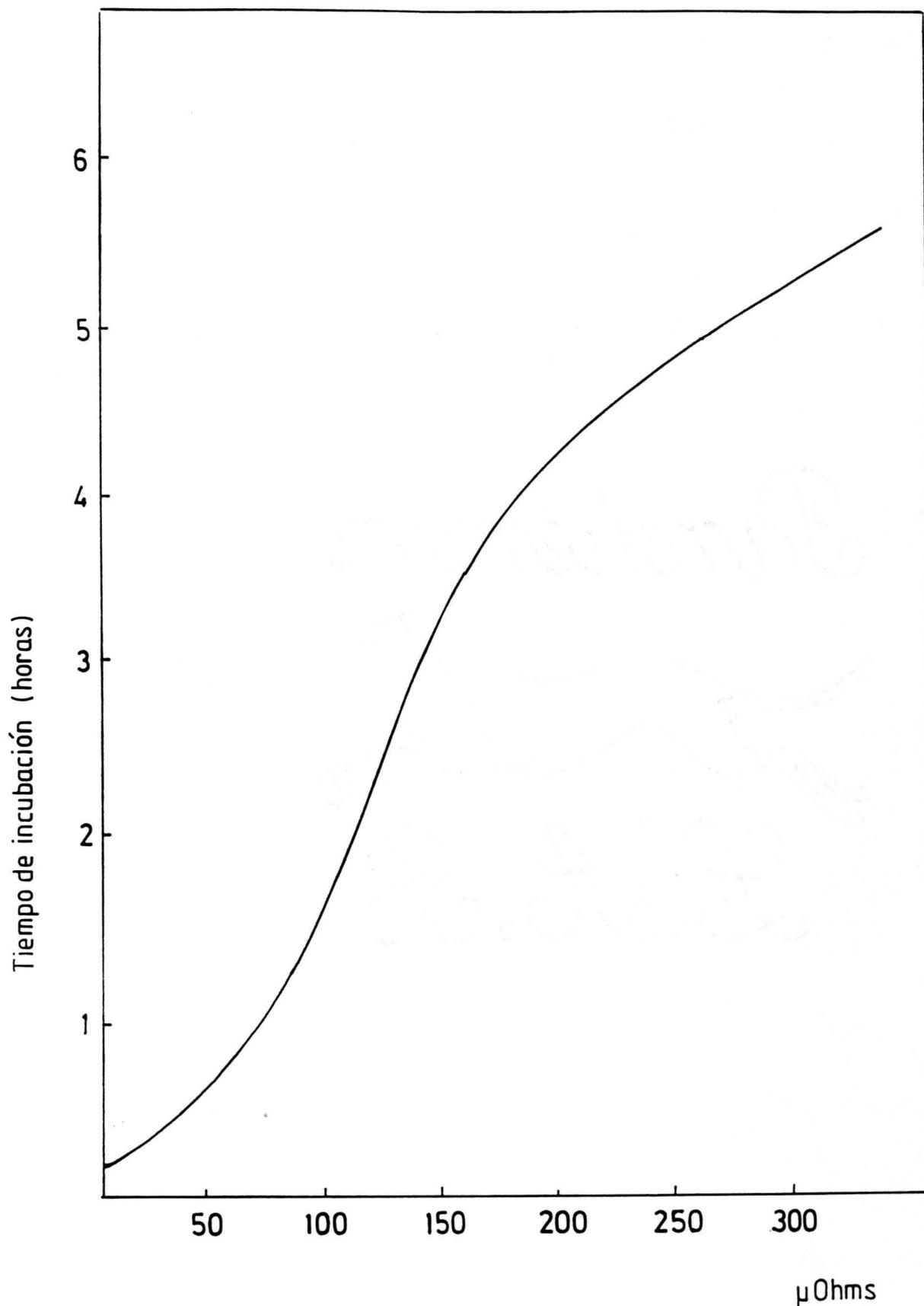


FIGURA 33. Salida de iones al medio de incubación, medida como conductividad del medio, durante las primeras 6 horas de incubación en agua

4.5. Efecto del ácido abscísico sobre la síntesis proteica "in vitro"

El ácido abscísico es una fitohormona capaz de modificar una serie de parámetros relacionados con el crecimiento y desarrollo de plantas superiores; sin embargo, todavía no se ha aclarado su mecanismo de acción; quizás, entre otras causas, porque no se conoce su receptor. Este podría indicarnos, por su localización, en qué punto de la célula desencadena su acción. La expresión génica puede estar implicada, al igual que ocurre en las demás fitohormonas. En esta Memoria continuamos nuestras investigaciones para intentar demostrar que el ABA induce alteraciones en la síntesis proteica, así como la rapidez con que esta alteración se produce.

Para ello, incubamos ejes aislados de semillas de garbanzo tal y como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de ABA a concentraciones que oscilan entre 10 y 50 μM , un periodo de tiempo entre 6 y 48 horas. Al cabo de este tiempo, los ejes fueron congelados a -40°C , sus polisomas extraídos, el ARN cuantificado y el ARNm traducido en un sistema derivado de germen de trigo.

4.5.1. **Variaciones de ARN polisomal**

Una vez obtenidos los polisomas como se detalla en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos (3.12), se fenolizó el sedimento polisomal y el ARN total se cuantificó, expresándose como unidades de absorbancia a 260 nm por órgano (eje embrionario). Los resultados se observan en la Tabla XX.

TABLA XX. Variación en el contenido de ARN polisomal durante el crecimiento de ejes aislados de *Cicer arietinum* incubados en presencia de ABA. Los datos son la media de 2-3 determinaciones \pm error estándar.

Horas	Tratamientos	ARN polisomal (unidades/eje)
cero	agua	0.922 \pm 0.015
seis	agua	0.893 \pm 0.040
	ABA (10)	1.020 \pm 0.028
	ABA (25)	1.050 \pm 0.016
	ABA (50)	1.060 \pm 0.008
dieciocho	agua	0.920 \pm 0.080
	ABA (10)	1.021 \pm 0.051
	ABA (25)	1.086 \pm 0.060
	ABA (50)	1.180 \pm 0.054

En el control con agua, el ARN polisomal extraído no se modifica en el periodo de tiempo estudiado; sin embargo, la presencia de ABA en el medio de incubación induce un ligero incremento conforme es mayor la aplicación exógena de la fitohormona. Esta variación en la cuantificación de ARN polisomal ya es detectable a las 6 horas de incubación.

4.5.2. Extracción y cuantificación de ARN poly (A⁺)

Una vez extraído el ARN polisomal, se cromatografió en una columna de afinidad de Oligo(dT)-celulosa para separar el ARN que contiene colas de adenina en OH-5'. Los resultados se exponen en la Tabla XXI y se expresan como unidades por eje embrionario así como en microgramos por órgano, asumiendo que 1 unidad de densidad óptica (260 nm) son 40 microgramos de poly (A⁺). La presencia de ABA en el medio induce un incremento de ARN (poly A⁺), obteniéndose a 50 µM un valor de 1.32 veces el cuantificado en el control. Así mismo, los valores cuantificados de ARN (poly A⁺) respecto al ARN polisomal total de partida (expresados en tanto por ciento) son 0.143 (cero horas), 0.16 (6 horas), 0.167 (ABA 10 µM), 0.171 (ABA 25 µM) y 0.204 (ABA 50 µM), lo que parece indicar que el ABA también incrementa el porcentaje de ARN poliadenilado en el polisoma.

4.5.3. Actividad biológica del ARNm (poly A⁺)

Las poblaciones de poly (A⁺) obtenido, se han traducido en un sistema S₂₃ derivado de germen de trigo. Los polipéptidos obtenidos mediante este sistema "in vitro" fueron analizados por electroforesis en un sistema de tampón discontinuo, a fin de

TABLA XXI. Variaciones en ARN poly (A⁺) durante las primeras 6 horas de incubación, en ácido abscísico, de ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum*. Los resultados se expresan con el error estándar.

Horas	Tratamientos	ARN poly (A ⁺)	
		DO/eje	µg/eje
cero	agua	$132 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$	0.052 ± 0.006
seis	agua	$150 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	0.060 ± 0.008
	ABA (10)	$171 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-5}$	0.068 ± 0.002
	ABA (25)	$180 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$	0.072 ± 0.003
	ABA (50)	$217 \times 10^{-5} \pm 15 \times 10^{-5}$	0.082 ± 0.007

cuantificar el peso molecular.

Los resultados de las traducciones se expresan en la figura 34 como $\text{cpm} \times 10^{-3} / 25 \mu\text{l} / \mu\text{g poly (A}^+)$. Todos los ARNm obtenidos traducen en este sistema "in vitro". Cantidades de ARN poly (A⁺) que oscilan entre 0.1-0.4 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ de mezcla de reacción inducen una incorporación lineal del precursor radiactivo en material precipitable en ácido tricloroacético; cantidades superiores a 0.5 μg saturan el sistema, por lo que para los cálculos de la actividad biológica de estos "mensajeros" se tuvo en cuenta la fase lineal de las cinéticas de incorporación.

Una vez conocida la cinética de incorporación de las diferentes poblaciones de ARNm, y habiendo calculado previamente las cantidades de ARN-poly (A⁺) extraído en cada tratamiento (Tabla XXI), podemos calcular la actividad específica del "mensajero" y el número de unidades de actividad por eje embrionario. Como puede observarse en la Tabla XXII, la actividad biológica del "mensajero" aislado aumenta a medida que avanza el crecimiento; mientras que la presencia de ABA en el medio de incubación produce una actividad biológica que no está muy en concordancia con la concentración de la fitohormona añadida.

Los productos sintetizados "in vitro" por el ARN rico en poly (A⁺) en el sistema derivado de germen de trigo fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía. La figura 35 muestra la fotografía de la electroforesis de los polipéptidos sintetizados, una vez que el sistema fue programado con "mensajeros" de cero y 6 horas de crecimiento, así como en presencia de ABA (10, 25 y 50 μM).

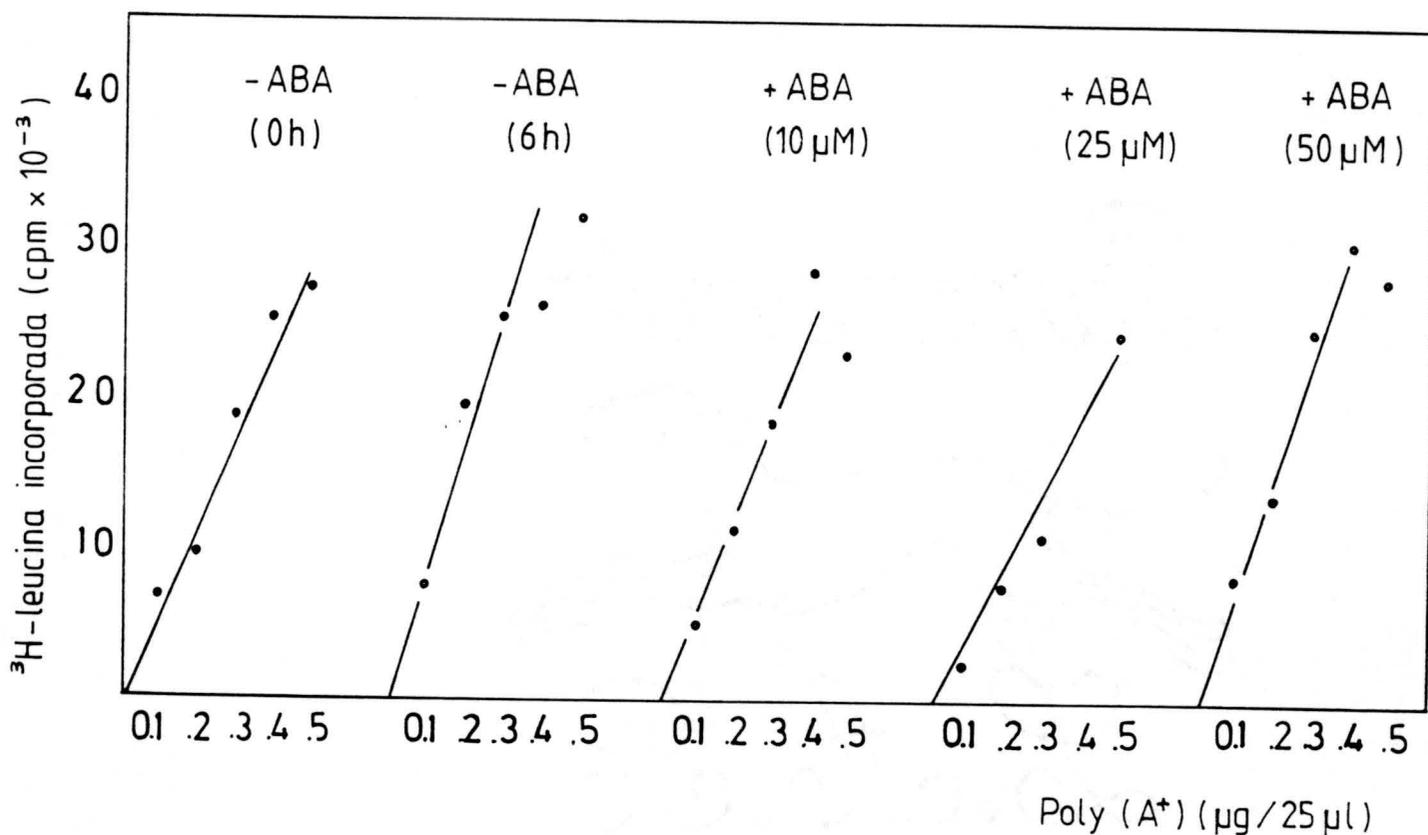


FIGURA 34. Actividad biológica del ARN-poly(A⁺) polisomal obtenido de ejes embrionarios aislados e incubados, en presencia de las concentraciones de ABA que se indican, durante 6 horas. Las cinética de 0 horas que se muestra, se refiere a ejes aislados una vez imbibidas las semillas enteras 4 horas.

TABLA XXII. Actividad biológica del ARN-poly (A⁺) extraído de ejes embrionarios aislados de semillas de *Cicer arietinum* e incubados durante 6 horas en presencia de ABA.

Hora	Tratamiento	Actividad específica (unidades)	Unidades totales/eje
Cero	agua	55.5 ± 1.7	2.93 ± 0.02
Seis	agua	75.0 ± 2.1	2.17 ± 0.04
	ABA (10)	52.5 ± 1.5	3.59 ± 0.05
	ABA (25)	48.2 ± 0.9	3.02 ± 0.05
	ABA (50)	68.5 ± 1.8	5.84 ± 0.08

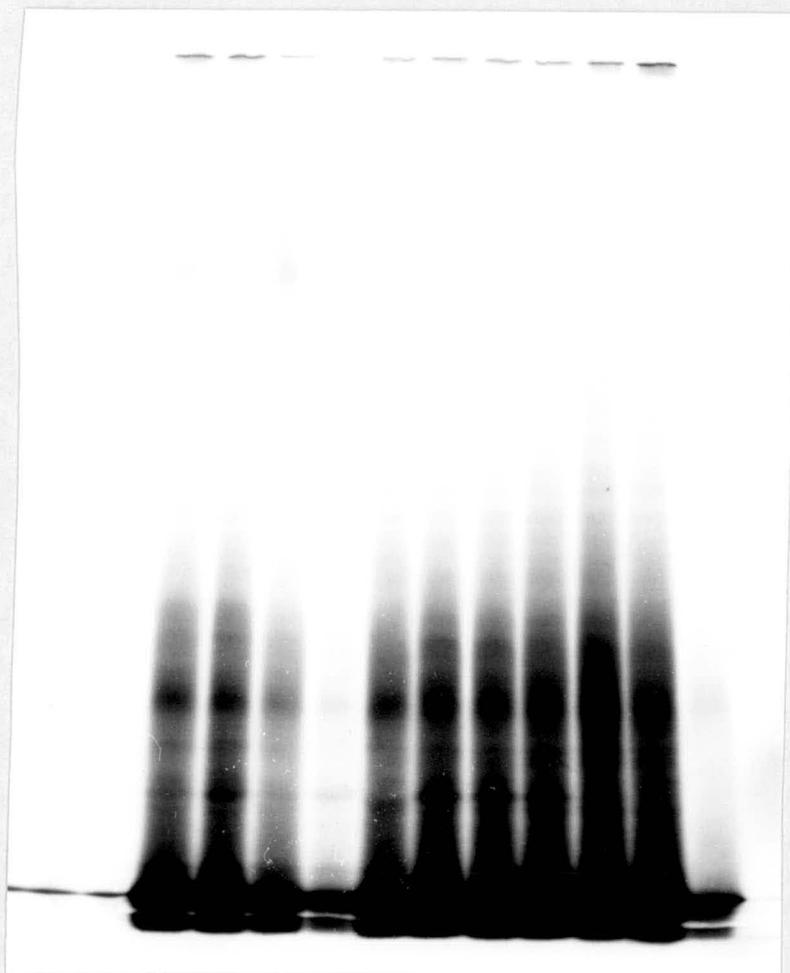


FIGURA 35. Fotografía de la electroforesis

La figura 36 representa el perfil densitométrico de la zona del gel en que las variaciones inducidas por ABA son más patentes. En la zona de 25-30 Kd aparece un polipéptido que se induce por ABA, ya que incrementa la actividad del "mensajero" que lo codifica a medida que la concentración de ABA se hace mayor. Hay que hacer notar que la acción del ABA es rápida en el eje aislado, y probablemente también lo sea en otros tejidos de garbanzo, puesto que a seis horas de incubación, cuando apenas existe elongación (Fig. 1A) y nada de mitosis (datos no mostrados), la acción del ABA sobre la transcripción es patente. Es decir, que el mecanismo de acción del ABA, por lo que al efecto sobre la transcripción y traducción, se refiere, tiene un periodo "lag" (si es que lo posee) muy corto. La rápida acción que el ABA tiene sobre el intercambio H^+/K^+ y, por tanto, sobre la toma de agua, puede ser la responsable de tal efecto.

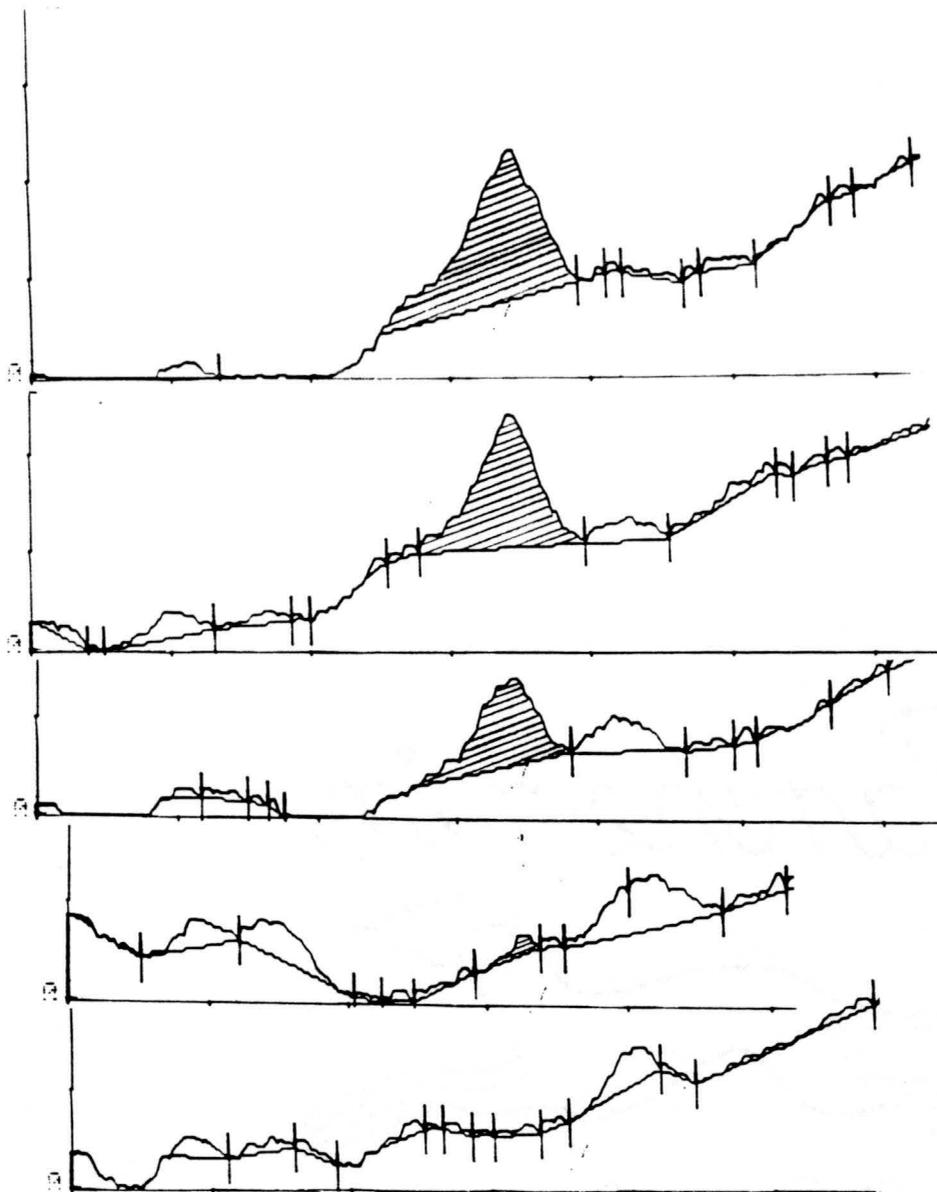


FIGURA 36. Perfil densitométrico del gel.

DISCUSSION

DISCUSION

El crecimiento y desarrollo de plantas superiores está controlado, entre otros factores, por las sustancias reguladoras de crecimiento o **fitohormonas**, correspondiendo a cada fase del desarrollo una concentración determinada de ellas. Sin embargo, el concepto de fitohormona, fisiológicamente hablando, ha variado sustancialmente en los últimos años, pues si en un principio se pensaba que las diferentes etapas y respuestas de una especie determinada dependían de los niveles endógenos de las sustancias reguladoras del crecimiento, actualmente se tiende a dar mayor importancia a la sensibilidad del tejido o célula estudiada frente a una fitohormona concreta que al nivel endógeno de la misma, en ese momento (TREWAVAS, 1982; KUBICK y ANTOSZENSKI, 1983). Esta última afirmación se sustenta básicamente, y entre otras razones, por el hecho de que no siempre el incremento del nivel de una fitohormona en un tejido u órgano concreto, provoca el efecto que en un principio podría esperarse de esa sustancia.

Una de las sustancias reguladoras de crecimiento con mayor interés actualmente es el ABA, como lo demuestran la cantidad de trabajos de investigación publicados. Para su estudio, se han utilizado una serie de órganos y fases del desarrollo de plantas; pero sobre todo mutantes deficientes en producción de ABA (KARSEN y cols., 1983; WANG y cols., 1984; NEILL y HORGAN, 1985) así como el proceso germinativo de semillas (WALTON, 1981).

En el desarrollo normal de la semilla, la germinación no se produce hasta que el embrión no ha completado totalmente su maduración en la semilla, y por tanto, el "viviparismo" no es

viable. Lo que básicamente regula este proceso, impidiendo que la semilla germine cuando el embrión no está maduro, es el ABA (ACKERSON, 1984a y b; OBENDORF Y WETTTLAUFER, 1984), mediante un mecanismo todavía no conocido, pero en el que podrían estar implicadas la transcripción y la traducción (EISENBERG y MASCARENHAS, 1985).

Durante los últimos diez años se han realizado gran cantidad de análisis en semillas de garbanzo para aclarar algunos puntos acerca del mecanismo de acción del ABA. De todos estos experimentos se puede concluir, entre otros efectos, que el ácido abscísico reduce considerablemente la germinación de *Cicer arietinum*, actuando bien sobre el intercambio H^+/K^+ , lo que provoca una disminución en el potencial hídrico celular (ALDASORO y cols., 1981) o sobre la síntesis de ARNm y proteínas (RODRIGUEZ y cols., 1985).

En esta Memoria se han empleado ejes aislados de semillas de *Cicer arietinum* para estudiar una serie de parámetros en relación con la aplicación exógena de ABA. El eje embrionario de garbanzo es un sistema experimental muy apropiado para este estudio ya que en una primera fase de su desarrollo el crecimiento es básicamente debido a procesos de elongación celular (apto para estudiar alteraciones debidas al potencial hídrico y a la permeabilidad celular); sin embargo, en periodos posteriores a las 24 horas de crecimiento se inicia la mitosis (datos no mostrados) y los procesos de síntesis y degradación de material génico se intercalan con los de elongación.

El crecimiento del eje embrionario aislado, medido como incremento de peso fresco, aumenta progresivamente conforme

avanza el periodo de incubación. La presencia de ABA en el medio a concentraciones entre 5 y 50 μM , induce un descenso en el crecimiento, siendo más intensa la reducción a medida que la concentración de la fitohormona es mayor. Como consecuencia de la escasa, casi nula, oscilación del peso seco del tejido en todo el periodo, podemos concluir que el ABA está alterando preferentemente el contenido en agua celular y por tanto incidiendo en el potencial hídrico (Ψ). Es decir, que el balance hídrico es el parámetro más afectado.

Esta conclusión está reforzada por el hecho de que el contenido en potasio (K^+) durante el proceso estudiado y en presencia de los niveles exógenos de ABA añadidos, está altamente correlacionado con los niveles de agua del órgano. En estudios previos al presente, hemos demostrado la gran importancia que tienen los procesos de fijación oscura del CO_2 y las implicaciones de los enzimas malato-DH y málico formadores, en un último estadio, de ácido málico, el cual en presencia de K^+ produce el malato potásico, sustancia osmótica que provoca un gran descenso del potencial hídrico y por tanto la toma de agua (HERNANDEZ-NISTAL y cols., 1983). Una parte del potasio proviene preferentemente del medio de incubación a donde van a parar, en los primeros instantes de la germinación, gran cantidad de iones como consecuencia de los procesos de reestructuración de las membranas.

La presencia de poliaminas en el medio, a concentraciones que oscilan entre 0.1 mM y 10.0 mM, modifica igualmente la cinética de crecimiento. Su acción depende del número de grupos amino presentes en la molécula. Así, si bien la cadaverina apenas

altera el peso fresco, con el consiguiente mantenimiento de los niveles de potasio y sodio, no sucede igual con la triamina espermidina y la tetraamina espermina que los reducen a medida que incrementa la concentración exógena de amina.

El ABA tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de plantas superiores. En hojas, puede regular la formación o activación de numerosos enzimas, entre los que podemos incluir la ribonucleasa, enzima de gran implicación en el metabolismo de ácidos nucleicos. La mayoría de las investigaciones se han realizado con hojas pertenecientes a plantas en estado senescente o bien sometidas a estrés hídrico; en ambos casos, se provoca un aumento en la actividad enzimática (ARAD y RICHMOND, 1976). Sin embargo, se han hecho muy pocas investigaciones en relación con el control, por parte del ABA, de esta actividad así como por el déficit hídrico inducido. Y en el proceso germinativo de semillas, todavía menos.

Los resultados que aparecen en esta Memoria indican que la actividad RNásica desciende de forma progresiva a como incrementa el ABA exógeno, y su desarrollo con el crecimiento puede asociarse con el descenso en contenido hídrico inducido por ABA. Pero no existe una gran correlación entre esta actividad enzimática, el peso fresco y porcentaje de agua en cada etapa del desarrollo, lo que sugiere que en el control de la RNasa están implicados más factores, aparte del potencial hídrico celular. Ahora bien, la RNasa requiere un nivel mínimo de agua en el órgano. La tiourea (TU), que acelera la toma de potasio (K^+) así como el contenido en agua en semillas de garbanzo (ALDASORO y cols., 1981), provoca una actividad enzimática muy parecida al

control (agua). Sin embargo, esta similitud no se observa cuando, en vez de tiourea, se incluye en el medio de crecimiento un osmótico como el polietilenglicol (PEG). ARAD y RICHMOND (1976) propusieron que el descenso en contenido en agua inducido por la sequía, sustituye al efecto fitohormonal en la regulación de la actividad ribonucleásica.

Para profundizar en el mecanismo por el que el ABA modifica la actividad RNásica, se han realizado una serie de experimentos relacionados con los procesos de traducción y transcripción. En presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, se produce un descenso importante en la actividad RNásica durante el periodo de tiempo estudiado, lo que indica que el incremento enzimático observado depende de la traducción, tanto en presencia como en ausencia de ABA. El 5-fluor-uracilo y la α -amanitina, inhibidores de la síntesis de ARNr y ARNm respectivamente, causan una reducción en la actividad enzimática. Esto sugiere que la transcripción es un requisito importante para la estimulación de la RNasa. Sin embargo, la reducción comentada en la actividad degradativa del ARN, disminuye ostensiblemente si el ABA y los inhibidores de la transcripción se añaden conjuntamente, lo que parece apuntar hacia una acción del potencial hídrico celular, reducido por ácido abscísico y a la disminución en la síntesis de ARN. Previamente, DURE y cols. (1980) y MOZER (1980), describen un efecto del ABA sobre la transcripción de una serie de especies de ARNm en semillas de algodón y capas de aleurona, respectivamente. El papel fisiológico de estas proteínas no se conoce, pero quizás YI y TODD (1979) hayan iniciado la solución de este problema al descubrir un inhibidor proteico inducido por

el estrés hídrico provocado por ABA.

En definitiva, aunque la acción del ABA sobre la transcripción parece clara en ejes embrionarios de garbanzo, la acción primaria de la fitohormona parece residir en el control de la toma de agua. Trabajos recientes sobre esta problemática demuestran que, sustancias que provocan un estrés hídrico similar al inducido por ABA, como el ClNa exógeno, estimulan la síntesis de proteínas idénticas a las que induce la hormona (SING y cols., 1985) que bien pudieran ser inhibidoras de reacciones metabólicas de gran trascendencia en un momento dado del desarrollo de la planta.

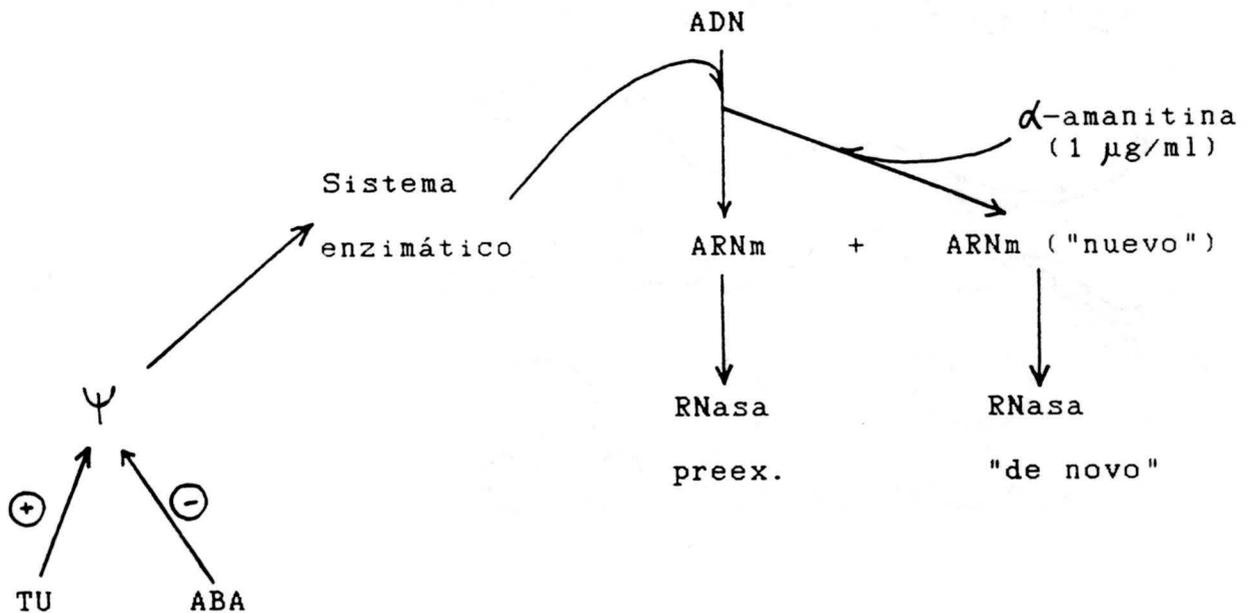
Por otra parte, las poliaminas estudiadas en esta Memoria, aunque también alteran el potencial hídrico celular, no parecen actuar sobre la actividad RNasa de un modo similar al ABA ya que, por los datos que se han obtenido, es probable que provoquen una preservación del ARN (sustrato del enzima) a la degradación, modificándose con ello la actividad RNásica. ALTMAN y cols (1977), ALTMAN (1982), KAUR-SANHNEY y GALSTON (1979) y APELBAUM y cols. (1981), demostraron que las poliaminas retrasan la senescencia en hojas aisladas y protoplastos, y que reducen la biosíntesis de etileno, respectivamente.

En el año 1984, SPERANZA y cols. esbozan una hipótesis y evidencian que los niveles de poliaminas en polen de **Malus domestica** cv. controlan la actividad RNásica, mientras que "in vitro" apenas producen alteraciones en la actividad degradativa del ARN. Sin embargo, SEN y GHOSH (1984), en semillas de arroz, demuestran una acción positiva de poliaminas exógenas sobre la actividad RNásica, y KAUR-SAWHNEY y cols. (1982) concluyen que la

actividad proteásica y la pérdida de clorofila está reducida cuando hojas senescentes de *Avena sativa* cv. Victory se incuban con poliaminas.

Además, otro hecho que parece poner en evidencia lo que acabamos de decir es que, cuando el ABA y las poliaminas se incluyen conjuntamente, si ambas sustancias están a bajas concentraciones, la poliamina contrarresta la reducción del potencial hídrico provocada por ABA. Y, por lo que se refiere a la actividad RNasa, es el ABA el que parece primar. Estos datos posiblemente nos quieren indicar que ambas sustancias no actúan en idénticos lugares o bien que sus mecanismos de acción, si es que existe alguno en el caso de las poliaminas, son muy diferentes.

A la vista de los resultados que se adjuntan en la presente Memoria con relación a la actividad ribonucleásica y su regulación por ABA exógeno, podemos aventurar el siguiente esquema de trabajo:



Durante el proceso de germinación de semillas de garbanzo, se produce en el cotiledón, un gran número de actividades metabólicas para abastecer al eje radicular y cooperar a su desarrollo; el control por parte de éste de algunas actividades enzimáticas ha sido demostrado previamente (MATILLA y NICOLAS, 1983).

Las fosfatasas ácidas son enzimas que catalizan la hidrólisis de una gran variedad de ésteres fosfato (GIORDANI y cols., 1986), son bastante inespecíficas y existen en muy pequeñas cantidades en semillas (LEO y SACHER, 1970), lo que las convierte en enzimas de aislamiento y cuantificación dificultosa. En plantas esta actividad está muy pobremente definida pero su papel en la movilización de fosfato parece tener consistencia (TAMURA y cols., 1982).

En esta Memoria se estudian algunas características de la actividad fosfatasa ácida, supuestamente implicada en la producción y transporte de fosfato inorgánico de gran importancia para muchas reacciones metabólicas (GUARDIOLA y SUTCLIFFE, 1971). Bajo nuestras condiciones, la actividad fosfatásica hidroliza el sustrato artificial p-nitrofenil-fosfato con un pH óptimo de 5,25 y sigue una cinética de primer orden. Otros investigadores como FERENS y MORAWIECKA (1985), KAMENAN y DIOPOH (1982) y TENO y cols. (1987), encuentran una actividad fosfatásica con pH próximos al nuestro.

Por otra parte, en esta Memoria, se demuestra que el ABA añadido exógenamente al eje embrionario aislado, induce un descenso de calcio endógeno así como una disminución en la actividad fosfatásica ácida. Ambos factores, por tanto, pueden

verse implicados en las alteraciones del enzima pudiendo, de alguna forma, estar relacionados. Sin embargo, y como ocurre con la actividad ribonucleásica, el potencial hídrico celular puede estar también implicado. El ABA inhibe la actividad de enzimas que movilizan sustancias de reserva en otras especies como la isocitrato liasa en endospermo de *Ricinus communis* (MARRIOT y NORCOTHE, 1977) o la endo- β -mananasa de semillas de lechuga (BEWLEY y HALMER, 1980/81).

La actividad fosfatásica está relacionada con la expresión génica durante el periodo de germinación estudiado. Cuando la semilla se puso en contacto con 5-FU, un inhibidor de la síntesis de ARNr (RODRIGUEZ y cols., 1982) y cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica (MATILLA y cols., 1982), la actividad fosfatásica es alterada. Pero, mientras que la CH la reduce sustancialmente en cortos periodos de tiempo, el 5-FU no tiene esta acción, lo que sugiere que la actividad fosfatásica no depende de la transcripción sino de la traducción; probablemente la traducción de una población de ARNm que es muy abundante en esta leguminosa (MATILLA y cols., 1980).

Durante el proceso germinativo, la actividad fosfatásica incrementa en el cotiledón; la ausencia del eje embrionario provoca un descenso de la misma, debido probablemente a la ausencia del órgano consumidor, provocándose la síntesis "de novo" del enzima como consecuencia de la presencia del eje radicular. La regulación de algunas actividades metabólicas por el eje han sido previamente descritas en semillas de garbanzo (MATILLA y col., 1982; MATILLA y NICOLAS, 1983) y en otras semillas (BEWLEY y HALMER, 1980/81; CHIN y cols., 1974). Sin

embargo, hay procesos que no son afectados por la ausencia del eje embrionario (HUANG y BEEVERS, 1974).

Poliaminas añadidas en el medio de incubación de ejes embrionarios aislados no modifican significativamente la actividad fosfatásica a ninguna de las concentraciones empleadas, lo que parece indicar que estas aminas no alteran ningún parámetro relacionado con la activación o síntesis de esta actividad. Además, la fosfatasa estudiada, al menos a estas alturas de investigación, no parece modificarse por el potencial hídrico celular aunque las poliaminas estudiadas sí lo modifican a altas concentraciones. La presencia de ABA en el medio de incubación sí modifica la actividad fosfatásica producida por poliaminas, por lo que parece deducirse que ambas sustancias deben poseer puntos de acción similares en relación con la expresión génica implicada en la regulación de esta fosfatasa.

Uno de los aspectos que afectan tanto poliaminas como ABA es la permeabilidad celular procediendo de formas diferentes, pues si bien la fitohormona altera la polarización de la membrana mediante su incidencia contrastada sobre la bomba de protones (intercambio H^+/K^+), las poliaminas, aunque menos estudiadas, presumiblemente, preservan a las membranas biológicas y a los compartimentos celulares de pérdidas masivas de iones y otros compuestos (ROBERTS y cols., 1986; SRIVASTAVA y SMITH, 1982). En esta Memoria se han estudiado algunos efectos, tanto del ABA como de poliaminas, en la permeabilidad celular medida ésta como conductividad del medio, así como por su contenido en proteínas, azúcares o aminoácidos.

En el proceso de crecimiento y desarrollo de semillas y sus órganos, se produce normalmente, en periodos tempranos, una salida intensa de iones y otros solutos al medio de incubación. En nuestro caso, los ejes embrionarios aislados pierden iones de forma abundante durante las 6 primeras horas, continuando un incremento de la conductividad con el tiempo, aunque con una menor intensidad como consecuencia de los procesos de reestructuración de membranas celulares que están acompañados por una reabsorción iónica. La adición de poliaminas en el medio altera la pérdida de solutos cargados, estando esta salida relacionada con la concentración de la amina. La presencia de grupos amino no parece tener mayor incidencia. Resultados parecidos los encuentran SRIVASTAVA y cols. en *Beta vulgaris*. Los aminoácidos y proteínas son un componente importante en esta alteración, ya que su salida se ve afectada claramente por estos policationes básicos. Sin embargo, a los azúcares no les afectan tanto.

A diferencia de las poliaminas, el ABA reduce la salida de aminoácidos y azúcares de una manera inversamente relacionada con la concentración exógena del medio; estas medidas parecen indicar que la menor hiperpolarización del plasmalema, provocada por el ABA, hace que estas sustancias vean dificultada su salida, sobretodo los aminoácidos ya que muy probablemente tengan una excrección dependiente de la actividad de la bomba de protones. Para algunos azúcares como la glucosa sí se ha demostrado que su toma depende de la actividad de la bomba (ALDASORO y cols., 1981). Sin embargo, el ABA exógeno no modificó la conductividad del medio, o lo que es lo mismo, no alteró la permeabilidad de

as membranas de ejes aislados de garbanzo en corto espacio (6 horas), ya que los perfiles apenas difieren significativamente con el control con agua destilada. En algunas especies como **Phaseolus vulgaris** (KARMOKER y VAN STEVENINCK, 1978) o **Pyrus communis** (ANDERSEN y PROEBSTING, 1984) el ABA incrementa la conductividad hidraulica en las raíces; sin embargo en **Phaseolus vulgaris** (FISCUS, 1981) la disminuye (en contra de lo publicado anteriormente) y en **Helianthus annuus** (ERLANDSSON y cols., 1978) no la altera. Esto corrobora lo poco que se conoce acerca del mecanismo de acción del ABA, en lo que se relaciona con la permeabilidad celular.

En el desarrollo normal de una semilla, la germinación no se lleva a término hasta que el embrión no completa totalmente su desarrollo en la semilla. Un embrión inmaduro aislado puede germinar precozmente; pero si en el medio se añade ABA, se inhibe la germinación precoz (OBENDORF y WETTCLAUFER, 1984), sinteti- zándose una serie de proteínas que en ausencia de la fitohormona no se producían (QUATRANO y cols., 1983). Lo que sugiere que "in vivo" el ABA endógeno provoca la inducción de la expresión génica conducente a la síntesis de proteínas que impiden que el "viviparismo" se produzca. Esta aseveración fue confirmada por el empleo de mutantes carentes de síntesis de ABA (KARSSSEN y cols., 1983).

El ABA exógeno, aparte de reducir el crecimiento, también suele provocar una reducción en la síntesis de ARN (MINOCHA y DIBONA, 1979) por un mecanismo desconocido, pero con muchas posibilidades de que modificase la ARN polimerasa o la actividad cromatínica. Sin embargo, cuando el virus del mosaico del tabaco

(VMT) infecta la hoja de tabaco, la concentración endógena de ABA incrementa entre 2-5 veces con una elevación paralela en la síntesis y acumulación de ARN (WHENHAM y FRASSER, 1980). Recientemente BARRAT (1986) describe una modulación por parte del ácido abscísico en la acumulación y síntesis de proteínas de reserva de *Vicia faba*.

Vistos estos antecedentes y continuando con nuestra Línea de Investigación, nos pareció de gran importancia estudiar cómo afecta el ABA a la síntesis de proteínas "in vitro" en ejes aislados de garbanzo. Para ello se aisló el ARN "mensajero" polisomal de ejes embrionarios incubados en presencia de diferentes concentraciones de ABA. El "mensajero" incrementa conforme lo hace la concentración de la fitohormona, mientras que la actividad biológica sufre alteraciones que no parecen depender de la concentración de ABA, pero que referidas a unidades de actividad biológica en cada eje embrionario, siempre se inducen valores mayores que el control con agua. Analizados los polipéptidos sintetizados "in vitro", se observa que el ABA induce un ARNm que codifica a un péptido entre 25-30 Kd. Este péptido se sintetiza a raíz de la adición de ABA ya que, conforme la concentración exógena de ABA es mayor, también incrementa la densidad de la banda en la autorradiografía. En el control no aparece este polipéptido y a concentraciones bajas de ABA (5 μ M) su detección es dificultosa.

A la vista de estos datos podemos decir que la caracterización de esta proteína debe ser el objetivo preferente de nuestra investigación ya que, probablemente, pertenezca a una familia de proteínas cuya misión sea regular el crecimiento en

los órganos de desarrollo de semillas de garbanzo.

En embriones de *Glycine max* L. el ABA induce la síntesis de un péptido de 11S de peso molecular que resultó ser una proteína de reserva (EISENBERG y MASCARENHAS, 1985). Asimismo, en *Spirodella polyrrhiza* se detectan cambios en los niveles de ARN y proteínas provocados por ABA, en relación a la inducción de turiones (SMART y TREWAVAS, 1984).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con el fin de esclarecer algunos aspectos que afectan al mecanismo de acción del ABA y, por tanto, intentar conocerlo o al menos aproximarnos a ello, hemos estudiado varios de los efectos que induce esta fitohormona en el crecimiento y desarrollo de ejes embrionarios aislados de semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), tanto a nivel de la expresión génica como sobre procesos de permeabilidad celular, obteniendo las siguientes conclusiones:

(1) La aplicación exógena de ABA reduce la actividad Ribonucleásica soluble conforme es mayor la concentración de la fitohormona en el medio de incubación. Uno de los factores que controla esta actividad enzimática es el potencial hídrico celular inducido.

(2) En la regulación de la ribonucleasa, aparte del potencial hídrico, también está implicada la expresión génica ya, que la modifican inhibidores de traducción y transcripción, tanto en presencia como en ausencia de ABA.

(3) Las poliaminas, que modifican notablemente el potencial hídrico celular, no tienen una acción tan acentuada sobre la actividad Ribonucleásica, probablemente porque su efecto inhibidor sea una consecuencia de la preservación del ARN frente a la degradación. Estas poliaminas no revierten los efectos del ABA.

(4) El ácido abscísico, que reduce los niveles de calcio en el tejido, también induce una disminución en la actividad fosfatasa ácida, enzima que tiene al fosfato como producto final y que es muy importante en el metabolismo del fósforo. Este último, al igual que la actividad enzimática, está afectado, en semilla entera, por la presencia del eje radicular.

(5) El desarrollo de la fosfatasa ácida, a diferencia de la ribonucleasa, depende poco de la transcripción y su actividad apenas es alterada por poliaminas. Esto parece indicar que las aminos usadas no modifican parámetros relacionados con la activación o síntesis del enzima. Sin embargo, el ABA sí modifica la actividad fosfatásica en presencia de poliaminas, por lo que parece claro que ambas sustancias posean puntos de acción similares o muy próximos, en relación con la expresión génica implicada en la regulación fosfatásica.

(6) La permeabilidad celular se modifica por la presencia de ABA y poliaminas en el medio de incubación. Sin embargo, mientras que el ABA reduce la salida de solutos al medio en relación con su concentración exógena, las poliaminas la aceleran a medida que su presencia es más alta. Por tanto, no se ha observado una preservación de las membranas por parte de las poliaminas.

(7) El ABA induce un incremento en la transcripción del ARN-poly(A) polisomal en periodos de incubación muy cortos (6 horas), provocando la síntesis de una especie de ARN mensajero

que codifica una proteína con un peso molecular entre 25-30 Kd. Esta proteína se incrementa a medida que la concentración del ABA presente en el medio de incubación es mayor. Esto demuestra, por primera vez que el ABA, en cortos periodos de tiempo, no sólo es capaz de acelerar la permeabilidad por su acción sobre la bomba de protones (H^+/K^+), sino que también puede modificar la transcripción y provocar la síntesis "de novo" de proteínas, que muy probablemente son reguladoras del crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACKERSON, R.C. (1984a). Regulation of soybean embryogenesis by ABA. *J. Exp. Botany*, **35**:403-413.
- ACKERSON, R.C. (1984b). ABA and precocious germination in soybean. *J. Exp. Botany*, **35**: 441-421.
- ACKERSON, R.C. & RADIN, J.W. (1983). Abscisic acid in cotton leaves in response to dehydration at high pressure. *Plant Physiology*, **71**: 432-433.
- ACTON, G.I. (1974). Phytochrome controlled acid RNase: an "attache" protein of ribosomes. *Phytochemistry*, **13**:1303-1310.
- ADDICOTT, F.T. & LYON, J.L. (1969). Physiology of abscisic acid and related substances. *Annual Review of Plant Physiology*, **20**: 139-164.
- ADESOMUJO, A.A., OKOGUN, J.I., EKONG, E.R.U. & GASKIN, P. (1980). GC-MS identification of abscisic acid and abscisic acid metabolites in seed of *Vigna unguiculata*. *Phytochemistry*, **19**: 223-225.
- ALDASORO, J.J., MATILLA, A. & NICOLAS, G. (1981). Effects of ABA, fusaric acid and thiourea on germination and K^+ and glucose uptake in chickpea seeds at different temperatures. *Physiol. Plantarum*, **53**: 139-145.
- ALTMAN, A. (1982). Polyamines and wounded storage tissues. Inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol. Plantarum*, **54**: 194-198.
- ALTMAN, A., KAUR-SAWHNEY, R. & GALSTON, A.W. (1977). Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.*, **60**: 570-574.

- ANDERSEN, P.C. & PROEBSTING, W.H. (1984). Water and ion fluxes of ABA acid-treated root systems of pear, *Pyrus communis*. *Physiol. Plant.*, **60**: 143-148.
- ANDERSON, R.L. & RAY, P.M. (1978). Labelling of the plasma membrane of pea cells by a surface-localized glucan synthetase. *Plant Physiol.* **61**: 723-730.
- APELBAUM, A., BURGOON, A.C., ANDERSON, J.D., LIEBERMAN, M., BEN-ARIE, R. & MATOO, A.K. (1981). Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplast. *Plant Physiol.*, **69**: 453-456.
- ARAD, S. & RICHMOND, A. (1976). Leaf cell water and enzyme activity. *Plant Physiology*, **57**: 510-558.
- ASPINAL, D. (1980). Role of abscisic acid and other hormones in adaptation to water stresses. En: *Adaptation of Plants to Water and High Temperatures Strees*, eds. N.C. Turner y P.J. Kramer, pp. 155-172. New York, Chichester, Brisbane, Toronto John Wiley & Sons.
- ASSANTE, G., MERLINI, L. & NASINI, G. (1977). (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Experientia*, **33**: 1556-1557.
- ASTLE, M.C. & RUBERY, P.H. (1985). Uptake of abscisic acid by suspension-cultured *Phaseolus coccineus* L. cells: evidence for carrier participation. *J. Exp. Bot.*, **36**: 469-484.
- AVIV, H. & LEDER, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymydylic acid-cellulosa. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1408-1412.
- BALBOA-ZAVALA, O. & DENNIS, F.G. (1977). Abscisic acid and apple seed dormancy. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **102**(5): 633-637.

- BALLARIN-DENTI A. & COCUCCI, M. (1979). Effects of abscisic acid, gibberellic acid and fusaric acid on the transmembrane potential during the early phases of germination in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Planta*, **146**(1): 19-23.
- BARKER, G.R., BRAY, C.M. & WALTER, T.J. (1974). The development of RNase and acid phosphatase during germination of *Pisum arvense*. *Biochem. J.*, **142**: 211-219.
- BARRATT, D.H.P. (1986). Modulation by ABA of storage protein accumulation in *Vicia faba* L. cotyledons cultured in vitro. *Plant Science*, **46**: 159-167.
- BEEVERS, I. & GUERNSEY, F.S. (1966). Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. *Plant. Physiol.*, **41**: 1455-1458.
- BENNET-CLARK, T.A. & KEFFORD, N.P. (1953). Chromatography of the growth substances in plants extracts. *Nature*, **171**: 645-648.
- BERDEN, J.R. (1980). Plant hormones and other growth substances—their background, structures and occurrence. In *Hormonal Regulation of Development I. Molecular Aspect of Plant Hormones*. Encyclopaedia of Plant Physiology, ed. J. McMillan, vol 9, pp. 9-112. Berlin. Heidelberg. New York. Springer-Verlag.
- BERRIE, A.M.M. (1975). Germination and dormancy. In: *Advanced Plant Physiology*, **19**: 440-466.
- BERRIE, A.M.M., BULLER, D., DON, R. & PARKER, W. (1979). Possible role of volatile fatty acids and abscisic acid in the dormancy of oats. *Plant Physiol.*, **63**: 758-764.

- BERRIE, A.M.M. & ROBERTSON, J. (1976). Abscisic acid as an endogenous component in lettuce fruits. *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids. Does it control thermodormancy?. *Planta*, **131**: 211-215.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. (1982). "Physiology and biochemistry of seeds". Vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag. Berlin. New York.
- BEWLEY, J.D. & HALMER, D. (1980/81). Embryo-endosperm interaction in the hydrolysis of lettuce seed reserves. *Israel Journal of Botany*, **29**: 118-132.
- BEWLEY, J.A. & BLACK, M. (1978). Physiology and Biochemistry of seeds in relation to their germination. Vol. I. Development, germination and growth. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Pag. 306.
- BEX, J.H.M. (1972a). Effect of abscisic acid on oxygen uptake and RNA synthesis in germinating lettuce seeds. *Acta Bot. Neer.*, **21**(3): 203-210.
- BEX, J.H.M. (1972b). Effects of abscisic acid on nucleohistone and histone synthesis in maize coleoptiles. *Acta Bot. Neer.*, **21**(3): 292-300.
- BHATTACHARYA, K. & BISVAS, B.B. (1982). Induction of a high affinity binding site for auxin in *Avena* root membrane. *Phytochem.*, **22** 1207-1211.
- BLACK, M. (1983). Abscisic acid in seed germination and dormancy. En: Abscisic acid. Ed. F.T. Addicott. Praeger. New York. Pp.: 331-363.
- BLACK, M. (1980/81). The role of endogenous hormones in germination and dormancy. *Isr. J. Bot.*, **29**(1-4): 181-192.

- BOLLER, T. & KENDE, H. (1979). Hydrolytic enzymes in the control vacuole of cells. *Plant. Physiol.*, **63**: 1123-1132.
- BORUCKA-MANKIEWICZ, M. & SZARKOWSKY, J.W. (1977). Purification and some properties of a nuclease from rye germ nuclei. *Acta Biochem. Pol.* **24**: 289-299.
- BRADFORD, H.J. & HSIAO, T.C. (1982). Physiological responses to moderate water stresses. En "Encyclopedia of Plant Physiology" "new Series". Vol. 12B (A. Pirson and M.H. Zimmerman, eds.) pp. 263-324. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- BRAUN, J.W. & KHAN, A.A. (1975). Endogenous abscisic acid levels in germinating and nongerminating lettuce seed. *Plant Physiol.*, **56**(6): 731-733.
- BRAY, E.A. & ZEEVAART, J.A.D. (1986). Compartmentation and equilibration of abscisic acid in isolated *Xanthium* cells. *Plant Physiol.*, **80**: 105-109.
- BRYAN, J.A., GREENWAY, S.C. & WES, G.A. (1976). Development of nuclease activity in cotyledons of *Pisum sativum* L. *Planta*, **130**: 137-140.
- CAERS, L.I., PENMANS, W.J. & CARLIER, A.R. (1979). Preformed and newly synthesized mRNA in germination wheat embryos. *Planta*, **144**: 491-496.
- CLELAND, R.E. (1983). The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of *Avena* coleoptile cell elongation. *J. Exp. Bot.*, **34**(143): 676-680.
- COCUCI, S. & COCUCCI, M. (1977). Effect of ABA, GA₃ and FC on the development of potassium uptake in germinating radish seed. *Plant Science Letters*, **10**: 85-95.

- COHEN, B.L. (1980). Transport and utilization of proteins by fungi. In *Microorganism and nitrogen sources*. Ed. Payne, pp. 411-430. Chichester.
- COOMBE, B.G. & HALE, C.R. (1973). Hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substances. *Plant Physiol.*, **51**: 6629-6634.
- CORNFORTH, J.W., MILBORROW, B.V., RYBACK, G., ROTHWELL, K. & WAIN, R.L. (1966). Identification of the yellow lupine growth inhibitor as (+)-abscisin II ((+)-dormin). *Nature*, **211**: 742-743.
- CORNFORTH, J.W., MILBORROW, B.V., RYBACK, G. & WAREING, P.F. (1965). Chemistry and physiology of "Dormins" in sycamore. Identity of sycamore "Dormin" with abscisin II. *Nature*, **205**: 1269-1270.
- CUMMINS, W.R. (1973). The metabolism of abscisic acid in relation to its reversible action on stomata in leaves of *Hordeum vulgare* L. *Planta*, **114**: 159-167.
- CHEN, L., RHOADS, D. & TAI, P.C. (1985). Alkaline phosphatase and Omp A protein can be translocated post-translationally into membrane vesicles of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **161**: 973-980.
- CHEN, D. & OSBORNE, D.J. (1970). Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryos. *Nature*, **227**: 66-67.
- CHEUNG, C.P., WU, J. & SUHADOLNIK, R.J. (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryo. *Nature*, **277**: 66-67.
- DASHEK, W.V., SINGH, B.N. & WALTON, D.C. (1979). Abscisic acid localisation and metabolism in barley aleurone layers. *Plant Physiology*, **64**: 43-48.

- DAVIS, L.A. & ADDICOTT, F.T. (1972). Abscisic acid-correlations with abscission and with development in cotton fruits. *Plant Physiol.*, **49**: 644-648.
- DE LEO, P. & SACHER, J.A. (1971). Effect of ABA and auxin on the Ribonuclease during ageing of bean endocarp tissue sections. *Plant Cell. Physiol.*, **12**: 791-796.
- DELSENY, M., ASPART, I. & GUITTON, Y. (1977). Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish (*Raphanus sativus* L.) embryo axes. *Planta*, **135**: 125-128.
- DENFFER, D., BRESINSKY, A., EHRENDORFER, F. & ZIEGLER, H. (1986). *Tratado de Botánica (Strasburger)*. Ed. Marin. Barcelona.
- DEWDNEY, S.J. & McWHA, J.A. (1979). Abscisic acid and the movement of photosynthesis assimilates towards developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Z. Pflanzenphysiol.*, **92**(2): 183-186.
- DIETER, P. (1984). Calmodulin and calmodulin mediated processes in plants review. *Plant Cell & Environment*, **7**: 37-380.
- DÖRFFLING, K. (1976). Correlative bud inhibition and abscisic acid in *Acer pseudoplatanus* and *Syringa vulgaris*. *Physiol. Plant*, **38**: 319-322.
- DÖRFFLING, K., TIETZ, D., STREICH, J. & LUDENING, M. (1980). *Estudies on the role of abscisic acid in stomatal movements. En Plant Growth Substances, 1979*, ed. F. Skoog, pp. 274-285. Berlin. Heidelberg. New York. Springer-Verlag.
- DUBOIS, M., GILLED, K.A., HAMILTON, I.K., REBERS, P.A. & SMITH, R. (1956). Colorimetric method for determination of sugars & related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.

- DUDA, C.T. (1976). Plant RNA polymerases. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**: 119-132.
- DURE, L.S. (1975). Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 259-278.
- DURE, L.S., CAPDEVILA, A.M. & GREENWAY, S.C. (1980). Messenger RNA domains in the embryogenesis of cotton cotyledons. En: *Genome organization and expression in plants*. Ed. C. Leaver. Pleunn Publishing Corporation. New York. Pp. 124-146.
- EISENBERG, A.J. & MASCARENHAS, J.P. (1985). ABA and regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta*, **166**: 505-514.
- ERLANDSSON, G., PETTERSSON, S. & SUENSSON, S.B. (1978). Rapid effect on ion uptake in sunflower roots. *Physiol. Plantarum*, **43**: 380-384.
- EVANS, M., BLACK, M. & CHAPMAN, J. (1975). Induction of hormone sensitivity by dehydration is one positive role for drying in cereal seed. *Nature*, **258**: 144-145.
- FERENS, M. & MORAWIECKA, B. (1985). Rye germ acid phosphatase properties of the enzymes and its activation by lectins. *Phytochemistry*, **24**: 2839-42.
- FERNANDEZ-VIVAS, A., MUÑOZ, J., ARIAS, J.M. & MONTOYA, E. (1984). Morphological changes induced by phosphate in *M. corallodorus* vegetative cells. En *FEMS. Symposium Bacterial Morphogenesis Marsella*.
- FIRN, R.D. & DIGGBY, J. (1984). A third dimension in the control of plant development. *TIBS*, **9**: 49.
- FIRN, R.D., BURDEN, R.S. & TAYLOR, H.F. (1972). The detection and stimulation of the growth inhibitor xanthoxin in plants.

- Planta, **102**: 115-126.
- FIRN, R.D. & FRIEND, J. (1972). Enzymatic production of the plant growth inhibitor, xanthoxin. *Planta*, **103**: 263-266.
- FISCUS, E.L. (1981). Effects of ABA on the hydrolytic conductance and of the total ion transport through **Phaseolus** root systems. *Plant Physiol.*, **68**: 169-74.
- FOUNTAIN, D.W. & BEWLEY, J.A. (1973). Polyribosome formation and protein synthesis in imbibed but dormant lettuce seeds. *Plant Physiol.*, **52**: 604-607.
- GALLI, M.G., MIRACCA, P. & SPARVOLI, E. (1980). Lack of inhibiting effects of ABA on seeds of **Haplopappus gracilis** (Nutt) pregerminated in water for short times. *J. Exp. Bot.*, **31**: 763-770.
- GALLI, M.G., MIRACCA, P. & SPARVOLI, E. (1979). Interaction between ABA and fusaric acid during germination and post-germinative growth in **Haplopappus gracilis**. *Plant Sci. Lett.*, **12**: 105-111.
- GALSTON, A.W., ALTMAN, A. & KAUR-SAWHNEY, R. (1978). Polyamines, ribonuclease and the improvement of oats leaf protoplast. *Plant Sci. Lett.*, **11**(1): 69-79.
- GIBBINS, L.N. & NORRIS, F.W. (1963a). Vitamins in Germination. *Biochem. J.* **86**: 64-67.
- GIBBINS, L.N. & NORRIS, F.W. (1963b). Phytase and Acid Phosphatase in the Dwarf Bean, **Phaseolus vulgaris**. *Biochem. J.*, **86**: 67-71.
- GIORDANI, R., NARI, J., NOAT, G. & SAUVE, P. (1986). Purification and molecular properties of an acid phosphatase from **Asclepias curasavica**. *Latex. Plant Science*, **43**: 207-212.

- GONZALEZ, C. & BAEZ, M. (1972). Método de determinación de fósforo en tejidos vegetales. *Agrochim.*, XVI(4-5): 342-344.
- GUARDIOLA, J.L. & SUTCLIFFE, J.F. (1971). Mobilisation of phosphorus in the cotyledons of young seedling of the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Ann. Bot.*, 35: 809-823.
- GUILLARD, D.F. & WALTON, D.C. (1976). Abscisic acid metabolism by a cell-free preparation from *Echinocystis lobata* liquid endosperm.
- HALMER, P., BEWLEY, J.D. & THORPE, T.A. (1976). An enzyme to degrade lettuce endosperm cell walls. Appearance of a mannanase following phytochrome -and gibberellin- induced germination. *Planta*, 130(2): 189-196.
- HARDIN, J.W. & CHERRY, J.H. (1972). Solubilization and partial characterization of soybean chromatin-bound RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48(2): 299-306.
- HARRISON, M.A. & WALTON, D.C. (1975). Abscisic acid metabolism in water-stressed bean leaves. *Plant Physiology*, 56: 250-254.
- HASEGAWA, S., POLING, St., MAIER, V.P. & BENNETT, R.D. (1984). Metabolism of abscisic acid: Bacterial conversion to dehydovomifoliol and vomifolioldehydrogenase activity. *Phytochemistry*, 23: 2769-2771.
- HEGARTY, T.W. (1978). The physiology of seeds hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination. A review *Plant Cell & Envir.*, 1:101.
- HEGARTY, T.W. & ROSS, H.A. (1980/81). Investigation of control metabolisms of germination under water stress. *Israel Journal of Botany*, 29: 83-92.

- HEMPHILL, D.D. & TUKEY, H.B. (1975). Effect of intermittent mist on abscisic acid levels in *Euonymus alatus*. Leaching versus moisture stress. HortScience, **10**(4): 369-370.
- HERNANDEZ-NISTAL, J., ALDASORO, J.J., RODRIGUEZ, D., MATILLA, A. & NICOLAS, G. (1983). Effect of thiourea on the ionic content and dark fixation of CO₂ in embryonic axes of *Cicer arietinum* L. seeds. Physiol. Plant., **57**: 273-278.
- HIGGINS, T.J.V., ZWAR, J.A. & JACOBSEN, J.V. (1976). Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amilase in barley aleurone layers. Nature, **260**: 166-169.
- HIRAI, N. & KOSHIMIZU, K. (1983). A new conjugate of dihydrophaseic acid from avocado fruit. Agricultural and Biological Chemistry, **47**: 365-371.
- HIRAI, N., FUKUI, H & KOSHIMIZU, K. (1978). A novel abscisic acid metabolite from seeds of *Robinia pseudoacacia*. Phytochem., **17**: 1625-1627.
- HIRON, R.W.P. & WRIGHT, S.T.C. (1973). The role of endogenous abscisic acid in the response of plants to stress. Journal of Experimental Botany, **21**: 769-781.
- HO, T.H.D. (1982). The mechanism of abscisic acid during seed germination. In: The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. (A.A. Khan, ed.) Elsevier. Biomedical Press., **12**: 299-320.
- HO, T.H.D. & VARNER, J.F. (1974). Hormonal control of mRNA metabolism in barley aleurone layers. Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 4783-4786.

- HOAD, G.V. (1973). Effect of moisture stress on abscisic acid levels in *Ricinus communis* with particular reference to phloem exudate. *Planta*, **113**(4): 367-372.
- HOAD, G.V. & GASKIN, P. (1980). Abscisic acid and related compounds in phloem exudate of *Yucca flaccida* Haw and coconut (*Cocos nucifera* L.). *Planta*, **150**: 347-348.
- HOCKING, T.J., CLAPMAN, J. & CATELL, K.S. (1978). Abscisic acid binding to subcellular fractions from leaves of *Vicia faba*. *Planta*, **138**: 303-304.
- HOCKING, T.J., HILLMAN, J.R. & WILKINS, M.B. (1972). Movement of abscisic acid in *Phaseolus vulgaris* plants. *Nature* (London). New York. *New Biol.*, **235**(56): 124-125.
- HODGE, E.T. & SACHER, J.A. (1975). Effect of kinetin, auxin and ABA on ribonuclease and acid phosphatase during senescence of leaf tissue. *Biochem. Physiol. Pflanz*, **168**: 433-441.
- HORTON, R.F. (1971). Stomatal opening: the role of abscisic acid. *Can. J. Bot.*, **49**: 583-585.
- HORNBERG, C. & WEILER, E.W.W. (1984). High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cell. *Nature*, **310**: 321-324.
- HSU, F.C. (1979). Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, **63**(3): 552-556.
- IHLE, J.N. & DURE, L.S. (1972). In: *Plant Growth Substances* (D.J. Carr, ed.), pp. 216-221. Springer-Verlag. Berlin.
- INGLE, J. & HAGEMAN, R. H. (1965). Metabolic changes associated with the germination of corn II. Nucleic acid metabolism. *Plant Physiol.*, **40**: 48-53.

- INGRAM, J.M., CHENG, K.J. & COSTERTON, J.W. (1973). Alkaline phosphatase of *P. aeruginosa*: the mechanism of secretion and release of the enzyme from whole cells. *Can. J. Microbiol.*, **19**: 1407-1415.
- JENDRISAK, J.J. & GUILFOYLE, T.S. (1978). Eukaryotic RNA polymerases: comparative subunit structures, immunological properties and -amanitine sensitivities of the class II enzyme from higher plants. *Biochemistry*, **17**: 1322-1327.
- JOHRI, M.M. & VARNER, J.E. (1968). Enhancement of RNA synthesis in isolated pea nuclei by gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **59**(1): 269-276.
- JONES, R.J. & MANSFIELD, T.A. (1970). Auppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, **21**: 714-719.
- KAMENAN, A. & DIOPOH, J. (1982). Purification and physicochemical properties of an acid phosphatase from *Discorea cayenensis* cytoplasm. *Plant Science Letters*, **24**: 173-182.
- KARMOKER, J.L. & VAN STEVENINCK, R. (1978). Stimulation of volume flow and ion flux by ABA in excised root system of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Redland Pioneer. *Planta*, **141**: 37-43.
- KARSSSEN, C.M., BRUIKHORST-VAN DER SWAN, D.L.C., BREEKLAND, A.E. & KOORNNEEF, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous ABA: studies on ABA deficient fenotypes of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Planta*, **157**: 158-165.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L., CEGIELSYA, T. & GALSTON, A.W. (1982). Inhibition of protease activity by polyamines. *FEBS LETTERS*, **145**(2): 345-349.

- KAUR-SAWHNEY, R. & GALSTON, A.W. (1979). Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell & Environment*, **2**: 189-196.
- KEY, J.L., LEAVER, C.J., COWLES, J.R. & ANDERSEN, J.M. (1972). Characterization of short time labelled adenosine monophosphate-rich ribonucleic acid of soybean. *Plant Physiol.*, **49**: 783-788.
- KING, R.W. (1982). Abscisic acid in seed development. En: *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. A.A. Khan, ed. Elsevier. Biomedical Press.
- KING, R.W. (1979). Abscisic acid synthesis and metabolism in wheat ears. *Australian J. of Plant Physiol.*, **6**: 99-108.
- KING, R.W. (1976). Abscisic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta*, **132**: 43-51.
- KING, R.W. & GALE, M.D. (1980). Pre-harvest assessment of potential α -amylase production. *Cereal Res. Commun.*, **88**(1): 157-165.
- KNOX, J.P. (1982). Hormonal aspects of apical dominance. Ph.D. Thesis. University of Wales.
- KOORNNEEF, M., JORNA, M.L., BRINKHORST-SWAN, D.L.C. & KARSSSEN, C.M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in nongerminating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.*, **61**: 385-393.
- KOSHIMIZU, K. INUI, M., FUKUI, H. & MITSUI, T. (1968). Isolation of (+)abscisyl- β -D-glucopyranoside from immature fruit of *Lupinus luteus*. *Agricultural & Biological Chemistry*, **32**:

789-791.

- KUBIK, M. & ANTOSZEWSKI, R. (1983). Altering the sensitivity of strawberry plants to exogenous ABA. *Physiol. Plant.*, **57**: 505-508.
- LACHICA, M., AGUILAR, A. & YANEZ, J. (1973). Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín (II). *An. de Edafología y Agrobiología XXXII*, (11-12): 1033-1047.
- LADBROOKE, B.D., WILLIAMS, R.M. & CHAPMAN, D. (1968). Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**(3): 333-340.
- LADO, P., RASI-CALDOGNO, F. & COLOMBO, R. (1975). Acidification of the medium associated with normal and fusicoccin-induced seed germination. *Physiol. Plant.*, **34**(4): 359-364.
- LAEMMLY, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LEO, P. & SACHER, J. (1970). Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and ABA during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant Physiology*, **46**: 806-811.
- Le PAGE-DEGIVRY, M.T. (1973). Influence de l'acide abscissique sur le développement des embryons de *Taxus baccata* L. cultivés "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**: 406-413.
- LINDBER, R. & DRUCKER, H. (1984). Regulation of *N. crassa* extracellular RNase by phosphorus, nitrogen and carbon depression. *J. Bacteriol.*, **157**: 380-384.

- LITTLE, C.H.A. (1975). Inhibition of cambial activity in *Abies balsamea* by internal water stress: role of abscisic acid. *Can. J. Bot.*, **53**(24): 3041-3050.
- LITTLE, C.H.A. & EIDT, D.C. (1968). Effects of abscisic acid on bud break and transpiration in woody species. *Nature*, **220**: 498-499.
- LOVEYS, B.R. (1979). The influence of light quality on levels of abscisic acid in tomato plants, and evidence for a novel abscisic acid metabolite. *Physiologia Plantarum*, **46**: 79-84.
- LOVEYS, B.R. (1977). The intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. *Physiologia Plantarum*, **40**: 6-10.
- LOVEYS, B.R. & MILBORROW, B.V. (1984). Metabolism of abscisic acid. En: *The biosynthesis and metabolism of plant hormones*. Ed. A. Crozier and J.R. Hillman. *Seminer Series*, **23**: 71-104.
- LOVEYS, B.R. & MILBORROW, B.V. (1981). Isolation and characterization of 1'-O-abscisic acid- β -glucopyranoside from vegetative tomato tissue. *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**: 571-589.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.S. & YANEZ, J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- LÜETTGE, U. & HIGINBOTHAM, N. (1979). "Transport in plants". Springer-Verlag. Berlin. New York.
- LUZZATTI, V.E. & HUSSON, F. (1962). The structure of the liquid-crystalline phases of the lipid-water system. *J. Cell Biol.*, **12**: 207-219.

- LYNDON, A. (1966). Intracellular distribution of ribonuclease activity in pea roots. *Biochem. Biophys. Acta*, **113**: 110-119.
- MACKO, V. & NOVACKY, A. (1966). The study of plant peroxidase isozymes by means of disk electrophoresis on acrilamide gel. *Biologia (Bratislava)*, **21**(2): 128-132.
- MANDAL, N.C., BURMAN, S. & BISWAS, B.B. (1972). Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. *Phytochemistry*, **11**: 495-50.
- MANDAL, N.C. & B.B. BISWAS (1970). Metabolism of inositol phosphates I, synthesis during germination in cotyledons of mung beans, *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.*, **45**: 4-7.
- MARBACH, I. & MAYER, A.M. (1985). The effect of temperature changes on leakage from pea seeds. *J. Exp. Bot.*, **36**: 353-358.
- MARCUS, A., SPIEGEL, S. & BROOKER, J.D. (1975). Preformed mRNA and the programming of early embryo development. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **62**: 1-19.
- MARCUS, A., WEEK, D.P. & SEAL, S.W. (1973). Protein chain initiation in wheat embryo. *Biochem. Soc. Symp.*, **38**: 97-109.
- MARME, D. (1977). Phytochrome: Membranes as possible sites of primary action. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**: 173-198.
- MARME, D. & DIETER, P. (1983). The role of Ca²⁺ and calmodulin in plants. En "Calcium & Cell function". Vol. **4**. Ed. W.Y. Cheung. Academic Press. N. Y. Pp. 263-311.
- MARTIN, G.C., DENNIS, F.G., McMILLAN, J. & GASKIN, P. (1977). Hormones in pear seeds. I. Levels of gibberellins, abscisic acid, phaseic acid, dihydrophaseic acid and two metabolites of dihydrophaseic acid in immature seed of *Pyrus communis* L. *Journal of American Society for Horticultural Science*, **102**:

- MARRE, E. (1979). Fusicoccin: a tool in Plant Physiology. Ann. Rev. Plant Physiol., **30**: 273-288.
- MARRIOT, K.M. & NORCOTHE, D.H. (1977). The influence of ABA, cyclic AMP and gibberellic acid and the induction of isocitrate lyase activity in the endosperm of germinating castor bean seeds. J. Exp. Botany, **28**: 219-224.
- MATILE, P. (1978). Biochemistry and function of vacuoles. Ann. Rev. Plant Physiol., **29**: 193-213.
- MATILLA, A. & NICOLAS, G. (1983). Changes in RNase activity in cotyledons of *Cicer arietinum* L. during the first hours of germination. Acta Physiologiae Plantarum, **5(4)**: 219-226.
- MATILLA, A., NICOLAS, G. & SIERRA, J.M. (1982). Changes in mRNA in *Cicer arietinum* L. cotyledons seeds during germination. Plant Science Letters, **25**: 209-217.
- MATILLA, A., NICOLAS, G., VICENTE, O. & SIERRA, J.M. (1980). Preformed mRNA in cotyledons of ungerminated seeds of *Cicer arietinum* L. Plant Physiol., **65**: 1128-1132.
- MAYER, A.M. (1973). Control of the initial stages of germination. Biochemical investigations. Seed Sci. Technol., **1(1)**: 51-72.
- MAYER, A.M. & MARBACH, I. (1981). Biochemistry of the transition from resting to germination state in seeds. Progress in Phytochemistry, **7**: 95-136.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. (1975). The germination of seeds. Ed. Pergamon Press. Oxford.
- MAYER, A.M. & SHAIN, Y. (1974). Control of seed germination. Ann. Rev. Plant Physiol., **25**: 167-193.

- McDANIEL, S., SMITH, J.D. & PRICE, H.J. (1977). Response of viviparous mutants to ABA in embryo culture. *Maize Gent. Coop. Newslett.*, **51**: 85-86.
- MacKERSIE, B.D. & STINTON, R.H. (1980). Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiol.*, **66**: 316-320.
- McMILLAN, J., SEATON, J.C. & SUTER, P.J. (1960). Plant Hormones-I. Isolation of gibberellin A₁ and gibberellin A₅ from *Phaseolus multiflorus*. *Tetrahedron Letters*, **11**: 60-66.
- MacROBBIE, E.A.C. (1977). Function of ion transport in plant cell tissue. En "International Review of Biochemistry, Plant Biochemistry II". Ed. D.H. Northcote, Vol. 13. Univ. Park. Press. Oxford. 1982.
- McWHA, J.A. & JACKSON, D.L. (1976). Some growth promotive effects of ABA. *J. Exp. Bot.*, **27**: 1004-1008.
- McWHA, J.A. & HILLMAN, J.R. (1973). Uptake and metabolism of 2-[¹⁴C]abscisic acid in lettuce fruits var. Great Lakes. *Planta*, **110**: 345-351.
- MEYER, H., MAYER, A.M. & HAREL, E. (1971). Acid Phosphatases in Germinating Lettuce. Evidence for Partial Activation. *Physiol. Plant.*, **24**: 95-101.
- MICHAEL, G.H. & BERINGER, H. (1981). En: Physiological Aspect of Crop productivity, pp. 85-116. Proc. 15th Colloque Int Potash Inst. Bern. 1980.
- MICHAELIS, S., GUARENTE, L. & BECKWITH, J. (1983). "In vitro" construction and characterization of phoA-lacZ gene fusions in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **154**: 356-365.

- MILBORROW, B.V. (1983). The reduction of (+)-[2-¹⁴C]abscisic acid to the 1',4'-trans-diol by pea seedlings and the formation of 4'-desoxy ABA as an artifact. *J. Exp. Bot.*, **34**: 303-308.
- MILBORROW, B.V. (1978). Abscisic acid. En *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*, eds. D.S. Letham, P.B. Goodwin & T.V.J. Higgins. Vol. 1, pp. 295-347. Amsterdam Oxford. New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- MILBORROW, B.V. (1974a). Biosynthesis of abscisic acid by a cell-free system. *Phytochemistry*, **13**: 131-136.
- MILBORROW, B.V. (1974b). The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 259-307.
- MILBORROW, B.V. (1974c). The chemistry and biochemistry of abscisic acid. En *The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones. Recent Advances in Phytochemistry*, eds. V.C. Runeckles, E. Sondheimer & D.C. Walton. Vol. 7, pp. 57-91. Oxford: Pergamon Press.
- MILBORROW, B.V. (1971). Abscisic acid. En *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*, ed. T.W. Goodwin, pp. 137-151. London: Academic Press.
- MILBORROW, B.V. (1970). The metabolism of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, **21**: 17-29.
- MILBORROW, B.V. (1969). Identification of "metabolite C" from abscisic acid and a new structure for phaseic acid. *Chemical Communications*, pp. 966-967.
- MILBORROW, B.V. (1967). The identification of (+)-abscisin II [(+)-dormin] in plants and measurement of its concentrations. *Planta*, **76**: 93-113.

- MILBORROW, B.V. & VAUGHAN, G.T. (1982). Characterization of dihydrophaseic acid 4'-O- β -D-glucopyranoside as a major metabolite of abscisic acid. *Australian Journal of Plant Physiology*, **9**: 361-372.
- MILBORROW, B.V. & VAUGHAN, G. (1979). The long term metabolism of (+)-[2- 14 C]abscisic acid by apple seeds. *Journal of Experimental Botany*, **30**: 983-95.
- MILBORROW, B.V. & MALLABY, R. (1975). The occurrence of methyl(+)-abscisate as an artefact of extraction. *Journal of Experimental Botany*, **24**: 537-548.
- MILBORROW, B.V. & ROBINSON, D.R. (1973). Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, **24**: 537-548.
- MILBORROW, B.V. & NODDLE, R.C. (1970). Conversion of 5-(1,2, epoxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-3-methylpenta-cis-2-trans-4-dienoic acid into abscisic acid in plants. *Biochemical Journal*, **119**: 727-734.
- MINOCHA, S.C. & DIBONA, S. (1979). Effect of auxin and ABA on RNA and protein synthesis prior to the first cell division in Jerusalem artichoke tuber tissue cultured "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, **92**: 367-374.
- MITCHELL, P. (1974). A chemiostic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. *FEBS Letts.*, **43**: 189-194.
- MITTELHEUSER, C.J. & VAN STEVENINCK (1969). Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature*, **221**: 281-282.
- MIZRAHI, Y., BLUMENFELD, A. & RICHMOND, A.E. (1970). Abscisic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic root

- stress. *Plant Physiol.*, **46**(1): 169-171.
- MOZER, T.J. (1980). Control of protein synthesis in barley aleurone layers by the plant hormone gibberellic acid on ABA. *Cell*, **20**: 479-485.
- MOZER, T.M. (1980). Partial purification and characterization of the mRNA for α -amylase from barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, **65**(5): 834-837.
- MULLET, J.H. & CONSIDINE, J.A. (1980). Potassium release and uptake in germinating legume seeds in relation to seed condition and germination environment. *J. Exp. Bot.* **31**: 151-162
- NAITO, K., IIDA, A., SUSUKI, H. & TSUI, H. (1979). The effect of benzyladenina on changes in nuclease and protease activities in intact bean leaves during ageing. *Physiol. Plant.*, **46**: 50-53.
- NEILL, S.J. & HORGAN, R. (1985). ABA production and water relations in wilted tomato mutants subjected to water deficiency. *J. Exp. Botany*, **36**: 1222-1231.
- NEILL, S.J., HORGAN, R. & WALTON, D.C. (1984). Biosynthesis of abscisic acid. En: *The biosynthesis and metabolism of plant hormones*. Ed. A. Crozier and J.R. Hillman. Seminar Series, **23**: 43-70.
- NEILL, S.J. & HORGAN, R. (1983). Incorporation of α -ionylidene ethanol and α -ionylideneacetic acid into abscisic acid by ~~C~~~~e~~~~e~~~~c~~~~c~~~~s~~~~p~~~~h~~~~a~~~~r~~~~a~~~~r~~~~e~~~~s~~~~s~~~~c~~~~o~~~~d~~~~a~~ *Phytochemistry*, **222** 2469-2472.
- NIKOLAEVA, M.G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. En: *"The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination"*. Khaned.-Elsevier. North Holland. Biomedical Press.

- OBENDORF, R.L. & WETTLAUFER, S.H. (1984). Precocious germination during in-vitro growth of soybean seeds. *Plant Physiol.*, **76**: 1024-1028.
- OKHUMA, K., ADDICOTT, F.T., SMITH, O.E. & THUCMEN, W.E. (1965). The structure of abscisin II. *Tetrahedron Letters*, **29**: 2529-2535.
- OKHUMA, K., LYON, J.L., ADDICOTT, F.T. & SMITH, O.E. (1963). Abscisin II, an abscisin-acelerating substances from young cotton fruit. *Science*, **142**: 1592-1593.
- ONISHI, H.R., TKAZ, J.S. & LAMPEN, J.O. (1975). Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. Formation of acid active enzyme in the presence of tunicamycin. *J. Biol. Chem.*, **254**: 11943-11952.
- PAYNE, P.I. (1976). The long-lived messenger ribonucleic acid of flowering-plant seeds. *Biol. Rev.*, **51**: 329-363.
- PEARSON, J.A. & WAREING, P.F. (1969). Effect of abscisic acid on activity of chromatin. *Nature*, **221**: 672-673.
- PIERCE, M. & RASCHKE, K. (1980). Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta*, **148**: 174-182.
- PIETRZAK, M., CUDNY, H. & MALUSZYNSKI, M. (1980). Purification and properties of two ribonucleases and a nuclease from barley seeds. *Biochem. Biophys. acta*, **614** 102-112.
- PILET, P.E. (1970). The effect of auxin and abscisic acid on the catabolism of RNA. *J. Exp. Bot.*, **21**: 446-451.
- PINTA, L. (1973). Méthodes de référence pour détermination des éléments minéraux dans le végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique.

- Oléagineux, **28**(2): 87-92.
- PITT, D. & GALPIN, M. (1971). Increase in ribonuclease activity following mechanical damage to leaf and tuber tissues of *Solanum tuberosum*. *Planta*, **101**(4): 317-332.
- PLISCHKE, W. & HESS, D. (1980). Nuclease from *Petunya hybrida*. A sugar-unspecific nuclease isolated from leaves. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **175**: 629-636.
- POIRIER, T.P. & HALT, S.C. (1983). Isolation, purification and characterization of the enzymes from *C. ochracea*. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 1361-1368.
- POULSON, R. & BEEVERS, L. (1970). Effects of growth regulators on ribonucleic acid metabolism of barley leaf segments. *Plant Physiol.*, **46**(6): 782-785.
- PRATT, C. (1980). Kinetics and regulation of the cell free alkaline phosphate synthesis. *J. Bacteriol.*, **143**: 221-230.
- QUATRANO, R.S., BALLO, B.L., WILLIAMSON, J.D., HAMBLIN, M.T. & MANSFIELD, M. (1983). ABA controlled expression of embryo specific genes during wheat grain development. En: *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.*, N.S., vol. 12. *Plant molecular biology*, pp. 343-353. Goldberg. R.G., ed. Allan R. Liss. New York.
- RADIN, J.W. & TREESE, E. (1976). Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. *Plant Physiol.*, **57**: 902-905.
- RAILTON, I.D., REID, D.M., GASKIN, P & McMILLAN, J. (1974). Characterization of abscisic acid in chloroplasts of *Pisum sativum* L. cv. Alaska by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Planta*, **117**: 179-182.

- RASCHKE, K. (1982). Involvement of ABA in the regulation of gas exchange: evidence and inconsistencies. En "Plant growth substances" (P.F. Wareing, ed.) pp. 581-590. Academic Press. Inc. London.
- RASCHKE, K. (1979). Movements using turgor mechanisms. En "Encyclopedia of Plant Physiology" "New Series". Vol. 7. (A. Pirson and M.H. Zimmermann, eds.) pp. 383-441. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- RASCHKE, K. (1975). Simultaneous requirement of carbondioxide and abscisic acid for stomatal closing in *Xanthium strumarium* L. Plant Physiology, **58**: 169-174.
- RAY, P.M. (1977). Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. Plant Physiology, **59**: 594-599.
- RAYLE, D.L. & CLELAND, R.E. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol., **46**:250-253.
- REID, T.W. & WILSON, T.B. (1971). En The Enzymes. Ed. P.D. Boyer, 3^a ed. Vol. 4, pp. 373-415. Academic Press. New York.
- REJMAN, B.E. & BUCHOWICZ, J. (1971). Sequence of initiation of RNA, DNA and protein synthesis in the wheat grains during germination. Phytochemistry, **10**(12): 2951-2957.
- REYNOLDS, T. & THOMPSON, P.A. (1971). Characterization of the high temperature inhibition of germination of lettuce. Physiol. Plantarum, **24**: 544-547.
- RIJVEN, A.H.G.C. (1978). Ribosomal wash ribonucleases from feungreek (*Trigonella foenum graecum* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cotyledons and their interaction

- with poly (A) and some modified nucleosides. *Plant. Sci. Lett.*, **11**: 293-303.
- ROBERTS, D.R., DUMBROFF, E.B. & THOMPSON, J.E. (1976). Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves—a basis for potential misinterpretation of their tone physiological role. *Planta*, **167**: 395-401.
- ROBERTS, B.E. & PATERSON, B.M. (1973). Efficient translocation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9 S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 2330-2334.
- ROBICHAUD, C.S., WONG, J. & SUSSEX, I.M. (1980). Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by ABA. *Dev. Genet.*, **1**: 325-330.
- ROBINSON, D.R. & RIBACK G. (1969). Incorporation of tritium from [(4R)-4-³H]mevalonate into abscisic acid. *Biochemical Journal*, **113**: 895-897.
- ROBINSON, P.M. & WAREING, P.F. (1964). Chemical nature and biological properties of the inhibitor varying with photoperiod in sycamore. *Physiol. Plantarum*, **17(2)**: 314-323.
- RODAWAY, S. & MARCUS, A. (1980). In vivo synthesis of 6-azauridine 5'-triphosphate and incorporation of 6-azauridine into RNA of germinating wheat embryonic axes. *J. Biol. Chem.*, **255(18)**: 8402-8404.
- RODRIGUEZ, D., NICOLAS, G., ALDASORO, J.J., HERNANDEZ-NISTAL, J., BABIANO, M.J. & MATILLA, A. (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.

- RODRIGUEZ, D., MATILLA, A., ALDASORO, J.J., HERNANDEZ-NISTAL, J. & NICOLAS, G. (1983). Germination of *Cicer arietinum* seeds and thiourea-induced phytotoxicity. *Physiol. Plant.*, **57**:267-272.
- ROY, N., GHOSH, R. & DAS, J. (1982). Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **150**: 1033-1039.
- SACHER, J.A. y DE LEO, P. (1977). Wound-induced RNase in senescing bean pod tissue: post-transcriptional regulation of RNase. *Plant Cell Physiol.*, **18**: 161-171.
- SACHER, J.A., MORGAN, E.L. & DE LA ROSA, D. (1975). Paradoxical effect of actinomycin D. Regulation of wound RNase at translation in turnip tissue. *Plant Physiol.*, **56**: 442-449.
- SCHMANN, J., VOLKI, W., UDVARDY, J., BORBELY, G., SIVOK, B. & FARKAS, G.L. (1979). Characterization of a RNase from *Anacystis nidulans* infected with cyanophage AS-1. *Phytochemistry*, **18**: 541-544.
- SCHOPFER, P., BAJRACHARYA, D. & PLACHY, C. (1979). Control of seed germination by ABA I. Time course of action in *Sinapis alba*. *Plant. Physiol.*, **64**: 822-827.
- SCHROTH, M.N. & COOK, R.J. (1964). Soaking injury and solute leakage on scarified seeds. *Phytopathology*, **54**: 670-673.
- SEMBDNER, G., WEILAND, J., SCHMEIDER, G., SCHREIBER, K. & FOCKE, I. (1972). Recent advances in the metabolism of gibberellins. En: "Plant Growth Substances" 1970. Ed. D.J. Carr. Springer-Verlag. Berlin, pp. 143-150.
- SEN, K. & GHOSH, B. (1985). Effect of polyamines on Ribonuclease activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Phytochem.*, **23**: 1583-85.

- SERRANO, R. (1984). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel tipe of proton pump. *Current Topics in Cellular Regulation*, **23**: 87-125.
- SETTER, T.L., BRUN, W.A. & BRENNER, M.L. (1981). Abscisic acid translocation and metabolism in soybeans following depodding and petiole girdling treatments. *Plant Physiol.*, **67**: 774-779.
- SHANER, D.L., MERTZ, S.M. & ARNTZEN, C.J. (1975). Inhibition of ion accumulation in maize roots by ABA. *Planta*, **122**: 78-80.
- SIMON, E.W. (1981). Membrane changes underlaying post-harvest deterioration in quality. *Long Ashton Symp.* 7th: 247-252.
- SINGH, N.K., HANDA, A.K., HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A. (1985). Protein associated with adaptation of Cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, **79**: 126-137.
- SMART, CH.C. & TREWAVAS, A.J. (1984). ABA-induced turion formation in *Spirodella polyrrhiza* L. III. Specific changes in protein synthesis and translatable RNA during turion development. *Plant Cell & Environment*, **7**: 121-132.
- SMITH, J.D., McDANIEL, S. & LIVELY, S. (1978). Regulation of embryo growth by abscisic acid in vitro. *Maize Genetics Co-operative Newsletter*, **52**: 107-108.
- SPERANZA, A., CALZONI, G.L. & BAGNI, N. (1984). Evidence for a poliamine-mediated control of Ribonuclease activity in germinating apple polen. *Physiol Veg.*, **22**(3): 323-331.
- SPIEGEL, S. & MARCUS, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independ of either transcription or polyadenilation. *Nature*, **256**: 228-230.

- SRIVASTAVA, S.K. & SMITH, T.A. (1982). The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry*, **21**: 997-1008.
- SRIVASTAVA, B.I.J., MATSUMOTO, H. & CHADHA, K.C. (1971). Studies on chromatin-associated nuclease from barley leaves. *Plant. Cell. Physiol.*, **12**: 609-618.
- STARLING, R.J. (1984). The question of plant hormone binding sites. *TIBS*, **9**: 48.
- STEWART, G.R. & SMITH, H. (1972). Effects of abscisic acid on nucleic acid synthesis and the induction of nitrate reductase in *Lemna polyrhiza*. *J. Exp. Bot.*, **23**(77): 875-885.
- SUSSEX, I.M. & DALE, R.M.K. (1979). In: *The Plant Seed: Development, Preservation and Germination* (I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach, eds.), pp. 129-141. Academic Press. New York.
- SUTCLIFFE, J.F. (1980). Ion distribution in germinating seeds. *Encyclopedia of Plant Physiol.* Springer-Verlag. Berlin. Vol 2
- SUTCLIFFE, J.F. & BASET, Q.A. (1973). Control of hydrolysis of reserve materials in the endosperm of germinating oat (*Avena sativa*) grains. *Plant. Sci. Lett.*, **1**: 15-20.
- TAKAIWA, J. & TANIFUJI, S. (1978). Development of RNase activity in embryonic axis of germinating pea seeds. *Plant Cell. Physiol.*, **19**: 1507-1518.
- TAMURA, T., MINAMIKAWA, T. & KOSHIBA, T. (1982). Multiple forms of acid phosphatase in cotyledons of *Vigna mungo* seedling. *Journal of Experimental Botany*, **33**: 1332-1339.
- TENO, A.M., PALMA, M. & ROSSI, A. (1987). Acid phosphatase from maize scutellums: properties as a function of seed

- germination. *Phytochemistry*, **26**: 55-58.
- TREWAVAS, A.J. (1982). Growth substances sensitivity. The limiting factor in plant development. *Physiol. Plantarum*, **55**: 60-72.
- TREWAVAS, A.J. (1980). An auxin induces the appearance of auxin-binding activity in artichoke tubers. *Phytochemistry*, **19**: 1303-1308.
- TREWAVAS, A.J. (1979). What is the molecular basis of plant hormone action?. *Trends Biochem. Sci.*, **4**(9): 199-200, 202.
- TREWAVAS, A.J. & CLELAND, R.E. (1983). Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances?. *TIBS*, **8**: 345-357.
- TUAN, D.V.H. & BONNER, J. (1964). Dormancy associated with repression of genetic activity. *Plant Physiol.*, **39**(5): 768-772.
- UDVARDY, J. & FARKAS, G.L. (1972). Abscisic acid stimulation of the formation of an ageing specific nuclease in *Avena* leaves *Journal of Experimental Botany*, **23**: 914-920.
- VAN DER WILDEN, W., HERMAN, E.M. & CHISPEELS, M.J. (1980). Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 428-432.
- VAN ONCKEKEN, H.A., HOREMANS, S. & GREEF, J.A. (1981). En: Aspects and Prospects of Plant Growth Regulators, 1980. BPGRG Symposium, Monograph, No. 6.
- VAN STEVENICK, R.F.M. (1972). ABA stimulation of ion transport and alteration in K^+/Na^+ selectivity. *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**: 282-286.

- VAN STEVENICK, R.F.M. & KARMOKER, J.L. (1978). Stimulation of volume flow and ion flux by ABA in excised roots systems of **Phaseolus vulgaris** L. cv. Redland Pioneer. *Planta* **141**:37-43
- VARIAN, A. & SACHER, J.A (1978). Wound-induced RNase in bean pod tissue II. Auxin regulation of RNase synthesis at transcription. *Plant Cell. Physiol.*, **19**: 1185-1193.
- VILLIER, T.A. (1974). Seed ageing: Chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. *Plant Physiol.*, **53**: 875-878.
- VOGT, V.M. (1973). Purification and further properties of single-strand specific nuclease from **Aspergillus oryzae**. *Env. J. Biochem.*, **33**: 129-200.
- WAGNER, H. (1974). Effect of kinetin on protein synthesis in maturing barley grains. *Angew. Bot.*, **48**(3-4): 175-184.
- WALBOT, V. (1971). RNA metabolism during embryo development and germination of **Phaseolus vulgaris**. *Develop. Biol.*, **26**(3): 369-379.
- WALTON D.C. (1981). Does ABA play a role in seed germination?. *Israel Journal of Botany*, **29**: 168-180.
- WALTON, D.C. (198). Biochemistry and Physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, **31**: 453-489.
- WALTON, D.C., GALSON, E. & HARRISON, M.A. (1977). The relationship between stomatal resistance and abscisic acid levels in leaves of water-stressed bean plants. *Planta*, **133**: 145-148.
- WALTON, D.C., HARRISON, M.A. & COTE, P. (1976). The effect of water stress on abscisic acid levels and metabolism in roots of **Phaseolus vulgaris** L. and other plants. *Planta*, **131**:141-4.

- WALTON, D.C. & SONDHEIMER, E. (1972). Metabolism of 2-¹⁴C-(+)-abscisic acid in excised bean axes. *Plant Physiol.* **49**:285-89
- WANG, T.L., DONKIN, M.E. & MARTIN, E.S. (1984). The physiology of a willy pea: ABA production under water stress. *J. Exp. Botany*, **35**: 1222-1232.
- WAREING, P.F. & SAUNDERS, P.F. (1971). Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 453-459.
- WAREING, P.F., GOOD, J., POTTER, H. & PEARSON, A. (1968). Preliminary studies on the mode of action of abscisic acid. *Soc. Chem. Ind., London. Monogr. n^o 31*: 191-207.
- WHENHAM, R.J. & FRASER, R.S.S. (1980). Stimulation by ABA of RNA in disc from healthy and tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Planta*, **150**: 349-353.
- WHITE, J.C. & MANSFIELD, T.A. (1977). Correlative inhibition of lateral bud growth in *Pisum sativum* L.: studies of the role of abscisic acid. *Ann. Bot.*, 1163-1170.
- WILKINS, H. & WAIN, R.L. (1974). The root cap and control of root elongation in *Zea mays* L. seedling exposed to ligh. *Planta*, **122**: 1-8
- WILLIAMS, S.G. (1970). The Role of Phytic Acid in the Wheat Grain. *Plant Physiol.*, **45**: 376-381.
- WILSON, C.M. (1980). Plant ribonucleases VI. Genetic and developmental variability in Ribonuclease activity in inbred and hybrid corn endosperm. *Plant Physiology*, **66**: 119-125.
- WILSON, C.M. (1975). Plant nucleases. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**: 187-208.

- WILSON, C.M. (1971). Plant nucleases III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. *Plant Physiol.*, **48**: 64-68.
- WILSON, C.M. & ALEXANDER, D.E. (1967). Ribonuclease activity in normal and opaque-2 mutants endosperm maize. *Science*, **155**: 1575-1576.
- WIREMAN, J.W. & DWORKIN, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *H. xanthus*. *J. Bacteriol.*, **129**: 796-802.
- WRIGHT, S.T.C. (1978). Phytohormones and Stress Phenomena. En: *Phytohormones and Related Compounds. A comprehensive Treatise, Vol. II.* Eds.: Letham Goodwin and Higgins. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. pp. 495-534.
- WRIGHT, S.T.C. (1975). Seasonal changes in the levels of free and bound abscisic acid in blackcurrent (*Ribes nigrum*) buds and (*Fagus sylvatica*) buds. *J. Exp. Bot.*, **26**: 161-174.
- WRIGHT, S.T.C. (1969). An increase in the "inhibitor-" content of detached wheat leaves following a period of wilting. *Planta*, **86**: 10-20.
- WYEN, N.V., ERDEI, S., DVARDY, J., BAGI, G. & FARKAS, G.L. (1972). Hormonal control of nuclease level in excised *Avena* leaf tissue. *J. Exp. Bot.*, **23**: 37-44.
- WYEN, N.V. & FARKAS, G.L. (1971). Nature of nuclease activity associated with cytoplasmic ribosomes isolated from *Avena* leaves. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **162**(3): 220-224.
- YI, C. & TODD, G.W. (1979). Changes in ribonuclease activity of wheat plants during water stress. *Physiol. Plant.*, **46**(1): 13-18.

- ZABADAL, T.J. (1974). A water potential threshold for the increase in abscisic acid in leaves. *Plant Physiol.* **53**:125-127.
- ZEEVAART, J.A.D. & MILBORROW, B.V. (1976). Metabolism of abscisic acid and the occurrence of *epi*-dihydrophaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, **15**: 493-500.
- ZWAR , J.A. & JACOBSEN, J.V. (1972). A correlation between a ribonucleic acid fraction selectively labeled in the presence of gibberellic acid and amilase synthesis in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, **49**: 1000-1006.