

41/97 CONGRESOS
Y JORNADAS



XII REUNION NACIONAL DE LA SEFV
Córdoba 23 - 26 de septiembre de 1997

V CONGRESO HISPANO-LUSO DE
FISIOLOGIA VEGETAL



sociedad
española
de
fisiología vegetal

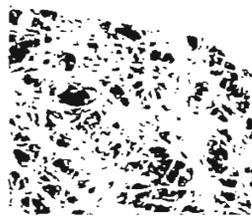


UNIVERSIDAD DE CORDOBA

RESUMENES



JUNTA DE ANDALUCIA
Consejería de Agricultura y Pesca



**XII REUNION NACIONAL DE LA SEFV
V CONGRESO HISPANO-LUSO
DE FISILOGIA VEGETAL**

23-26 Septiembre 1997
CORDOBA

**Sociedad Española de Fisiología Vegetal
Universidad de Córdoba**

LIBRO DE RESUMENES

XII REUNION NACIONAL DE LA SEPTA
V. CONGRESO HISPANO-LUSO
DE FISIOLOGIA VEGETAL

1997

© Edita: JUNTA DE ANDALUCIA,
Consejería de Agricultura y Pesca
Publica: Dirección General de Investigación y Formación Agraria,
Servicio de Publicaciones y Divulgación
Colección: Congresos, Jornadas 41/97
Depósito Legal: SE-1483/97
I.S.B.N.: 84-89802-12-2
Maquetación e impresión: Tecnographic, S.L.

Comité Organizador

Presidente:	José María Maldonado Ruiz Universidad de Córdoba
Vicepresidente:	Manuel Díaz de la Guardia Chico Universidad de Córdoba
Secretario:	Francisco Castillo Rodríguez Universidad de Córdoba
Tesorero:	Manuel Pineda Priego Universidad de Córdoba

Vocales:

Eloísa Agüera Buendía
Universidad de Córdoba

Pedro González Fernández
CIFA, Córdoba

Manuel Benloch Marín
Universidad de Córdoba

Agustín González Fontes de Albornoz
Universidad de Córdoba

M^a del Rosario de Felipe Antón
CSIC, Madrid

Purificación de la Haba Hermida
Universidad de Córdoba

Mercedes Fernández Pascual
CSIC, Madrid

Rafael Pérez Vicente
Universidad de Córdoba

Luis García Torres
CSIC, Córdoba

Francisco Javier Romera Ruiz
Universidad de Córdoba

Comité Científico

Carlos F. Alcaraz Molina
CSIC, Murcia

José María Maldonado Ruiz
Universidad de Córdoba

M^a Carmen Alvarez Tinaut
Universidad de Extremadura

Maria Amelia Martins Louçao
Universidad de Lisboa

Pedro J. Aparicio Alonso
CSIC, Madrid

José Olivares Pascual
CSIC, Granada

Pedro M. Aparicio Tejo
Universidad Pública de Navarra

José Alberto Pardos Carrión
Universidad Politécnica de Madrid

Joaquim Azcón Bieto
Universidad Central de Barcelona

E. Roberto Rodríguez Fernández
Universidad de Oviedo

Francisco Castillo Rodríguez
Universidad de Córdoba

Joao Santos Pereira
Inst. Sup. de Agronomía, Lisboa

José Luis García Martínez
Univ. Politécnica de Valencia-CSIC

Juan Segura García del Río
Universidad de Valencia

Carmen González Murúa
Universidad del País Vasco

José María Vega Piqueres
Universidad de Sevilla-CSIC

Carmen Lluch Pla
Universidad de Granada

Miguel Vendrell Melich
CSIC, Barcelona

Entidades y Organismos Colaboradores

Sociedad Española de Fisiología Vegetal

Universidad de Córdoba

Programa Propio de Ayuda a la Investigación

Programa XXV Aniversario de la Universidad de Córdoba

Junta de Andalucía

Consejería de Agricultura y Pesca

Consejería de Educación y Ciencia

Excma. Diputación Provincial de Córdoba

Excmo. Ayuntamiento de Córdoba

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Ministerio de Educación y Cultura-DGES

CajaSur-Obra Social y Cultural

RENFE-AVE

Consejo Regulador D.O. Montilla-Moriles

ASL-SNIJDERS

Beckman Instruments España S.A.

Braun Biotech S.A.

FRISOL-CLIMATRONIC S.A.

IZASA-REGO S.A.

INDICE

PRESENTACION	11
CONFERENCIA DE APERTURA	13
CONFERENCIA DE CLAUSURA	19
SIMPOSIOS.....	25
Simposio S1: Fotobiología Vegetal.....	27
Ponencias S1-1 a S1-3	
Simposio S2: Membranas: Aspectos Moleculares del Transporte Iónico...	35
Ponencias S2-1 a S2-3	
Simposio S3: Fisiología Vegetal: Agricultura y Medio Ambiente	45
Ponencias S3-1 a S3-3	
COMUNICACIONES	55
Sección C1: Agronomía y Silvicultura	57
Comunicaciones C1-1 a C1-23	
Sección C2: Ecofisiología.....	87
Comunicaciones C2-1 a C2-28	
Sección C3: Estrés bióticos y abióticos (I).....	125
Comunicaciones C3-1 a C3-24	

Sección C4:	Estreses bióticos y abióticos (II)	165
	Comunicaciones C4-1 a C4-21	
Sección C5:	Fotosíntesis y metabolismo del carbono	193
	Comunicaciones C5-1 a C5-25	
Sección C6:	Interacciones planta-microorganismo	233
	Comunicaciones C6-1 a C6-18	
Sección C7:	Metabolismo del nitrógeno.....	265
	Comunicaciones C7-1 a C7-26	
Sección C8:	Morfogénesis y cultivo <i>in vitro</i> (I).....	299
	Comunicaciones C8-1 a C8-21	
Sección C9:	Morfogénesis y cultivo <i>in vitro</i> (II)	329
	Comunicaciones C9-1 a C9-23	
Sección C10:	Nutrición: absorción y transporte.....	363
	Comunicaciones C10-1 a C10-13	
Sección C11:	Regulación del crecimiento y desarrollo.....	383
	Comunicaciones C11-1 a C11-32	
Sección C12:	Senescencia y fisiología post-cosecha.....	427
	Comunicaciones C12-1 a C12-14	
INDICE DE AUTORES		447

PRESENTACION

La XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal acoge en Córdoba a casi 350 investigadores de España, Portugal y otros países iberoamericanos y europeos. Esta Reunión constituye el foro en el que se presentan y discuten los principales avances científicos en la fisiología de las plantas producidos en los dos últimos años -desde la última Reunión celebrada en Estoril (Portugal) en 1995. En el presente libro se recogen los resúmenes de los trabajos presentados. Al leerlo, se puede apreciar y valorar la calidad de las investigaciones que se están llevando a cabo en España y Portugal, que ya gozan de un bien ganado reconocimiento internacional.

La presente Reunión consta de dos Conferencias Plenarias (de Apertura y de Clausura), tres Mini-Simposios y casi trescientas comunicaciones. A la hora de seleccionar los temas de los Simposios y de las Comunicaciones, hemos pretendido ofrecer una panorámica de la Fisiología Vegetal desde los niveles molecular y celular hasta el de organismo completo, todos ellos de importante repercusión biotecnológica, agronómica y ambiental.

Es un motivo de gran satisfacción para todos nosotros el que en este Congreso de Córdoba se haga entrega de los nombramientos de Socio de Honor de la SEFV a los Profesores D. Manuel Losada Villasante y D. Ernesto Vieitez Cortizo por sus reconocidos méritos científicos y apoyo a nuestra Sociedad desde su fundación, además en un año en el que se conmemora el XXV aniversario de la Universidad de Córdoba. Es nuestro deseo que esta Reunión sirva para promover un fructífero intercambio de conocimientos que permita seguir avanzando en la comprensión de los procesos vegetales y conseguir un mejor aprovechamiento de los recursos naturales, a la vez que para disfrutar de unos agradables días de convivencia. A todo ello contribuirá, sin duda alguna, el atractivo y la herencia cultural que posee la ciudad de Córdoba.

EL COMITE ORGANIZADOR

CONFERENCIA DE APERTURA

¿Es el mecanismo de la fosforilación otro huevo de Colón?

M. Losada

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis,
Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja,
Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla*

Es para mí un gran honor y un alto privilegio haber sido invitado por el Comité Organizador de la XII Reunión Nacional de la SEFV y V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal a pronunciar la Conferencia Inaugural, así como ser admitido, junto con el profesor don Ernesto Vieitez, como Socio de Honor de la SEFV. Mi carrera científica e investigadora se inició en 1947, cuando tuve la fortuna de conocer en Madrid al profesor don José María Albareda. De entonces arranca mi vocación por la Biología vegetal, que él supo despertar y promover. Después de mi estancia como becario predoctoral en el Instituto Botánico de la Universidad de Münster —donde trabajé en la citología de los orgánulos fotosintéticos y respiratorios bajo la dirección del profesor Strugger— y en el Laboratorio Carlsberg de Copenhague —donde realicé mi tesis doctoral sobre genética-bioquímica de levadura bajo la dirección del profesor Winge— marché como postdoctor en 1958 al Departamento de Suelos y Nutrición Vegetal de la Universidad de California, donde trabajé durante cuatro años en Fotosíntesis bajo la dirección del profesor Arnon. A mi llegada a Berkeley era un dogma científico que la energía de la luz se utilizaba directamente para romper los enlaces de la molécula de dióxido de carbono (Warburg) o de agua (Van Niel, Hill). Al estudiante de hoy día le resulta difícil darse cuenta de que el concepto de que la luz induce un transporte cíclico y no cíclico de electrones en los cloroplastos no fue introducido hasta comienzos de los años 60, y a mí me cabe ciertamente el orgullo de haber contribuido decisivamente a esta concepción fundamental en bioenergética: pronto quedaría definitivamente establecido que la reacción básica de la fotosíntesis oxigénica es la fotoelectrólisis del agua catalizada por la clorofila con el concurso de dos fotosistemas.

Otro concepto fundamental introducido en las décadas de los 60 y 70 por nuestro grupo fue el de que la fotosíntesis no se limita a la asimilación del dióxido de carbono a expensas de la energía solar —proceso esclarecido por el profesor Calvin—, sino que incluye igualmente la reducción del nitrato a amoníaco por el agua, con el concomitante desprendimiento de oxígeno. En la década de los 80 propusimos una teoría unificada para la transducción secuencial de la energía por los sistemas bioquímicos que operan en fotosíntesis, así como en respiración y fermentación. Según esta propuesta, la energía electrónica es el eslabón obligatorio entre las distintas formas de energía (luminosa, redox, ácido-base, ortofosfato-metafosfato, etc.), y el primer acto de la transducción consiste en la energización de una de las formas de los pares implicados, lo que conlleva cambios de afinidad (E'_0 , pK_a , etc.) por los electrones, protones, grupos fosfato, etc. El grupo que dirige conmigo el doctor José M^o Ortega ha dedicado su atención durante los últimos años al cito-

como transmembranal *b*-559 del fotosistema II, que, dependiendo de su estado de energización, opera a dos E'_0 y pK_a alternantes y puede estar implicado en la transducción de energía redox en energía ácido-base (véase resumen de la comunicación).

Creo que pocos científicos han tenido, como yo, la suerte de vivir tan cerca de los padres de la fosforilación respiratoria y fotosintética: Ochoa y Arnon, respectivamente. Aunque la hipótesis quimiosmótica de Mitchell supuso un enorme avance en el esclarecimiento de la fosforilación a nivel de membrana, todavía constituye un reto de significación trascendental para los bioenergetistas la elucidación del mecanismo por el que se sintetiza una molécula de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i) a expensas de un potencial electroquímico de protones:

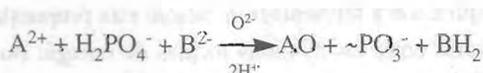


Curiosamente, hay también bacterias fotosintéticas que, en ciertas condiciones, sintetizan igualmente pirofosfato (PP_i), en vez de ATP, a expensas del potencial transmembranal de protones generado por la luz:

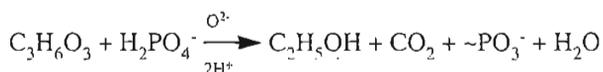


La deshidratación del fosfato a pirofosfato se puede conseguir también calentando a 400°C. Por otro lado, la simple hidrólisis del pirofosfato por la acción de las pirofosfatasas solubles, así como la del ATP por las ATPasas, va acompañada de liberación de calor. La doctoranda Rosario Gómez está llevando a cabo un estudio comparativo de las pirofosfatasas solubles de bacterias fotosintéticas, microalgas y plantas (véase resumen de la comunicación).

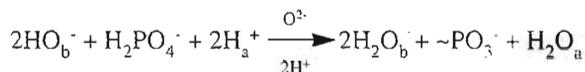
Nuestra hipótesis considera que la clave del *mecanismo de la fosforilación* propiamente dicha radica en la transformación endergónica del compuesto estable ortofosfato ($H_2PO_4^-$) en el compuesto rico en energía metafosfato ($\sim PO_3^-$). Una vez formado, el grupo inestable $\sim PO_3^-$ se ancla o bien en una molécula de ADP para dar ATP ($ADP\sim PO_3^-$) o bien en una molécula de ortofosfato o para dar pirofosfato ($H_2PO_4\sim PO_3^-$). De hecho, la energía química contenida en el enlace pirofosfato del ATP ($\approx 1/3$ eV molécula⁻¹ ó 33 kJ mol⁻¹) es del mismo orden que la del propio pirofosfato. El análisis comparado de la fosforilación a nivel de sustrato (*fermentación*) y de membrana (*fotosíntesis* y *respiración*) revela que, en uno y otro caso, se puede tratar de un proceso ácido-base peculiar de deshidratación secuencial, en el que un grupo ácido (A^{2+}) remueve un anión óxido (O^{2-}) del ortofosfato, y un grupo básico (B^{2-}) remueve a continuación los dos protones:



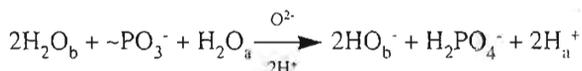
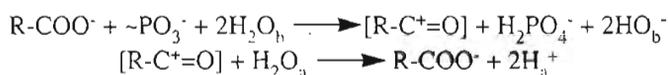
En el caso de la fosforilación a nivel de sustrato que tiene lugar en la fermentación alcohólica, los grupos ácido (catión acilio) y básico (carbanión y anión alcoholato) son productos intermedios de la transformación redox del azúcar en alcohol y dióxido de carbono:



En el caso de la fosforilación a nivel de membrana, los grupos ácido y básico son, en último término, los iones hidronio e hidróxido que constituyen el potencial transmembranal de protones:



Recientemente, el grupo que dirige conmigo el doctor Aurelio Serrano ha conseguido la ionización del agua promovida por ATP en un sistema modelo reconstituido, integrado esencialmente por los enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante y no fosforilante, de acuerdo con las siguientes ecuaciones secuenciales simplificadas:



En contraste con la G3PDHasa cloroplástica fosforilante, la G3PDHasa no fosforilante es un enzima citosólico exclusivo de las células eucarióticas fotosintéticas. La operación en tándem de ambos enzimas permite utilizar la energía del ATP para la exportación al citosol del poder reductor (H^-) a través de la membrana cloroplástica así como el mantenimiento del potencial de hacia dos unidades de pH existente entre ambos compartimentos celulares. Los genes que codifican estos enzimas en algas y plantas han sido clonados y secuenciados y su regulación investigada por el doctorando Federico Valverde. El carácter anfóbico de la G3PDHasa fotosintética de cianobacterias ha sido demostrado por primera vez mediante complementación funcional en *E. coli* (F. Valverde, M. Losada y A. Serrano, 1997, *J. Bacteriol.*, en prensa). La anterior ecuación revela que el papel del par $\text{R-COO}^-/[\text{R-C}^+=\text{O}]$ y del anión óxido en la fosforilación a nivel de sustrato podría ser igualmente válido en la fosforilación a nivel de membrana, así como en la operación de las bombas de protones de las membranas plasmáticas y vacuolares dependientes de ATP ó pirofosfato. El doctor José R. Pérez-Castiñeira está procediendo a la identificación y caracterización de los genes que codifican estas proteínas en bacterias fotosintéticas, algas y plantas (véase resumen de la comunicación).

**CONFERENCIA
DE CLAUSURA**

Molecular biology in the cell: immunolocalisation and *in situ* hybridisation with molecular probes

N.J. Brewin, P. Dahiya, L.E. Hernández, E.A. Rathbun,
J-P. Wiszniewski, J.L. Vincent

John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, Great Britain

In recent years, plant cell biology and plant physiology have been revolutionised by the development and use of molecular probes to investigate biological macromolecules in the context of their cellular and subcellular environments. This theme will be discussed with reference to the use of immunolocalisation and *in situ* hybridisation methods to investigate the process of tissue and cell invasion by *Rhizobium* during the development of the legume root nodule¹. The study of nodule morphogenesis will be used to illustrate general themes that are common to many aspects of plant physiology and development, for example, the control of nitrogen metabolism; membrane biogenesis; cell wall differentiation; cell-to-cell communication; and plant-microbe interaction.

Where available, antibodies have considerable advantages over cDNA probes for use in molecular cell biology. They can be used to examine the post-translational processing of proteins and to monitor their targeting to subcellular and extracellular locations. Antibodies can also be used in cell extracts to investigate physical and biochemical interactions between proteins and other cellular components. Furthermore, antibodies can be used to examine non-protein macromolecules, e.g. glycolipids² and cell wall polysaccharides. Each of the above listed features testifies to the versatility of antibody probes relative to cDNA probes, which can only be used to identify those cells that express the transcript of any particular gene.

Specific antibody probes can be obtained in two ways: either by developing an antiserum to a biochemically pure component, or by raising a panel of monoclonal antibodies to biochemically uncharacterised material and then selecting the probe of interest from among the antibodies obtained. In the context of pea nodule development this latter approach was adopted in order to identify and characterise components of the plant-microbial interface³.

Using this immunological approach, several important components of the plant intercellular matrix have been identified. The topology of a *Rhizobium*-induced infection thread has been defined as being equivalent to a tubular invagination of the primary cell wall. The infection thread lumen contains a 105 kD plant glycoprotein which may serve to control the process of infection thread growth. Biochemical studies suggest that, under oxidative conditions, this protein is apparently cross-linked into an insoluble form. Moreover, in the absence of borate (an essential micronutrient for nodule development) there is apparently a physical interaction between matrix glycoprotein and the bacterial cell surface⁴: such an interaction may impede the uptake of *rhizobia* by endocytosis through the plant cell plasma membrane. Other plant components of the infection thread lumen have been identified using specific antisera, namely lipoxygenase⁵, thiolprotease⁶ and diamine oxidase. Their possible involvement in the promotion and prevention of infection thread development will be discussed.

Monoclonal antibodies have also been used to identify various "glycocalyx" components of plant (and bacterial⁷) cell surface membranes³. These probes have been used to investigate the development of the "symbiosome" as a specialised compartment of the endomembrane system. In particular, antibody JIMIB has been shown to recognise a plant glycolipid (a putative glycosylinositol phosphosphingolipid²). Immunogold labelling revealed this antigen to be present on all plasma membranes but it was otherwise restricted to juvenile (undifferentiated) forms of peribacteroid membrane⁸. The sudden loss of JIMIB antigen from mature peribacteroid membrane represents one of the earliest markers for the differentiation of the symbiosome compartment, and seems to mark the onset of a new targeting pathway. Interestingly, *sym31*, a symbiotically defective pea mutant apparently does not undergo this developmental switch: bacteroids remain in an undifferentiated state and JIMIB antigen is not lost from the peribacteroid membrane at any stage of host cell development⁹.

Antibody MAC266 was found to recognise a carbohydrate epitope associated with a number of Golgi-derived glycoproteins targeted to the symbiosomal fluid of mature symbiosomes. One of these glycoproteins was purified, sequenced and found to correspond to a nodule specific member of the legume lectin gene family¹⁰. Discrepancies between a highly abundant mRNA transcript (detectable by in situ hybridisation) and a very low level of protein antigen (detected immunologically) suggest that this vegetative lectin may serve as a transient nitrogen storage compound that is turned over very rapidly in nodule tissue. Nodule fractionation studies indicate that isolated symbiosomes express two isoforms of nodule lectin and a third isoform is probably associated with the vacuolar compartment. In nodule extracts from the *sym31* mutant, only the vacuolar isoform is found, providing further evidence that this pea mutant is defective in some aspect of vesicle targeting involving the trans-Golgi network.

-
1. Brewin NJ (1991) Development of the legume root nodule. *Ann Rev Cell Biol* 7,191-226
 2. Hernández LE, Brewin NJ, Dröbak BK (1996) Detection of glycolipids as biotinylated derivatives using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem* 241, 593
 3. Perouo S, VandenBosh KA, Butcher GW, Brewin NJ (1991) Molecular composition and development of the plant glycocalyx associated with the peribacteroid membrane of pea root nodules. *Development* 112, 763-173
 4. Bolaños L, Brewin NJ, Bonilla I (1996) Effects of boron on *Rhizobium*-legume cell surface interactions and nodule development. *Plant Physiol* 110,1249-1256
 5. Gardner CD, Sherrier DJ, Kardailsky IV, Brewin NJ (1996) Localisation of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: identification of lipoxygenase in the lumen of infection threads. *MPMI* 9, 282-289
 6. Kardailsky IV, Brewin NJ (1996) Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. *MPMI* 9, 689-695
 7. Lucas MM, Peart J, Brewin NJ, Kannenberg EL (1996) Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives. *J Bacteriol* 178, 2727-2133
 8. Peroo S, Donovan N, Dröbak BK, Brewin NJ (1995) Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen of the peribacteroid membrane during pea nodule development. *MPMI* 8, 560-568

9. Sherrier DJ, Borisov, AY, Tikhonovich, IA, Brewin NJ (1997) Immunocytological evidence for abnormal symbiosome development in nodules of the pea mutant line Sprint2Fiz⁻ (*sym31*). *Plant Physiol* (submitted)
10. Kardailsky IV, Sherrier DJ, Brewin NJ (1996) Identification of a new pea gene, *PsNlecl*, encoding a lectin-like glycoprotein isolated from the symbiosomes of root nodules. *Plant Physiol* 111, 49-60.

SIMPOSIOS

SIMPOSIO S1:

Fotobiología Vegetal

El fotosistema II de plantas superiores

R. Picorel

Estación Experimental Aula Dei (CSIC),

Apdo. 202, 50080-Zaragoza, España

La fotosíntesis es la función biológica por la cual la luz es transformada en energía de potencial químico, utilizable por los organismos vivientes. Dicha función tiene lugar a través de múltiples y complejos procesos, unos unidos a membrana y otros catalizados por enzimas solubles, siendo sin duda los primeros los más genuinos de la fotosíntesis. En los procesos unidos a membrana intervienen fundamentalmente los complejos del fotosistema II, fotosistema I y citocromo b_6f , conectados entre sí por transportadores redox móviles, unos solubles en la membrana fotosintética y otros hidrosolubles. Estos transportadores redox actúan como cofactores de los complejos multiproteicos con los que interaccionan de forma específica y precisa. El aparato fotosintético es además muy sensible a estreses bióticos y abióticos, induciendo cambios estructurales y funcionales que pueden ser utilizados como marcadores internos y servir de diagnóstico del estado fisiológico/nutricional de la planta.

El fotosistema II es uno de los complejos multiproteicos fundamentales del aparato fotosintético de plantas y es responsable de la absorción de luz, separación de cargas, reducción de aceptores secundarios de electrones y fotólisis del agua. Durante la fotólisis del agua se generan electrones y protones, utilizados en la síntesis de NADPH y ATP, respectivamente, y oxígeno molecular que se desprende a la atmósfera. Una de las grandes ventajas de la fotosíntesis oxigénica (la que tiene lugar en plantas, algas y cianobacterias) respecto a la anoxigénica (la que se da en bacterias fotosintéticas) es la utilización del agua como donador de electrones del fotosistema II. La selección del agua como donador de electrones tiene la ventaja de ser un compuesto abundante y muy accesible pero supone un coste energético para los organismos fotosintéticos e influye de forma definitiva en las características estructurales/funcionales del fotosistema II. La extracción de electrones del agua sólo se puede conseguir si a dicho proceso conectamos un oxidante muy potente, que en el fotosistema II es un dímero de clorofilas (Chl) denominado P680.

El fotosistema II está compuesto estructural y funcionalmente por tres partes bien diferenciadas pero muy relacionadas entre sí, es decir la antena externa, el "core" y las proteínas extrínsecas. La antena externa está constituida por el complejo LHClI, cuya función primordial es capturar la luz y transferir dicha energía de excitación al "core" a través de las antenas minoritarias denominadas CP29, CP26 y CP24. Estas antenas minoritarias parecen ejercer también un papel relevante en la regulación del flujo de excitones desde la LHClI al "core". El "core" es la parte central del fotosistema II y está, a su vez, formado por las antenas internas CP43 y CP47 y el centro de reacción. En él tienen lugar los procesos de separación de cargas a través de la membrana fotosintética, la reducción de quinonas y la fotólisis de la molécula de agua. Las proteínas extrínsecas de 33, 23 y 16 kDa intervienen, sobre todo la primera, en la estabilización del proceso de la fotólisis del agua. De

hecho en cianobacterias sólo se da la proteína de 33 kDa. Estas proteínas extrínsecas unen específicamente átomos de Ca^{2+} y Cl^- , esenciales durante la fotólisis del agua. El centro de reacción del fotosistema II ha sido aislado y purificado de varias plantas superiores y su composición proteica está formada por los péptidos D2, D1, subunidades (y (del Cyt b559 y el producto del gen *psbI* en una proporción estequiométrica de 1:1:1:1:1. El contenido en cofactores más probable correspondería a 6 Chl, 2 feofitinas (Pheo), 2 (-carotenos y 2 citocromos (Cyt) b559 por centro de reacción. Variaciones a esta estequiometría pueden darse dependiendo del método de purificación utilizado.

Una vez que una molécula de Chl es excitada por la luz, el excitón resultante migra de una forma muy eficiente hacia el centro de reacción, en donde excita al P680 que libera un electrón a una Pheo (molécula de Chl sin el átomo de Mg central), denominándose, por lo tanto, donador y aceptor primarios, respectivamente. La Pheo así reducida cede el electrón a Q_A y ésta a su vez a Q_B , que son plastoquinonas y constituyen los aceptores secundarios de electrones del fotosistema II. La plastoquinona Q_B , doblemente reducida, deja el centro de reacción y se dirige al "pool" de plastoquinonas reducidas de la membrana fotosintética para interactuar posteriormente con el complejo b_6f . Tanto las quinonas Q_A y Q_B como el átomo de Fe no hemínico del lado aceptor se pierden durante la purificación del centro de reacción. El P680 en estado oxidado recibe un electrón de la Tyr161 (componente Z) presente en la proteína D1, siendo a su vez reducida por los electrones procedentes del agua y almacenados en el cluster de Mn. El cluster de Mn del lado donador del centro de reacción se cree que está activamente involucrado en el proceso de extracción y almacenamiento de los electrones del agua. Ya que la reducción de P680^+ consume un único electrón, se necesitan cuatro ciclos de óxido-reducción para liberar una molécula de oxígeno a partir de dos moléculas de agua. Actualmente el concepto de un enzima específico, que cataliza la fotólisis del agua, diferente del centro de reacción, está definitivamente desterrado, siendo el lado aceptor del propio centro de reacción el encargado de llevar a cabo dicha función fundamental en biología vegetal. En situaciones de estrés, en las que el sistema de fotólisis del agua no funciona debidamente, otros componentes del centro de reacción pueden actuar de donadores de electrones del P680^+ ya que éste, debido a su elevado potencial redox, no puede permanecer largo tiempo en estado oxidado sin degradarse irreversiblemente. Entre los donadores de electrones alternativos cabe destacar el (-caroteno, Chl monoméricas, Cyt b559 y un componente aún no bien caracterizado que podría corresponder a una His. La naturaleza ha diseñado todos estos mecanismos para proteger al P680, molécula clave en todo el funcionamiento del fotosistema II.

El fotosistema II es también la diana de muchos herbicidas, metales pesados y del fenómeno de la fotoinhibición. Los herbicidas actúan reemplazando Q_B de su sitio de acción, paralizando así el transporte electrónico más allá del fotosistema II y provocando, por lo tanto, la muerte de la planta. La utilización intensiva de estos herbicidas ha dado lugar a la aparición de ecotipos resistentes a estos herbicidas con los consiguientes problemas para los cultivos. Los metales pesados pueden actuar tanto en el lado aceptor como en el donador, dependiendo del tipo y concentración. El fenómeno fotoinhibitorio aparece en situaciones de exceso de luz y puede darse tanto en el lado aceptor como en el donador,

aunque sus mecanismos de acción son muy distintos. En ambos casos, el resultado final es la degradación del centro de reacción que será reemplazado por otro de nueva síntesis. La proteína D1 es el péptido más sensible a la fotoinhibición (y una de las de mayor "turn-over" en la naturaleza), dando lugar a productos de degradación específicos. Algunos metales pesados, como el Cu^{2+} cuando actúa en el lado aceptor, acelera drásticamente el proceso fotoinhibitorio ya que estimula la formación de radicales de oxígeno como el radical hidroxilo, altamente tóxico.

... la luz en un sistema de reacción...
... el que se produce...
... el centro de reacción...
... la proteína D1...
... el metal pesado...
... el radical hidroxilo...

Fotomorfogénesis en condiciones naturales: su control vía fitocromos

E. Simón

*Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Fisiología Vegetal,
Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 645, 08028 Barcelona*

La luz no tan solo suministra la energía que precisan las plantas para su funcionamiento sino que actúa también como señal ambiental que condiciona la forma de la planta al controlar su crecimiento y desarrollo. Como tal señal ambiental, varía en cuanto a duración, intensidad, dirección y calidad, aspectos todos ellos percibidos por las plantas, las cuales han desarrollado sistemas muy sofisticados para captar y responder específicamente a dichas variaciones. Un claro ejemplo de esta sofisticación es la complejidad fisiológica del sistema fitocromo, familia de fotorreceptores presente en casi todo el reino vegetal y responsable de la mayor parte de las respuestas fotomorfogénicas en plantas superiores. Se trata de un grupo de cromoproteínas fotoconvertibles por la luz, que poseen el mismo cromóforo pero difieren, en un 50-70 %, en su parte proteica (fitocromos A, B, C, D, E), y que están codificadas por una familia de genes divergentes, de los que se conocen por lo menos cinco en *Arabidopsis*.

La intensa investigación de los años 70 y principio de los 80 estableció las bases de las características físico-químicas y fisiológicas del fitocromo, en especial del fitocromo abundante en plantas etioladas, que hoy conocemos como fitocromo A (Phy A) y dejó claro que su acción fisiológica estriba en la fototransformación, probablemente por isomerización alrededor del C15 entre los anillos C y D con el subsiguiente reajuste de la interfase cromóforo-proteína. Esta fotoconversión establece una determinada proporción del fitocromo considerado activo (Pfr) respecto al total, o sea un estado fotoestacionario concreto del que dependen los distintos tipos de respuesta. Muy recientemente la implicación de Pr, forma considerada inactiva, en el control de la germinación añade complejidad al sistema.

Desde que en 1989 se establece la existencia de distintos fitocromos, se ha obtenido importante información sobre el fitocromo B (Phy B), estable a la luz y abundante en plantas verdes. Sin embargo, se desconoce casi todo de los restantes fitocromos, aunque se piensa que Phy C podría ser también estable a la luz. Actualmente se intenta establecer que tipo de fitocromo es el responsable de las distintas respuestas fisiológicas y como puede explicarse la complejidad de los sistemas de respuesta que se desencadenan en condiciones de irradiación muy diversas (VLFR, LFR, HIR). La obtención de mutantes y plantas transgénicas es de especial ayuda en este aspecto.

Por otra parte, las respuestas fotomorfogénicas tienen rendimientos cuánticos elevados, a menudo superiores a uno. Hay pues un mecanismo de amplificación en estrecha relación cuantitativa con el fotoproducto inicial. En este aspecto hay evidencia de la participación del Ca^{2+} en la transducción de respuestas dependientes del fitocromo. La fosforilación de proteínas dependiente de luz roja también se ha demostrado en varios sistemas. Recientemente, se ha propuesto un modelo de transducción para Phy A con tres vías diversificadas a partir de proteínas G, con participación de cGMP, de Ca^{2+} y cGMP, y de Ca-calmodulina.

En condiciones naturales, los fitocromos son responsables de la captación y respuesta al grado de sombreado y detección de la proximidad de vecinos, así como de aquellos procesos que dependen de la duración del tiempo de iluminación. En el primer caso, las variaciones ambientales modifican la proporción entre la luz roja y roja lejana del medio lo que se traduce en variaciones del estado fotoestacionario del fitocromo que desencadenan respuestas proporcionales al mismo.

El segundo grupo de respuestas implica dos procesos simultáneos: distinción luz/oscuridad y medida del tiempo de iluminación. Un ejemplo clásico lo constituye la inducción fotoperiódica de la floración, otro de menor complejidad los movimientos foliares de las Leguminosas. En estos casos, los fotorreceptores interactúan con un oscilador endógeno circadiano responsable de la medida del tiempo. Ello implica una sincronización con el ambiente externo.

Los movimientos foliares, rítmicos y nictinásticos, son un sistema especialmente útil para estudiar esta interacción pues reúnen en un mismo órgano, el pulvínulo, los componentes del oscilador, los fotorreceptores involucrados y los elementos transductores, condicionando una respuesta rápida y simple, básicamente dependiente de cambios de turgencia celular. No hay pues procesos de crecimiento y diferenciación implicados que dificulten la interpretación de la investigación. La estimulación fotoreversible del fitocromo(s) en distintos momentos del ciclo circadiano cambia la fase del ritmo circadiano, provocando adelantos y atrasos de hasta 12 h. con curvas de fase-respuesta de tipo fuerte. Este tipo de respuesta no parece atribuible a Phy A sino que dependería de Phy B o Phy C probablemente. Sin embargo, la interacción fitocromo-oscilador endógeno se da también en sistemas etiolados, tales como el fotocontrol de la nitratorreductasa (NR) en cotiledones de pepino, en los que puede probablemente intervenir Phy A. Nuestro grupo trabaja actualmente en la identificación del tipo de fitocromo involucrado en ambas respuestas: los movimientos foliares de Leguminosas y la actividad de la NR en cotiledones etiolados, así como en la identificación de los componentes de sus vías de transducción respectivas para comparar respuestas equivalentes y que, posiblemente, dependerían de distintos fitocromos.

O aumento do CO₂ na atmosfera e a fotossíntese - o carbono como substrato e como regulador da actividade fotossintética

M.M.Chaves

*Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia,
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa codex*

O aumento de CO₂ na atmosfera leva em geral a um acréscimo da actividade fotossintética das plantas C₃ no curto prazo devido a uma maior disponibilidade de CO₂ no cloroplasto. Frequentemente, a longo prazo, o estímulo da fotossíntese desaparece devido a processos de aclimação que levam a um aumento da eficiência do uso dos recursos ou alternativamente, devido a respostas indirectas ao decréscimo relativo nas disponibilidades dos outros nutrientes. Com efeito, a fotossíntese das plantas C₃ em condições de luz saturante está normalmente limitada pela capacidade da RuBPCarboxilase-oxigenase consumir RuBP na fixação do CO₂. Um enriquecimento em CO₂ na atmosfera aumenta a taxa de consumo da RuBP em relação à sua produção, podendo a Rubisco tornar-se excessiva relativamente à capacidade de produzir RuBP. Nessas condições, as plantas podem aclimatar-se reduzindo o investimento em Rubisco e aumentando o investimento nos processos que suportam a regeneração de RuBP e de Pi. Por outro lado, um desequilíbrio entre a produção fotossintética em condições de CO₂ elevado e a capacidade de utilização dos fotoassimilados produzidos, pode levar a uma aclimação com redução no teor dos componentes do aparelho fotossintético, permitindo assim reequilibrar as capacidades de fixação e de utilização do carbono. A base bioquímica para a aclimação ao CO₂ elevado, a velocidade a que ocorre essa aclimação e a existência de diferenças inter-específicas, são questões ainda não totalmente esclarecidas. Pensa-se, no entanto, que a acumulação de açúcares observada nas folhas sob condições de CO₂ elevado pode desempenhar um papel importante na regulação da actividade fotossintética, como por exemplo, na repressão da expressão génica de enzimas do ciclo de Calvin (Sheen, 1994). Existem também indicações recentes de que o transportador de Pi no cloroplasto, a sacarose P sintase (SPS) e a PEPcarboxilase, não estando presentes em excesso na célula, podem contribuir para a limitação da fotossíntese das plantas cultivadas a CO₂ elevado (Riviere-Rolland et al, 1996). Discute-se ainda a hipótese de parte dos efeitos observados em plantas cultivadas em CO₂ elevado, como por exemplo o decréscimo de azoto nos tecidos, não reflectir uma aclimação ao CO₂ mas ser simplesmente o resultado de uma aceleração do crescimento. Deste modo, comparando plantas de tamanho equivalente essas diferenças deixariam de se observar. Para além do cloroplasto, também os estomas respondem ao aumento do CO₂ na atmosfera; a sua resposta a longo prazo é, no entanto, ainda mal conhecida.

Um outro aspecto a considerar diz respeito à resposta fotossintética ao aumento de CO₂ na atmosfera em interacção com outros stresses ambientais. Discutem-se resultados que apontam para uma acrescida resistência do aparelho fotossintético aos stresses característicos do verão Mediterrânico, designadamente elevada temperatura e deficiência hídrica, como resultado do crescimento em atmosfera enriquecida em CO₂ (Faria et al, 1996).

Faria, T, Wilkins, D., Besford, R.T., Vaz, M., Pereira, J.S. and Chaves, M.M. (1996) *J exp. Bot.*, 47, 1755-1761
Riviere-Rolland, H., Contard, P. and Betsche, T. (1996) *Plant, Cell and Environment*, 19, 109-117
Sheen, J. (1994) *Photosynthesis Research*, 427-438

SIMPOSIO S2:

**Membranas: Aspectos Moleculares
del Transporte Iónico**

Papel de las H^+ -ATPasas de plasmalema y tonoplasto y del antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto en la respuesta de las plantas al estrés por NaCl

J.P. Donaire

*Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas,
Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C.,
Profesor Albareda 1, 18008 Granada*

Un objetivo importante en el campo de la Agrobiología es el estudio de la tolerancia de las plantas a la salinidad, factor que interfiere el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos, al determinar el rendimiento y calidad de las cosechas. Para minimizar dicho problema, se han utilizado estrategias de tipo agronómico, las cuales se basan en el control del contenido de agua en el suelo, estrategia de alto coste económico, o de tipo biológico, que utilizan el potencial genético de muchas especies vegetales, con el objeto de seleccionar aquellas más resistentes. Sin embargo, el éxito obtenido por el momento ha sido escaso, debido, por una parte, a la complejidad de las características de la tolerancia, que ha resultado ser multigénica, y, por otra parte, a lo poco que se conoce de los mecanismos últimos fisiológicos, bioquímicos y moleculares responsables de la sensibilidad y tolerancia a dicho factor.

Cuando las plantas son expuestas a un estrés por NaCl, tienen lugar cambios osmóticos, iónicos y nutricionales, siendo vital para la normalización del metabolismo y el crecimiento de la planta, el restablecimiento de las condiciones de homeostasia iónica celular, es decir, la adaptación a la sal. De aquí, que de las estrategias utilizadas por la mayoría de las especies halófitas y glicófitas frente a la salinidad, especial importancia tengan aquellas cuya función es regular la absorción y compartimentación intracelular de los iones predominantes en el medio externo. Ello relaciona estas respuestas con el transporte a nivel de las membranas intracelulares, y, muy especialmente, con las bombas primarias de H^+ (H^+ -ATPasas), ubicadas en el plasmalema y tonoplasto, como determinantes de la capacidad de controlar el transporte y acumulación de Na^+ y Cl^- , al proveer la energía necesaria para el mantenimiento de las condiciones osmóticas, iónicas y nutricionales idóneas para el óptimo funcionamiento celular.

En función de estos hechos, objetivo primario de este trabajo ha sido la descripción de las características y propiedades bioquímicas de las H^+ -ATPasas de plasmalema y tonoplasto y del transportador secundario, antiporte Na^+/H^+ , de tonoplasto de raíces de plántulas de girasol, desarrolladas en medios diferenciales de NaCl.

El enzima H^+ -ATPasa de plasmalema (EC 3. 6. 1. 35) pertenece a la familia de las P-ATPasa, con una única subunidad catalítica de aproximadamente 100 KDa, formando intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción, mediante enlace aspartil-fosfato, siendo por ello inhibible por ortovanadato, mientras que la H^+ -ATPasa de tonoplasto (EC 3. 6. 1. 3) es una V-ATPasa, que no sufre fosforilación durante la catálisis y, por tanto, es insensible al ortovanadato. En las fracciones del gradiente discontinuo de sacarosa enriquecidas en vesículas de plasmalema y tonoplasto de raíces de girasol, los aniones estimularon

significativamente la actividad del enzima de tonoplasto ($\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$), mientras que la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de plasmalema ($\Delta\text{Va-ATPasa}$) fue estimulada por los cationes y apenas por los aniones. Ambas enzimas, se inhibieron diferencialmente por DCCD, eritrosina B, DES y DIDS, mostrando la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de tonoplasto una mayor sensibilidad. El ATP fue el sustrato más efectivo para las dos $\text{H}^+\text{-ATPasas}$, con una alta dependencia por el Mg, una total inhibición frente al Ca, Co y Zn, y con curvas de saturación de tipo michaeliano frente a concentraciones de sustrato. La K_m para el Mg-ATP del enzima de plasmalema fue de 0.4 mM, presentando una actividad máxima a partir de 2 mM, a pH óptimo de 6.5, mientras que la H-ATPasa de tonoplasto mostró valores de K_m de 0.2 mM y actividad máxima a partir de 1 mM, a pH óptimo de 6.5-7.5.

En lo que respecta al efecto del NaCl sobre estos enzimas, las actividades fosfohidrolíticas total y basal sensibles a vanadato ($\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de plasmalema) se inhibieron por los tratamientos salinos, no afectándose el transporte de H^+ dependiente de ATP, en tanto que el tratamiento salino estimuló la actividad transportadora de H^+ correspondiente a la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de tonoplasto, sin cambios en la actividad fosfohidrolítica. La inhibición de la V_{max} del enzima de plasmalema por el NaCl, no se debió a un efecto sobre la cantidad de proteína antigénica, sugiriéndose un mecanismo de regulación por la sal, basado en la modulación metabólica de la actividad. Del mismo modo, la estimulación por el NaCl de la actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP en las vesículas de tonoplasto, tampoco se pudo relacionar con un incremento aparente de la síntesis del enzima $\text{H}^+\text{-ATPasa}$, al no haberse detectado cambios en la cantidad de proteína antigénica. El incremento observado en la actividad bombeadora de H^+ por el NaCl, sin incrementos proporcionales de la actividad fosfohidrolítica, podría deberse a un mejor acoplamiento entre el transporte de H^+ y la hidrólisis de ATP en presencia de la sal.

Los resultados de este trabajo también han definido la inducción específica por el NaCl de un sistema antiporte Na^+/H^+ en las vesículas de tonoplasto, acoplado al gradiente de pH generado por el enzima $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de dicha membrana. La mayor afinidad de la proteína antiportadora por el sustrato, al aumentar la concentración de NaCl en el medio de cultivo, sin cambios en la V_{max} , y el incremento significativo de la K_m para el Na^+ , en presencia de amilórido, un inhibidor competitivo del antiporte Na^+/H^+ , hace pensar en la regulación positiva del intercambio Na^+/H^+ por activación de una proteína preexistente.

En su conjunto, el estudio comparado llevado a cabo en este trabajo del efecto del estrés salino sobre los enzima $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de plasmalema y $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ de tonoplasto y sobre el antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto de raíces de girasol, permite sugerir que estos sistemas pueden estar implicados en la tolerancia de este cultivo al NaCl. Sin embargo, quedan interrogantes importantes por descifrar. Se refieren éstos, por una parte, a la identificación y caracterización de los determinantes de tolerancia relacionados con el eflujo, compartimentación y absorción de Na^+ en la célula, y, muy especialmente, de los genes que controlan la homeostasia iónica (aquellos que codifican para transportadores de K^+ ; para proteínas implicadas en el eflujo de Na^+ a través del plasmalema, vía un Na^+/H^+ antiporte o a través de una bomba de Na^+ análoga a la ENA de lavaduras; o para un polipéptido de 170 KDa, como probable constituyente del antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto, de gran interés para

la compartimentación del Na^+ en la vacuola), y, por otra parte, al hecho de que la capacidad genética para la adaptación de las plantas a la sal, debe incluir un apropiado y coordinado sistema de transducción de la señal de estrés, en el que una serie de moléculas (segundos mensajeros) regulen las proteínas envueltas en el transporte iónico o la expresión de los genes que las codifican.

Abreviaturas: DES – dietilestilbestrol; DCCD – N–N–díciclohexilcarbodiimida; DIDS – ácido 4,4–diisotocianatoestilbeno–2,2–disulfónico.

Trabajo financiado por la CICYT (Proyecto PB94–0118–C02–01).

Transporte de potasio en hongos y en plantas

A. Rodríguez-Navarro, M.A. Bañuelos, G. Santa-María y F. Rubio
Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos,
28040 Madrid

El potasio es el catión más abundante en las plantas y la carencia de potasio limita el rendimiento de los cultivos, lo que no es infrecuente porque la concentración de este catión en la solución del suelo puede ser muy baja, sobre todo en las proximidades de las raíces. Por estas razones, el estudio bioquímico de los transportadores que median en la absorción de potasio y el clonaje de los genes que los determinan son temas de interés científico y técnico. No obstante, la estructura compleja de la raíz, la existencia de vías redundantes para el transporte de potasio y la dificultades del proceso de aislar e identificar genes en plantas complican la consecución de estos objetivos.

Una alternativa al estudio directo del transporte de potasio en las raíces de las plantas es utilizar hongos o algas como modelos y como medio de expresión de los genes que los determinan. Hongos y algas comparten con las plantas la organización celular, en ocasiones los mismos nichos y, aunque lejana, tienen relación filogenética. Por ello, está fuera de duda que la ventaja en la aplicación de los métodos bioquímicos y de biología molecular en estos organismos compensa sobradamente los inconvenientes de una aproximación reduccionista. En esta comunicación se resumen los avances recientes en la bioquímica y la genética de los sistemas de transporte de potasio en hongos y en plantas.

El potasio neutraliza eléctricamente las cargas negativas del interior celular y su transporte a la célula tiene lugar en intercambio con protones. Este proceso tiene carácter despolarizante y se produce por acoplamiento eléctrico con el bombeo de protones, mediado por una ATPasa. Los genes que determinan esta ATPasa se han clonado en muchos hongos y bastantes plantas, en las que existe un número alto de genes repetidos que se expresan específicamente en tejidos determinados. El mecanismo exacto del acoplamiento eléctrico entre el bombeo de protones y el transporte de potasio es un simporte potasio-protón en *Neurospora crassa* y un mecanismo similar puede existir en plantas. No obstante, la determinación exacta del mecanismo y de otras características bioquímicas de los transportadores requiere el clonaje de los genes y su expresión en un sistema sencillo que permita su análisis aislado.

De todos los organismos eucariotas con pared, la genética del transporte de potasio se conoce de forma completa sólo en *Saccharomyces cerevisiae*. En este organismo existen dos genes *TRK1* y *TRK2* que determinan dos transportadores muy parecidos. *TRK1* explica todas las características notables del transporte y las cepas *TRK1 trk2* no tienen diferencias apreciables con una cepa silvestre. Sólo en los mutantes *trk1*, el transportador *TRK2* juega un papel importante, porque, aunque con escasa velocidad, *TRK2* es capaz de transportar potasio cuando el catión está en concentraciones bajas. Como consecuencia, los mutantes *trk1 trk2* son muy defectivos para el transporte de potasio, creciendo sólo a altas concentraciones del catión. Esta característica y el desarrollo de la genética molecular en *S. cerevisiae*

ha hecho de estos mutantes una herramienta clave para el clonaje de los genes de transporte de potasio de otros hongos, algas y plantas. Otros dos hongos, *Schizosaccharomyces pombe* y *N. crassa* tienen también transportadores de tipo TRK, aunque no se sabe si sólo de este tipo o junto con otros tipos de transportadores.

En *Schwanniomyces occidentalis* se ha caracterizado un transportador diferente, HAK1, con una afinidad muy alta para potasio y capaz de mantener una concentración interna de potasio siete órdenes de magnitud más alta que la exterior. La característica cinética más notable de este transportador, en comparación con los de tipo TRK, es su escasa discriminación entre potasio y rubidio. El transportador HAK1 muestra una homología alta con el transportador Kup de *Escherichia coli*, y transportadores de este tipo se han encontrado recientemente en otras bacterias.

Por complementación de mutantes *trk1* o *trk1 trk2* de *S. cerevisiae* con genotecas de cDNA de plantas, construidas en vectores de expresión en levadura, se han aislado dos tipos diferentes de cDNAs capaces de complementar estas mutaciones. Los primeros en aislarse, *KAT1* y *AKT1*, determinaban canales rectificadores de entrada de potasio. El primero de ellos probablemente media la entrada de potasio en las células oclusivas del estoma, en tanto que el otro se expresa en la raíz. La función del canal de la raíz no se conoce, pero parece claro que no puede mediar la entrada de potasio que tiene lugar a bajas concentraciones del catión. El otro tipo de cDNA (*HKT1*) determina un simporte sodio-potasio, que discrimina muy fuertemente entre potasio y rubidio, y que, por ello, no es fácil que se corresponda con el transportador de alta afinidad de las raíces de plantas. La función exacta de este simporte sodio-potasio no se conoce.

Suponiendo que efectivamente plantas y hongos comparten los mismos transportadores, se han buscado sistemas de plantas homólogos a los TRK y HAK. Los transportadores TRK quizás no existan en las plantas, pero los transportadores de tipo HAK están ampliamente representados y probablemente cuatro y cinco genes que codifican isoformas de este transportador están presentes en cada especie. Al menos dos transportadores de tipo HAK se expresan en la raíz y uno de ellos es probablemente el transportador de alta afinidad conocido como Sistema I de Epstein.

Una aproximación electrofisiológica al transporte iónico en el plasmalema

J.A. Fernández, M.J. García-Sánchez y M.A. Heredia

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, Campus de Teatinos S/N, 29071, Málaga

La bomba primaria del plasmalema de plantas superiores, la mayoría de algas verdes y hongos es una H^+ -ATPasa. Este enzima transporta protones hacia fuera de la célula consumiendo ATP que proviene del metabolismo respiratorio (Slayman, 1987). El movimiento unidireccional de cargas positivas, genera en las células vegetales una fuerte diferencia de potencial eléctrico, positivo fuera y negativo dentro de la célula, que se denomina potencial de membrana (E_m). La energía acumulada en el plasmalema por el transporte primario, electrogénico, de protones, se consume en el transporte secundario, electroforético, de iones, que puede ser *pasivo*, que tiene lugar a través de canales o *activo* a través de transportadores en los que los protones actúan como principal ion motriz.

Igual que en células animales, los potenciales de membrana en células vegetales se miden con electrodos de punta abierta. Se insertan en las células, tras romper la pared celular, mediante micromanipuladores de diverso tipo. La diferencia de potencial se mide con respecto a un electrodo de referencia que queda fuera de la célula. Ambos se conectan a un electrómetro de alta impedancia. Este se conecta a un sistema de almacenamiento de datos o a un registrador. El espécimen se sitúa en una cámara por la cual circula el medio de ensayo de forma continua. El circuito de circulación se dispone para que sea fácil el cambio de solución. La cámara se sitúa en la pletina de un microscopio para asegurarse un buen posicionamiento de los microelectrodos, así mismo, cuando no se necesita un tratamiento lumínico específico, se usa la luz del microscopio, cuya intensidad se calibra previamente, como fuente de luz en los experimentos.

Mediante el uso de determinados ionóforos, es también posible la medida de actividades iónicas intracelulares. La técnica se basa en situar en la punta de los microelectrodos una pequeña cantidad de un ionóforo selectivo para un determinado ión. El electrodo así fabricado es denominado *de punta cerrada* y, una vez dentro de la célula, mide el potencial eléctrico debido a la asimetría del ion al cual es sensible y al mismo tiempo el E_m . Una correcta medida de las actividades iónicas intracelulares implica la inserción, simultánea en la misma célula, de un microelectrodo de punta cerrada ($E_n^j + E_m$) y un microelectrodo de punta abierta (E_m). Mediante un electrómetro diferencial se restan las dos señales y se tiene por separado el E_m y el E_n^j . Este último se calibra con concentraciones (actividades) conocidas para el ión "j". La técnica de preparación y uso de microelectrodos ión selectivos puede encontrarse en Felle y Bertl (1986), Felle (1987, 1989, 1993 y 1994) y en Miller y Zhen (1991).

Los potenciales de membrana que pueden medirse en células vegetales pueden llegar a ser tan negativos como -260 mV. A diferencia de las células animales, el E_m de las células vegetales tiene dos componentes, uno metabólico, que se disipa en presencia de inhibidores de la respiración (Felle y Bertl, 1986) y de la H^+ -ATPasa y otro pasivo, potencial de

difusión (E_D) que puede predecirse mediante la ecuación de Goldman a partir de la asimetría dentro-fuera de la célula de la concentración de K^+ y en mucha menor medida de Na^+ (Felle, 1981).

Aunque el mantenimiento del Em en células vegetales depende del metabolismo respiratorio, el Em en células fotosintéticamente activas sufre cambios luz-oscuridad. Tras un tiempo en oscuridad, la luz provoca una hiperpolarización transitoria de las células y la oscuridad una despolarización transitoria (Denny y Weeks, 1970; Mimura y Tazawa, 1986; Felle y Bertl, 1986). Estos cambios son simultáneos a una acidificación del pH citoplasmático (pHc) en oscuridad y una alcalinización del pHc en luz (Felle y Bertl, 1986) que se producirían al detenerse o ponerse en marcha el consumo de CO_2 fotosintético.

Ya sea en luz o en oscuridad, el transporte secundario de solutos a través de transportadores activos, tiene una repercusión en el potencial de membrana, de forma que es posible detectar, y hasta cierto punto caracterizar, el funcionamiento de dichos sistemas de transporte siguiendo las hiperpolarizaciones o despolarizaciones que la adición de dichos solutos provocan en el Em. Así, se han descrito mecanismos activos de incorporación de K^+ en *Arabidopsis thaliana* (Maathuis y Sanders, 1994) NO_3^- en raíces de maíz (McClure et al., 1990) y en cebada (Glass et al., 1992) basándose en la despolarización del Em que provoca la adición de NO_3^- . Esta misma aproximación se ha usado para describir un sistema de transporte activo de fosfato en *Lemma gibba* G1 (Ullrich-Eberius, 1989), aminoácidos en *Riccia fluitans* (Felle y Johannes, 1990), y glucosa en el hongo marino *Dendryphie-lla salina* (Davies et al., 1990) entre otros.

La medida simultánea al Em de la actividad iónica intracelular hace posible identificar al ion motriz implicado en el mecanismo de transporte e incluso aventurar la estequiometría de los flujos de iones asociados. Tal es el caso del cotransporte H^+/Cl^- en pelos radiculares de *Sinapis alba*, descrito por Felle (1994) en el que se demuestra que la despolarización producida por la adición de Cl^- está acompañada por una acidificación transitoria del pHc. Del mismo modo se ha descrito un transporte activo de K^+ , impulsado por H^+ tanto en raíces de maíz (Newman et al., 1987), como en cebada (Walker et al., 1995). En todos los casos citados hasta ahora, el ion motriz involucrado en los sistemas activos de transporte es el H^+ , puesto que la H^+ -ATPasa del plasmalema acumula energía en forma de gradiente de potencial electroquímico para protones o fuerza protón motriz. Recientemente, no obstante, se han descrito sistemas de transporte activo de iones donde el ion motriz involucrado es el Na^+ . Tal es el caso del transporte activo de K^+ en distintas especies de *Chara* y *Nitella* (Walker y Sanders, 1991). El Na^+ parece ser el ion motriz de un sistema de transporte de alta afinidad en contraste con los sistemas impulsados por H^+ que tendrían una afinidad menor (Maathuis et al., 1996). El origen de la fuerza Na^+ motriz podría ser un sistema secundario de salida de Na^+ impulsado por H^+ .

Una aplicación novedosa de la electrofisiología clásica es el estudio del transporte de carbono inorgánico. Aunque existen algunos trabajos clásicos en los que se registran Em tras la adición de HCO_3^- (Denny y Weeks, 1970; Spanswick, 1970) y CO_2 (Lyalin y Ktitova, 1976), la gran variedad de mecanismos de deshidratación y transporte de carbono inorgánico en plantas acuáticas requiere una revisión del problema (Bowes, 1987). La

medida simultánea del Em y el pHc permite distinguir el transporte difusivo, eléctricamente silencioso de CO_2 del transporte electroforético, probablemente en contra de gradiente de HCO_3^- . Además la incorporación de CO_2 acidifica el pHc en contra de lo que ocurre con el transporte de HCO_3^- (Ballesteros et al., remitido). Medidas de control de tasas de fotosíntesis en las mismas condiciones en las que se realizan estas medidas, en presencia y en ausencia de inhibidores de la anhidrasa carbónica son imprescindibles para caracterizar dichos sistemas de transporte.

- Ballesteros D., M.J. García-Sánchez and J.A. Fernández. remitido. *J. Exp. Bot.*
- Bowes G. 1987. Pathways of CO_2 fixation in freshwater organisms. In: *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms* (W.J. Lucas and J.A. Berry, eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 187-210.
- Davies J.M., C. Brownlee and D.H. Jennings. 1990. *J. Exp. Bot.* 41(225): 449-456.
- Denny P. & D.C. Weeks. 1970. *Ann. Bot.* 34: 483-496.
- Felle H. 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 646: 154-160.
- Felle H. 1987. *J. Exp. Bot.* 38: 340-354.
- Felle H. 1989. *Plant Physiol.* 91:1239-1242.
- Felle H. 1993. *Bot. Acta.* 106: 5-12.
- Felle H. 1994. *Plant Physiol.* 106: 1131-1136.
- Felle H. & A. Bertl. 1986. *J. Exp. Bot.* 37(182): 1416-1428.
- Felle H. and E. Johannes. 1990. *J. Exp. Bot.* 41(226): 587-592.
- Glass A.D.M., J.E.Shaff and L.V. Kochian. 1991. *Plant Physiol.* 99: 456-463.
- Lyalin O. O. and I.N. Ktitorova. 1976. *Soviet Plant. Physiol.* 23: 261-268.
- Mathuis F.J.M. and D. Sanders. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:9272-9276.
- Mathuis F.J.M., D. Verlin, F.A. Smith, D. Sanders, J.A. Fernández and N.A. Walker. *Plant Physiol.* 112: 1609-1616.
- McClure P.R., L.V. Kochian, R.M. Spanswick and J.E. Shaff. 1990. *Plant Physiol.* 93: 281-289.
- Miller A.J. & R. Zhen. 1991. *Planta.* 184: 47-52.
- Mimura T. & M. Tazawa. 1986. *Plant Cell Physiol.* 27 (5): 895-902.
- Newman I.A., L.V. Kochian, M.A. Grusak and W.J. Lucas. 1987. *Plant Physiol.* 84: 1177-1184.
- Slayman C.L. 1987. *J. of Bioenergetics and Biomembranes.* Vol. 19 No. 1: 1-20.
- Spanswick R.M. 1970. *J. Membrane Biol.* 2: 59-70.
- Ullrich-Eberius C.I., A. Sanz and A.J. Novacky. 1989. *J. Exp. Bot.* 40(210): 119-128.
- Walker A.N. and D. Sanders. 1991. *Planta.* 1985: 443-445.
- Walker D.J., S.J. Smith and A.J. Miller. 1995. *Plant Physiol.* 108: 743-751.

SIMPOSIO S3:

**Fisiología Vegetal:
Agricultura y Medio Ambiente**

Biotechnología y tolerancia al estrés hídrico

C. Romero, M.C. Cutanda, A. Espinosa, C. Aguado, J.M. Bellés, R. Serrano y F. A. Culiáñez Macià

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-C.S.I.C., Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

La falta de agua es el mayor factor limitante en la productividad de las plantas de cultivo¹. Puesto que la tecnología para combatir la sequía suele ser extremadamente costosa², la obtención de especies que toleren mejor el estrés ocasionado por las condiciones climáticas adversas, ha constituido un objetivo prioritario en la mejora genética clásica. Junto a los métodos de mejora clásicos, el notable desarrollo de la bioingeniería molecular está permitiendo un aumento significativo en las perspectivas de mejora de muchas de las especies de interés agronómico. La adaptación celular al estrés osmótico (osmoregulación) es un proceso biológico fundamental que protege a los organismos contra el efecto letal de la deshidratación³, alterando la expresión génica y previniendo la pérdida de turgencia y el colapso celular ocasionado por el cambio de osmolaridad⁴. Tras descriptivos estudios iniciales, diversos genes han sido aislados y caracterizados en relación a su potencial contribución en la tolerancia al estrés osmótico. Entre los genes vegetales cuyo estímulo común es la pérdida celular de agua se encuentran los denominados *Lea*, de expresión abundante en las últimas etapas de la embriogénesis también inducida por el ácido abscísico^{5,6,7}. Los que codifican proteínas homólogas a la familia de proteínas de membrana MIP^{8,9}, a proto-oncogenes *Myb*¹⁰ ó a genes halotolerantes de levadura *Hal*^{11,12}. Los que participan en la síntesis de solutos compatibles de bajo peso molecular (osmolitos), entre los que se encuentran polioles como el manitol, aminoácidos como la prolina y azúcares como la trehalosa¹³. Plantas transgénicas que sobreexpresan muchos de estos genes, están siendo estudiadas en su tolerancia al estrés osmótico. Resultados preliminares están poniendo de manifiesto, especialmente en el caso de la biosíntesis de osmoprotectores^{14,15,16,17}, que esta bioingeniería metabólica mejora eficazmente la tolerancia al estrés osmótico de las plantas. Sin embargo, será necesario un extenso conocimiento del metabolismo vegetal, para prevenir posibles alteraciones fisiológicas no deseadas, antes de que esta tecnología pueda extenderse con éxito a la mayoría de especies cultivadas.

1. Le Rudulier et al., Science 224, 1064 (1984).

2. Downton, CRC Crit Rev Plant Sci 1, 183 (1984).

3. Morgan, Aust J Plant Physiol 18, 249 (1991).

4. Tomos, Water Sci Rev Cambridge University press, 186 (1988).

5. Dure et al., Biochemistry 20, 4162 (1981).

6. Marcotte et al., Cell 1, 969 (1989).
7. Goday et al., Plant Cell 6, 351 (1994).
8. Culiáñez-Macià and Martin, Plant J 4, 717 (1993).
9. Fray et al., Plant Mol Biol 24, 539 (1994).
10. Urao et al., Plant Cell 5, 1529 (1994).
11. Gläser et al., EMBO J 12, 3105 (1993).
12. Quintero et al., Plant Cell 8, 529 (1996).
13. Csonka and Hanson, Ann Rev Microbiol 45, 569 (1991).
14. Tarczynski et al., P Natl Acad Sci USA 89, 2600 (1992).
15. Kishor et al., Plant Physiol 108, 1387 (1995).
16. Holmström et al., Nature 379, 683 (1996).
17. Romero et al., Planta 200, 000 (1997).

Importancia de las micorrizas en nutrición de las plantas y en la recuperación y mantenimiento de ecosistemas

J. M. Barea

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos,
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Prof. Albareda 1, 18008 Granada, Spain*

La inmensa mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualística, con ciertos hongos del suelo dando lugar a las llamadas "micorrizas" ("hongo-raíz"). El hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, llegando a ser parte integrante de dicho órgano, en el que desarrolla un micelio extrarritral que, a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua del suelo. De hecho, la simbiosis se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de absorción de nutrientes de las plantas. A su vez, la planta hospedadora proporciona nutrientes orgánicos, así como un nicho ecológico protegido al hongo simbiote, heterótrofo. Se reconoce que las micorrizas juegan un papel clave en la supervivencia de las plantas y en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema. Se las encuentra prácticamente en todos los suelos y climas de la tierra. Sólo en unas pocas familias botánicas (Crucíferas, Quenopodiáceas y Ciperáceas) hay especies que no forman micorrizas.

Es lógico que la universalidad de esta simbiosis implique una gran diversidad en lo que concierne a la taxonomía de los hongos (y plantas) simbiotes. De hecho existen diferencias considerables en la morfología y fisiología de las micorrizas, lo que permite reconocer unos 5 tipos diferentes, entre ellos las micorrizas arbusculares, cuya importancia ecológica y económica está avalada por su presencia en más del 80% de las especies vegetales existentes. Entre otras, son plantas formadoras de este tipo de micorrizas las leguminosas herbáceas y muchas leñosas, los cereales, todos los frutales y otras de interés en hortofruticultura o en revegetación de suelos degradados.

En cuanto a la formación de micorrizas arbusculares, se sabe que esta simbiosis se inicia con la germinación de las esporas del hongo, o a partir de otras formas de propágulos, tales como fragmentos de raíz micorrizada, presentes en la mayoría de los suelos, procedentes de cultivos precedentes. El micelio activado penetra las células corticales de la raíz, formando estructuras intracelulares especializadas, llamadas *arbusculos*, en los que tiene lugar el intercambio de metabolitos entre el hongo y la planta. Las hifas del hongo se extiende posteriormente desde la raíz hacia el suelo, lo colonizan y exploran más eficazmente los microhabitats del mismo. A este tipo de micorrizas son a las que se refiere el presente estudio que, en adelante usará simplifícadamente el término "micorrizas". Con respecto a las claves del funcionamiento de las micorrizas, se puede decir que las hifas externas del hongo que se desarrollan en el suelo, constituyen un sistema capaz de absorber elementos minerales. Esta red de micelio se extiende varios cm desde la superficie de la raíz, por lo que las hifas actúan como "puentes" que superan la zona de "agotamiento" en nutrientes que rodea la raíz. Su función es crítica para la captación de nutrientes poco

móviles. Particularmente fosfato, amonio y algunos micronutrientes. Las hifas del hongo, en conjunción con otros microorganismos del suelo, contribuyen a la formación de agregados estables necesarios para mantener la calidad del suelo. La colonización interna de las raíces por los hongos micorrizógenos, junto con el aporte de nutrientes y agua del suelo, que lleva a cabo el micelio externo del hongo simbiote, dan lugar a cambios en la fisiología de la planta hospedadora. Tales cambios permiten que las plantas micorrizadas se desarrollen mejor y respondan a los estreses ambientales de forma diferente que las plantas no micorrizadas. Las acciones que llevan a cabo las micorrizas que resultan beneficiosos en los sistemas suelo-planta sostenibles, pueden concretarse en las siguientes: (a) Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento. Estas acciones se ejercen mediante la producción por el hongo y microorganismos asociados de hormonas, vitaminas y otras sustancias; (b) Incremento en el suministro/disponibilidad de nutrientes. Este efecto deriva del protagonismo de las micorrizas en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes; (c) Mejora de la estructura del suelo. Consecuencia de la contribución microbiana en la formación de agregados estables; (d) Protección de la planta frente a estreses bióticos y abióticos. Actividad que provoca un incremento en la planta de la resistencia/tolerancia a patógenos, salinidad, sequía, etc... Ello indica un papel importante de las micorrizas en el mantenimiento de agroecosistemas y ecosistemas naturales.

En cuanto a las aplicaciones prácticas de las micorrizas hay que establecer que, al ser los hongos de la micorriza simbioses obligados, no pueden completar su ciclo de vida salvo en simbiosis con la planta. Por ello los inóculos disponibles, aunque de contrastada calidad, son una mezcla de estructuras del hongo con el sustrato de crecimiento y/o restos de raíces etc. Ello hace que estos inóculos no sean practicables en cultivos arables y que sus aplicaciones se concentren en cultivos que llevan fase de transplante como práctica habitual. Así, se ha demostrado la efectividad de la inoculación con micorrizas en los cultivos siguientes: Cultivos hortícolas (lechuga, cebolla, ajo, esparrago, fresa, pimiento, tomate, leguminosas...); frutales y cultivos leñosos de regiones templadas (cítricos, manzano, ciruelo, cerezo, melocotonero, almendro, olivo, vid...); cultivos tropicales (café, papaya, aguacate, cacao, coco, mandioca, piña, platanera, té...); plantas ornamentales, etc... En cuanto a plantas de interés en revegetación y recuperación de suelos, se ha demostrado su eficacia en leguminosa leñosas (y herbáceas), actinorrizas, aromáticas-melíferas-medicinales (romero, tomillo, lavanda...), estudios que se extienden a sabinas y enebros, *Crataegus* sp., *Prunus* sp., *Pistacia* sp., *Taxus* sp. y otros representantes del matorral mediterráneo

Una mención especial merece la micorrización de material vegetal micropropagado. Dado que el cultivo *in vitro* exige el uso de medio y sustratos carentes de microbiota, las plántulas no tienen opción a micorrizarse, proceso que normalmente es indispensable a este material para poder superar el estrés asociado al transplante a condiciones *ex vitro*. El efecto y manipulación de las micorrizas en plantas micropropagadas ha sido recientemente analizado habiéndose demostrado efectos positivos de la micorrización.

En cuanto a los estudios sobre micorrizas y control biológico, se ha comprobado que la simbiosis pueden reducir el efecto de patógenos de la raíces, aunque el incremento en la resistencia/tolerancia no es generalizable ya que la efectividad varía con el hongo micorrí-

zico, el patógeno, el sustrato y las condiciones ambientales. Se dispone de algunos ejemplos que apoyan la reducción y en plantas micorrizadas de los síntomas de enfermedades causadas por hongos: *Phytophthora*, *Gaeumannomyces*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Aphanomyces*...; y por nematodos: *Rotylenchus*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne*. Parece recomendable utilizar conjuntamente micorrizas y otros agentes de control biológico, desarrollando así sistemas micorrizosféricos apropiados en una acción integrada (ciclado de nutrientes y protección para la planta). En este sentido hay interés en: bacterias, particularmente PGPR (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*) y en hongos (*Trichoderma*, *Gliocladium*...) habiéndose demostrado que estos agentes de control biológico que antagonizan hongos patógenos, no lo hacen, e incluso benefician a los hongos de la micorriza.

Con respecto a los mecanismos sugeridos para explicar el efecto de las micorrizas en control biológico de patógenos del sistema radical, se han sugerido los siguientes: Mejora de la nutrición de la planta, compensación de daños, competición por fotosintetizados, competición por sitios de colonización/infección, producción de cambios morfológicos y anatómicos en el sistema radical, inducción de cambios en las poblaciones de microorganismos en la micorrizosfera, activación de los mecanismos de defensa de la planta. La intervención real de cada uno de estos mecanismos es actualmente objeto de debate.

Un aspecto importante de las micorrizas deriva de sus efectos en la recuperación de ecosistemas naturales degradados. De hecho estudios previos en relación con las interacciones microbianas (micorrizas, *Rhizobium*, rizobacterias) han demostrado la factibilidad de su aplicación como componentes de las estrategias de revegetación para la lucha contra la desertificación. En este sentido se están llevando a cabo programas de investigación de acuerdo con los objetivos siguientes: (1) Lograr la regeneración del suelo, como consecuencia, de la restauración de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y del desarrollo de la vegetación adecuada (matorral natural) en "unidades-piloto" representativas de un ecosistema mediterráneo semiárido desertificado. (2) Establecer una cobertura vegetal diversificada y estable, de acuerdo con la sucesión natural. (3) Conocer el funcionamiento y dinámica del matorral restaurado que permita el progreso de la sucesión. (4) Retener el proceso erosivo, como medida de conservación del sistema (suelo-microorganismos-vegetación). (5) Desarrollar una tecnología transferible, aplicable a programas de revegetación, basada en el uso de material vegetal autóctono, producido por macro y/o micropropagación, con rizosferas/micorrizosferas optimizadas.

Los nitratos en agricultura de regadío: seguimiento y control

J.M. Villar¹, F. Ferrer¹, P. Villar^{1,2} y M. Arán²

¹Departamento de Medio Ambiente y Ciencias del Suelo, Universidad de Lleida,
Rovira Roure, 177, 25198 Lleida,

²Laboratorio de Análisis y Fertilidad de Suelos, Diputació de Lleida,
Partida Setsams, s/n, Sidamon

La agricultura ha transformado los sistemas naturales en sistemas agrícolas o agroecosistemas, que se caracterizan básicamente por no ser autosostenibles, por la falta de diversidad y por tanto de resistencia, muy dependientes del nivel de manejo y con unos objetivos productivos a corto plazo, que dificultan la adopción de prácticas de cultivo que tiendan a mantener la productividad a más largo plazo. (Stoskopf, 1981). El desarrollo científico y tecnológico ha favorecido un cambio importante en la forma en que la agricultura afecta al medio ambiente. El estudio de las actividades agrícolas nos proporcionará información con base científica para establecer las relaciones que se establecen con el medio ambiente tal como sugieren Briggs y Courtney (1991). La pérdida de calidad del suelo (degradación) empieza a ser un tema de preocupación científica. De acuerdo con la UNEP (1992) (citado por Bouma(1997)) un 23% de los suelos europeos están químicamente, físicamente o biológicamente degradados. Bouma (1997) cita como ejemplos de degradación química, el contenido excesivo de metales pesados, fertilizantes químicos y biocidas. La degradación física está causada por la erosión y la compactación, mientras que ejemplos de degradación biológica son la disminución en el contenido de materia orgánica y en biodiversidad. Las soluciones que adoptan los distintos países ante el impacto de actividades agrícolas son bien distintas según su nivel de sensibilización ante la problemática ambiental, la gravedad del problema, la disponibilidad y costo de tecnología, el nivel de conocimientos sobre los procesos más importantes en condiciones de campo o la disponibilidad de información de base. Mientras en California (EEUU) las aguas de drenaje desde las zonas de regadío son conducidas directamente al mar sin contaminar los ríos y sus deltas, en otras zonas desarrolladas, ante transformaciones de secano a regadío a principios del siglo XXI, esta idea ni tan siquiera llega a plantearse. Los efectos residuales por el uso de pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) y fertilizantes como fuente no puntual de contaminación de aguas subterráneas también son motivo de numerosos trabajos.

El estudio que se presenta es un ejemplo de como aplicar los conocimientos científicos y tecnológicos disponibles para estudiar y proponer prácticas de manejo que reduzcan el impacto de los nitratos en la agricultura de regadío. Se trata de mantener la productividad evitando el exceso de fertilización nitrogenada para reducir la presencia de nitratos. Se centra en las investigaciones llevadas a cabo desde 1993 sobre el uso de nitrógeno y su impacto en la productividad y el medio ambiente. Se inicia con un trabajo de seguimiento de parcelas comerciales de maíz (*Zea mays L.*) seleccionadas a partir de los tipos de suelos en la zona regable por los Canales d'Urgell (Herrero et al. 1993). Los agricultores contacta-

dos siembran un híbrido de maíz ampliamente utilizado en la zona, y utilizan las mismas técnicas culturales. La fertilización con abonos químicos la realizan según sus consideraciones con dosis que oscilan entre los 230 y los 350 kgNha⁻¹, aunque en la zona de estudio se llegan a utilizar dosis más elevadas. El nitrógeno se midió en los perfiles de suelo antes de la fertilización, mensualmente durante el desarrollo del cultivo y después de la cosecha. Así mismo, se han realizado muestreos periódicos de biomasa y del N absorbido durante el ciclo de cultivo. Durante dos campañas (1994 y 1996) se han realizado experimentos con un diseño en bloques al azar para ensayar la respuesta a diferentes dosis de nitrógeno.

Los objetivos y finalidades del estudio han sido diversos. En una primera fase ha interesado conocer la dinámica del nitrógeno en el sistema suelo-planta, la respuesta del cultivo a la aplicación de distintas cantidades de nitrógeno en las series de suelos más representativas y encontrar la forma de establecer recomendaciones de abonado nitrogenado objetivas en base al método del N-min, el cual toma en consideración el nitrógeno mineral presente en el suelo antes de la siembra. Desde el primer momento se han tenido en cuenta tanto las consideraciones económicas como las ambientales, y ello ha obligado a un seguimiento lo más exhaustivo posible del nitrógeno en forma de nitratos en el medio (suelo, planta y agua de riego).

La gran cantidad de información obtenida ha permitido calibrar y validar el modelo de simulación del crecimiento de cultivos CropSyst. Se trata de un modelo eminentemente mecanístico con una base fisiológica importante en la mayoría de los procesos, pero con las simplificaciones necesarias para permitir reducir el número de parámetros, lo que facilita su uso para aplicaciones prácticas a nivel de parcela.

Los resultados de las simulaciones realizadas con ayuda de los generadores meteorológicos han permitido evaluar para períodos de 30 años los rendimientos del maíz y las pérdidas de nitrógeno por lavado según condiciones de manejo y tipo de suelos. Aplicaciones de 200-250 kgNha⁻¹ garantizan los máximos rendimientos reduciendo substancialmente la contaminación de nitrógeno (Villar et al., 1996). Se ha ajustado una curva de respuesta a los datos simulados obteniéndose la dosis óptima de fertilizante N como una función del N-min (Ferrer et al, 1997). También se ha estudiado la presencia de nitratos en las aguas de riego ya que implica una reducción de las necesidades de fertilizantes nitrogenados. El agua de riego en la zona presenta una variabilidad enorme según su origen y su contribución a la nutrición de los principales cultivos también ha formado parte de los objetivos del estudio. En el caso del maíz, el riego con aguas de azarbe aporta entre un 15 y un 30% de la extracciones (Ferrer et al., 1997).

En la situación actual los resultados obtenidos nos permiten concluir que es posible utilizar el método N-min como base para las recomendaciones de fertilizantes nitrogenados en la zona, tal como ocurre en otros países europeos (Necteson, 1995), que mientras no se reduzcan en general los niveles de fertilización utilizados habrá que considerar los aportes por el agua de riego y que un uso adecuado de los modelos de simulación nos permite un mejor y más completo análisis de las opciones de manejo. No hay que olvidar la necesidad de conducir experimentos de campo y en condiciones controladas para estudiar aspectos agronómicos y fisiológicos que permitan la suficiente simplificación o adaptación de las

ecuaciones que describen los procesos. Ello permitiría el uso de modelos de manejo de cultivos con una gran fiabilidad y una mayor capacidad de dar respuesta a las necesidades actuales de la agricultura.

- Bouma J. 1997. *Soil Environmental Quality: A European Perspective*. J. Environ. Qual. 26:26-31.
- Briggs D. and F. Cortney. 1989. *Agriculture and environment*. Longman Scientific & Technical.
- Ferrer F., Villar J.M., Villar P., Arán M. and Stockle C.O. 1997. *Analyzing environmental side effects derived from applying recommended N fertilizer rates based on the Nmin method with a cropping systems simulation model*. 11th world fertilizer congress of CIEC. Gent. Belgium.
- Ferrer F., Villar J.M., Villar P., Arán M. 1997. *Impacto del nitrógeno presente en el agua de riego en la zona regable del Canal d'Urgell*. XV Congreso Nacional De Riegos. Lleida.
- Herrero C., Boixadera J., Danés R. y Villar J.M., 1993. *Mapa de Sòls de Catalunya 1:25.000. Full núm. 360-1-2 (65-28) Bellví*. Generalitat de Catalunya. DGPIA/DARP-ICC/DPTOP. 198 pp. + Mapa
- Neeteson J.J. 1995. *Nitrogen Management for intensively grown arable crops and field vegetables*. 295-325. In Nitrogen fertilization in the Environment. Marcel Dekker, Inc.
- Stoskopf N.C. 1981. *Understanding crop production*. Reston Publishing Company.
- Villar P., Stockle C., Villar J.M. 1996. *Long-term evaluation of corn yield and nitrogen leaching in the irrigated area of the Urgell's Channel, Spain*. European Society of Agronomy. 4th Congress. Wageningen. The Netherlands. 7-11 July. Book of Abstracts. 388-389.

COMUNICACIONES

Sección C1:

Agronomía y Silvicultura

Determinación del CHR a través de bandas extensiométricas

C. Pérez de los Reyes, A. Porras Piedra, M. L. Soriano Martín
U.C.L.M. Ciudad Real - España

Con fundamento en los principios de extensimetría, se ha desarrollado un sistema de determinación del contenido hídrico relativo (CHR) de una planta medido a través de la variación de la resistencia de una banda extensiométrica colocada en un sensor situado alrededor del tallo de la misma. Dicha variación emite una señal eléctrica que, debidamente amplificada, es recogida y procesada en un ordenador.

El estudio se ha realizado desarrollando las siguientes fases:

Diseño, construcción y ensayo de un sensor para determinación de la dilatación del tallo de la planta según el contenido hídrico.

Ensayo y toma de datos.

Análisis de resultados.

Programación automatizada del riego según las necesidades hídricas de la planta.

Entre las conclusiones obtenidas son de destacar las siguientes:

El sensor desarrollado permite establecer contacto con la planta y usar la señal eléctrica por él producida para iniciar y detener el riego automáticamente. Además tiene un precio reducido.

El diámetro de la planta disminuye al hacerla la humedad del suelo, llegando a un valor mínimo correspondiente al punto de marchitez permanente.

El diámetro de la planta aumenta al hacerla la temperatura. Esta influencia de la temperatura sobre el diámetro del tallo disminuye a medida que el suelo se seca.

Relaciones entre el rendimiento, sus componentes y diferentes índices de crecimiento en cultivos de secano de trigo y cebada

Campos, J.A.; López-Garrido, J y Cabrera, J.
Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria,
Universidad de Castilla-La Mancha, EUITA, Ciudad Real

Los cereales de invierno (trigo y cebada, fundamentalmente) pertenecen a ese reducido número de especies que pueden alcanzar rendimientos normales en las duras condiciones climáticas y edáficas de la llanura manchega. Durante 6 años (1990-1995) se ha estudiado el desarrollo y la fenología de estos cultivos y se ha realizado un exhaustivo análisis del crecimiento, siguiendo la metodología propuesta por el equipo de Ramos *et al* (1985). En total se han estudiado 112 parcelas distribuidas por distintas localidades de las provincias de Ciudad Real, Cuenca y Albacete en régimen de secano todas ellas y sin tener en cuenta otros factores de discriminación que no fueran el geográfico y el de régimen de secano.

Resulta de especial interés correlacionar la cosecha (Y) con los componentes del rendimiento (NEP= nº de espigas por planta; NPS = nº de plantas por m²; NES = nº de espigas por m²; NGE = nº de granos por espiga; PMG = peso de 1000 granos) y con los índices de crecimiento (LAI = índice de área foliar; CDW = materia seca por m²; 1/LAR = eficiencia fotosintética medida como materia seca dividida entre área foliar; LAD = duración del área foliar; G = eficiencia medida como cosecha dividida por la duración del área foliar) medidos en diferentes estadios fenológicos (1 = ahijado; 2 = encañado; 3 = espigado y 4 = antesis). La Tabla resumida de los coeficientes de correlación obtenidos es la siguiente:

	Y	NEP	NPS	NES	NGE	PMG
LAI3	0.825	0.530	0.566	0.706	0.541	0.350
CDW3	0.813	0.464	0.694	0.499	0.451	0.243
1/LAR3	0.414	0.432	0.205	0.242	0.288	0.237
LAD	0.623	0.521	0.549	0.645	0.471	0.386
G	0.508	0.302	0.464	0.645	0.690	0.376
Y	—	0.523	0.747	0.811	0.381	0.389

Los valores resaltados en negrita tienen un grado de confianza superior al 0.001

En este trabajo queremos resaltar que la cosecha (Y) ha obtenido los máximos valores de coeficiente de correlación con el LAI de espigado (LAI3), con materia seca de espiga-

do (CDW3) y con el nº de espigas por m² (NES), así como los bajos valores de correlación entre los índices que expresan la eficiencia fotosintética (I/LAR y G). También se destaca que los valores de correlación entre el peso de los granos (PMG) y la cosecha (Y) son muy bajos. Estos resultados concuerdan con los de por **J.M. Ramos** y **L. García del Moral** en los cultivos de secano de Andalucía en diferentes trabajos publicados en años precedentes.

Ref: Ramos, J.M.; García del Moral, L. y Recalde, L. (1985): "Vegetative growth of winter barley in relation to environmental condition and grain yield". *J. agric. Sci. Camb.***104**, 413-419

La siembra directa mejora la nutrición nitrogenada y el rendimiento en *Hordeum vulgare*

J.L. Lucena¹, L.M. Muñoz-Guerra¹, J.L. Tenorio²

¹Dpto. de Química Agrícola, Geología y Geoquímica,
Universidad Autónoma de Madrid

Ctra. N-607 Madrid-Colmenar Viejo, 28049 Madrid

²CRF-INIA Área Agricultura Sostenible,
Ap. Correos 8111, C.P. 28080

El fin de las prácticas agrícolas incluidas en la agricultura sostenible es la conservación del suelo y la minimización de la contaminación de origen agrícola, pero sin comprometer la imprescindible rentabilidad de la explotación agrícola. El ciclo del N es uno de los procesos más afectados por trabajos agrícolas como el tipo de laboreo o por la secuencia de cultivos realizada, por ejemplo influyen en la velocidad de mineralización de la materia orgánica, la composición del residuo de cosecha, la distribución de N en el perfil, o en los procesos de lixiviación, erosión y desnitrificación. El experimento que se presenta pretende la adecuación a nuestras condiciones edafoclimáticas de las técnicas de la "agricultura sostenible", el objetivo es conocer el efecto del tipo de laboreo y la secuencia de cultivos sobre dos aspectos fundamentales de la fertilidad del suelo: la materia orgánica y el ciclo del N. Además de investigar como se ve afectado indirectamente el desarrollo de la cebada (*Hordeum vulgare*) y su rendimiento final. Esta investigación está siendo desarrollada por un equipo formado por investigadores del I.N.I.A y del Dpto. de Química Agrícola de la U.A.M. Para conocer como afectan estas técnicas al rendimiento se estudió la incidencia sobre el sistema suelo-planta de distintas prácticas agrícolas (Distintos tipos de laboreo y secuencias de cultivos), tanto las tradicionales de la agricultura actual (laboreo tradicional, monocultivo) como las propuestas para conseguir un menor impacto medioambiental (laboreo mínimo, siembra directa, barbecho y rotación de cultivos). Este ensayo se inició en Otoño del 93 y continuará al menos 4 años, los datos aquí mencionados son del período Nov/93 - Jun/95.

Se planteó un diseño de bloques al azar, con dos factores independientes: tipo de labor y secuencia de cultivos. Los tres tipos de laboreo fueron el tradicional (L.T: usando el arado de vertedera, cultivador, rulo si es necesario y sin herbicidas), laboreo mínimo (L.M: arado chisel, cultivador, rulo si es necesario, y sin herbicidas), y por último la siembra directa (S.D: no se trabaja el suelo, se practica la escarda química). Se realizaron tres tipos de secuencias de cultivos: el monocultivo de cebada, barbecho-cebada, y veza-cebada. Además del análisis de parámetros característicos del suelo se cuantificó el rendimiento, nº espigas/tallo, tallos/m², nº granos/espiga, peso de 1000 semillas, biomasa total, biomasa no fotosintética, plantas/m², hojas/planta, IAF y altura. Estos parámetros están muy relacionados con la disponibilidad de N (siempre que no opere otro factor limitante). A continuación comentamos los resultados referentes al tipo de laboreo.

Las parcelas trabajadas mediante el L.T. y la S.D. dieron mayor rendimiento que las de L.M. Además sus plantas exportaron mayor cantidad de N, debido al mayor rendimiento mas que a mayores porcentajes de N en planta y grano. Se observa que de los tres componentes del rendimiento (espigas/m²), granos/espiga y peso de 1000 semillas) las mayores diferencias se producen en el n° de granos/espiga y en el n° de espigas/m², ambos parámetros son favorables para la S.D. y el L.T. en comparación con el L.M. En el caso del L.M. en el momento del espigado se contó el mayor n° espigas/m² de los tres tratamientos reduciéndose fuertemente al llegar a la madurez (34% de reducción respecto al inicio), en la S.D. (25%) y sobre todo en el L.T. (2%) las reducciones fueron sensiblemente menores. Igualmente en la madurez la biomasa (en gr. peso seco/m²) y el porcentaje de biomasa no fotosintética indican que al final del ciclo de cultivo las plantas de las parcelas de L.M. están sufriendo una carencia de N en comparación con la S.D. y el L.T. (en ambos casos se observa mayor biomasa y menor biomasa no fotosintética que en el L.M.). Tras el análisis de estos datos sobre el desarrollo de la planta y conocer los resultados sobre los contenidos iniciales y finales de N en el suelo se llega la conclusión de que el L.T. y la S.D. no han aportado mas nitrógeno, sino que se lo han proporcionado a la planta mas adecuadamente que el L.M. Pero el L.T. produce importantes perdidas de N del suelo, puede comprometer su disponibilidad futura y facilitar la contaminación de las aguas con nitratos.

Influencia de extractos húmicos en la germinación y crecimiento de rye-grass

M.C. G. Asenjo, J.L. González y J.M. Maldonado

Dpto. de Biología Vegetal y Ecología (Fisiología Vegetal) y Dpto. de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba,
14071 Córdoba

La finalidad del trabajo fue estudiar la influencia del extracto húmico obtenido de turba, estiércol de ovino y compost de residuos sólidos urbanos sobre la germinación y el crecimiento de rye-grass (*Lolium multiflorum*), con objeto de obtener resultados de referencia para el uso de estos mismos abonos en cultivos agrícolas. La extracción de sustancias húmicas se llevó a cabo por el método de Kononova and Bel'chikova (1961).

En las pruebas de germinación, empleando distintas diluciones de los productos, se observó que dosis mayores del 20% inhibían la germinación de semillas, por lo que en un primer ensayo en cámara de cultivo se emplearon dosis de fertilizante del 20% y del 10%, junto a un control que se regó con solución nutritiva. La dosis del 20% producía efectos adversos en el crecimiento de las plantas, por lo que en un segundo ensayo se usaron dosis de extracto del 10% y del 5%, y además se alternó un riego con extracto (o solución nutritiva en el caso del control) y otro con agua destilada. Tras realizar un primer corte, se continuó regando únicamente con agua destilada para observar el efecto residual de los distintos abonos. Se hizo un tercer ensayo en las mismas condiciones.

Los análisis efectuados fueron: a) peso fresco; b) peso seco; c) contenido en N por el método Kjeldhal; d) contenido en P y K por espectrofotometría tras mineralización de las muestras (C.I.I.T.D.F., 1969) y e) pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) por espectrofotometría tras su extracción con acetona (H.K. Lichtenthaler, 1987).

Los datos de dichos análisis indican que los mejores resultados se consiguen con el estiércol, seguido de la turba y el compost. Las diferencias entre los tres tipos de fertilizantes fueron más notables que las observadas entre distintas dosis de un mismo fertilizante (10% y 5%).

C.I.I.T.D.F. (1969): Métodos de referencia para la determinación de elementos en vegetales. Anal. Edafol. Agrobiol. 28:409-430.

Kononova M.M. and Bel'chikova N.P. (1961). Rapid methods of determining the humus composition of soils. Pochvovedenie 10:75-79.

Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, Methods Enzymol. 148: 350-371.

Investigación financiada por el Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía (grupos CVI-0159 y RNM-0147) y el Ministerio de Educación y Ciencia a través de una beca de Formación de Profesorado Universitario a M.C. G. Asenjo.

Identificación y análisis genético en variedades frutícolas del género *Prunus* mediante marcadores RAPDs

B. Balaguer, R. Aznar *, E.P. Lorences **

Comercial Técnica y Viveros, S.A. (COTEVISA), L'Alcudia (Valencia)

*Dpto. Microbiología, Fac. CC. Biológicas, Univ. de Valencia

**Dpto. Biología Vegetal, Fac. CC. Biológicas, Univ. de Valencia

La diferenciación de variedades frutícolas por caracteres morfológicos o por sistemas isoenzimáticos no conduce, en la mayoría de casos, a una identificación inequívoca, debido en el primero de los casos, al limitado número de características morfológicas y en el segundo, a la falta de suficiente polimorfismo para discriminar entre variedades. Es más, en ambos casos la expresión de dichas características morfológicas se ve afectada tanto por factores propios del desarrollo de la planta como por factores ambientales. En los últimos años, se han desarrollado múltiples técnicas moleculares basadas en el DNA, tales como RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats), con las que se generan patrones característicos de variedad, a modo de "código de barras", que permiten estudiar la variabilidad genética e incluso identificar variedades frutícolas estrechamente relacionadas, es más, independientemente de factores ambientales, estadios de desarrollo o del tipo de tejido a analizar. Esto resulta de suma importancia para el sector viverista, dado que gran parte de su interés se centra en la adecuada catalogación y registro de las distintas variedades, de tal modo que la identificación de las mismas se realice de forma inequívoca asegurando así la exclusividad de las patentes.

El objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización e identificación de variedades frutícolas del género *Prunus* que actualmente se están produciendo y comercializando en la Comunidad Valenciana, mediante la aplicación de la técnica RAPD. Tras la extracción de los DNAs de las distintas variedades, se ha llevado a cabo la amplificación al azar de éstos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y cebadores de secuencia arbitraria (10 bases). Tras la separación de los fragmentos de DNA amplificados en geles de agarosa y su tinción en bromuro de etidio se han visualizado los patrones de bandas. Mediante un sistema de análisis de imagen se han registrado los perfiles así obtenidos, lo que ha permitido crear un banco de datos y comparar los "patrones RAPDs" de ensayos independientes.

Se han probado un total de 40 cebadores, de los cuales se han seleccionado los más adecuados para cada una de las especies analizadas, dando como resultado la obtención de patrones específicos y la diferenciación de casi la totalidad de las variedades estudiadas. Por un lado, dichos patrones constituyen el "código de barras" que identifica cada variedad, asegurando el origen de las mismas. Por otro lado, su inclusión en el banco de datos permitirá diferenciar variedades no registradas, y establecer las relaciones genéticas entre ellas.

Influencia de la adición de aminoácidos en los contenidos en clorofila de plantas de espárrago verde

R. Gámiz*, J.A. Espejo*, J.E. Castillo**, J.L. González***

* Consejo Regulador de la Denominación Específica del Espárrago de Huétor-Tájar (Granada)

** Dpto. de Producción Vegetal de la Universidad de Córdoba

*** Dpto. de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba

En el caso de las plantaciones andaluzas de espárrago verde, el final de la recolección (junio) se caracteriza por temperaturas elevadas, lo que origina que el espárrago muestre una brotación apreciable y que el turión no tenga suficiente calidad, dejándose ramificar para crear órganos portadores de clorofila. Se inicia con ello una actividad fotosintética intensa, que permite desarrollar no sólo un sistema aéreo voluminoso sino acumular reservas en el aparato radicular para la próxima cosecha. El objetivo del presente trabajo es estudiar como evolucionan las clorofilas de la parte aérea tras la aplicación de aminoácidos en el período de vegetación.

Las experiencias se desarrollan en el año 1994 en la D.E. Espárrago de HUETOR-TAJAR (Granada), seleccionando dos variedades distintas, UC-157 de gran implantación en la zona y variedad autóctona Morado de Huétor. Se estudiaron campos experimentales cada uno con las dos variedades indicadas, durante el año se efectuaron los tratamientos agroquímicos normales de la zona y al empezar el período vegetativo se iniciaron tratamientos foliares con SIAPTON cada veinte días, mensualmente se efectuó la determinación de clorofilas en cladodios, comparando los resultados con plantas sin tratamiento foliar de aminoácidos.

Los resultados apuntan a que independientemente del tratamiento o no con aminoácidos y de la variedad considerada, se producen descensos importantes de los niveles de clorofila a y clorofila b en los cladodios de esparraguera a lo largo del ciclo vegetativo, pasando de valores comprendidos entre 6.000-6.500 ppm de clorofila a y entre 2.500-3000 ppm de clorofilas b en la primera fecha de muestreo a valores entre 300-600 ppm y 200-400 ppm de clorofilas a y b respectivamente en la última fecha de muestreo, cuando la senescencia de la esparraguera es manifiesta. No obstante, en todos los casos se encuentran mayores valores para las plantas tratadas foliarmente con aminoácidos.

Diferencias varietales en la tolerancia a la salinidad en girasol

J.M. Quintero, M.C. Blanco y M. Benloch

Dpto. de Agronomía, E.T.S.I.A.M.,

Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba

Se considera al girasol como una especie moderadamente tolerante a la salinidad (Bowling y Ansari, 1971), dotada de mecanismos de exclusión de Na^+ que evitan la acumulación de dicho ion en la parte aérea (Lessani y Marschner, 1978). Se ha sugerido que la alta capacidad de discriminación del sistema transportador de K^+ en presencia de Na^+ , que presenta la raíz de girasol, pudiera estar relacionada con la tolerancia a la salinidad de dicha especie (Benloch y otros, 1994).

En el presente trabajo se ha analizado la respuesta a la salinidad de tres cultivares de girasol, cultivados en contenedores con suelo artificial, a los que se aportaba una solución nutritiva enriquecida, en los tratamientos salinos, con ClNa hasta una concentración de 50 mM.

Los resultados obtenidos indican que existe variabilidad en la tolerancia a la salinidad dentro de esta especie. La mayor tolerancia se ha observado que está relacionada con la mayor capacidad de evitación de la acumulación de Na^+ en el limbo de la hoja. Aunque los mecanismos de exclusión Na^+ más eficientes deben de estar localizados en la raíz, en este trabajo también se ha puesto de manifiesto que la acumulación de Na^+ en el tallo del girasol puede contribuir a la exclusión de Na^+ del limbo de la hoja.

Benloch, M., Ojeda, M. A., Ramos, J., Rodríguez-Navarro A. (1994). *Plant and Soil* 166: 117-123.

Bowling, D. I. F., Ansari, A. Q. (1971). *Planta* 98: 323-329.

Lessani, H., Marschner, M. (1978). *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 27-37.

Crioconservación de semillas de *Pinus nigra* y *P. sylvestris*

J.M. Pita, S. Barrero, F. Pérez García y A. Escudero

Departamento de Biología Vegetal, Escuela Universitaria de Ingeniería

Técnica Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad

Universitaria s/n, 28040 Madrid

Se ha estudiado el efecto de la conservación en nitrógeno líquido en la viabilidad de semillas de dos pinos ampliamente distribuidos en la Península Ibérica: *Pinus nigra* Arnold subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco y *P. sylvestris* L.

Para que se abrieran los conos y poder extraer fácilmente las semillas, se sometió a éstos a un tratamiento con calor (70°C). Las semillas se conservaron a baja temperatura (6°C) y en oscuridad hasta el momento de llevar a cabo los ensayos. Para comprobar si la humedad de la semilla influía en la técnica de crioconservación, la mitad de las semillas de cada especie se desecaron previamente en gel de sílice durante 60 días. Las semillas (desecadas y no desecadas) se introdujeron por inmersión en nitrógeno líquido (NL2, -196°C) y se conservaron durante 1 ó 30 días. Tras estos períodos de crioconservación, las semillas se sembraron en placas Petri de 7 cm de diámetro, sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con 3 ml de agua destilada. En cada ensayo, se utilizaron 4 repeticiones de 25 semillas cada una. Las semillas se incubaron a 25/15°C y fotoperíodo de 16 h de luz. Para cada especie y para cada combinación de desecación-conservación ensayada, se calculó el porcentaje de germinación a los 30 días de incubación de las semillas y los días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (T50).

Los resultados obtenidos muestran que la crioconservación parece no afectar a la viabilidad de las semillas de las dos especies de pinos estudiadas. Así, se alcanzaron porcentajes finales de germinación muy elevados en todos los ensayos realizados (80-90%, para *Pinus sylvestris* y 82-94%, para *P. nigra*), no presentando diferencias significativas con los de las semillas empleadas como control. Los valores de T50 de las semillas previamente desecadas fueron, en general, más elevados que los de las semillas no desecadas.

El contenido de humedad de las semillas es uno de los factores más críticos a tener en cuenta en las técnicas de crioconservación. De tal manera que, tanto contenidos elevados como muy bajos, se traducen en pérdidas drásticas de la viabilidad de las semillas. En nuestro caso, debido al tratamiento con calor utilizado para extraer las semillas de los conos, el contenido de humedad de éstas siempre fue bajo (6-7%). Los resultados obtenidos indican que estos contenidos de humedad son los adecuados para evitar una pérdida significativa de viabilidad, por lo que no es necesario la desecación de estas semillas en gel de sílice antes de su crioconservación.

Por tanto, la crioconservación, sin un desecado previo de las semillas, se puede utilizar como un método económico y práctico para la conservación a muy largo plazo de las semillas de estas dos especies de pinos.

Caracterización isoenzimática de 46 líneas puras de guisante (*Pisum sativum*) procedentes del noroeste de la Península Ibérica

M. Varela**, A. M. de Ron*, J. Hernández-Nistal**

* Misión Biológica de Galicia - Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**Departamento de Biología Vegetal, Universidad de

Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo

La importancia de la especie *Pisum sativum* radica en su alto valor nutritivo, sus múltiples usos y su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Es además una de las leguminosas más interesantes como fuente de proteína para la alimentación animal. Su cultivo es tradicional en Galicia, donde el agricultor utiliza normalmente variedades locales que presentan adaptación al medio, pero el rendimiento y la calidad de grano obtenidos son muy variables, debido a que las poblaciones locales suelen ser mezcla de líneas puras.

En 1987 la Misión Biológica de Galicia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC, Pontevedra) comenzó la prospección y recolección de germoplasma autóctono (Ron et al., 1994). Este material fue evaluado durante varios años para conocer sus características y la posibilidad de utilizarlo en futuros programas de mejora.

El objetivo del presente trabajo es conocer la diversidad genética del material por medio del estudio del polimorfismo isoenzimático, como complemento de la información obtenida a partir de los caracteres agronómicos. Para dicho propósito, se evaluaron 46 líneas puras de guisante procedentes de la selección realizada en 15 variedades locales que fueron evaluadas durante la campaña 94-95. En el estudio se emplearon las técnicas estándar de electroforesis en gel de almidón, adaptadas al género *Pisum* por Przybylska (1986) y Cooke (1983). Los sistemas isoenzimáticos determinados fueron Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT), Peroxidasa (PEX), Fosfoglucoisomerasa (PGI), Superóxido Dismutasa (SOD), Ácido Fosfatasa (ACP) y Diaforasa (DIA).

El revelado de algunas de las isoenzimas permite determinar que líneas consideradas puras no lo son, lo que se pone de manifiesto por la presencia en ellas de individuos isoenzimáticamente distintos. Puede ser por alguna mezcla de semilla debido a un error humano o bien porque al ser el guisante una planta con un pequeño porcentaje de alogamia, haya existido algún cruzamiento en generaciones anteriores.

La isoenzima que presenta mayor variación es GOT, por tanto es la que resulta más interesante como marcador genético para estudiar la variabilidad existente. Por el contrario, no se observa ninguna variación en el revelado para las isoenzimas Peroxidasa, Superóxido Dismutasa, Ácido Fosfatasa y Diaforasa.

Cooke, R.J. 1983. The characteristics of *Pisum sativum* L. (partim)(field pea) cultivars by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. National Institute of Agricultural Botany 16: 213-220.

Przybylska, J. 1986. Identification and classification of the *Pisum* genetic resources with the use of electrophoretic protein analysis. Seed Sci. & Technol. 14: 529-543.

Ron, A.M.de, J.M. Amurrio, N. Barcala. 1994. Colección de variedades de guisante de la Misión Biológica de Galicia (CSIC). Actas de Horticultura 12: 157-160.

Biodiversidad en poblaciones de *Quercus rotundifolia* y *Quercus faginea*

P. Pérez-Bermúdez, L. del Castillo Agudo*, M. Costa, I. Gavidia,
J. Segura y P. Soriano

Departamento de Biología Vegetal y Departamento de Microbiología (*),
Universidad de Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n,
46100 Burjasot

El presente trabajo es una primera aproximación al conocimiento de la variabilidad genética en *Quercus rotundifolia* y *Quercus faginea*, y sus objetivos fueron:

1) Establecer, mediante la técnica de PCR y la generación de marcadores RAPD, el tipado genotípico de táxones de estas especies integrados en diferentes asociaciones de carrascales y quejigares. 2) Determinar las relaciones filogenéticas para cada una de las especies, tanto a nivel intrapoblacional como interpoblacional.

Los árboles de ambas especies se seleccionaron en poblaciones uniformes existentes en distintos pisos bioclimáticos, en ocho estaciones de estudio que comprenden nueve poblaciones dentro de la Comunidad Valenciana y áreas colindantes.

Para la extracción y purificación del ADN de hojas de carrasca y quejigo se emplearon los métodos de Stewart y Via (1993) y Del Castillo Agudo y col. (1995). En ensayos preliminares realizados con muestras de ADN de ambas especies se evaluaron 60 oligonucleótidos como cebadores (Operon series A, B y C), siendo finalmente seleccionados OPA-2, OPB-10 y OPC-8. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. Estos tres cebadores produjeron un total de 44 bandas en *Q. faginea* y 49 en *Q. rotundifolia*. El número de bandas por oligonucleótido y especie varió entre 4 y 15, con un tamaño entre 0.39 Kpb y 2.80 Kpb. Los patrones de bandas de cada individuo fueron comparados intra e interpoblacionalmente. Tanto las matrices de similaridad, considerando simultáneamente en cada individuo el número total de marcadores obtenido con los distintos oligonucleótidos, como los dendrogramas correspondientes a las mismas fueron generados por el paquete estadístico SPSS/PC+.

***Quercus rotundifolia*.** La variabilidad genética intrapoblacional de carrasca es muy elevada, con un polimorfismo que varía entre un mínimo del 64.7 % en la población de Morella 1 y el 83.3 % en la población de L'Avellá. Dicha variabilidad también es apreciable al considerar las medias de los coeficientes de similaridad de las distintas poblaciones de carrasca, la población más homogénea es Gandía (0.63 ± 0.11) y la mayor heterogeneidad se ha detectado en L'Avellá (0.37 ± 0.09). Este último resultado no es especialmente sorprendente dado que esta población presenta individuos con profundas diferencias morfológicas. Tales diferencias reflejan probablemente la existencia de hibridaciones y/o introgresiones de mayor o menor grado entre *Q. ilex* y *Q. rotundifolia*.

***Quercus faginea*.** La variabilidad genética de los quejigos es muy elevada, e incluso superior a la observada en las poblaciones de carrasca. El polimorfismo oscila entre un 59.4 % en la población de Rubielos y un 90.5 % en la población de Morella 2, datos que son corroborados por sus coeficientes de similaridad (0.60 ± 0.01) y (0.26 ± 0.12), respecti-

vamente. Es importante destacar que dicha variabilidad genética no se corresponde con variaciones morfológicas apreciables entre los táxones analizados de esta especie.

Inicialmente se consideró la posibilidad de que el estudio realizado permitiera una caracterización genética ligada a la presencia de carrascas o quejigos en un determinado piso bioclimático. Los resultados obtenidos no permiten alcanzar conclusiones definitivas en este sentido.

Dada la frecuencia de hibridaciones e introgresiones que presentan las especies del género *Quercus*, podría ser de gran interés realizar estudios comparativos de caracteres genéticos y morfológicos, o bien utilizar éstos para llevar a cabo una selección de muestras que analizadas genéticamente pudieran ofrecer datos acerca del flujo genético interespecífico.

Del Castillo Agudo L, Gavidia I, Pérez-Bermúdez P, Segura J (1995) *Bio Techniques* 18: 766-768.
Stewart CN, Via LE (1993) *BioTechniques* 14: 748-749.

Investigación subvencionada por Institució Valenciana d'Estudis i Investigació (Proy. 073/002)

Efecto del herbicida MON 37588 en diferentes especies de cereales

M. Villarroya, M.C. Chueca y J.M. García-Baudín

Area de Protección Vegetal, CIT-INIA, Carretera de La Coruña Km. 7, 28040 Madrid

El *Bromus diandrus* Roth., adventicia de los cereales de otoño-invierno(1), ha experimentado un fuerte incremento en estos cultivos debido fundamentalmente al desarrollo del laboreo de conservación junto a la falta de eficacia de los herbicidas empleados en los trigos y cebadas.

El MON 37588, herbicida perteneciente al grupo de las sulfonilureas de reciente introducción en los trigos, tiene una buena eficacia contra diversas especies adventicias del género *Bromus* (2) y gran selectividad en los cultivares de trigo ensayados (3).

En este trabajo se estudia la respuesta de diferentes especies de cereales y de *Bromus diandrus* Roth., con el fin de buscar un ensayo rápido y sencillo, para la evaluación del efecto de dicho herbicida en estos cultivos.

Los ensayos se realizaron en medio de crecimiento líquido nutritivo Hewitt en cámara ($24\pm 1^\circ\text{C}$ (luz), $14\pm 1^\circ\text{C}$ (oscuridad), 16 horas luz, $75\pm 5\%$ de humedad relativa e iluminación de $110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) con los cultivares Antón de trigo duro (*Triticum turgidum* L.), Anza de trigo blando (*Triticum aestivum* L.), Petkus de centeno (*Secale cereale* L.), Barbarrosa de cebada (*Hordeum vulgare* L.), Trujillo de triticale (*S. cereale* L. X *T. turgidum* L.), HT 322 de tritordeum (*H. chilense* L. X *T. turgidum* L.), Previsión de avena cultivada (*Avena sativa* L.), además de la adventicia *Bromus diandrus* Roth.

Las plántulas, en estado 12 de la escala de crecimiento de Zadoks, fueron sometidas durante 24 horas a diferentes dosis de herbicida. Se realizaron 5 repeticiones de 5 plantas cada una por dosis, con dos repeticiones en el tiempo.

Se analiza la inhibición del crecimiento del peso fresco de la parte aérea de las plántulas respecto al testigo calculándose la DI_{50} . Se comprueba la diferente respuesta de las especies de cereales y de *Bromus* estudiados que van desde un $DI_{50}=0,07$ ppm para *Bromus diandrus* Roth. hasta $DI_{50}>4$ ppm para los trigos.

(1) GARCIA-BAUDIN, J.M. (1984) EWRS Sym. on Weed Problems in the Mediterranean Area Oeiras (Portugal) 2: 389-396.

(2) PARRISH, S.K., KAUFMANN, J.E., CROON, K.A., ISHIDA, Y., OHTA, K. y ITOH, S. (1995) Brighton Crop Prot. Conf. Weeds, 1: 57-63.

(3) GEIER, P.W. y STAHLMAN, P.W. (1996) Weed Technology, 10: 870-875.

Efectos de los plaguicidas sobre el crecimiento *in vitro* en el género *Lactarius*

*M. Marín, *L. García, *M. Ibarra, I. Pardo y S. Ferrer

*Comercial Técnica y Viveros, Apdo. Correos 92, 46250 L'Alcúdia, València
Dept. Microbiología i Ecología, Univ. de València, 46100 Burjassot, València

Las especies del género *Lactarius* son hongos ectomicorrízicos, algunas de sus especies forman los cuerpos fructíferos conocidos como níscalos o rebollones, de alto interés económico y culinario en nuestro país. Las micorrizas que forman estos hongos son estructuras simbióticas formadas entre la raíz de una planta vascular y un hongo micorrízico. Esta simbiosis ayuda al desarrollo de la planta, al aumentar la superficie de absorción de las raíces y a protegerla frente a ataques de patógenos; ayudando a mejorar la tasa de supervivencia en las reforestaciones.

En la producción de plantas para reforestación, es práctica habitual durante la fase de vivero la utilización de herbicidas y fungicidas. Por esta razón, se ha testado la sensibilidad *in vitro* de estos hongos ectomicorrízicos frente a plaguicidas de uso común en vivero. Se han empleado productos con diferentes materias activas y modo de actuación, tanto sistémicos como de contacto. Interesaba aquellos que cumplieran mejor su función y que además no fueran nocivos para la micorriza.

Las especies del género *Lactarius* estudiadas fueron: *Lactarius deliciosus*, *L. hepaticus*, *L. sanguifluus* y *L. chrysorheus*. En la especie *L. deliciosus* se estudiaron tres cepas diferentes y en el resto solo una cepa. Estos hongos ectomicorrízicos fueron cultivados en medios de cultivo sólidos con diferentes concentraciones de cada uno de los herbicidas y fungicidas utilizados, llevándose a cabo un seguimiento del crecimiento micelial de cada especie frente a su crecimiento sin plaguicida, así como el rendimiento micelial final obtenido en cada uno de los casos. En la mayoría de los casos, el efecto inhibitor de los herbicidas sobre los hongos ectomicorrízicos es mayor que el efecto producido por los fungicidas. Se ha observado que alguno de los plaguicidas estudiados estimula el crecimiento respecto al control en alguna de las dosis estudiadas. Se ha encontrado variabilidad de respuesta a los plaguicidas entre las diferentes especies de *Lactarius* estudiadas, así como, dentro de las cepas de *L. deliciosus*.

Efecto del paclobutrazol y del etileno sobre el crecimiento en vivero de *Quercus ilex* y *Q. suber*

*L. García, *M. Ibarra, *M. Marín y M. Pardos

*Comercial Técnica y Viveros, Apdo. Correos 92, 46250 L'Alcúdia, València
CIFOR-INIA, Area de silvicultura y mejora, Ctra.de la Coruña Km. 7,5, 28040 Madrid

El control de un excesivo desarrollo vegetativo en planta forestal durante la fase de vivero puede reflejarse en un descenso en las marras producidas durante la plantación, tanto debido al mayor endurecimiento que se produce durante su crecimiento como a una disminución en la relación tallo/raíz, lo que indica una mayor superficie de absorción por unidad de longitud de tallo. Para controlar el crecimiento en el cultivo de *Q. ilex* y *Q. suber* se ha decidido ensayar el uso de diferentes reguladores de crecimiento durante la fase de vivero, en concreto de Paclobutrazol y Etileno.

Los triazoles son un grupo de fungicidas sistémicos que en determinadas concentraciones muestran un efecto de reguladores del crecimiento. Uno de estos triazoles es el retardante de crecimiento Paclobutrazol, (PP 333) (2RS, 3RS) - 1 - (4 - Clorofenil) - 4,4 - dimetil - 2 - (1,2,4 - triazol -1- il) pentán - 3- ol, que inhibe específicamente los tres pasos en la oxidación del precursor de las giberelinas ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico. El paclobutrazol actúa como inhibidor del crecimiento en numerosas plantas y ya desde 1979 se viene utilizando para regular el crecimiento y favorecer la fructificación en frutales. Paclobutrazol es el ingrediente activo del **Cultar (ICI)** y presenta la posibilidad de ser usado tanto en aplicación foliar como inyectado en suelo; las dosis según el método de aplicación varían sensiblemente, y sobre todo en función de las especies. El producto es asimilado por la raíz y a través de las cutículas de las hojas, siendo transportado por el xilema en sentido ascendente.

Asimismo hay experiencias del uso del etileno como regulador del crecimiento sobre diferentes especies. Su aplicación es posible mediante Ethephon, comercializado bajo el nombre de **Ethrel 48 (ETISA)**. El modo de acción del ethephon $C_2H_6O_3PCl$ o Ac. 2-cloroetilfosfónico es mediante su descomposición en Etileno. Este ya se ha revelado como uno de los mas fuertes reguladores de crecimiento en plantas y sus efectos son muy variados, según dosis de empleo, variedad, y sobre todo, época y momento fisiológico de aplicación.

La siembra se realizó a cielo abierto y las aplicaciones se realizaron dos meses después de realizada ésta, cuando la altura media de las plantas era de 2-4 cm. Los tratamientos se han realizado mediante aplicación vía foliar (con adición de mojante) a razón de 1 y 2.5 cm³/l en el caso del Cultar y de 1 y 2 cm³/l en el caso del etileno. El volumen de aplicación fue de 300 l/Ha.

Realizadas las mediciones al final del periodo vegetativo, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas tanto para *Q. ilex* como para *Q. suber* en cuanto a altura de las plantas en el tratamiento realizado con Cultar, y no así en el de Etileno. Analizada la concentración de clorofila en hoja, no se han apreciado ningún tipo de diferencias.

Métodos fiables y eficaces para el análisis de la composición polisacáridica de residuos de origen vegetal*

D. Rodríguez, P. Portela y P.P. Gallego

Lab. Fisiología y Biotecnología Vegetal, Fac. Biología-CC del Mar,
Universidad de Vigo, E-36200, Vigo

En la localidad de Lourizán (Pontevedra) se ubica una fábrica de pasta de papel que utiliza como materia prima madera de *Eucalipto globulus* Labill. Las aguas residuales generadas en las distintas etapas de producción se someten a una serie de procesos de depuración con objeto de reducir su carga contaminante. En la actualidad, esos procesos incluyen primeramente un tratamiento biológico de baja intensidad en un sistema seriado de lagunas para la eliminación de los efluentes de condensados y de blanqueo, seguido de un tratamiento en la Estación de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) junto a los efluentes de producción, donde los residuos sólidos son concentrados y prensados recibiendo el nombre de pasta residual (PR).

Las grandes cantidades de pasta residual (5-9 t/día) obtenidas tras los procesos de depuración de efluentes constituyen una compleja problemática ambiental. Así a la gran cantidad de espacio necesario para su almacenaje, se une la falta de métodos adecuados para su reutilización, siendo habitual su utilización en la nivelación de terrenos o su incineración. No obstante, estos residuos ricos en polímeros estructurales de origen vegetal, constituyen un recurso de gran interés biotecnológico, pudiéndose utilizar como complemento para la alimentación animal, en la producción de disolventes orgánicos, etc. En colaboración con las áreas de Bioquímica y Biología Animal, hemos llevado a cabo una biotransformación de estos residuos mediante procesos de vermicompostaje, siendo la PR acondicionada con purín de cerdo (PC), empleado como fuente de nitrógeno.

Los objetivos de este trabajo han sido: i) la puesta a punto de métodos fiables y eficaces para el análisis de la composición polisacáridica de estos residuos de origen vegetal y ii) caracterización de los polisacáridos. Para ello, muestras de PR, PC y una mezcla de ambos (4:1; p:p) denominada mezcla inicial (MI), se homogeneizaron en etanol 80% con objeto de favorecer la precipitación de los polisacáridos constituyentes. El homogenizado se hidrolizó químicamente en medio ácido en diferentes condiciones A: 3 h a temperatura ambiente y 2'5 h a 100°C; B: 1 h a temperatura ambiente y 1 h a 121°C; C: 3 h a temperatura ambiente y 1 h a 121°C y D: 1 h a temperatura ambiente en baño de ultrasonidos y 1 h a 121°C. Los resultados obtenidos mostraron grandes diferencias entre los contenidos estimados en azúcares totales para la PR en los cuatro métodos. Así, mientras con el método A se obtuvieron 500 µg de azúcares por mg de fracción polisacáridica, en B, C y D se consiguieron incrementos con respecto al anterior del 52, 60 y 95%, respectivamente. La MI se comportó de forma similar a la PR, con incrementos con respecto al método A del 52, 55 y 72%. Por su parte, las muestras de PC respondieron más homogéneamente a los distintos tratamientos hidrolíticos, con cantidades que oscilaron entre 300-370 µg/mg. La comparación de estos resultados demostró que el método D era el más eficiente para conseguir una

hidrólisis total de los polisacáridos. La caracterización de los polisacáridos en cuanto a su origen celulósico o no celulósico, mostró que el 85 y 80% de la PR y MI respectivamente, se correspondían con los primeros, mientras que en el PC los polisacáridos constituyentes fueron al 50% no celulósicos y celulósicos. El análisis posterior, mediante cromatografía de gases, nos ha permitido la determinación de la composición monosacáridica de dichos polisacáridos, comprobándose que el mayor componente de la PR es la celulosa y por tanto, que más que un residuo, la PR es un subproducto claramente reutilizable.

*Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT (BIO-0336).

Análisis de residuos de origen vegetal de la industria vitivinícola. Composición de la uva de Albariño*

R. Rodríguez y P.P. Gallego

Lab. Fisiología y Biotecnología Vegetal, Fac. Biología-CC del Mar,
Universidad de Vigo, E-36200, Vigo

La enorme producción de residuos, y sobre todo su acumulación, lleva consigo una progresiva degradación del Medio Ambiente. Estos residuos pueden provenir de cualquier actividad pero, desde un punto de vista de reutilización industrial, los más importantes son los denominados "biomasa residual", por cuanto son generados año a año (López Sastre et al., 1994). Entre ellos, los residuos agrarios adquieren especial relevancia, debido a la gran actividad agrícola de nuestro país. En este trabajo, nos centramos en el análisis de residuos de origen vegetal que genera la industria vitivinícola.

Generalmente se conoce como bagazo al residuo sólido que resulta del prensado de la uva blanca, y constituido por raspones, hollejos y pepitas. Dado que tras cada vendimia se producen grandes cantidades de estos residuos sería recomendable su aprovechamiento (combustible, fuente de aceite o alcohol, fibra vegetal, etc.) más que su pobre utilización como abonos o material combustible. Para saber cual puede ser el método mejor y más económico de utilización del mismo, hemos realizado un análisis cuantitativo del bagazo producido de la uva de Albariño.

El análisis del bagazo puso de manifiesto que es la pepita el principal componente de este residuo (39%), mientras que el hollejo representa el 34% y el raspón el 26%. Estos datos apuntan a diferencias importantes con respecto a estudios previos realizados sobre otras variedades de uva (López Sastre et al., 1994), lo que nos permitiría ajustar a este caso concreto de uvas de Albariño, la utilización de un método para su biotransformación diferente del empleado en esas otras variedades. A continuación, se ha realizado la determinación del porcentaje de fibra total o alimentaria de los mismos siendo el contenido en raspón del $13.22 \pm 2.77\%$; hollejo $9.93 \pm 0.57\%$ y pepita $37.51 \pm 1.75\%$. Estos resultados de nuevo revelan diferencias con estudios previos realizados en otras variedades (Igartuburu et al., 1987), y abren una vía para su utilización como fuente de fibra vegetal.

En la actualidad se está llevando a cabo una serie de estudios de caracterización de estos materiales para establecer su riqueza en proteínas, grasas, carbohidratos totales, y otros productos de creciente interés tales como resveratrol, taninos, etc...

Igartuburu, J. M., Martínez, G., Montiel, J.A., Pando, E., Rodríguez-Luis, F. (1987). Azúcares y fibra de subproductos agrícolas. I. Azúcares y fibra en la semilla de uva Palomino. Aceites y Grasas 38: 220-223.

Igartuburu, J. M., Massanet, G.M., Montiel, J.A., Pando, E., Rodríguez-Luis, F. (1987). Azúcares y fibra de subproductos agrícolas. II. Azúcares y fibra en el hollejo de uva Palomino. Aceites y Grasas 38: 323-324.

López Sastre, J.A., Coca, P.L., Paunero, A. (1994). La utilización de los residuos de la industria vitivinícola en Castilla y León. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Valladolid.

*Este trabajo ha sido financiado por la Exma. Diputación de Pontevedra (CO-019-96) y la Universidad de Vigo (64102C506).

Propagación vegetativa de *Colutea*

E.F. de Andrés¹, J. Alegre², J. Sánchez¹, M. Manzanares¹, J.L. Tenorio¹ y L. Ayerbe¹

¹Area de Agricultura Sostenible, CRF-INIA. Apdo. 1045
28800-Alcalá de Henares (Madrid)

²SIA. Finca "El Encín", Apdo. 127, 28800-Alcalá de Henares (Madrid)

Estamos realizando una evaluación de distintas procedencias geográficas de leguminosas arbustivas del género *Colutea* para su utilización en la revegetación de zonas agrícolas abandonadas y, en general, la recuperación de terrenos marginales y degradados. Estos arbustos se caracterizan por su capacidad de crecimiento en suelos pobres y su adaptabilidad en climas semiáridos fríos, unidos a un alto valor forrajero. La producción de grandes cantidades de plantas de *Colutea* a partir de semillas es dificultosa, debido a que el material de partida es escaso, las semillas presentan una alta incidencia de plagas y sus porcentajes de germinación son bajos. Así, estamos estudiando la propagación vegetativa de *Colutea*, con el fin de conseguir un método para poder propagar las variedades que sean seleccionadas según distintos criterios: resistencia a la sequía, alta productividad, calidad forrajera, etc.

Iniciamos el estudio sobre la propagación vegetativa en dos especies del género *Colutea*: *C. arborescens* y *C. istria*, teniendo en consideración distintos factores: tipo de estaquilla, época de recogida de la estaquilla, condiciones de humedad ambiente durante el ensayo, tratamiento hormonal con ácido indolbutírico (IBA) e incisiones en la zona basal de la estaquilla.

C. arborescens presentó una alta capacidad de enraizamiento, con un porcentaje de enraizamiento medio de 65-70 %. De los resultados obtenidos para el porcentaje de enraizamiento podemos decir que había un descenso en el potencial de enraizamiento de las estaquillas desde la base hasta el ápice de las ramas, las estaquillas tratadas con IBA enraizaban mejor y las condiciones de humedad no afectaban al potencial de enraizamiento de la estaquilla.

C. istria mostró una capacidad de enraizamiento menor, con un porcentaje de enraizamiento medio entre 20-30 %. El potencial de enraizamiento fue mayor en las estaquillas provenientes de la zona media-apical de los ramos recolectados en otoño, sin embargo el porcentaje de enraizamiento fue mejor en las estaquillas de la zona media-basal de los ramos recogidos en invierno. Comprobamos que el tratamiento con IBA, condiciones de alta humedad e incisiones en la zona basal de la estaquilla favorecían el enraizamiento de las estaquillas de *C. istria*.

Para conocer el estado de desarrollo de las plantas producidas estudiamos los siguientes parámetros: número de raíces, longitud de las mismas, peso fresco y seco de las raíces y peso fresco y seco de la parte aérea. En *C. arborescens* utilizando estaquillas basales tratadas con IBA y un ambiente de alta humedad, conseguimos unas plantas más desarrolladas y en óptimas condiciones para su trasplante. Para *C. istria* conseguimos los mejores resultados cuando tratamos a las estaquillas con IBA, hicimos incisiones basales y realizamos el ensayo en condiciones de alta humedad.

Influencia de diversas técnicas de control de competencia herbácea sobre la producción de biomasa de *Pinus halepensis* Mill.

S.Hernando, C. Lamsfus, E. Eraso*, P.M. Aparicio

Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona (Navarra)

* Departamento de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Gobierno de Navarra

El uso de herbicidas como método de control de la competencia herbácea en las repoblaciones forestales **no está** muy difundido en España. Las causas de la escasa utilización pueden buscarse en la **baja** selectividad de los productos utilizados, en **el desconocimiento** de dosis y épocas de aplicación, degradabilidad de los productos y una **escasa** diferencia entre la ejecución mecánica y química (Serrada, 1995). El éxito de la forestación de terrenos agrícolas recientemente abandonados está comprometido por la **densidad** de la vegetación adventicia. La homogeneidad fisiográfica de **este** tipo de terrenos **hace que** sean adecuados para la experimentación de estos productos.

En este trabajo se muestran los resultados de la producción de biomasa de *Pinus halepensis* Mill. transcurrido un año desde su plantación sobre un terreno agrícola del Valle Medio del **Ebro**. Se ensayaron tres técnicas de control de la vegetación competidora: empleo de **aperos** tradicionales como el cultivador agrícola, **acolchado plástico** de una casilla de 60 x 60 cm alrededor de cada planta y aplicación de hexazinona en una dosis de 2 kg/ha, herbicida **selectivo** para coníferas. **Estos** tratamientos se combinaron con tubos invernadero y la adición de un polímero acumulador de agua en el hoyo de plantación.

Los tratamientos con acolchado plástico se han mostrado **ineficaces en el control** de las malas hierbas, lo que ha **afectado negativamente** al desarrollo longitudinal y **producción** de biomasa **aérea en las plantas de pino**. El herbicida ha controlado la **vegetación** de forma muy efectiva **no detectándose diferencias** en cuanto al crecimiento respecto a los tratamientos en los que **se** pasó el cultivador.

Se ha observado un etiolamiento de los pinos **crecidos** en tubos invernadero así como una ramificación anormal respecto al resto de los tratamientos.

Serrada, R (1995): Posibilidades de **utilización** de fitocidas **en actividades forestales**. Actas de la Sociedad Española de Malherbología. Huesca

Efecto de la humedad atmosférica en la productividad de cebada sometida a alta temperatura y sequía durante el llenado

J.L. García y M. Sánchez-Díaz

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y Farmacia,
Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona

Numerosos autores afirman que el descenso de la humedad relativa puede originar bien un aumento de la cantidad de agua transpirada, o bien cierre estomático, produciéndose en cualquier caso una disminución de la producción. Sin embargo, Dawson y Wardlaw (1989) y Tashiro y Wardlaw (1990) observaron que la baja humedad del aire en condiciones de temperatura alta ejercía un efecto beneficioso sobre el cuajado del trigo.

Con el fin de comprobar este efecto en la producción de cebada en condiciones de sequía, se han sometido plantas de la variedad *Camelot* a 3 tratamientos desde el momento de emergencia de aristas hasta el fin del ciclo: 1) 20°C y 0,9 kPa DPV (déficit de presión de vapor); 2) 30°C y 0,9 kPa DPV y 3) 30°C y 2,1 kPa DPV. En los tres casos se diferenciaron plantas bien regadas y en sequía, estas últimas se regaron diariamente de modo que la transpiración fuera 1/3 de la de las plantas bien regadas. Se determinó la biomasa y cosecha final, y se registró diariamente el consumo de agua y la fenología.

La cosecha total y la de la espiga principal, así como la producción total de biomasa disminuyeron con el aumento de temperatura. La disminución fue más acusada a 0,9 que a 2,1 kPa. Este efecto positivo del DPV alto fue más evidente en sequía que en condiciones óptimas de riego.

Con DPV bajo (0,9 kPa) se obtuvo un número de granos mucho menor, observándose también una disminución en el peso por grano, aunque menos intensa. Así mismo, en la espiga principal el cuajado disminuyó, y a nivel de toda la planta se desarrollaron menos espigas con grano.

La causa del descenso en el peso por grano a 0,9 kPa fue la menor tasa de llenado, siendo la duración del llenado similar a ambos DPV.

En plantas sometidas a sequía y elevada temperatura, la cantidad de agua transpirada fue la misma a 0,9 que a 2,1 kPa. Como consecuencia, la cebada mostró una eficiencia transpiratoria más elevada a 2,1 kPa que a 0,9 kPa. Puesto que no se dio limitación de CO₂, se sugiere un efecto combinado de la alta humedad relativa y elevada temperatura sobre la fotosíntesis y/o la respiración, posiblemente por una temperatura foliar más alta.

Dawson I.A., Wardlaw I.F. (1989). Australian Journal of Agricultural Research 40: 965-980.

Tashiro T., Wardlaw I.F. (1990). Australian Journal of Plant Physiology 17: 551-561.

Acclimatization of Woody Species: Chlorophyll Fluorescence as a Physiological Marker of Light Availability

L. F. Carvalho,⁽¹⁾ M. L. Osório,⁽²⁾ S. Amâncio⁽¹⁾

⁽¹⁾Dept de Botânica e Engenharia Biológica, ⁽²⁾Dept de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia, UTL, 1399 Lisboa

In vitro culture of plant tissues is made under controlled environmental conditions, in what concerns physical factors (temperature and light), hormonal, nutritious and sanitary factors. It is used, among other applications, in plant clonal propagation, which has countless advantages when compared to *in vivo* propagation. Nevertheless, a large number of *in vitro* produced plants doesn't survive when transferred to field growth conditions. It is necessary to submit them to an acclimatization period, defined as the natural process through which plants can adjust their physiological processes to the changing man-controlled environmental conditions. The manipulation of environmental factors (e.g. irradiance and photoperiod) has obtained good results, both in the reduction of the acclimatization time and in the increase of survival rates.

This trial tested the use of two light intensities ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) during a 6 weeks acclimatization period. Treatments were studied through growth analysis, chlorophyll content measurements and fluorescence parameters.

Chlorophyll fluorescence is an indicator of photosynthetic reactions that take place in the chloroplasts of green plants. The relationship between chlorophyll fluorescence and the mechanisms of photosynthesis have been widely studied since Kautsky discovered that fluorescence intensity in green leaves displays characteristic changes upon illumination (Kautsky effect). F_v/F_m reflects the maximum efficiency of electron transfer to the photosystem II (PS II). F_v'/F_m' indicates the efficiency of opened reaction centres. Genty parameter corresponds to a measurement of the yield of photosynthesis and can be obtained from the fluorescence in the steady state (F_s) and F_m' .

F_v/F_m presents a lower value at the end of the treatment which was submitted to a higher light intensity, which can show a lower efficiency of these leaves. Genty parameter shows significantly higher values on the lower light intensity treatment, which means that PS II yield is higher on this treatment. Light intensity also influences Chlorophyll quantity, which is higher on the lower light intensity treatment. Plants acclimatized at higher light intensity invest markedly on root formation on the first week of growth. This seems to indicate a slightly different early growth strategy, that is, at higher light intensity, plants seem to accumulate higher quantities of assimilates in the roots.

Efectos del Jopo (*Orobanche cernua*) sobre plantas de girasol (*Helianthus annuus L.*) cultivadas en macetas

E. Alcántara, J. Díaz, F. Perea y M. Díaz de la Guardia
Departamento de Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba,
Apdo 3048, 14080 Córdoba

El jopo (*Orobanche cernua* Loelf, sin. *Orobanche cumana* Wallr.) del girasol es una planta fanerógama parásita que se instala en las raíces de la planta de cultivo, nutriéndose de ella. Las variedades de girasol oleaginoso cultivadas en Andalucía eran resistentes al jopo, hasta la aparición de nuevas razas de jopo más virulentas que es la causa del incremento de esta enfermedad en los últimos años. No obstante, también existen ya algunos híbridos resistentes a las nuevas razas.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar algunos de los efectos que produce el jopo sobre el crecimiento, desarrollo y estado nutritivo de plantas de girasol cultivadas en macetas con una mezcla de arena y turba. Los tratamientos establecidos fueron: plantas infestadas o no con jopo y distintas dosis de N en la fertilización. En los tratamientos con jopo se mezclaron 50 mg de semilla de la planta parásita con el sustrato inmediatamente antes de la siembra del girasol. La fertilización se llevó a cabo mediante riego semanal con soluciones nutritivas completas que variaban en la concentración de N.

El método de infestación resultó efectivo, llegándose a alcanzar en algunos tratamientos hasta 100 jopos emergidos por planta. El jopo provocó una disminución del crecimiento y un retraso del desarrollo del girasol. Así, las plantas con jopo presentaron menor altura, debido a un acortamiento de los entrenudos, menor acumulación de peso seco en la parte aérea y menor diámetro del capítulo floral. Las hojas de estas plantas mostraron síntomas de clorosis y necrosis en los ápices y bordes que sugerían alteraciones nutritivas. El análisis foliar de elementos nutritivos mostró menores contenidos de K, Ca, Zn, Mn y Cu en las plantas con jopo que en las sin jopo. Se determinó también la concentración de K en dos zonas del tallo (una superior y otra inferior). Las plantas con jopo tuvieron menos K en tallo que las de Control. Estos resultados sugieren que la absorción de K por el jopo, procedente de la planta de girasol, es la causa del menor crecimiento de entrenudos de las plantas infectadas, ya que el K participa en el alargamiento de entrenudos (De la Guardia, M.D. y M. Benlloch, 1980, *Physiol. Plantarum* 49: 443-448).

La respuesta de crecimiento al aumento de la dosis de N fue positiva tanto para el girasol, con o sin jopo, como para el jopo.

Evolución estacional de parámetros hídricos y de intercambio gaseoso en una plantación de encina (*Quercus ilex* L.) micorrizada

M. Pardos¹, A. Royo², J.A. Pardos²

¹ Área de Selvicultura y Mejora Forestal, CIFOR-INIA, Ap. 8111, 28080-Madrid

² E.T.S.I. Montes, U.P.M., Ciudad Universitaria s/n, 28040 - Madrid

La disponibilidad de agua y de nutrientes constituyen dos de los factores limitantes en las formaciones arbóreas mediterráneas. De ahí la importancia que tiene el desarrollo de un sistema radical fisiológicamente vigoroso, bien micorrizado, en plantas producidas en vivero; máxime cuando la forestación se realiza en terrenos agrícolas abandonados, cuyo uso continuado genera un empobrecimiento del suelo. La profundización en el conocimiento de los procesos fisiológicos desarrollados bajo condiciones de baja disponibilidad de agua y nutrientes permitirá mejorar las labores culturales, tanto durante la fase de vivero como tras su establecimiento en campo.

En este estudio se aborda el comportamiento de encinas (*Quercus ilex* L.) de tres y cuatro savias, micorrizadas en vivero con *Tuber melanosporum*, durante un periodo vegetativo (mayo a octubre 1996) a través de la evaluación de parámetros hídricos y de intercambio gaseoso.

La plantación, realizada a marco cuadrado de 7m, ocupa una superficie de 20 ha en un terreno pedregoso y de escasa pendiente, anteriormente dedicado al cultivo de cebada, situado en la provincia de Teruel, en el término municipal de Teruel, a 1.100m de altitud; con temperatura media durante el periodo vegetativo (mayo a septiembre) de 18,3°C. y media, media de las máximas del mes más cálido y media de las mínimas del mes más frío de 11,7, 29,9 y -1,6°C, respectivamente y una precipitación media anual de 385,5 mm.

Se establecieron cuatro bloques rectangulares de 140m² de superficie, con cuatro filas de cinco plantas por bloque. Se realizaron un total de cinco mediciones, iniciándose a finales de mayo y repitiéndose en los meses siguientes con una periodicidad de 26, 35, 40 y 41 días. En cada fecha se practicaron las siguientes mediciones: potencial hídrico de base y potencial al mediodía, medidos en hojas aisladas con una cámara de presión; parámetros de intercambio gaseoso (transpiración, fotosíntesis, conductancia estomática al vapor de agua, concentración interna de CO₂), medidos con un analizador de imágenes por infrarrojo (IRGA), modelo portátil; y temperatura y humedad del suelo a 20 cm de profundidad, medidas con una sonda térmica y un TDR, respectivamente. También se determinaron a posteriori la relación entre la concentración interna y la externa, la eficiencia en el uso del agua y la eficiencia intrínseca en el uso del agua.

Los resultados indican que a pesar de la escasa precipitación anual de la zona, la frecuencia de tormentas durante los meses de verano permitió a las plantas mantener potenciales hídricos de base relativamente altos en dicho periodo (-0,55 MPa en julio), que bajaron al final del periodo vegetativo (-0,76 MPa, en octubre), cuando la temperatura del suelo había descendido a 10,6° C y la humedad era de 16% (en volumen), frente a los valores de temperatura de 16° C y de humedad de 11,2% medidos en julio.

La fotosíntesis y la transpiración, medidas al mediodía, aumentaron paulatinamente desde el mes de mayo, alcanzando un máximo en septiembre ($A=12,4\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $E=5,31\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para disminuir al final del periodo vegetativo hasta valores mayores que al inicio del periodo vegetativo -más del doble en el caso de la fotosíntesis-. Respuesta similar muestran la conductancia estomática y la concentración interna de CO_2 , si bien sus valores máximos se alcanzan antes, en la medición de julio. La eficiencia en el uso del agua y la eficiencia intrínseca en el uso del agua muestran sus máximos valores en junio ($\text{EUA}=4,21$; $\text{EIUA}=147,49$), con un descenso importante en pleno verano y una recuperación en las dos siguientes mediciones.

Crecimiento e intercambio gaseoso de *F. sylvatica* L. y *Q. petraea* (Matt.) Liebl. en el "Hayedo de Montejo de la Sierra" (Madrid)

I. Aranda, F. Pardo, L. Gil y J.A. Pardos

Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal, Departamento de Silvopascicultura,
E.T.S.I. Montes, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid

Las hayas (*F. sylvatica* L.) y los robles albares (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) son especies con una amplia área de distribución en Europa. En la Península Ibérica tienden a ocupar el piso montano de los sistemas montañosos del Norte, apareciendo de forma más esporádica en el Sistema Ibérico, Ayllón y Sistema Central. Montejo de la Sierra en Madrid, constituye una de las localidades más meridionales de la Península Ibérica donde ambas coexisten. Dicha posición geográfica hace que dichos hayedos ocupen una situación intermedia entre la vegetación de carácter ibero-atlántico y la típicamente mediterránea.

En el presente trabajo se resumen los datos de crecimiento de hayas y robles albares en el Hayedo de Montejo durante un periodo de 25-30 años en dos rodales mixtos, con presencia de otras especies mesófitas (acebos, cerezos, serbales, etc...). Uno dominado por el haya (45,8% de los pies), el otro por el roble albar (64,9% de los pies). En los años 1993, 1994 y 1995 se realizó un seguimiento del intercambio gaseoso y el estado hídrico de las dos especies en el primer rodal. El crecimiento radial se estableció a partir de muestras extraídas con barrena Pressler en diez árboles por especie a una altura de 1,30 m. y posterior medida de los anillos. Las medidas del intercambio gaseoso y el estado hídrico de hayas y robles durante los tres años se realizaron en una torre situada en el rodal I que permitió el acceso a la parte superior de las copas.

Los resultados ponen de manifiesto que condiciones ambientales extremas como las heladas tardías (primavera de 1995), ó los periodos secos (años 1994-1995), inciden de manera acentuada en las dos especies. Tanto el crecimiento radial, como el intercambio gaseoso, mostraron una disminución en todo el periodo, más acentuada en el año 1995. Durante este último se registró una helada tardía que redujo el índice de área foliar en más de la mitad en el rodal dominado por hayas (5,64 en 1994, 2,19 en 1995). Las hayas, de brotación más temprana, acusaron en mayor medida dicho fenómeno. El efecto de la sequía, evaluado a través de la humedad del suelo, se suma al de las heladas. Así se observa que la fotosíntesis disminuye en el haya en el año 1994 y en haya y roble en el año 1995, año en el cual coinciden sequía y heladas tardías.

Como conclusión se puede extraer que hayas y robles se ven afectadas por los rigores climáticos extremos (continentalidad y mediterraneidad) propios del enclave estudiado, aunque la primera posee una mayor sensibilidad a estos factores.

Efeito da data de arranque no viveiro e do tratamento das plantas pelo frio na qualidade do morangueiro

M.G.S.Palha* e M.J.P. Silva**

Departamento de Horticultura e Floricultura* e Departamento de
Fisiologia Vegetal**

Estação Agronómica Nacional, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

A qualidade do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) está relacionada com a maturidade que a planta atinge durante a sua permanência no viveiro. É essencial a obtenção de plantas maduras capazes de suportar o arranque do viveiro, o transporte até à plantação e a transplantação.

Em 1992 e 1993 estudou-se a influência da data de arranque das plantas do viveiro e do seu tratamento pelo frio nos teores de amido e de açúcares das raízes e suas repercussões na qualidade do morangueiro.

Plantas das cultivares Chandler e Douglas colhidas, entre Outubro e Novembro, num viveiro de altitude na região da Guarda, em 3 datas com intervalos de 2 semanas, foram submetidas a frio (2 °C) durante 0, 2 e 4 semanas. Após tratamento de frio os morangueiros foram plantados em Odemira, uma zona de clima de inverno ameno.

Dum modo geral o atraso no arranque das plantas do viveiro provocou uma acumulação de amido e uma redução dos teores de açúcares, sobretudo dos totais, nas raízes das duas cultivares. Verificou-se, ainda, que o atraso no arranque teve um efeito favorável na produção total de frutos por planta.

Os tratamentos de frio, após o arranque, resultaram numa diminuição de amido e no aumento dos açúcares nas raízes. A produção total de frutos por planta mostrou tendência a diminuir mas apenas nas plantas com tratamento de frio mais prolongado (30 dias).

A qualidade das plantas parece pois ter sido favorecida por uma permanência mais longa no viveiro mas não pelos tratamentos de frio (2 °C), pelo menos relativamente ao mais longo.

Sección C2:

Ecofisiología

Estrutura e intercepção da PAR em *Cistus crispus* L., *C. salvifolius* L. e *C. ladanifer* L.

I.P. Pereira, M.P. Simões e L.C. Gazarini

Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Apartado 94,

P-7001 Évora codex

Estudou-se a estrutura do coberto em *Cistus crispus*, *C. salvifolius* e *C. ladanifer* e a intercepção da radiação fotossinteticamente activa (PAR, 400-700 nm) em Março de 1996, na região Alentejo (Portugal).

A estrutura do coberto foi analisada pelo método do corte estratificado (Monsi e Saeki, 1953), em áreas de 50x50 cm e estratos de 10 cm. A fitomassa obtida foi separada em biomassa e necromassa, tendo-se determinado os pesos secos de todos os componentes e as áreas projectadas das folhas e caules, por estrato e espécie.

Para descrever a estrutura vertical foram ainda quantificados os seguintes parâmetros: índice de área foliar (LAI), índice de área fotossinteticamente activa (GAI), índice de área da planta (PAI) e densidade de área foliar (LAD).

Para a obtenção de perfis verticais diários de intercepção da PAR, mediu-se a transmissão da radiação solar utilizando um medidor de luz portátil (*ceptometer*), em dois pontos por estrato e espécie.

Quantificou-se a intensidade relativa da PAR ao longo de cada perfil vertical e calcularam-se os coeficientes de extinção (k).

Apesar da variação da distribuição da biomassa fotossinteticamente activa e não activa ser semelhante nas três espécies (diminuindo a primeira e aumentando a segunda, do topo para a base), *C. crispus*, *C. salvifolius* e *C. ladanifer* diferem na fitomassa total, 623.72, 1213.56 e 1139.80 g m⁻², respectivamente.

O LAI e o LAD apresentam valores mais elevados nos estratos superiores, diminuindo em direcção ao nível do solo. Este decréscimo é mais acentuado em *C. crispus*, no qual a metade superior da copa (20 cm), que inclui 74% da área foliar total, é responsável pela extinção de 87% da PAR. Em *C. salvifolius*, 65% da PAR extinguem-se dos 20 aos 50 cm (altura da copa igual a 60 cm) onde estão compreendidos 72% da área foliar total, enquanto em *C. ladanifer*, os estratos de 30 a 80 cm (altura da copa igual a 100 cm), com 73% da área foliar total, são responsáveis pela extinção de 60% da PAR.

Os valores do coeficiente de extinção são 1.3, 0.8 e 0.8 para *C. salvifolius*, *C. ladanifer* e *C. crispus*, respectivamente.

Variação sazonal da queda de folhada e composição química em *Quercus suber* L. e *Quercus rotundifolia* Lam.

C.S. Sá, M.P. Simões, M.A. Madeira e L.C. Gazarini

Departamento de Biologia, Universidade de Évora,

Apartado 94,P-7001 Évora codex

Quantificou-se a queda da folhada de duas espécies de quercíneas (*Quercus suber* L. e *Q. rotundifolia* Lam.) em montados da região de Évora (Alentejo, Portugal). A recolha efectuou-se quinzenalmente, de Março de 1994 a Setembro de 1996.

A produção média anual de folhada foi de $0.59 \text{ kg m}^{-2}\text{ano}^{-1}$, sob coberto, para *Q. suber* e $0.42 \text{ kg m}^{-2}\text{ano}^{-1}$, sob coberto, para *Q. rotundifolia*. A queda de folhada apresentou um padrão sazonal, conferido essencialmente pelas folhas que representaram a fracção predominante, 39% do total para *Q. suber* e 44% para *Q. rotundifolia*. O auge da queda das folhas de *Q. suber* ocorreu na Primavera, enquanto que para *Q. rotundifolia* oscilou interanualmente entre a Primavera e o Verão. Os restantes componentes tiveram diferentes épocas máximas de queda, no entanto apresentaram padrões semelhantes nas duas espécies. As flores predominaram no início da Primavera, de Março a Abril. Os frutos foram mais abundantes de Setembro a Novembro e constituíram um importante contributo para o peso total da folhada anual, 33% e 30% respectivamente para *Q. suber* e *Q. rotundifolia*.

Foi analisado o conteúdo em nutrientes da fracção de folhas da folhada para as duas espécies. A quantidade anual média de nutrientes que as folhas caídas devolveram ao solo foi de $18.3 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de azoto, $7.2 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de potássio e $0.92 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de fósforo para *Q. suber* e de $14.9 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de azoto, $6.3 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de potássio e $0.90 \text{ kg ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ de fósforo para *Q. rotundifolia*.

Compromisso fotossíntese-transpiração em *Quercus suber* L.

T.M.S. Pinto, J.M.G. Torres-Pereira, R.J.C.G. Santos

Secção de Engenharia Biológica e Ambiental, Universidade de

Trás-os-Montes e Alto Douro,

Apartado 202, 5001 Vila Real Codex, Portugal

É relativamente antigo o interesse pelo estudo das conseqüências fisiológicas do descortçamento. Vários processos têm vindo a ser ensaiados mas até agora a tecnologia utilizada não permitia extrair conclusões hoje viáveis pela introdução de tecnologias mais avançadas e novos produtos impermeabilizantes.

Neste trabalho estudamos o efeito da aplicação duma película antitranspirante, a diferentes concentrações e após o descortçamento, no compromisso fotossíntese-transpiração em *Quercus suber* L..

Apresentam-se dados, de três anos de investigação (1992-94-96), obtidos com um analisador de gás por infravermelhos relativamente a parâmetros bióticos (**fotossíntese** aparente; condutância estomática; condutância subestomática e transpiração) e **abióticos** (radiação fotossinteticamente activa; humidade relativa; temperatura do ar e temperatura da folha).

Observaram-se diferenças significativas entre as árvores tratadas com as diversas concentrações de parafina. No entanto, podemos também observar que as árvores mesmo antes de serem submetidas a qualquer intervenção e respectivo tratamento já **apresentavam** comportamento muito diferente. Assim, outro aspecto igualmente integrado **na nossa** linha de orientação é a caracterização dos diferentes indivíduos a partir de **parâmetros de** natureza isoenzimática.

Apresentam-se os resultados do estudo especialmente no que diz respeito à **relação** existente entre as diferenças de produtividade das várias **árvores** e as suas características genéticas.

Caracterización parcial de superóxido dismutasas en líquenes procedentes de la sierra de Guadarrama

M.A. Ruano, L.M. Sandalio¹ y J.M. Palma¹

Departamento de Biología Vegetal II Universidad Complutense,

Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, ¹Departamento de Bioquímica Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental de Zaidín, CSIC Apdo. 419, 18008 Granada

Los sistemas antioxidantes son esenciales para la vida de cualquier organismo aerobio. Uno de los sistemas enzimáticos de mayor relevancia en la eliminación de las especies de oxígeno activado en la célula es la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1). Las SODs se clasifican en tres grupos atendiendo al metal que actúa como grupo prostético: CuZn-SODs, Fe-SODs y Mn-SODs. Las peculiares relaciones hídricas de la simbiosis líquénica y las condiciones de los hábitats que ocupan, hacen muy posible que se produzcan especies de oxígeno activado y que, en dichas situaciones, la actividad SOD pudiera tener un papel fundamental.

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de las dismutasas presentes en dos especies con diferente distribución geobotánica: *Lasallia hispanica* (biotipo umbilicado), endemismo mediterráneo occidental y *Cornicularia normoerica* que presenta biotipo fruticuloso y es de amplia distribución en las montañas europeas. Ambas fueron recolectadas de la sierra de Guadarrama y congeladas una vez completamente secas. En el laboratorio fueron sometidas a diferentes tratamientos: extracción directa, 24 horas a 18-20° y 24 horas a 18-20° o a 4-6° tras hidratación a saturación. Se determinó la actividad SOD total en los extractos de las muestras por espectrofotometría utilizando el método del citocromo *c* [1]. Las distintas SODs se individualizaron mediante isoelectroenfoque en geles cilíndricos con gradiente de pH de 3.5 a 10 y se detectó la actividad SOD por el método de reducción fotoquímica del NBT [2].

De las dos especies estudiadas *C. normoerica* presenta una mayor actividad SOD total. En esta especie se detectaron tres isoenzimas, una CuZn-SOD, una Mn-SOD y una Fe-SOD, siendo la CuZn-SOD la más abundante. Las tres isoenzimas descritas mostraban mayor actividad cuando los talos de *C. normoerica* se sometían a un proceso de hidratación-deshidratación a temperatura ambiente. Por otro lado en *L. hispanica* se observaron seis isoenzimas: tres Mn-SOD, dos Fe-SOD y una CuZn-SOD. Además en los talos de esta especie sometidos a hidratación-deshidratación a temperatura ambiente o a 4°, se detectó una Mn-SOD adicional con un pH más ácido que las anteriores. El patrón isoenzimático de SOD en *L. hispanica* no experimentaba variaciones cualitativas, aunque sí cuantitativas, entre individuos procedentes del valle o de mayor altitud, a pesar de las diferencias microclimáticas existentes.

1. Mc Cord JM & Fridovich I (1969) J Biol Chem 244:6049-6055

2. Beauchamp CO & Fridovich I (1971) Anal Biochem 44:276-287

Efeito da seca no crescimento, na partição da biomassa e na WUE de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

J. Lauriano¹, N. Marques², J. Semedo², E. Rebelo², M. Drumond²,
M.C. Matos²

¹Fac. Ciências Agrárias, Univ. Agostinho Neto, CxP 236, Huambo, Angola

²Dep. Fisiol. Vegetal, Estação Agronómica Nacional, Qta do Marquês,
2780 Oeiras, Portugal

A sobrevivência das plantas em condições de seca depende da capacidade de manter a taxa de fixação do CO₂ a níveis adequados, da distribuição dos fotoassimilados pelos diferentes órgãos e da eficiência com que utilizam a água. Dado a pertinência do tema e, muito essencialmente, pelo facto de ocorrerem diferenças intraespecíficas, o objectivo deste trabalho foi o de analisar o efeito da seca sobre os parâmetros anteriormente mencionados em cvs. de amendoim. As observações incidiram sobre plantas de três cvs. de amendoim (57-422, 73-30 e GC 8-35) com aproximadamente dois meses de idade. As plantas (uma por vaso de 2 L) desenvolveram-se em condições de estufa. A seca foi imposta por suspensão da rega; o teor hídrico relativo (RWC) foi determinado segundo Catsky (1960), e a transpiração (E) pelo método gravimétrico; a produção de biomassa foi quantificada através da determinação do peso seco e a eficiência no uso da água (WUE) foi calculada pela razão entre a biomassa (B) produzida expressa em gramas e a água consumida expressa em Kg. Os resultados obtidos mostram que, em condições de seca, as cvs. estudadas apresentam um decréscimo na produção de biomassa total: 41%, 28% e 19% respectivamente em relação às cvs. 57-422, 73-30 e GC 8-35. Em relação à WUE, os níveis de stress a que as plantas foram sujeitas provocaram um aumento de 84%, 60% e 9% respectivamente nas cvs. 57-422, GC 8-35 e 73-30. Nestas condições, todas as cvs. apresentaram decréscimos no consumo de água: 68%, 50% e 34%, e verificou-se também um aumento da razão "root/shoot" (88%, 85% e 66%) e da biomassa radicular (58%, 34% e 31%) respectivamente nas cvs. GC 8-35, 57-422 e 73-30. Em contrapartida, verificaram-se decréscimos tanto da biomassa foliar (36%, 30% e 19%) como da biomassa caulinar (20%, 12% e 11%) respectivamente nas cvs. pela ordem anteriormente indicada. Conclui-se que a seca aumentou a WUE (muito na 57-422 e pouco na 73-30, ocupando a GC 8-35 uma posição intermédia) à custa de maiores reduções na E do que na produção de B. A cv. GC 8-35 apresentou o melhor equilíbrio entre a redução da E e a da produção da B. Também a razão "root/shoot" aumentou principalmente na cv. GC 8-35 (devido a significativos aumentos da biomassa radicular e suaves decréscimos da biomassa caulinar e foliar) e na 57-422 (graças a significativos aumentos na biomassa radicular e decréscimos na biomassa foliar e caulinar, embora em relação a esta última a redução fosse moderada).

Influencia del genotipo y del fotoperiodo sobre el desarrollo del meristemo apical en triticale (*X Triticosecale* Witt.)

J.A. Yáñez, J.M. Ramos y L.F. García del Moral

*Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,
18001 Granada*

Se estudia la influencia del fotoperiodo y la temperatura sobre el desarrollo y diferenciación del meristemo apical en cinco genotipos de triticale, Trujillo (variedad madre) y cuatro líneas isogénicas derivadas de Trujillo (genotipos T-1280-4, T-8-2, T-11-1 y T-155-1). Los ensayos se realizaron en cámara de ambiente controlado con iluminación de 6000 lux y humedad constante del 80%.

Se realizaron tres experimentos en los que se varió el fotoperiodo (FP):

- Experimento 1: FP largo (18h/6h) y T alta (25°C/15°C).
- Experimento 2: FP medio (14h/10h) y T alta (25°C/15°C).
- Experimento 3: FP corto (10h/14h) y T alta (25°C/15°C).

El diseño consistió en bloques al azar con los cinco genotipos de triticale y tres repeticiones, situando las plantas en placas de 24 macetas de 6 cm de diámetro por 12 cm de altura, con sustrato de turbas puras con combinación de abonos, manteniendo la humedad a capacidad de campo.

El desarrollo de las plantas se siguió desde la fase de emergencia hasta hasta la de anteras verdes, con una periodicidad de 2-4 días, dependiendo de la fase del ciclo. En cada muestreo se tomaron los siguientes parámetros del tallo principal de 5 plantas:

- Estadío de crecimiento.
- Estadío de desarrollo del meristemo apical.
- Número de primordios de espiguilla del ápice.
- Longitud y anchura máxima del meristemo apical.

Con estos valores primarios se calcularon los siguientes parámetros:

- Duración en días de cada estadío.
- Niveles relativos de crecimiento del ápice.
- Tasa y duración de la iniciación de primordios.

Al integrar estos parámetros con el desarrollo del meristemo apical del tallo principal en un análisis estadístico conjunto (correlación múltiple por etapas), se demostró que, independientemente del genotipo y del fotoperiodo, el número máximo de primordios de espiguilla dependía directamente de la duración de la fase de producción de primordios, de la tasa de iniciación de primordios y de la longitud del ápice, e inversamente de la velocidad de crecimiento relativo del ápice ($R=0.970$; $P=0.01$). Estos resultados son de gran interés,

ya que como se ha demostrado en numerosos estudios sobre cereales, el máximo número de primordios está estrechamente relacionado con el número final de granos por espiga. Por ello, conociendo los factores implicados en la determinación del número máximo de primordios en función del genotipo y del fotoperiodo, podremos también conocer las variaciones que sucedan en un componente de la cosecha del triticale como es el número de granos por espiga.

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT mediante el proyecto AGF93-0528-CO2-01

Growth and internal cycling of nitrogen in cork oak (*Quercus suber*) seedlings in relation to nitrogen supply.

P. Carvalho¹, D. Ribeiro², P. Millard³, J.S. Pereira¹

¹Instituto Superior de Agronomia, Dept. Eng. Florestal, Univ. Téc. Lisboa
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa codex, Portugal

²Instituto Florestal, Av. João Crisóstomo, 26/28, 1000 Lisboa, Portugal

³Macaulay Land Use Research Institute, Craigiebuckler, Aberdeen,
AB9 2QJ, UK

The growth and internal cycling of nitrogen in *Quercus suber* seedlings were studied in relation to N supply. Plants were grown in sand culture throughout 1992 and supplied with either 6.0 mol.N.m⁻³ (High N) or 1.0 mol.N.m⁻³ (Low N) NH₄NO₃, in order to precondition their growth, nitrogen status and capacity for N storage. The NH₄NO₃ supplied to the plants in 1992 was labelled with ¹⁵N to 5.18% allowing a direct measurement of remobilized N for new growth during 1993. In February 1993 the plants were removed from their pots, any sand was washed from the roots and they were replanted in clean pots with new sand. Plants that had received 6.0 mol.N.m⁻³ in 1992 were given either 6.0 (High N/ High N) or 1.0 (High N/ Low N) mol.N.m⁻³ and plants given 1.0 mol.N.m⁻³ in 1992 were also supplied with either 6.0 (Low N/ High N) or 1.0 (Low N/ Low N) mol.N.m⁻³. None of the N supplied in 1993 was enriched with ¹⁵N. This allowed the study of the influence of current N supply on the internal cycling of N of plants preconditioned during 1992.

Both whole plant biomass and foliar area increased during the experiment, although by the end (November 1993) differences among the four treatments have increased. In February 1993 most of the ¹⁵N uptake was found in the root system. Remobilization of N from the roots and old leaves occurred as soon as growth resumed in 1993. The amount of N remobilized was not affected by the current (1993) N supply. In the end of the experiment an increase of ¹⁵N in the roots occurred in all plants, indicating some remobilization of N back to the roots. A relative accumulation of N in the roots occurred simultaneously, indicating storage of N in the root system in the Autumn.

Seguimiento de la producción de biomasa, del índice de área foliar y de la radiación interceptada en cultivos de altramuz (*Lupinus albus* L.) y de guisante proteaginoso (*Pisum sativum* L.) mediante diversos índices de vegetación.

J.L. Paz Rodríguez, B. Ruíz Nogueira y F. Sau

Departamento de Producción Vexetal, Universidade de Santiago de Compostela.

Escola Politécnica Superior (Campus Universitario), 27002 Lugo (España)

El seguimiento de la producción de los cultivos mediante técnicas de teledetección permite obtener estimaciones casi instantáneas del estado hídrico, nutricional y sanitario de las explotaciones y rendimientos esperados. Además, estas técnicas pueden ser de gran utilidad a la hora de adecuar el riego, el abonado y los tratamientos fitosanitarios a las necesidades de cada zona, dentro de una misma parcela de cultivo, en el marco de lo que se ha dado en llamar la aproximación "reactiva" a la "Agricultura de Precisión". (Bouma et al., 1997).

Siguiendo el enfoque del Análisis de Componentes Espectrales, se pueden correlacionar diferentes Índices de Vegetación (I.V.), obtenidos a partir de mediciones de reflectancia realizadas desde el suelo, con los principales parámetros ecofisiológicos (Richardson et al., 1992; Thenkabail et al., 1992).

Con este objetivo, se llevó a cabo en la Finca de Prácticas de la Escola Politécnica Superior de Lugo un ensayo de campo durante el año 1996.

- Material Vegetal: *Pisum sativum* L. (cv. Solara y Azur) - *Lupinus albus* L. (cv. Lutop y Lucky)
- Fecha de siembra: 7 de marzo de 1996
- Densidad de siembra: (*Pisum sativum* L.) - (*Lupinus albus* L.)
- Muestreos de biomasa, toma de datos espectrorradiométricos y de radiación interceptada: cada 15 días

Las medidas de radiación interceptada se realizaron mediante un ceptómetro Decagon y las espectrales con un espectrorradiómetro Li-Cor 1800 desde 300 nm hasta 1100 nm. Se han calculado los siguientes I.V.: RVI, NDVI, SAVI2, TSAVI y PVI.

Los primeros análisis de los datos parecen mostrar que los I.V. más complejos (incluyen modificaciones para corregir el efecto del suelo) no mejoran sustancialmente las predicciones obtenidas con los más sencillos (RVI y NDVI).

Bouma, J., Verhagen, J., Brouwer, J. y Powell, J.M., 1997. Using system approaches for targetting site specific management on field level. En: Application of system approaches at field level. Kropff, M.J., Teng, P.S., Aggerwal, P.K., Bouma, J., Bouma, B.A.M., Jones, J.W. y van Laar, H.H. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.

- Richardson, A.J., Wiegand, C.L., Wanjura, D.F., Dusek, D. y Steiner, J.L., 1992. Multisite analyses of spectral-biophysical data for sorghum. *Remote Sens. Environ.*, 41: 71-82.
- Thenkabail, P.S., Ward, A.D. y Lyon, J.G., 1994. Landsat-5 Thematic Mapper models soybean and crop characteristics. *Int. Remote Sens.*, 15(1): 49-61.

Efectos del ABA y del Cl_2Hg sobre el flujo de exudación en raíces de girasol. Influencia del Ca^{2+}

J.M. Quintero¹, J.M. Fournier¹, J. Ramos² y M. Benlloch¹

Dptos. de Agronomía⁽¹⁾ y de Microbiología⁽²⁾, E.T.S.I.A.M.

Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba

La mayor parte del flujo radial de agua en la raíz es simplástico¹. Este hecho, junto con el reciente descubrimiento de acuaporinas, proteínas integrales de membrana que actúan como canales específicos de agua², nos induce a pensar que el mecanismo de regulación del transporte radial de agua en la raíz debe de estar localizado en el simplasto. Es conocido el efecto inhibidor del Cl_2Hg sobre las acuaporinas³. El ABA favorece el proceso de exudación en raíces aisladas de girasol⁴, y se conoce que la acción de esta hormona en el cierre estomático depende de la concentración de calcio en las células epidérmicas⁵.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del Cl_2Hg sobre el flujo de exudación de raíces aisladas, tratadas y no tratadas con ABA. Igualmente se estudió el efecto del ABA sobre la exudación de raíces con distinto contenido interno en Ca^{2+} . Para ello, se utilizaron raíces aisladas de plantas de girasol cultivadas durante 15 días en soluciones nutritivas, a las que se les añadía, según los casos, ABA (4 μM) al inicio de la exudación y Cl_2Hg (1 μM) al cabo de 2 horas de iniciarse dicho proceso. Las plantas con menor contenido en Ca^{2+} se obtuvieron eliminando el aporte de calcio de la solución nutritiva un día antes de los ensayos de exudación.

Los resultados muestran que el ABA estimuló el flujo de exudación, y dicha acción fue mayor en aquellas raíces que presentaban un mayor contenido en Ca^{2+} . La presencia de Cl_2Hg en el medio de exudación inhibió el flujo de exudación tanto en raíces tratadas con ABA como sin ABA.

Nuestros resultados sugieren que la acción del ABA sobre el flujo radial de agua en la raíz podría estar regulada por la concentración de calcio en la raíz, así como la posible existencia de acuaporinas en la raíz, que regularían el flujo hídrico en la raíz independientemente de la presencia de ABA.

1. Steudle, E., Murrmann, M. & Peterson, C.A. (1993). *Plant Physiol.* 103: 335-349.

2. Chrispeels, M.J. & Maurel, C. (1994). *Plant Physiol.* 105: 9-13.

3. Maggio, A. & Joly, R.J. (1995). *Plant Physiol.* 109: 331-335.

4. Fournier, J.M., Benlloch, M. & De La Guardia, M.D. (1987). *Physiol. Plantarum* 69: 675-679.

5. Atkinson, C.J., Mansfield, T.A., McAinsh, M.R., Brownlee, C. & Hetherington, A.M. (1990). *Biochem. Physiol. Pflanzen* 186: 333-339.

**Polimorfismo en la organización del ADN
mitocondrial y androesterilidad
en poblaciones naturales de *Rosmarinus officinalis* L.**

*P. Hidalgo Fernández, R. Pérez Vicente, J.M Maldonado y
J.L. Ubera Jiménez*

*Dpto. Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba,
Avda. San Alberto Magno s/n, 14004-Córdoba, España*

Se ha estudiado el polimorfismo en la organización del genoma mitocondrial de individuos de tres poblaciones silvestres de *Rosmarinus officinalis* de Sierra Morena (Andalucía, España) en las que coexisten plantas androfértiles y androestériles. La organización del ADN mitocondrial se analizó mediante hibridación Southern empleando tres enzimas de restricción (*Hind* III, *Eco*R I y *Bgl* II) y sondas que contienen secuencias de los genes mitocondriales *coII*, *cob* y *atpA*. Con las combinaciones *Hind* III/*coxII* y *Hind* III/*cob* se detectó el mayor grado de polimorfismo, obteniéndose 11 mitotipos diferentes de un total de 27 individuos analizados. La sonda que detectó mayor polimorfismo fue la que contenía secuencias del gen *cob*. El altísimo grado de polimorfismo del genoma mitocondrial encontrado en nuestras poblaciones de *Rosmarinus* es semejante al detectado en poblaciones naturales de otras labiadas.

El fenotipo floral de cada individuo se ha estimado según el número de flores androestériles que producen a lo largo del periodo de floración. Así, podemos describir tres fenotipos: el androestéril (100% de flores androestériles), el intermedio (25% de flores androestériles) y el androfértil (0% de flores androestériles). Aunque no hemos encontrado una correlación estricta entre mitotipo y fenotipo floral, uno de los mitotipos resultó especialmente abundante entre los individuos androfértiles (10 individuos con el mismo mitotipo de los 13 androfértiles analizados). El resto de los mitotipos están representados por uno o dos individuos que en su mayoría son androestériles. Por tanto, el polimorfismo observado es mayor entre individuos androestériles que entre individuos androfértiles.

La plasticidad de la mitocondria vegetal para generar variantes mediante reorganizaciones de su ADN está bien documentada en muchas especies de plantas. La expresión de alguna de las variantes no afecta el crecimiento vegetativo pero da lugar a fenotipos androestériles como el caso del maíz o petunia. Nuestros datos sugieren que en *Rosmarinus*, la androesterilidad puede estar asociada a la aparición de variantes del genoma mitocondrial que se apartan de un patrón típico de plantas androfértiles. En estudios realizados a MET hemos observado que una alteración metabólica podría ser la responsable del aborto de las anteras. La microsporogénesis es un proceso muy complejo, con un alto requerimiento de energía, que podría verse afectado por la presencia de mitocondrias con una organización génica que conduzca a un funcionamiento subóptimo.

El estrés hídrico induce diferentes niveles de regulación fotosintética en plantas de vid

J. Flexas, J.M. Escalona & H. Medrano

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados
(Universitat de les Illes Balears-CSIC)

El déficit hídrico reduce la actividad fotosintética de las plantas a diferentes niveles. Uno de los más estudiados es la disminución en la asimilación del CO₂ producida por el cierre estomático. El efecto directo del estrés hídrico sobre los fotosistemas presenta mayor controversia. Existen numerosas evidencias de que la sequía no afecta directamente su funcionamiento. Sin embargo, la falta de agua en condiciones de elevada iluminación y temperatura puede inducir fotoinhibición. En condiciones de clima mediterráneo, el fuerte déficit hídrico que sufren las plantas durante el verano suele ir acompañado de fuertes insolaciones y elevadas temperaturas. En estas condiciones, los efectos del déficit hídrico debidos al cierre estomático pueden combinarse con la fotoinhibición.

La vid es una planta típicamente mediterránea cuyo ciclo vital se desarrolla durante los meses de verano. Con el objeto de estudiar los efectos de la sequía y la posible fotoinhibición en esas condiciones se aplicaron ciclos de riego-sequía a plantas de *Vitis vinifera* cv. Tempranillo cultivadas en macetas de 60 litros de capacidad en condiciones semi-controladas de invernadero. Tras un período de fuerte crecimiento con aporte de riego mediante solución nutritiva, se dejó de regar durante 20 días (primer ciclo de sequía, Sequía 1). Posteriormente se regaron las plantas. El primer día tras el riego se consideró como un tratamiento de Recuperación, y tras cinco días de riego continuado se consideró que las plantas estaban en condiciones de Riego. Finalmente se volvió a dejar de regar hasta establecer un segundo ciclo de sequía (Sequía 2). Durante los cuatro tratamientos se siguieron ciclos diarios de fotosíntesis neta, transpiración y parámetros derivados de la fluorescencia de la clorofila (fluorescencia, eficiencia cuántica, tasa de transporte de electrones, estimaciones de la fotorrespiración, disipación térmica).

Los potenciales hídricos al amanecer fueron de -0,13 (Riego), -0,19 (Recuperación), -0,41 (Sequía 1) y -0,58 MPa (Sequía 2). Los resultados obtenidos muestran claramente que la sequía induce una disminución en las tasas de fotosíntesis, tanto en las tasas máximas de fotosíntesis neta medidas por intercambio de gases (de 14,6 en Riego a 8,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en Sequía) como en las tasas máximas de transporte de electrones medidas por fluorescencia (de 118,7 en Riego a 59,8 $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en Sequía). Asimismo, las plantas mostraron los efectos de la fotoinhibición al mediodía. Estos efectos fueron tanto más acusados cuanto mayor era el grado de estrés hídrico de las plantas (se encontró una regresión $r^2=0,99$ entre el potencial hídrico al amanecer y la tasa máxima de transporte de electrones). En plantas sometidas a los tratamientos de Recuperación y Sequía 1 la fotoinhibición queda plenamente justificada por el incremento en la disipación térmica de energía, estimada a partir del *quenching* no-fotoquímico de la fluorescencia, lo cual no ocurre en la Sequía 2. La fotorrespiración, calculada en base a la combinación de medidas

de fluorescencia y asimilación de CO_2 , en ningún caso justifica la disipación de más de un 15% de la energía incidente. Es interesante destacar que la *ratio* ETR/A se mantiene prácticamente constante y alrededor de 10 a lo largo del día para todos los tratamientos, excepto para Sequía 2, en que aumenta considerablemente (hasta 70) incluso antes de mediodía. Todo ello, junto con una forma característica de la curva de respuesta de ETR a la luz, con valores máximos a intensidades medias de iluminación, sugiere que a partir de determinados niveles de estrés hídrico, los mecanismos habituales de disipación de energía de la planta resultan insuficientes. Como consecuencia de ello se produce fotooxidación de los sistemas fotosintéticos.

Fertilización foliar de cítricos en condiciones salinas: consecuencias sobre el intercambio gaseoso

R. Romero-Aranda* y J.P. Syvertsen

Universidad de Florida, IFAS, CREC, Lake Alfred, FL 33850-2299, FI:UU

*Dirección actual: E. E. "La Mayora", CSIC, 29750 Algarrobo-Costa (Málaga)

La aplicación de fertilizantes foliares en cítricos ha sido recomendada como una alternativa al uso de abonos convencionales, por su repercusión en el descenso de los niveles de salinidad del suelo y de contaminación de las aguas subterráneas. Se ha demostrado que aplicaciones foliares de urea-N en plantas deficientes en este elemento aumentan la concentración de nitrógeno en un 60% y duplican la tasa de fotosíntesis¹. La reducción del crecimiento y la productividad en cítricos sometidos a elevados niveles de salinidad en el suelo, suelen asociarse al desequilibrio del balance hídrico² y/o a una reducción de la capacidad fotosintética³. En estudios previos en nuestro laboratorio se observó que pulverizaciones foliares con soluciones salinas aumentaban la concentración foliar de cloro sin que se registrase una reducción significativa de la conductancia estomática (gs) y de la fotosíntesis (A_{CO_2}). Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar la eficacia de la fertilización foliar en plantas con elevadas concentraciones de cloro procedente del agua de riego y b) determinar si el efecto del cloro sobre el intercambio gaseoso era dependiente del tipo de aplicación (foliar o en el agua de riego). Plantas jóvenes de pomelo 'Duncan' y naranjo 'Valencia' se trataron durante un período de seis semanas con una solución de NaCl (75 mM) aplicada bien en el agua de riego o en forma de pulverización foliar. En combinación con los tratamientos salinos se efectuaron aplicaciones foliares de urea-N (8.9 g N litro⁻¹). Las plantas pulverizadas con NaCl presentaron mayores concentraciones foliares de cloro que aquellas otras tratadas con NaCl en el agua de riego. La fertilización foliar aumentó significativamente la concentración de nitrógeno independientemente del tipo de tratamiento de salinidad, lo que repercutió en un importante incremento de A_{CO_2} , alcanzándose los máximos valores en las plantas pulverizadas con NaCl. Independientemente de la fertilización foliar, la aplicación de NaCl en el agua de riego redujo sensiblemente los valores de gs y A_{CO_2} respecto de las plantas control. No se registraron variaciones significativas de gs y A_{CO_2} en plantas pulverizadas con NaCl. La adición de NaCl en el agua de riego produjo un importante descenso en el potencial hídrico de hoja en ambas especies, aunque se produjo un cierto ajuste osmótico, que hizo que el potencial de turgencia se mantuviera estable en pomelo e incluso aumentara ligeramente en naranjo. Estos datos sugieren que la fertilización foliar puede ser viable en condiciones de elevada salinidad en suelo aunque su eficacia estaría limitada por el grado de salinidad alcanzado en la planta. Los menores valores de gs y A_{CO_2} registrados en plantas regadas con NaCl respecto de las pulverizadas con la misma solución podrían explicarse por la producción en raíz de algún tipo de regulador de la apertura estomática.

(1) Romero-Aranda R y Syvertsen JP. 1996. The influence of foliar-applied urea nitrogen and saline solutions on net gas exchange of *Citrus* leaves. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 501-506.

- (2) Syvertsen JP, Lloyd J y Kriedemann PE. 1988. Salinity and drought stress effects on foliar ion concentrations, water relations and photosynthetic characteristics of orchard citrus. *Aust. J. Agric. Res.* 39: 619-627.
- (3) Lloyd J, Kriedemann PE y Aspinall D. 1989. Comparative sensitivity of 'Prior Lisbon_ lemon and 'Valencia_ orange trees to foliar sodium and chloride concentrations. *Plant, Cell and Environ.* 12:529-532.

Sistemas de protección de especies arbóreas mediterráneas frente al daño fotooxidativo invernal

J. I. García-Plazaola, U. Artetxe, M. K. Duñabeitia y J. M. Becerril

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco.

Apdo 644, 48080 Bilbao

La vegetación esclerófila mediterránea mantiene su follaje verde durante todo el año. Esto provoca la necesidad de tener que mantener las estructuras fotosintéticas en condiciones ambientalmente adversas, como son las que se observan en la mayor parte del interior de la Península Ibérica durante el periodo invernal. En esta época las situaciones anticiclónicas favorecen la existencia de largos periodos de días despejados y fríos. En estas condiciones la luz captada por los pigmentos antena puede exceder con mucho la capacidad de disipación energética de la planta, provocando procesos de fotoinhibición y de daño fotooxidativo. Por ello cabe esperar que las hojas de las plantas perennes sean capaces de responder de modo flexible a estas situaciones, disipando el exceso de energía los días fríos y fotosintetizando activamente los días templados.

En el presente trabajo se ha caracterizado cuáles son los mecanismos que permiten a la vegetación mediterránea, en este caso la encina (*Quercus rotundifolia*), adaptarse a las temperaturas subóptimas y en qué medida éstas dañan a la propia planta. Para ello se han comparado durante el invierno las características fotosintéticas y el metabolismo antioxidante de hojas desarrolladas en la parte externa de la copa (hojas de sol) y en hojas desarrolladas en la parte interior de la copa (hojas de sombra). Ramas de estas mismas plantas se han transferido al laboratorio donde se ha estudiado cómo las bajas temperaturas provocan las respuestas observadas en el campo.

Una temperatura subóptima (6°C) por sí misma no afectaba a la eficiencia fotoquímica del PSII, pero en combinación con una iluminación moderada (300 $\mu\text{E. m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provocaba una caída de Fv/Fm. Esta era debida a la atenuación de la fluorescencia máxima (Fm) en tanto que la fluorescencia inicial (Fo) se mantuvo estable. Ambas observaciones sugieren que más que un proceso de fotoinhibición se trata de un incremento de la disipación energética a nivel de la antena. Esta disminución de Fv/Fm se correlacionó con una caída tanto del rendimiento cuántico como de la capacidad fotosintética. En las hojas expuestas al sol Fv/Fm resultó muy bajo incluso desde el amanecer (Fv/Fm= 0,55) llegando a 0,25 al mediodía, en tanto que en las hojas de sombra este parámetro se mantuvo constante y próximo a 0,75. No obstante la tasa de fotosíntesis llega a superar los 12 $\mu\text{moles CO}_2 \text{. m}^{-2} \text{. s}^{-1}$ en las horas centrales del día, valor que indica que la fotosíntesis no está fuertemente inhibida. La ausencia de recuperación de Fv/Fm durante la noche podría relacionarse con el mantenimiento durante este periodo de elevadas concentraciones de zeaxantina o antheraxantina, sin embargo en nuestras muestras la zeaxantina formada al mediodía se reepoxidó por completo a violaxantina al final del día.

Las hojas expuestas al sol se mostraron también mejor protegidas frente al estrés fotooxidativo, y de hecho las actividades enzimáticas glutatión reductasa, monodehidroascor-

bato reductasa, ascorbato peroxidasa y catalasa fueron entre un 60 y un 180% mayores que sus respectivas actividades en las hojas de sombra.

En conclusión la interacción del frío y la luz se traduce en una rápida disminución de la eficiencia fotosintética del PSII, probablemente debida al desarrollo de procesos no fotoquímicos de disipación energética. Sin embargo este proceso no parece directamente dependiente de la concentración de zeaxantina y anteraxantina. En condiciones invernales las encinas son además capaces de alcanzar tasas moderadas de fotosíntesis a temperaturas relativamente bajas manteniendo las hojas más expuestas al sol protegidas por una elevada actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes.

Financiación: Proyecto UPV 118.310-EA173/96.

Cursos diurnos de intercambio gaseoso en árboles de la laurisilva canaria medidos en condiciones naturales

D. Morales, A.M. González-Rodríguez y M.S. Jiménez
Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Laguna. E-38207
La Laguna, Tenerife, España

Los estudios del intercambio gaseoso de los árboles en condiciones naturales no son muy abundantes debido a la dificultad que conlleva este tipo de medidas, sin embargo son de vital importancia para caracterizar la fisiología de las distintas especies y el balance de agua y energía en los bosques. Si nos referimos a los árboles de la laurisilva canaria el interés se acrecienta como consecuencia de la importancia científica que tiene este bosque al ser considerado como una reliquia de la flora terciaria con la mayoría de sus especies endémicas de Canarias o al menos de la región macaronésica.

Se realizaron cursos diurnos de medidas de intercambio gaseoso durante los tres meses de verano (dos cursos por mes) con un analizador de gases por infrarrojo portátil (LCA-2, ADC. Ltd. Hoddesdon, U.K.). Todas las medidas se realizaron en el bosque de Agua García, Tenerife, en una parcela experimental (descrita en Morales et al. 1996), donde se construyó una torre de 20 m de altura y se instaló una estación meteorológica (registrador de datos con sensores de temperatura y humedad relativa, Delta-T. Cambridge, U.K.; medidor de cuantos LI 190 SA, LI-COR, Lincoln, NE. USA.; anemómetro y pluviómetro, Skye Inst. Llandrindod, U.K.) con registro continuo de los principales datos ambientales. Dicha torre se utilizó para realizar las medidas de intercambio gaseoso en las hojas de la parte superior del dosel vegetal, de las principales especies de árboles que viven en este bosque, *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Persea indica* (L.) Spreng. y *Myrica faya* Ait.

Los cursos diurnos de fotosíntesis neta (P_n) y transpiración (E) fueron diferentes de acuerdo con las condiciones ambientales del día ya que se registraron días nublados, días en los que alternaron las nubes con los claros y días completamente claros. En estos últimos en los que los valores de déficit de presión de vapor de agua fueron relativamente altos, se observó cierre estomático en las horas del mediodía en *P. indica* con una consecuente disminución en los valores de P_n y E , mientras que *L. azorica* mantuvo sus estomas abiertos durante todo el día con valores más altos. El comportamiento de *M. faya* fue intermedio. A pesar de estas diferencias entre las especies, las características generales fueron similares con bajas tasas de P_n (máxima de $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y valores de E próximos a $10 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lo que se corresponde con una baja eficiencia en el uso de agua instantánea (máxima de $1.8 \text{mmol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$). Estas características están en conformidad con las condiciones de alta humedad en que estos árboles normalmente se desarrollan.

Morales, D., Jiménez, M.S., González-Rodríguez, A.M., Cermák, J., 1996. Laurel forests in Tenerife, Canary Islands: I. The site, stand structure and stand leaf area distribution. *Trees*, 11:34-40
Gracias a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Ministerio de Educación y Cultura, Proyecto DGICYT: PB94-0580)

Respuestas a la sequía edáfica en *Laurus azorica* y *Viburnum rigidum*: Ajuste osmótico y cambios en la elasticidad celular

M.S. Jiménez¹, A.M. González-Rodríguez¹, D. Morales¹, G. Aschan² y R. Lösch²

¹Dpto. Biología Vegetal, Universidad de La Laguna, E-38207

La Laguna, Tenerife, España

²Abt. Geobotanik, H.-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse¹, 26.13,
40225 Düsseldorf, Alemania

Los tejidos vegetales responden al estrés hídrico con una disminución del potencial osmótico, debido a una concentración pasiva de solutos como consecuencia de la deshidratación o a una acumulación neta de solutos en la célula. Este último proceso recibe el nombre de ajuste osmótico. Hasta el momento no se conocen las características de este ajuste en las especies de la laurisilva canaria. Nosotros hemos comenzado por estudiarlas en *Laurus azorica* (Seub.) Franco, uno de los árboles más representativos de esta formación, y *Viburnum rigidum* Vent., un arbusto que crece en el sotobosque y en los márgenes del bosque.

Se utilizaron lotes de plantas de 7 a 8 años de edad, crecidas en macetas de 50 l de volumen, que no fueron regadas durante el mes en que se realizó la experiencia. Periódicamente se midió el potencial hídrico actual y se realizaron curvas de presión volumen en hojas de las dos especies con un microvoltímetro WesCor HR 33 (WESCOR, Logan, USA) conectado a seis cámaras (C52). También se midió el potencial osmótico actual por crioscopia en un osmómetro (Osmomat, GONOTEC, Berlin, D) y se determinaron los niveles de prolina espectroscópicamente.

El potencial osmótico a plena turgencia disminuyó desde -2.04 a -3.52 MPa en *L. azorica* y desde -1.91 a -2.59 MPa en *V. rigidum*. El potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia disminuyó desde -2.9 a -3.9 MPa en *L. azorica* y no cambió significativamente en *V. rigidum* (-2.9 a -3 MPa). El módulo de elasticidad aumentó durante el período de estrés hídrico desde 20 a 91 MPa y desde 12 a 31 MPa en *L. azorica* y *V. rigidum* respectivamente.

Los contenidos en prolina de *L. azorica* aumentaron drásticamente cuando el potencial hídrico fue de -2.6 MPa llegando a unos valores finales de aproximadamente 4 mg g⁻¹ peso seco. Por el contrario la concentración de prolina en *V. rigidum* no cambió aunque el potencial hídrico alcanzó valores de -3.5 MPa. Nuestros resultados indican que en *L. azorica* existe un ajuste osmótico considerable pero no en *V. rigidum*. Esta última especie parece evitar el estrés hídrico mas que tolerarlo. Esta caracterización se corresponde bien con la distribución de esta especie en los márgenes de la laurisilva con condiciones climáticas más versátiles, *L. azorica*, por el contrario, crece mejor en el interior del bosque donde predominan las condiciones de más humedad.

Efecto de la temperatura en el aparato fotosintético de gramíneas presentes en Canarias

M.I. Rodríguez-Jiménez, A.M. González-Rodríguez, D. Morales y M.S. Jiménez

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,
Universidad de La Laguna, 38206 La Laguna, Tenerife

La temperatura influye en la actividad metabólica, en el crecimiento y viabilidad de las especies y por lo tanto, en su distribución. El efecto del calor y del frío depende de su duración, sin embargo es costumbre realizar tratamientos de media hora para analizar la resistencia de los distintos órganos de las plantas. Las membranas tilacoidales son especialmente sensibles a las temperaturas extremas, por lo que en estos estudios se evalúa el daño en las hojas por medidas de fluorescencia de la clorofila, aunque también por determinación de pérdidas de electrolitos en las células e incluso por la observación de síntomas visibles.

En el presente trabajo se estudia el efecto de temperaturas extremas (tanto altas como bajas), en el aparato fotosintético de *Tricholaena teneriffae* (L. fil.) Link, *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., *Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf y *Brachypodium arbuscula* Knoch. Todas ellas son gramíneas presentes en las zonas semiáridas de las Islas Canarias, las tres primeras con metabolismo C_4 y *B. arbuscula* con metabolismo C_3 . Se emplean las técnicas mencionadas anteriormente para comparar su mayor efectividad.

Se recogieron las hojas de plantas que vivían en su propio hábitat y de plantas que crecieron en el invernadero. Una vez recogidas las hojas, se mantuvieron con su base en agua y en atmósfera saturante durante una noche para alcanzar su saturación antes de realizar los diferentes tratamientos térmicos. Estos consistieron en sumergir distintos lotes de hojas dentro de bolsas de plástico, en un baño termostático en oscuridad a diferentes temperaturas durante 30 minutos. El rango de temperaturas de los tratamientos fue desde $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ en pasos de 2K, excepto en el intervalo comprendido entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en donde los pasos fueron de 5K. La fluorescencia de la clorofila se registró con un fluorímetro portátil (Plant Efficiency Analyser, PEA, Hansatech, U.K.) inmediatamente transcurrida la media hora de tratamiento, y tras 24 h de recuperación a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones de saturación. A continuación se prepararon porciones similares (0,1 g) de las diferentes hojas y se sumergieron en 3 ml de agua destilada para, tras 24h, medir la pérdida de electrolitos con un conductímetro portátil (Dist 4, Hanna instruments, Mauritius).

Las especies C_4 no presentaron ningún síntoma de daño (menos del 10% de desviación de los valores normales) hasta $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la C_3 hasta $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ detectándose el mismo resultado con distintos índices de fluorescencia en las medidas realizadas a las 24 h del tratamiento y con los datos de conductividad. La resistencia a las altas temperaturas dependió más de la época del año en que se hicieron las determinaciones y del lugar de procedencia de las muestras (campo o invernadero) que de los tipos metabólicos a los que pertenecían las especies. Se encontraron los primeros síntomas de daño por encima de los $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (42 a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$) revelado por la fluorescencia variable en relación con la máxima (Fv/Fm). Las medidas de conductividad mostraron cambios en la permeabilidad de las membranas sólo a temperaturas bastante más altas (entre los 45 y $51\text{ }^{\circ}\text{C}$). Con la observación de daños visibles fue muy difícil determinar los niveles de daño en estos tipos de hoja.

Capacidad de superenfriamiento de las hojas de árboles de la laurisilva y su comparación con otras plantas pertenecientes a diferentes ecosistemas canarios

A.M. González-Rodríguez, M.I. Rodríguez-Jiménez, J. Peters, D. Morales y M.S. Jiménez

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de la Laguna, 38206 La Laguna, Tenerife

En nuestros estudios sobre las posibles causas que relegaron a las especies de los bosques de laurel, que se extendían durante el Terciario en la cuenca mediterránea, a vivir en el ambiente más templado y homogéneo de Canarias, es importante conocer su grado de resistencia al frío.

Las plantas resistentes a las bajas temperaturas pueden evitar la formación de hielo en sus tejidos mediante un superenfriamiento que previene la formación de hielo intracelular incluso a temperaturas muy por debajo del punto de congelación teórico de los tejidos. El objetivo de este trabajo es conocer las temperaturas a las que se produce dicho superenfriamiento en árboles de la laurisilva canaria y su comparación con otra especie arbórea que también sufrió este confinamiento, el pino canario y con otras plantas herbáceas que siguen distintas vías metabólicas fotosintéticas.

Las especies estudiadas fueron *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Persea indica* (L.) Spreng., y *Myrica faya* Ait., pertenecientes a la laurisilva; *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC.; y *Tricholaena teneriffae* (L. fil.) Link, *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. y *Brachypodium arbuscula* Knoche, gramíneas presentes en las zonas semiáridas de las Islas Canarias, las dos primeras con metabolismo C_4 y *B. arbuscula* con metabolismo C_3 .

La capacidad de superenfriamiento de las hojas fue determinada por análisis térmico diferencial, que consiste en la detección de un aumento de temperatura en el momento de formación de hielo en el tejido, mediante el registro de la diferencia de temperatura entre la muestra a analizar y una muestra de referencia seca con sendos termopares conectados a un registrador de datos. Las muestras se colocaron en un baño termostático y enfriadas hasta $-22\text{ }^\circ\text{C}$ a una tasa media de enfriamiento de 18 K h^{-1} .

Para la evaluación de la liberación de energía debido a la formación de hielo se determinaron los siguientes parámetros: La temperatura límite de superenfriamiento (T_{sc}), es decir, la temperatura media por debajo del punto de congelación antes de ser detectada la formación de hielo y la temperatura máxima de liberación de energía, es decir, la temperatura a la cual la liberación de calor por cristalización llega a su máximo (T_{ep}). En todas las especies estudiadas se observó un superenfriamiento (T_{sc}) que tuvo lugar, en los árboles de la laurisilva entre -7 y $-12\text{ }^\circ\text{C}$; en el pino canario y en las gramíneas C_4 alrededor de $-12\text{ }^\circ\text{C}$ y en la gramínea C_3 a $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

Gracias a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Ministerio de Educación y Cultura, Proyecto DGICYT:PB94-0580)

Improvement of antioxidant systems by N-nutrition in *Coffea arabica* submitted to high irradiance stress

J.C. Ramalho¹, F.C. Lidon², H.W. Groeneveld³,
M. Teixeira⁴ and M.Á. Nunes¹

¹Centro Estudos Prod. Tecnol. Agrícolas - IICT, Tapada da Ajuda, Ap. 3014,
1301 Lisboa Codex, Portugal

²Sector de Biol. Vegetal, Fac. Ciências e Tecnologia - Univ. Nova Lisboa,
2825 Monte da Caparica, Portugal

³Dept. Plant Ecol. Evolutionary Biology, Utrecht Univ., P.O. Box 80084,
3508 TB Utrecht, The Netherlands

⁴Inst. Tecnol. Química Biológica, Fac. Ciências e
Tecnologia - Univ. Nova Lisboa, Ap. 127, 2780 Oeiras, Portugal

Recent works showed that coffee plants (which grows naturally in shaded habitats) can improve their tolerance to high irradiances, if an appropriate nitrogen nutrition is provided^{2, 6, 7}. In this study, the modulation of antioxidant mechanisms implicated in the acclimation process is investigated.

C. arabica cv. Catuaí plants (1.5-2 years old) were grown in a shaded greenhouse with an average PPFD of $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a photoperiod of 12/12 h, temperature of 20/25 °C (night/day) and RH between 65-70%. Each plant was fed every 30 days, with a complete nutrient solution containing 0.45 mmol of nitrogen (KNO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). A supplementary 0.3 mmol of nitrogen (NH_4NO_3) was given with intervals of 7 days for the high N treatment (2N), 15 days for the intermediate N treatment (1N) and 45 days for the low N treatment (0N). After 6 months, the plants were exposed during 12-14 days to high irradiances (c. $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to undergo photoinhibition. Measurements were done in the 2 top pairs of mature leaves and included: i) the content of the xanthophyll cycle pigments violaxanthin (V), antheraxanthin (A) and zeaxanthin (Z) by HPLC³; ii) estimation of superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production by EPR⁹ and iii) the chloroplastic maximum apparent activities of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)⁴, ascorbate peroxidase (APer) (EC 1.11.1.7)⁵ and glutathione reductase (GRed) (EC 1.6.4.2)⁸.

After 12 days in high light exposure only the 2N plants showed a significant and stabilised increase of 42% in the (V+A+Z) content. Such increase, together with the higher initial amount of V in the 2N plants and a high conversion of V to Z, were responsible for the increase in Z who showed by the 12th day more 180% (2N), whereas 0N and 1N increased only 40% and 78%, respectively. The production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ before the onset of high light did not differ among N treatments. However, by the 12th day the $\text{O}_2^{\cdot-}$ production increased 46% in 0N but only 9% in 2N. By this time the rate of decay of $\text{O}_2^{\cdot-}$ represented 2% in 0N and 4% in 2N of the rate of production. After 12-14 days of high irradiance the activities of the enzymes SOD ($\text{Unid/g}_{\text{dw}}$), APer ($\text{mM ascorbate g}^{-1}_{\text{dw}} \text{min}^{-1}$) and GRed ($\mu\text{mol NADPH g}^{-1}_{\text{dw}} \text{min}^{-1}$) increased, respectively, 18%, 225% and 138% in 2N plants. The 0N

plants presented a 120% increase (SOD) (suggesting the presence of substrate O_2^- , confirmed by the EPR results), 68% (A_{Per}) and 20% (G_{Red}) decreases. The results suggest that high N availability allowed the reinforcement of mechanisms which: i) prevents the O_2^- production; ii) controls the levels of H_2O_2 (through the increase in the maximum apparent activities of A_{Per} and G_{Red}); iii) protects the antennae of LHC II (increase of Z content) through an energy dissipation involving the de-excitation of the singlet state of chlorophyll¹, which helps to maintain the photochemical efficiency of PS II.

1. Demmig-Adams B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1020:1-24.
2. Fahl J.I., Carelli M.L., Vega J. and Magalhães A.C. (1994) *J. Hort. Sci.*, 69: 161-169.
3. Johnson G.N., Scholés J.D., Horton P. and Young A.J. (1993) *Plant Cell Environ.*, 16: 681-686.
4. McCord J.M. and Fridovich I. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6055.
5. Nakano Y. and Asada K. (1981) *Plant Cell Physiol.*, 22: 867-880.
6. Nunes M.A., Ramalho J.C. and Dias M.A. (1993) *J. Exp. Bot.*, 44: 893-899.
7. Ramalho J.C., Pons T.L., Groeneveld H.W. and Nunes M.A. (1997) *Physiol. Plant.*, 100 (in press).
8. Schaedle M. and Bassham J.A. (1977) *Pl. Physiol.*, 59:1011-1012.
9. Sgherri C.L., Pinzino C. and Navari-Izzo F. (1993) *Physiol Plant.*, 87: 211-216.

Inibição do crescimento e alterações na composição mineral do suco xilémico relacionadas com a presença de alumínio na solução nutritiva

V. Quartin¹, J.C. Ramalho², H. Azinheira² e M.A. Nunes²

¹FCA-Univ. Agostinho Neto, PO Box 815, Luanda, Angola

²CEPTA-IICT, Tapada da Ajuda ap. 3014 Lisboa Codex, Portugal

A acidez do solo é um problema que afecta a agricultura em todo o mundo. O crescimento das plantas nestes solos é afectado quer por um efeito directo do valor do pH quer por alterações induzidas na composição mineral da solução do solo. A toxicidade de Al, tem sido referida por vários autores como sendo o principal problema nestes solos.

A inibição do crescimento radicular é uma das primeiras manifestações desta toxicidade. A absorção de nutrientes modificada pela presença de Al vem também a afectar o crescimento da parte aérea.

Com este trabalho pretendemos avaliar alguns efeitos do Al na cv. ARABIAN de tritcale. Os parâmetros estudados foram a biomassa radicular e da parte aérea, a concentração de minerais e a pressão osmótica do suco xilémico, a variação do pH e do NO_3^- da solução nutritiva.

Os ensaios decorreram numa câmara fitoclima, com fotoperíodo de 14 h/10 h, temperatura 25°/20° C durante dia/noite e uma humidade de 65%. A radiação foi de 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas cresceram em hidroponia com solução nutritiva de Moore *et al.* (1976) diluída a 1/4 com pH 4. O tratamento consistiu em adicionar a esta solução 15 ppm de Al sob a forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Foram colocadas 10 plantas /1800 ml de solução. A colheita e as determinações foram feitas em plantas com 15 dias e 4 folhas. Nesta altura, as plantas sem Al tinham 1 a 2 filhos.

Nas plantas com Al, observou-se uma inibição significativa na área e no peso seco da parte aérea de 38 e 34% respectivamente. O peso seco da raiz e a transpiração tiveram uma redução de apenas 12 e 10% respectivamente. O consumo de NO_3^- ($\mu\text{g/ml}$) relativo ao peso seco da raiz reduziu 48%. Os teores de Ca, Mg e P no suco xilémico tiveram uma redução de 71, 47 e 71%. O K aumentou 47%. A pressão osmótica não se alterou.

O pH da solução nutritiva sem Al, subiu para 7.1 nas 24 h que precederam a colheita do suco. O pH da solução com Al, manteve-se a 4.2. No mesmo período, a condutividade registou uma redução de 35 e 28% na solução sem Al e com Al.

Moore, D.P., Kronstad, W.E. & Metzger, R.R. (1976). Screening wheat for aluminium tolerance. In *Plant adaptation to mineral stress in problem soils*. (M.J. Wright, ed.). 287-295. Spec. Pub. Cornell University, Ithaca, N.Y.

Mecanismos fisiológicos de resposta ao stress hídrico em *Vigna* sp.

P. S. Campos, J. Semedo, N. Marques e M. C. Matos

Departamento de Fisiologia Vegetal, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal

O género *Vigna* inclui numerosas espécies e variedades com uma grande adaptabilidade a climas áridos e semi-áridos (Van der Maesen e Somaatmadja, 1989). Várias estratégias podem estar subjacentes às respostas de adaptação à seca. O fecho estomático e o ajuste osmótico muitas vezes precedem respostas mais complexas de tolerância protoplásmica. Este trabalho teve por objectivo analisar o comportamento em termos de relações hídricas de 3 cvs de *Vigna unguiculata* (1183, Lagoa e Epace) e de *Vigna glabrescens* (Vg), que apresentam diferentes graus de resistência à seca no campo e de tolerância membranaar à desidratação. A seca foi induzida por suspensão da irrigação, tendo-se realizado as medições em plantas bem hidratadas (C), sujeitas a desidratação intermédia (S1; valores de RWC entre 75 e 65%), e muito desidratadas (S2; valores de RWC abaixo de 60%). O teor hídrico relativo (RWC) foi medido segundo o método de Catsky (1960). Os potenciais hídrico (ψ_w) e osmótico (ψ_π) das folhas foram obtidos por meio de uma bomba de pressão e de um psicrómetro (Wescor, HR33T), respectivamente. Para as determinações de fotossíntese aparente (P_n) e condutância estomática (g_s) utilizou-se um porómetro/analizador portátil de gases por infra-vermelhos (LI-COR, LI-6200), e foram testadas plantas com valores de RWC entre 85 e 75%. Procedeu-se ainda à quantificação dos teores de prolina (Bates *et al.*, 1973) e açúcares solúveis (Ashwell, 1957) das folhas. No que diz respeito à relação RWC/ψ_w as cvs. 1183 e Lagoa apresentam uma diminuição mais acentuada do teor hídrico relativo do que a cv. Vg. Verifica-se que nas cvs. 1183 e Lagoa a fotossíntese aparente e a condutância estomática são reduzidas a teores hídricos mais elevados do que nas cvs. Epace e Vg. O potencial osmótico foliar diminui em todas as cvs. sujeitas a um nível intermédio de desidratação (S1), mantendo-se esta diminuição em condições de stress hídrico mais severo (S2). Na cv. Vg a percentagem de redução do ψ_π em relação ao controlo (ca. 63%) é superior à que se observa nas 3 cvs. de *Vigna unguiculata*, que variam entre 38 e 42%. Em relação aos teores endógenos de prolina, a cv. Vg apresenta um aumento significativo (80%) em S1, ao contrário das restantes cvs., onde se observa um aumento apenas em condições de stress severo (S2). Os açúcares solúveis tendem a diminuir nos dois níveis de desidratação em todas as cvs. excepto em 1183, onde ocorre um aumento significativo quer em S1 quer em S2. Nesta cv. observa-se também um aumento significativo do peso específico das folhas ao longo da seca. Os parâmetros analisados levam a concluir que Vg é a cv. mais tolerante à seca (redução de P_n e g_s a teores hídricos mais baixos, ajuste osmótico, aumento de prolina), enquanto que as cvs. 1183 e Lagoa parecem ser mais susceptíveis ao aumento da desidratação. Epace apresenta um comportamento intermédio em termos de adaptação a condições de menor disponibilidade hídrica.

- Bates, L.S., Waldren, R.P. e Teare, I., 1973. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Catsky, J., 1960. *Biol. Plant.*, 2: 76-77.
- Van der Maesen, L.J.G. and Somaatmadja, S., 1989. *Plant Resources of South-East Asia*. N. 1, Pulses. Pudoc/Prosea, Wageningen.

Drought effects on photosynthetic electron carriers of *Arachis hypogaea* L.

J. Lauriano¹, F. Lidon², C. Carvalho³, M. C. Matos³

¹Fac. Ciências Agrárias, Univ. Agostinho Neto, P.O. Box 236, Huambo, Angola

²Dept. Fisiol. Vegetal, Estação Agronómica Nacional, Qta do Marquês,
2780 Oeiras, Portugal

³Plant Biology Unit, Fac. Ciências Tecnologia - Univ. Nova Lisboa, Portugal

Water deficit impair the thylakoidal-mediated electron transport in *Arachis hypogaea* L. (5), being investigated the effects of water deficit on the concentration of the photosynthetic electron carriers. This experiment was carried out on two months old peanut (cvs. 57-422, 73-30 and GC 8-35) grown in a glasshouse and submitted to three treatments: control (C), mild drought stress (MDS) and severe drought stress (SDS), having relative water content (RWC) raging between 95-90%, 85-70% and 60-50%, respectively. RWC was determined according to (2). Chlorophyll (Chl) was determined by the method of Arnon (1). The chloroplast preparations for cytochromes (cyt) determination followed (7). Cyt b_{559HP}, b₅₆₃ and b_{559LP} concentrations were determined following (4), while cyt *f* followed (7). Isolation of subchloroplast fractions for plastoquinone (PQ) followed (3), being its content determined according to (6). During MDS, all the cvs. showed a decreased concentration of cyt b_{559HP} (21%, 18%, and 26% for the cvs. 57-422, 73-30 and GC 8-35, respectively) and b_{559LP} (36%, 31% and 21%, for cvs. 57-422, 73-30 and GC 8-35, respectively). Cyt b₅₆₃ concentration only increased in the cvs. 73-30 (139%) and GC 8-35 (60%). PQ slight increase in the cv. 73-30, decreasing with the cvs. 57-422 (81%) and GC 8-35 (35%). In all the cvs., PQ and cyt *b* concentrations decreased under SDS. In the cv. 57-422, PQ as well as cyt *f*, b₅₆₃, b_{559HP} and b_{559LP} decreased: 85%, 18%, 60%, 38% and 53%, respectively. In the cv. 73-30, that decrease was 44%, 56%, 15%, 72% and 72%, respectively. In the cv. GC 8-35 a 68%, 25%, 15%, 72% and 72% decrease was observed. It was concluded that during MDS, the accumulation of photosynthetic electron carriers in all the cvs. increased in the cyt *b*_{6f} complex (excepting cyt b₅₆₃ in the cv. 57-422), whereas cyt content in photosystem II (PSII) decreased. Under SDS, the accumulation of photosynthetic electron carriers coupled either to the cyclic electron transport, either to PSII was inhibited. Yet, this effect was higher in the PSII associated reactions (excepting cyt b₅₆₃ in the cv. 57-422).

¹Arnon, D.I. (1949) *Plant Physiol.* 24:1-15. ²Catsky, J. (1960) *Biol. Plant.* 2:76-77. ³Droppa, M., Masojidek, J., Rózsa, Z., Wolak, A., Horváth, L. I., Farkas, T., Horváth, G (1987). ⁴Houchins, J. P., Hind, G. (1984) *Plant Physiol.* 76: 456:460. ⁵Lauriano, J. A., Campos, P.S., Ramalho, J. C., Lidon, F., Matos, M. C. (1997) *Photosynth.* 33(1): 81-99. ⁶Redfearn, E. R., Friend, J. (1962) *Phytochem.* 1:147-151. ⁷Spiller, S., Terry, N. (1980) *Plant Physiol.* 65:121-125.

Respostas fisiológicas de diferentes variedades de alfarrobeira ao stress hídrico: importância da concentração de N

*Martins, V., Cruz, C., Correia, O. & Martins-Loução, M.A.
Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa,
Campo Grande Bloco C2, Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal
email: maloucao@fc.ul.pt*

A identificação dos processos fisiológicos responsáveis pela tolerância das plantas ao stress hídrico é de extrema importância, particularmente quando se trata da caracterização de cultivares de plantas utilizadas na produção económica, como é o caso da alfarrobeira. A alfarrobeira é uma leguminosa arbórea que tem sido cultivada sem cuidados especiais desde a antiguidade. Este tipo de cultivo originou grande número de variedades ou “cultivares” cuja caracterização fisiológica e genotípica é ainda inexistente. Uma vez que a cultura de alfarrobeira é maioritariamente realizada em condições de sequeiro, interessa, pois, caracterizar a capacidade de tolerância ao stress hídrico de diferentes cultivares, para posterior selecção e cultura intensiva particularmente nas condições de aridez presentes nas diferentes regiões do Mediterrâneo.

O estado nutricional das plantas tem impacto significativo na sua resposta ao stress hídrico. Em alfarrobeiras adultas, em condições de produção, a fertilização azotada tem, aparentemente, efeito positivo na resposta das plantas ao stress hídrico verificado durante o período de verão. No entanto estas respostas foram bastante difíceis de interpretar particularmente devido às complexas interacções presentes em qualquer experiência de campo.

O presente trabalho teve como objectivo averiguar em que medida a adição de fertilização azotada permite aumentar a tolerância de diferentes cultivares de alfarrobeira ao stress hídrico.

O estudo das trocas gasosas, potencial hídrico, fluorescência da clorofila a, e tomada e assimilação de azoto foram realizados nas diferentes cultivares de alfarrobeira sujeitas a diferentes ciclos de stress hídrico.

Verificou-se que as plantas respondem rapidamente ao stress hídrico baixando o potencial hídrico, embora mantendo a condutância estomática e a taxa fotossintética durante os primeiros dias de stress, à semelhança do que foi observado noutros sistemas e noutras condições. Depois da rehidratação a recuperação das plantas é rápida atingindo praticamente os valores de condutância e as taxas fotossintéticas das plantas sem stress. A fertilização azotada teve efeito positivo no crescimento das plantas e induziu maior tolerância ao stress. Os resultados são discutidos de forma a evidenciar o papel da fonte de azoto como regulador osmótico e as suas implicações ecofisiológicas do ponto de vista científico e prático durante o estabelecimento das plantas no campo será discutido.

Características fotossintéticas de folhas de diferentes sexos de uma espécie dioica (*Pistacia lentiscus*)

O. Correia¹ & M.C. Diaz Barradas²

¹Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Bloco C2, 4º Piso, 17000 Lisboa. email: otiliac@fc.ul.pt

²Departamento de Biologia Vegetal e Ecologia, Universidade de Sevilha, Apartado de Correos 1095, 41080 Sevilha, email: diaz@cica.es

De um modo geral, nas plantas de espécies dioicas, o investimento diferencial que normalmente ocorre pode originar uma segregação por habitats de acordo com os sexos, levando a um predomínio de indivíduos masculinos em habitats de recursos limitados.

Estudos recentes sobre a distribuição espacial de *Pistacia lentiscus* em ecossistemas mediterrânicos da Serra da Arrábida revelaram uma distribuição preferencial de indivíduos masculinos em comunidades dos estádios mais avançados da sucessão, enquanto que nos locais recentemente abandonados o número de indivíduos masculinos era semelhante ao número de indivíduos femininos. Os estudos estruturais não revelaram diferenças significativas entre os sexos, no entanto os indivíduos masculinos apresentaram sempre maior porte e maior índice de área foliar.

Será a maior capacidade competitiva e maior tolerância dos indivíduos masculinos apenas devida a uma distribuição diferencial do carbono nos dois sexos ou haverá diferenças nas características fisiológicas?

Neste contexto foram efectuados estudos ecofisiológicos durante o verão através de medidas de fluorescência, da taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática e potencial hídrico. Foram efectuadas curvas de luz e de CO₂ para caracterização das características fotossintéticas das diferentes folhas.

Em condições de stress hídrico acentuado, verificou-se que os indivíduos masculinos apresentam sempre taxas fotossintéticas mais elevadas bem como condutância estomática, no entanto os indivíduos femininos evidenciam uma melhor eficiência do uso da água. As curvas de luz e de CO₂ efectuadas em condições controladas de laboratório e as medidas de fluorescência não mostraram diferenças significativas entre os parâmetros analisados embora se verifique sempre uma tendência para valores superiores nos indivíduos masculinos. Em condições de stress hídrico os indivíduos femininos apresentam valores inferiores de eficiência fotoquímica do PS II (ϕ PS II) e da taxa relativa de transporte de electrões (ETR), apresentando uma limitação relativamente à eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) de 67% enquanto os indivíduos masculinos são menos afectados (apenas 32%).

Os resultados sugerem uma maior tolerância dos indivíduos masculinos ao stress hídrico, manifestado por valores mais elevados de taxas fotossintéticas, ETR e ϕ PS II. No entanto em condições não limitantes não se verificam estas diferenças entre sexos.

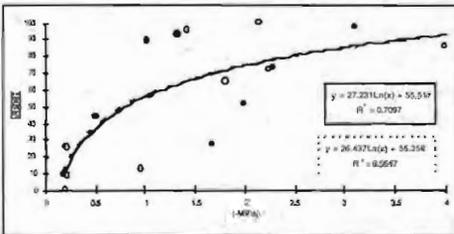
Conductividad hidráulica y resistencia a la sequía en dos cultivares de almendro

F. de Herralde¹, C. Biel¹, M. Cohen¹, I. Batlle² y R. Savé¹

¹Dept Tecnología Hortícola. IRTA, Cabrils, Ctra. Cabrils s/n, Cabrils, Barcelona

²Dept Arboricultura Mediterrània. IRTA, Mas Bové, Apt. 415, 43280 Reus, Tarragona

El almendro (*Prunus amygdalus* Batsch.) es un tradicional cultivo de secano en España, que, con 580.000 ha, es en la actualidad el segundo productor mundial de almendra, después de Estados Unidos. Dada su importancia económica, es de interés el estudio de esta especie, tanto para ampliar los conocimientos que ya se poseen sobre algunas variedades, como para proporcionar nuevos criterios de selección de variedades resistentes a la sequía en programas de mejora. Se compararon la variedades de almendro 'Garrigues' y 'Ramillete', injertadas sobre almendro c.v. 'Mollar de Tarragona'. Los almendros de 20 años de edad, fueron cultivados en secano, en un marco de plantación de 5 x 7 m, en una finca de Mas Bové, Reus (Tarragona). Se midieron parámetros de morfología de dosel y foliar (Percy *et al.* 1989). Se realizó una curva de vulnerabilidad al embolismo en tallos jóvenes (Cochard *et al.*, 1992; Sperry *et al.*, 1988).



Curva de vulnerabilidad al embolismo de las variedades 'Garrigues' (○) y 'Ramillete' (△). Los ajustes logarítmicos corresponden a 'Garrigues' (—) y 'Ramillete' (---); ambos son significativos a (≤ 0.05).

	k_s saturación (ml/mm s MPa)	Densidad foliar (hojas/cm)	Área foliar (cm ²)	Ángulo (°)
Ramillete	0.89 ±0.12	0.90 ±0.07	34.76 ±1.58	93.6 ±20.5
Garrigues	0.64 ±0.14	1.24 ±0.08	20.02 ±2.47	149.8 ±0.24

Tabla donde se muestran los parámetros de la arquitectura del dosel: conductividad hidráulica específica máxima a saturación (k_s saturación), densidad y área foliar y ángulo de inserción de ramas respecto a la vertical.

Estudios previos de las relaciones hídricas de 'Garrigues' y 'Ramillete', muestran como estas dos variedades de almendro se comportan de manera diferente en condiciones de estrés hídrico. (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1993). Estos estudios sugieren que la base fisiológica de dichas diferencias reside en una diferente captación y transporte del agua desde el suelo hasta las hojas. Las curvas de vulnerabilidad muestran un comportamiento idéntico de ambas variedades en lo que se refiere al desarrollo de cavitación en el xilema. Sin embargo, los valores de conductividad específica máxima, el transporte xilemático de agua es un **39%** mayor en 'Ramillete' que en 'Garrigues'. La estructura de la copa de 'Ramillete' es más abierta y menos densa que la de 'Garrigues', y sus hojas son de mayor tamaño. Esto indica que 'Ramillete' debido a su mayor biomasa vegetativa junto con la morfología

y arquitectura del dosel, puede presentar unas tasas transpiratorias más elevadas que 'Garrigues' (Savé *et al.* 1995), lo que es corroborado con una mayor conductividad hidráulica específica. En condiciones hídricas favorables, 'Ramillete' presenta conductancia foliar mayor que 'Garrigues', pero bajo déficit hídrico, las reducciones de conductancia foliar són un 17% más fuertes en 'Ramillete' que en 'Garrigues' (Torrecillas *et. al.*, 1996). Ello, unido a fenómenos de senescencia precoz y abscisión foliar de 'Ramillete' en periodos de estrés hídrico (Planes, 1994), hacen que 'Ramillete' sea una variedad que usa el agua de forma más optimista que 'Garrigues'.

Como conclusión puede aportarse que la distinta estrategia en cuanto al uso del agua en ambas variedades viene regulada por cambios en la arquitectura de la cubierta, es decir, por mecanismos de evitación al estrés hídrico.

- Cochard, H.; Cruziat, P. and Tyree, M.T. 1992. Use of positive pressures to establish vulnerability curves. *Plant Physiol.* (1992) 100, 205-209.
- Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A. and Rundel, P.W. 1989. *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation.* Capman and Hall. London, New York.
- Planes, J. 1994. Relaciones agua-planta del almendro (*Amygdalus communis* L.) en condiciones hídricas adversas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Ruiz-Sánchez, M.C., Sánchez -Blanco, M.J., Planes, J., Alarcón, J.J. and Torrecillas, A. 1993. Seasonal changes in leaf water potential components in two almond cultivars. *J. Agric. Sci.* (1993), 120, 347-351.
- Savé, R., Biel, C., Domingo, R., Ruiz-Sánchez, M.C. and Torrecillas, A. 1995. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. *Plant Science* 110: 165-172.
- Sperry, J.S., Donnelly, J.R. and Tyree, M.T. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment*, 11, 35-40.
- Torrecillas, A., Alarcón, J.J., Domingo, R., Planes, J., and Sánchez -Blanco, M.J. 1996. Strategies for drought resistance in leaves of two almond cultivars. *Plant Science* 118, 135-143.

El presente trabajo ha sido parcialmente subvencionado por la CICYT (AGF96-0520) y por una beca de Formación de Investigadores del IRTA.

Resposta de 8 cultivares de milho à radiação ultravioleta-B (UV-B) em condições naturais

Carlos M. Correia, Eunice L. V. Areal e José M. G. Torres-Pereira

Secção de Engenharia Biológica e Ambiental,
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro,
Apartado 202, 5001 Vila Real Codex, Portugal

Plantas de milho (*Zea mays* L.) foram expostas a radiação UV-B durante 3 meses, com início imediatamente após a emergência. Os resultados deste estudo ilustram que a radiação UV-B afecta negativamente vários processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, mas há grandes diferenças de sensibilidade à radiação UV-B entre cultivares. O ranking de sensibilidade estabelecido variou de -6,6, para a cultivar mais tolerante, a -54,6 para a mais sensível. A redução na produção de biomassa variou entre 10,3% e 30,3%, e pode ser atribuída a decréscimos nas capacidades *source* (área foliar e duração da área foliar) e *sink* (tamanho da espiga) bem como na eficiência da produção de matéria seca (taxa de assimilação aparente). Verificou-se redução acentuada na taxa de fotossíntese aparente em consequência dos aumentos das resistências do mesófilo e dos estomas, dos decréscimos das actividades da RUBISCO e da PEPcase, da redução nos teores em clorofila e carotenóides e da alteração na fluorescência das clorofilas *in vivo*, em particular o aumento de F_0 e o decréscimo de $t_{1/2}$. O aumento de c_i poderá indicar ainda diminuição da taxa de regeneração de RuBP. Não se verificou associação entre sensibilidade à radiação UV-B e a origem geográfica da semente, o mesmo acontecendo com o tipo de milho (híbrido ou cultivar de polinização livre), apesar de a cultivar mais tolerante ser uma cultivar regional. A evidência de grande variabilidade na sensibilidade à radiação UV-B entre cultivares, resultado de diferenças genotípicas, sugere a necessidade de vir a incluir esta característica nos programas de melhoramento do milho.

Pigmentos fotosintéticos y del ciclo disipativo de las xantinas en rebrotes de encina (*Quercus ilex*) después de incendio

X. Aranda¹, L. Llorens¹, K.P. Hogan², M.A. Abadía³ e I. Fleck¹

¹Departament de Biologia Vegetal, Unitat de Fisiologia Vegetal, Universitat de Barcelona

²Manaaki Whenua Landcare Research, PO Box 69, Lincoln 8152, New Zealand

³Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo. 202, 50080 Zaragoza

Partiendo de estudios previos sobre el comportamiento fotosintético de la vegetación de rebrote de encina (*Quercus ilex*) tras incendio forestal^{2,3}, se ha profundizado en los mecanismos de adaptación de dicha especie frente a condiciones de alta irradiancia, temperatura y déficit de presión de vapor que tienen lugar en verano a mediodía.

El trabajo que se presenta se realizó en el verano de 1996 en la Sierra de Garraf (Barcelona) afectada en agosto 1995 por un incendio forestal que consumió 100 hectáreas. Se delimitaron parcelas de bosque intacto y quemado, comparando las respuestas de los rebrotes frente a la vegetación original (control). A fin de estudiar la incidencia de la etapa ontogénica se diferenciaron hojas jóvenes de hojas maduras en encinas control frente a los rebrotes.

Se caracterizó la composición y la variación en pigmentos cloroplásticos a lo largo del tiempo de estudio, profundizando en la relación entre cantidad de xantofilas y proporción de zeaxantina y los procesos de disipación térmica de energía¹ medidos en las mismas hojas en el bosque mediante fluorescencia modulada. Asimismo se estudió la repartición del contenido nitrogenado de las hojas entre proteína soluble y pigmentos cloroplásticos y su relación con las tasas fotosintéticas obtenidas "in situ" mediante un sistema de intercambio de gases.

Los resultados indican una menor participación de mecanismos de disipación térmica en rebrotes frente a hojas control, correlacionados con su composición y contenido en pigmentos, y acordes con el mayor aprovechamiento de la energía absorbida en la asimilación del carbono.

1. Demmig-Adams B. & Adams II W.W. 1996. *Planta* 460-470

2. Fleck I., Grau D., Sanjosé M. & Vidal D. 1996. *Oecologia* 105:286-292

3. Fleck I., Grau D., Sanjosé M. & Vidal D. 1996. *Ann. Sci. For* 53:337-346

* Estudio subvencionado por DGICYT (PB94-0930)

Mobilização do enxofre em folhas de trigo e de milho crescidas em meio completo ou deficiente em enxofre ou em azoto

*M. G. Esquível**, *R. B. Ferreira*** e *A. R. Teixeira**

**Instituto Sup. Agronomia, Lisboa, Portugal; ** ITQB, Oeiras, Portugal*

Plantas de trigo e de milho em cultura hidropónica foram sujeitas a marcação radioactiva com ³⁵S-metionina. Após a marcação radioactiva, as plantas foram separadas em três lotes diferentes de meio nutritivo sem radioactividade (1º lote - meio completo; 2º lote - meio sem azoto e 3º lote - meio sem enxofre). Ao longo do tempo (0, 5, 10, e 15 dias), estudou-se a mobilização do enxofre determinando o seu teor em três fracções diferentes: no extracto foliar total, na proteína solúvel total e na RuBP carboxilase (EC. 4. 1. 1. 39).

Durante o período de tempo estudado, foram obtidos resultados semelhantes nas três fracções analisadas bem como nos ensaios efectuados tanto com o trigo como com o milho. Em condições normais de crescimento observa-se uma translocação gradual do enxofre marcado das raízes e do caule para as folhas mais novas. As folhas mais velhas retêm a maior parte do ³⁵S que apresentavam inicialmente. Contudo, em condições de carência de enxofre, observou-se uma mobilização de ³⁵S para as folhas mais jovens o qual proveio não só de enxofre das raízes e caule, mas também das folhas mais velhas. Por último a deficiência em azoto provocou uma constante translocação de ³⁵S das folhas mais velhas para as mais novas. Os resultados sugerem que em condições normais a mobilidade de enxofre nas folhas é bastante baixa. No entanto, a mobilidade do ³⁵S aumenta em condições de falta de enxofre e é particularmente elevada quando há carência de azoto na planta.

Precondicionamento à secura na videira - efeitos nas relações hídricas e na eficiência fotossintética

M.L. Rodrigues, M.L. Osório e M.M. Chaves

Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex, Portugal

Alterações nas relações hídricas, comportamento estomático e trocas gasosas foram analisadas em videiras envasadas, no decurso de um ciclo de desidratação (taxa de decréscimo do potencial de base - ψ_b de 0,1 MPa dia⁻¹) quer em plantas precondicionadas à secura - PS (sujeitas a ciclos de secura em que atingiram níveis de ψ_b de -0,7 MPa, seguidos de rehidratação) ou em plantas previamente mantidas em boas condições hídricas - S.

Para níveis moderados de stress ($\psi_b = -0,40$ MPa) o potencial osmótico na turgescência decresceu de forma similar nas plantas S e PS (-1,52 a -1,6 MPa) relativamente ao valor de -1,20 MPa das plantas regadas diariamente. Paralelamente, observou-se um aumento do módulo de elasticidade em todas as plantas sob stress e um decréscimo da fracção de água apoplástica nas plantas S. A condutância estomática (g_s) e a taxa fotossintética líquida foram já afectadas por este nível de desidratação, mais marcadamente nas plantas S do que em PS. A capacidade fotossintética, medida a CO_2 saturante (A_{max}) foi reduzida 30% nas plantas S mas manteve-se inalterada nas plantas PS, enquanto que o rendimento quântico do transporte não cíclico de electrões (Φ_e) mostrou um decréscimo de cerca de 20% nas plantas S e PS.

Um nível mais severo de stress hídrico ($\psi_b = -1,10$ MPa) não aumentou a capacidade de ajustamento osmótico e g_s aproximou-se de valores nulos ao longo do dia, limitando fortemente a assimilação do carbono. A meio do dia acentuou-se o decréscimo de Φ_e em todas as plantas sob secura (60% do valor das plantas regadas). Dois dias após a rehidratação, apesar da recuperação do estado hídrico da planta, g_s e A_{max} mantinham-se inibidas quer nas plantas S ou PS.

Embora o precondicionamento à secura da videira não aumente a regulação osmótica foliar, parece determinar uma ligeira aclimação a déficits hídricos moderados ao nível dos estomas e do mesófilo.

Sección C3:

Estreses bióticos y abióticos (I)

Os défices hídricos no solo manifestam-se mais por atrasos no crescimento do que por alterações no padrão de partição do carbono em *Eucalyptus globulus*

J. Osório, M. L. Osório, M. M. Chaves e J. S. Pereira
Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa,
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa, Portugal

Estacas enraizadas de três clones de *Eucalyptus globulus* pertencentes à colecção da empresa SOPORCEL (Lisboa, Portugal) - abreviadamente designados por AR3, CN44 e MP11 - foram sujeitas a dois níveis de défice hídrico no solo durante um período de crescimento de seis meses. Decréscimos nos processos de ramificação, produção de novas folhas e expansão foliar estiveram na origem das largas diferenças de biomassa que as plantas crescidas em deficiência hídrica evidenciaram, ao fim do período experimental, relativamente às bem regadas. Embora não se tenham registado diferenças interclonais significativas na produção de matéria seca, a susceptibilidade da ramificação, da produção de novas folhas e da expansão foliar à deficiência hídrica revelou-se mais acentuada nos clones AR3 e MP11 do que em CN44. O processo convencional de cálculo dos índices de distribuição relativa da biomassa pelas diferentes partes da planta revelou um claro efeito da disponibilidade de água no solo na partição da matéria seca produzida pelas plantas do ensaio. Todavia, a aplicação de uma análise alométrica aos dados da biomassa com o objectivo de ajustar as disparidades de tamanho existentes entre as plantas dos diferentes regimes hídricos evidenciou o desaparecimento daquele efeito, indicando que a água só de maneira indirecta afecta a alocação, através da aceleração do crescimento. Por outro lado, tanto o método convencional como a análise alométrica permitem concluir que os génotipos estudados diferem nos padrões de partição da biomassa acumulada.

Influencia de la absorción foliar de agua como mecanismo de tolerancia a la sequía en *Lavandula stoechas* L.

S. Munné-Bosch, S. Nogués y L. Alegre

Unidad de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal,
Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 645,
08028 Barcelona. E-mail: smunne@porthos.bio.ub.es

La vegetación mediterránea se ha adaptado al largo de la evolución a una marcada estacionalidad caracterizada por un invierno suave y lluvioso y un verano seco y caluroso. Es durante esta estación del año cuando ocurre tanto un estrés hídrico del suelo como una serie de estreses atmosféricos como son la combinación de altas temperaturas, baja humedad y alta radiación.

Se cultivaron plantas de *Lavandula stoechas* L. de un año de edad en los Campos Experimentales de la Universidad de Barcelona. Durante el verano, un lote de plantas fueron regadas mientras que las restantes fueron sometidas a sequía por falta total de riego. Para el estudio de relaciones hídricas, intercambio de gases y fluorescencia clorofílica modulada, se utilizaron brotes homogéneos apicales de diez cm de longitud seleccionados al azar. Durante el verano y otoño se analizaron los ciclos diarios de relaciones hídricas, transpiración, asimilación neta de CO_2 , conductancia estomática, CO_2 intercelular, el cociente F_v/F_m (representativo de la existencia o no de fotoinhibición), la eficiencia cuántica del fotosistema II y el "quenching" no fotoquímico de la fluorescencia, así como la composición en clorofilas y carotenoides totales. Con la llegada del otoño se evaluó el efecto del rocío en condiciones de campo y se comparó con el efecto de la lluvia natural en cuanto al estado hídrico de la planta y la capacidad fotosintética de plantas de *Lavandula stoechas* L. sometidas a sequía.

Por otra parte, en el laboratorio se analizó la potencialidad de las hojas de *L. stoechas* para absorber agua de rocío midiendo la duración, retención y absorción de agua por la cara adaxial de las hojas. Asimismo, se observó mediante microscopía de fluorescencia la penetración del agua por la cara adaxial de la hoja. Se demostró que la absorción de agua de rocío por las hojas es un proceso que se favorece con la presencia de tricomas en el haz de la hoja.

La potencialidad de absorción foliar fue comprobada en el campo. Se demostró que la absorción de agua de rocío permite a la planta tolerar los efectos negativos de la sequía antes de que las lluvias otoñales ocurran, así como mejorar su contenido hídrico e incrementar ligeramente su contenido en pigmentos (tanto en clorofilas como en carotenoides) aunque la capacidad fotosintética en el campo no fue totalmente restablecida hasta que sucedieron las lluvias otoñales.

La absorción foliar de agua ayuda a mantener las relaciones hídricas y, por tanto, el metabolismo de la planta hasta la llegada de las lluvias otoñales.

Efectos de la sequía en la actividad fotosintética de *Rosmarinus officinalis* L. y *Lavandula stoechas* L.

S. Nogués*, S. Munne-Bosch y L. Alegre

Unidad de Fisiología Vegetal. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología,
Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona

*Dirección actual: Department of Biological and Chemical Sciences,
University of Essex, Colchester CO4 3SQ, UK

Se ha estudiado el efecto de la sequía y posterior recuperación hídrica sobre la actividad fotosintética, el rendimiento cuántico del PSII (ϕ), Fv/Fm como parámetro indicador de la presencia o no de fotoinhibición en las plantas, tasa relativa de transporte de electrones y el "quenching" no fotoquímico en *Rosmarinus officinalis* L. y *Lavandula stoechas* L. cultivadas en condiciones de clima mediterráneo.

Los experimentos se llevaron a cabo durante el período verano-otoño del año 1996; se tomaron medidas con un intervalo de 2 horas desde las 6 horas solares hasta el atardecer y con una frecuencia semanal. Durante el período de sequía, agosto y setiembre, la mitad de las parcelas se regaron mensualmente con 80 mm de agua mientras que las restantes no recibieron aporte de agua. A partir de mediados de octubre con la llegada de las lluvias otoñales se estudió la influencia de la recuperación hídrica sobre la capacidad fotosintética. El intercambio de gases se determinó mediante un Licor-6200 y los parámetros de la fluorescencia de la clorofila con un fluorímetro portátil mini-PAM.

R. officinalis y *L. stoechas* presentaron una curva unimodal de absorción de CO₂ con un máximo a primeras horas de la mañana. El estrés hídrico causó un descenso en la fotosíntesis neta acompañado de una disminución de la tasa relativa de transporte de electrones y del rendimiento cuántico del PSII; sin embargo no se observaron variaciones significativas a lo largo del día en la relación Fv/Fm. El aumento del "quenching" fotoquímico junto con los valores estables de la relación Fv/Fm podrían indicar la falta de fotoinhibición en las especies objeto de estudio. El incremento del "quenching" no fotoquímico señalaría una disipación de la energía de excitación y por tanto intervendría en los procesos de evitar la fotoinhibición. Con la llegada de las lluvias otoñales se observó una recuperación rápida de las relaciones hídricas de la planta así como de la absorción del CO₂ y de la eficiencia cuántica de PSII.

Actividad fotosintética, fotorespiratoria y caracteres foliares asociados con tolerancia a la sequía en variedades de algodónero

E.O. Leidi, M. López y J.C. Gutiérrez

*Dpto. Biología Vegetal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC,
Apdo 1052 EP, 41080 Sevilla*

*Dpto. del Algodón, CIFA Las Torres-Tomejil, Apartado Oficial,
41200 Alcalá del Río (Sevilla)*

Entre los mecanismos de adaptación de las plantas a la sequía, el proceso más evidente es la reducción en el número y tamaño de las hojas, que trae aparejado una disminución de la pérdida de agua por evaporación y una reducción en la actividad fotosintética por planta. Un efecto derivado de la disminución de la transpiración es el incremento de la temperatura foliar, fenómeno que puede acarrear importantes cambios en la función fotosintética y la tasa fotorespiratoria. Acompañando a estos cambios, también pueden observarse otras alteraciones estructurales y fisiológicas en las hojas, estudiándose algunas de ellas en este trabajo. En experimentos de campo, se seleccionaron las variedades de algodón Coker 310 (Ck310) y Sicala 33 (Sic33), con distinta tolerancia a la sequía, para la determinación de actividad fotosintética, transpiración, conductancia estomática, respiración y fotorespiración (medida como pico de producción de CO_2 en oscuridad) empleando un analizador de $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ por infrarrojos (ADC-LC2). Las medidas de temperatura foliar se efectuaron por termometría infrarroja. Las hojas usadas para las determinaciones fueron aquellas totalmente expandidas y más próximas al ápice caulinar, empleándose posteriormente para la medida del contenido relativo de agua (CRA), peso foliar específico (PFE), potencial hídrico y discriminación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Δ). Adicionalmente se cortaron porciones de lámina en espacios internervales para estudios histológicos.

La menor disponibilidad hídrica para las variedades en secano produjo una disminución en el CRA, potencial hídrico y aumento en el PFE. No se observaron cambios en Δ para la variedad Sic33, mientras que en Ck310 se observó un ligero aumento de Δ . La variedad menos tolerante a la sequía (Ck310) presentó, efectivamente, una menor actividad fotosintética que la variedad Sic33 bajo condiciones de estrés hídrico, no existiendo diferencias entre ambas variedades en plantas de parcelas bajo riego. La menor actividad fotosintética por unidad de área foliar en Ck310 fue consecuencia, principalmente, de un mayor cierre estomático, si bien las concentraciones de CO_2 subestomático ligeramente superiores a las observadas en Sic33, también sugieren un componente mesofílico de la inhibición. Los cambios y diferencias en PFE entre variedades se pudieron relacionar con diferencias en la morfología foliar, tales como el grosor del mesófilo en empalizada, que podría contribuir también a las diferencias de comportamiento fotosintético bajo condiciones de estrés. En regadío, no se observaron diferencias en la fotorespiración entre variedades. En condiciones de secano, sin embargo, existieron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de fotorespiración, siendo superior en la variedad tolerante Sic33. Los resultados obte-

nidos nos permiten especular con el ya descrito papel protector del proceso fotorespiratorio en el mantenimiento de la maquinaria fotosintética de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico. El mantenimiento de una mayor tasa fotorespiratoria permitiría la disminución del exceso de poder reductor (NADPH), e indirectamente, la reducción de daños por fotoinhibición. La variedad más tolerante a la sequía tendría así mayor capacidad de mantener su maquinaria fotosintética operativa bajo condiciones de estrés que la variedad más sensible.

Trabajo subvencionado por INIA Proyecto No. SC95-084.

Caracteres fenológicos y fisiológicos relacionados con tolerancia a la sequía en cebada (*H. vulgare*)

A. González, I. Martín * y L. Ayerbe*

Unidad de Cereales y Leguminosas, Servicio de Investigación Agraria, C.A.M.,
Apdo.127, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

*CRF- INIA, Apdo. 1045, 28800 Alcalá de Henares, Madrid

La cebada es el cultivo predominante en zonas con clima de tipo mediterráneo. La productividad del cultivo en estas zonas está limitada, principalmente, por el estrés hídrico terminal y las altas temperaturas durante el periodo de llenado del grano. En estas condiciones el objetivo de la mejora es conseguir genotipos con buen rendimiento potencial y que tengan aquellos caracteres fenológicos y fisiológicos que contribuyan a aumentar la tolerancia a la sequía y por tanto el rendimiento cuando el estrés tiene lugar al final del ciclo del cultivo.

Para estudiar los caracteres fenológicos y fisiológicos que contribuyen a aumentar el rendimiento en condiciones de estrés, se plantearon los experimentos en un refugio antilluvia manteniendo una parte en condiciones óptimas de riego que consideramos como control, y otra parte se sometió a estrés hídrico terminal. Como material vegetal se utilizaron ocho genotipos de cebada. Para calcular el rendimiento se utilizó el m² central de cada microparcela. Tanto en el control como en el tratamiento se pusieron cuatro repeticiones por genotipo.

Los parámetros evaluados durante dos años fueron: rendimiento y sus componentes, índice de cosecha, días a emergencia de la espiga y días a maduración. Los caracteres fisiológicos estudiados fueron ajuste osmótico y conductancia estomática.

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

La reducción media del rendimiento del tratamiento respecto al control fue del 41% para el conjunto de los genotipos. Los componentes del rendimiento que afectan más a esta reducción son el n° de espigas por m² y el peso de mil granos.

Existe una correlación negativa muy significativa en sequía entre rendimiento y días a emergencia de la espiga y entre rendimiento y días a maduración ($p=0,01$ y $p=0,001$ respectivamente). En regadío la correlación es baja ($p=0,1$) para días a emergencia y días a maduración. Estos hechos confirman la ventaja de los genotipos precoces cuando se produce una sequía terminal.

La mayor capacidad de ajuste osmótico, medido como contenido hídrico relativo a -3 MPa, mejora el rendimiento en condiciones de estrés hídrico. La variabilidad para ajuste osmótico entre los genotipos estudiados fue importante oscilando entre 72,29 y 59,83 los dos años. La existencia de variabilidad es imprescindible para que un carácter pueda ser utilizado como criterio de selección en programas de mejora. Los genotipos L31 y L40, obtenidos por selección para resistencia a sequía, son los que presentaron los valores de ajuste osmótico más altos.

Los valores de conductancia estomática son mayores en el control que en el tratamiento en todos los genotipos estudiados. L31 y L40 mostraron diferencias entre regadío y estrés significativamente menores que las variedades Viva, Plaisant y Albacete. La correlación entre el rendimiento y la conductancia estomática fue elevada ($r = 0,75$; $p = 0,05$). El mantenimiento de una mayor conductancia de estos genotipos puede haber sido favorecida por la mayor capacidad de ajuste osmótico que presentan.

Variabilidad genética en el efecto del déficit hídrico en suelo sobre el crecimiento foliar en *Trifolium subterraneum* L.

G.A. Fernández, J. Gulías y H. Medrano

Departament de Biologia Ambiental, Universitat de les Illes Balears,
Institut Mediterráneo de Estudios Avanzados (UIB/CSIC),
Cra. de Valldemossa, Km 7.5, 07071 Palma de Mallorca

Uno de los efectos más inmediatos del déficit hídrico en suelo es la reducción de la tasa de aparición de nuevas hojas y/o de la tasa de expansión foliar. Existe variabilidad genética en la incidencia de estas reducciones en especies cultivadas. En especies pratenses en que la cosecha es mayoritariamente masa foliar, la identificación de genotipos con mayor mantenimiento de las tasas de aparición de hoja o expansión foliar en sequía es una vía para mejorar su producción en zonas semi-áridas.

Experimentos anteriores, en condiciones de campo demostraron que en trébol subterráneo existe variabilidad genética en la reducción del crecimiento foliar en sequía. En este trabajo se estudia el efecto del déficit hídrico en suelo sobre las tasas de aparición de hojas nuevas y expansión foliar en seis genotipos de trébol subterráneo.

El experimento fue realizado en condiciones de campo durante el mes de marzo en el centro-sur de Mallorca. Se sembraron plantas de *Trifolium subterraneum* L. ssp *brachycalicinum*. de 6 diferentes genotipos: Clare, 1022, 1229, Aubarca, 1929, y Funtanabona. Por cada cultivar y tratamiento se prepararon tres parcelas de 1,4m x 0,9m, en cada una de las cuales se sembraron 12 plantas. La sequía se implantó mediante supresión de riego y se dispuso una cubierta de plástico a modo de invernadero para prevenir la incidencia de lluvia sobre las parcelas. Se determinaron semanalmente el potencial hídrico (Ψ) al amanecer y mediodía, la tasa de aparición de hojas (TAH) y la tasa de expansión de las hojas (TEH) durante un periodo de cuatro semanas. La TAH se determinó mediante el recuento del número hojas en dos ramas de cada parcela por genotipo y tratamiento. La TEH se calculó mediante la medida de la variación en longitud de la nerviación central en un período de tres días, de cuatro hojas inmaduras (con los tres folíolos plegados) por genotipo y tratamiento. El potencial hídrico se determinó con la Cámara de Scholander, en cuatro hojas adultas por genotipo y tratamiento.

El potencial hídrico de referencia (amanecer en riego) se mantuvo en torno a -0,05MPa. En sequía se llegó a -0,20 MPa al final del tratamiento, aunque a mediodía descendió a -0,15 MPa en riego y a -2,00 MPa en sequía. La TAH aparece claramente ajustada desde los primeros días de sequía. Los valores más negativos de Ψ_{md} se corresponden con los más bajos en TEH (r^2 0,9). La TEH parece por tanto estar mucho más condicionada por la tensión hídrica del día que por el potencial de referencia (Ψ_{am}).

La mayor reducción debida a la sequía se da en el genotipo 1022 que pasa de 0,34 a 0,18 hojas/día. En Funtana Bona se mantienen valores similares en torno a 0,39 hojas/día. Las TEH (mm/día) en riego oscilan entre 1,20 y 1,50. La mayor reducción en la TEH tiene lugar en el genotipo 1929 en que se pasa de 1,20 a 0,25 mm/día. La mayor estabilidad en este parámetro se observa en 1022 (1,50 mm/día en riego y 0,85mm/día en sequía).

Utilización de las curvas presión-volumen para la selección precoz de genotipos resistentes a condiciones de estrés hídrico

M. Fernández*, P. Pita*, R. Alía**, L. Gil*, J.A. Pardos*

* Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal, E.T.S.I. de Montes, UPM, Ciudad Universitaria, 28040. Madrid

** Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28080 Madrid

La determinación de parámetros hídricos deducidos de las curvas presión-volumen se ha venido utilizando ampliamente en el estudio del comportamiento diferencial de distintos genotipos ante situaciones de estrés hídrico.

Dentro del ámbito de la mejora genética forestal en España, existen programas de mejora de especies importantes para la forestación y la producción de madera y pasta de celulosa como son, respectivamente, *Pinus pinaster* y *Eucalyptus globulus*. La consideración de la resistencia a condiciones de estrés hídrico y la posibilidad de una selección a edad temprana reviste especial interés con vistas a la adaptación del material vegetal al lugar de plantación.

Se ha aplicado esta metodología a la diferenciación de plantas de *Pinus pinaster* y *Eucalyptus globulus* por su respuesta al nivel de disponibilidad de agua del sustrato. Los parámetros hídricos analizados son: potencial osmótico a turgencia plena ($\Psi\pi_{100}$), y en el punto de marchitez ($\Psi\pi_0$), contenido hídrico relativo (CHR_{100} , CHR_0) y módulo de elasticidad (ϵ). Complementariamente se evalúan otros parámetros (morfológicos, de crecimiento e intercambio gaseoso) con el fin de relacionarlos con los anteriores.

Eucalyptus globulus

Se utilizan estaquillas enraizadas de siete clones selectos suministrados por la Empresa Nacional de Celulosas, con una altura inicial media de 28 cm. Tras un riego inicial a capacidad de campo se realizan riegos individualizados previa pesada en días alternos; añadiendo la cantidad de agua necesaria para mantener la humedad del sustrato en torno a unos valores prefijados para tres tratamientos. Con este diseño las plantas se someten a un estrés progresivo, hasta alcanzar un nivel de estrés severo (potencial hídrico del suelo de -1 MPa). Se realizan de 3 a 6 curvas por clon y tratamiento a los 60 y 90 días de regar a capacidad de campo.

Se obtienen diferencias significativas entre clones en los parámetros hídricos analizados solo para el periodo de imposición del estrés (medición a los 60 días). Los clones con mejor respuesta al estrés en términos de crecimiento mantienen mayores transpiraciones y dan menores valores de $\Psi\pi_{100}$ y $\Psi\pi_0$ y mayores valores de ϵ . El máximo ajuste osmótico obtenido es de 4 bar. Bajo un estrés severo y sostenido (medición a los 90 días) todos los clones muestran una respuesta análoga.

Pinus pinaster

Se utilizaron plantas de dos procedencias ibéricas (Oria, Arenas), escogidas por su buen comportamiento frente al estrés hídrico respecto a otras de climas menos cálidos. Se cultivaron en vivero bajo dos regímenes de disponibilidad de agua, regándose hasta capacidad de campo cuando el potencial hídrico del suelo bajaba hasta -0,5 y -1,5 MPa, respectivamente. Durante su primera estación vegetativa se realizaron mediciones de los parámetros antes señalados en cuatro fechas (20-jun., 30-jul., 10-sep. y 10-nov.) a razón de 4 plantas por procedencia. En general, todos los parámetros hídricos presentaron diferencias significativas entre tratamientos de riego y entre fechas de medida, indicando procesos de aclimatación de las plantas a las condiciones ambientales. No así entre las dos procedencias ensayadas. No obstante, el crecimiento de las plantas estuvo bien correlacionado con la eficiencia intrínseca en el uso del agua y, en alguna fecha de medición, con las pequeñas diferencias obtenidas de los parámetros hídricos analizados ($\Psi\pi_{100}$, $\Psi\pi_0$, ϵ , CHR).

Estudio fenológico de distintas variedades de guisante

M. Manzanares, F.J. Sánchez, E.F. de Andrés, J.L. Tenorio y L. Ayerbe
Area de Agricultura Sostenible, C.R.F. INIA, Apdo. 8111, 28080 Madrid

La fenología es considerada como un componente importante en la adaptación de las plantas a un ambiente determinado. Factores ambientales tales como la temperatura, radiación y condiciones hídricas pueden modificar sustancialmente esta fenología (Desclaux y Roumet, 1996). El agua es un factor limitante de la producción de guisante en Castilla. El cultivo puede verse afectado en gran medida por una sequía terminal produciendo una gran reducción del rendimiento potencial de grano. Una manera de resistir a la sequía es escapar a la misma completando el ciclo de cultivo antes de que se produzca el estrés hídrico. Así, independientemente de la presencia de otros caracteres, la perfecta adecuación del ciclo reproductivo al medio es una gran condición de resistencia a la sequía. Por eso consideramos importante el conocimiento del desarrollo fenológico de distintos cultivares de guisante.

Se realizó un ensayo en el invernadero en el que se sembraron 18 variedades de guisante en macetas de 22 cm de diámetro con una mezcla de arena, turba y tierra (2:1:1). Las plantas se regaron semanalmente. Se sembraron 2 plantas por tiesto. Individualmente en cada planta se indicó la aparición de los pisos florales desde el inicio de la floración. Se marcaba cada piso con una etiqueta apuntando la fecha de floración, estado límite de aborto (al menos hay una semilla con una longitud >6mm) y madurez fisiológica (vainas con color amarillo). Al final del ciclo se estimó el rendimiento y sus componentes: número de vainas por planta, número de semillas por vaina, peso seco de paja y peso seco de grano. Se calcularon las progresiones de la floración, estado límite de aborto y madurez fisiológica mediante correlaciones entre la aparición de pisos y el tiempo expresado como grados días acumulados desde la emergencia basándonos en los trabajos realizados por Ney y Turc (1993).

La progresión de la floración, estado límite de aborto y madurez fisiológica no presentan diferencias muy marcadas entre distintas variedades. Se puede distinguir entre variedades precoces, tienen una floración más temprana, variedades tardías y variedades con un comportamiento intermedio. Las variedades más precoces son las que presentan una progresión de la floración más lenta. Existe una correlación negativa entre la progresión de la floración y la precocidad expresada en grados días acumulados desde la emergencia de las semillas, considerando las variedades más precoces las que necesitan menos grados día para la floración. También existe una correlación positiva entre la progresión de la floración y los distintos componentes del rendimiento. Las variedades con una progresión más rápida presentan un mayor número de vainas y un mayor peso seco de paja y grano.

Se podría pensar que variedades como Frisson, Cea, RV-8, Esla y Azur que son de las más tardías pero con una progresión de la floración rápida podrían escapar más fácilmente a la sequía que variedades como Desso x Filby, Solara y Moron que son más precoces pero

tienen una progresión más lenta y por tanto más susceptibles de disminuir el rendimiento en condiciones de secano.

La progresión del estado límite de aborto y de la madurez fisiológica no presenta diferencias marcadas entre variedades y no parece afectar en gran medida a los componentes del rendimiento.

Desclaux, D. y Roumet, P. 1996. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars. *Field Crops Research* 46:61-70.

Ney, B. y Turc, O. 1993. Heat-unit-based description of the reproductive development of pea. *Crop Science* 33:550-514.

Acumulación en condiciones de estrés hídrico de azúcares solubles y prolina en diferentes genotipos de guisante

*F.J. Sánchez, M. Manzanares, E.F. de Andrés, J.L. Tenorio y L. Ayerbe
Area de Agricultura Sostenible, Centro de Recursos Fitogenéticos - INIA,
Apartado de Correos 8111, 28080 Alcalá de Henares (MADRID)*

La falta de agua es, generalmente, el factor más importante que limita la productividad de las cosechas. En respuesta al déficit hídrico se ha observado en muchas plantas la acumulación de aminoácidos, azúcares, azúcares alcohol y betaínas. Estos compuestos son denominados solutos compatibles, pues pueden acumularse en el interior de las células en altas concentraciones sin perjudicar la actividad de las macromoléculas. Se considera que los solutos compatibles pueden contribuir a la tolerancia del estrés, ya que reducen la dependencia de la absorción de iones Na^+ y Cl^- (los cuales son perjudiciales a concentraciones elevadas) como agentes osmóticamente activos y protegen la estructura de las membranas biológicas y macromoléculas de los daños causados por la deshidratación. Nosotros hemos estudiado en una colección de 50 genotipos de guisante, la variabilidad en la acumulación de prolina y azúcares solubles en plantas sometidas a estrés hídrico, con el fin de determinar su importancia práctica como indicadores de resistencia a la sequía.

Las plantas se cultivaron en macetas de 15 cm de diámetro rellenas de vermiculita, en una cámara de cultivo a una temperatura día/noche de 23°C/16°C, una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 16 h. Después de 24 días, regando periódicamente con agua y 0,3% fertilizante Bayfolan (Bayer), las plantas se sometieron a deshidratación interrumpiendo el riego. A intervalos regulares, se tomó el segundo par de folíolos completamente desarrollado (en las variedades semiafilas se tomaron las estípulas) y se determinó la concentración de prolina, según el método de Bates et al. (1973), y de azúcares solubles, según el método de la antrona. Sobre las mismas plantas y al mismo tiempo se midió el potencial hídrico y osmótico.

En todas las variedades estudiadas, la concentración de azúcares solubles durante el periodo de estrés se mantuvo constante o se incrementó en relación con su correspondiente control bien regado. La concentración de azúcares en las variedades de hoja convencional fue significativamente mayor ($p=0,01$) que en las variedades semiafilas. Por si solos, los azúcares solubles son responsables, dependiendo de la variedad, del 5-20% del potencial osmótico. Existe una correlación altamente significativa ($p=0,001$) entre el incremento en la concentración de azúcares durante el estrés y la capacidad para realizar ajuste osmótico.

La concentración de prolina se mantuvo constante y a niveles próximos al control durante la primera fase del estrés hídrico. Conforme fue progresando el estrés, y el potencial osmótico declinó por debajo de -1,5 MPa, se produjo un dramático incremento (hasta 40 veces en algunas variedades) en la acumulación de prolina. A pesar del formidable aumento de la concentración de prolina, esta tan solo fue responsable, como máximo, del 1% del potencial osmótico medido. Para estudiar las diferencias varietales en la acumulación de prolina se calculó la concentración del aminoácido a -2 MPa, y se encontró que las

variedades que acumulan más prolina tienen un contenido hídrico relativo más bajo a pérdida de turgencia ($p=0,001$).

Los resultados obtenidos parecen indicar que la acumulación de azúcares solubles puede conferir tolerancia a la sequía, incrementando la capacidad de realizar ajuste osmótico. Sin embargo, la acumulación de prolina parece actuar mediante un mecanismo diferente, protegiendo las macromoléculas de los daños causados por la desecación.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. 1973. *Plant and Soil* **39**: 205-207.

Influência da aplicação de calda bordalesa nas relações hídricas da *Vitis vinifera* L. (cv. Touriga Nacional)

J.M. Moutinho-Pereira, A.A. Oliveira, N. Magalhães e J.M. Torres-Pereira
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD),
Apt. 202, 5001 Vila Real Codex, Portugal

Pretende-se conhecer o comportamento fisiológico e vitícola dum clone de Touriga Nacional em condições naturais de elevado stress hídrico e térmico. Nestas condições, é estudada a influência que a calda bordalesa (formulação clássica), aplicada no princípio do período estival e mais ou menos coincidente com o período do pintor, tem nesse mesmo comportamento, em particular, no compromisso fotossíntese-transpiração das videiras.

Com esta estratégia procura-se conhecer novas potencialidades da calda bordalesa, nomeadamente, no âmbito das relações hídricas das videiras, e que resultem em benefício para uma maturação mais equilibrada das uvas e para níveis de produtividade aceitáveis e compatíveis com a qualidade do vinho.

O trabalho está a ser executado na Região Demarcada do Douro, Norte de Portugal, cujo clima estival é tipicamente Mediterrânico, com insuficiências hídricas acentuadas durante o período estival. Procedem-se a determinações foliares das trocas gasosas, do potencial hídrico, dos principais parâmetros associados à fluorescência de clorofila *a* (F_v/F_m , F_m , F_o , F_v , $t_{1/2}$), da temperatura das folhas, pigmentos clorofilinos, e de parâmetros relacionados com o controlo da maturação, como grau brix, acidez total e peso e volume dos bagos.

Relativamente aos resultados já obtidos, principalmente pelos valores de fluorescência basal (F_o) e teores em clorofila, constata-se uma maior protecção das folhas que foram pulverizadas com calda bordalesa, relativamente às folhas de videiras testemunha. Como consequência, a nível das trocas gasosas, essas folhas manifestaram taxas de fotossíntese líquida mais elevadas, embora as taxas de transpiração não tivessem sido muito diferentes das plantas testemunha. Contudo, os valores do potencial hídrico foliar, sobretudo os que foram medidos antes do nascer do Sol, evidenciaram melhor comportamento das plantas tratadas com calda bordalesa. Ao nível dos parâmetros vitícolas determinados, de uma forma geral, o grau brix, o peso e o volume dos bagos é ligeiramente mais favorável nas videiras que foram tratadas com calda bordalesa.

Efecto secuencial de la lluvia ácida simulada y la sequía en los procesos fotosintéticos de *Pinus radiata*

A.Mena, J. Hernández-Allika, M.K. Duñabeitia, C. González-Murúa,
M.Lacuesta*, A. Muñoz-Rueda

Dpto. Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias

*Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/EHU

La teoría más aceptada sobre las causas de la declinación de los bosques es la teoría de los estreses múltiples. La vegetación en el campo está expuesta, bien de forma simultánea o secuencialmente, a diferentes condiciones estresantes tales como temperaturas extremas, falta de nutrientes en el suelo, sequía y contaminación ambiental. Por ello, a la hora de analizar el efecto de la lluvia ácida sobre un bosque es preciso tener en cuenta los efectos interactivos o aditivos con otros estreses.

Los estudios que analizan los efectos de la precipitación ácida sobre la fotosíntesis de las especies arbóreas son discordantes, con informes de que la lluvia ácida puede estimular, disminuir o no tener efecto alguno sobre la fotosíntesis neta. No obstante, en aquellos casos en que se ve disminuida la fotosíntesis neta, se ha señalado que la lluvia ácida causa alteraciones en la funcionalidad de los cloroplastos, alteración de las actividades del PSI y PSII, modificaciones del comportamiento estomático y, en fin, aumentos en las tasas de respiración. Todos estos efectos harían a la planta menos eficiente en su metabolismo del carbono y reducirían su capacidad de resistencia frente a otros estreses como el frío, el ozono o la sequía.

En este trabajo hemos investigado el efecto secuencial de la lluvia ácida y la sequía en los procesos fotosintéticos de *Pinus radiata*. Para ello, las plantas fueron tratadas con lluvia ácida simulada, aplicada a dosis equivalentes a 15 mm de precipitación por semana, durante 4 semanas. El pH de la lluvia se ajustó a 3,0, obteniéndose mediante la adición de ácido sulfúrico con una cantidad adecuada de agua destilada. Los estudios se llevaron a cabo analizando el efecto de la lluvia ácida durante tres semanas después de su aplicación. Posteriormente, las plantas fueron sometidas a un periodo de 20 días de sequía, estudiándose la respuesta de las mismas a la privación de agua y su posterior recuperación.

La lluvia ácida produce una progresiva, aunque ligera, caída de la fotosíntesis neta que llegó a ser de un 21% al final del estudio, disminución que no se debía a reducción de la conductancia estomática ya que ésta sólo se vio afectada al final del ensayo. Por otro lado se apreció un continuo aumento de la Ci que llegó a alcanzar un 125% respecto del control, lo que confirma que el efecto sobre la fotosíntesis no se debía a cierre estomático. El tratamiento de sequía redujo fuertemente (90%) la tasa de fotosíntesis de las plantas control, y prácticamente en un 99% en las plantas que habían estado sometidas a lluvia ácida. Puestas a recuperarse (riego) las plantas no tratadas alcanzaron valores cercanos al 70% respecto del valor antes de la sequía, mientras que las plantas que habían sufrido episodios de lluvia ácida no alcanzaron recuperaciones superiores al 40%. Esta fuerte inhibición de la fotosíntesis causada por el tratamiento secuencial de lluvia ácida y sequía no se

debía tampoco a un mayor cierre estomático ya que al final del estudio los valores de conductancia eran similares en plantas control y tratadas mientras que los valores de C_i se mantenían elevados en las plantas tratadas y se recuperaban en los controles.

El análisis de fluorescencia muestra que la eficiencia fotoquímica del PSII no se vio apenas alterado durante el tratamiento con lluvia ácida. Por el contrario la sequía, y sobre todo la sequía en plantas tratadas previamente con lluvia ácida causaron disminución del cociente F_v/F_m , valor que se recupera prácticamente en plantas controles pero no en plantas sometidas a lluvia ácida más sequía posterior.

Así pues, las plantas que han sufrido episodios de precipitación ácida se ven más afectadas cuando se someten a períodos de sequía que las plantas que no han sufrido el efecto de la lluvia ácida.

Proyecto GV: 118.310-IDT/93

Efecto secuencial de la lluvia ácida y la sequía en las relaciones hídricas de plántulas de *Pinus radiata*

A. Mena, J. Hernández-Allika, B. González-Moró, A. Muñoz-Rueda, M. Lacuesta*

Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencias

*Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco/EHU

La contaminación ambiental y el cambio climático representan los factores que de forma más marcada pueden contribuir a la decadencia de los bosques. La lluvia ácida deteriora seriamente el ecosistema forestal. El impacto de la lluvia ácida como causante del deterioro de los bosques ha sido muy estudiada en Norteamérica y en Europa Central, siendo menos investigada su incidencia en los bosques del sur de Europa y la cuenca Mediterránea, si bien se han descrito procesos de lluvia ácida tanto en Grecia como en Italia y en España.

Para que el estudio de los efectos de la lluvia ácida sobre las plantas del bosque sea realista, es preciso investigar no sólo su efecto directo, sino también las interacciones con otros estreses. Así es conocida la interacción de la lluvia ácida con las bajas temperaturas y su influencia sobre el endurecimiento frente al frío, o su interacción con otros contaminantes atmosféricos como son el ozono, el amonio o el alto CO₂; sin embargo ha sido menos estudiada su influencia sobre posteriores períodos de sequía, como los que con frecuencia ocurren en la cuenca Mediterránea.

En este trabajo hemos investigado el efecto secuencial de la lluvia ácida y la sequía en las relaciones hídricas de plántulas de *Pinus radiata*. Con esta finalidad se realizaron experimentos en los cuales las plántulas fueron tratadas con lluvia ácida aplicada a dosis equivalentes a 15 mm de lluvia por semana, durante 4 semanas. El tratamiento ácido se obtuvo por adición de ácido sulfúrico con una cantidad adecuada de agua destilada, ajustándose el pH a 3.0. Se excluyó la aplicación de la lluvia al suelo protegiéndolo mediante una película impermeable. Los estudios se llevaron a cabo analizando el efecto de la lluvia ácida durante tres semanas después de su aplicación. Posteriormente las plantas fueron sometidas a un periodo de 20 días de sequía, estudiando la respuesta de las mismas a la privación de agua y su posterior recuperación (riego).

Nuestros estudios muestran como las plantas que reciben un buen aporte hídrico no presentan alteración ni de su potencial hídrico, ni del contenido hídrico relativo cuando son tratadas con lluvia ácida simulada. Sin embargo, cuando las plantas previamente tratadas con lluvia ácida se someten a un periodo de sequía y posteriormente se las riega, se observa una más lenta recuperación del estrés hídrico en las plantas tratadas con lluvia ácida. Es de destacar que la lluvia ácida produce un aumento de la conductividad de las acículas (135%) lo que indicaría una alteración de las membranas. Este efecto se ve todavía más acentuado cuando tras la precipitación ácida se sigue un periodo de sequía, lo que determina que tras el riego las plantas tratadas que habrían sufrido un proceso de lluvia ácida se recuperen peor y mantengan niveles de conductividad acicular superiores al 260% respecto de las plantas control. Este efecto sobre la conductividad de las membranas está estrechamente relacionado con las alteraciones de la capacidad fijadora de carbono que se produce en dichas plantas.

Efecto del estrés hídrico y del paraquat sobre los enzimas y metabolitos del ciclo ascorbato-glutación en *Pisum sativum* L.

I. Iturbe-Ormaetxe, P.R. Escuredo, C. Arrese-Igor y M. Becana

Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo. 202, 50080 Zaragoza

Introducción.

En condiciones naturales los cultivos están expuestos a varios estreses ambientales que disminuyen la producción. A nivel molecular el efecto negativo del estrés puede ser una consecuencia, al menos en parte, del daño oxidativo a importantes biomoléculas, como resultado de un aumento en la producción de radicales libres y/o una disminución de la capacidad antioxidante de la planta. En este trabajo se han determinado los efectos de la sequía y del paraquat (PQ) sobre diversos parámetros fisiológicos y bioquímicos de hojas de guisante, incluyendo el contenido de antioxidantes y el daño oxidativo a biomoléculas.

Materiales y métodos.

El crecimiento de las plantas de guisante cv. Lincoln y la determinación de antioxidantes se efectuaron según se ha descrito en trabajos anteriores. La medida del potencial hídrico foliar se llevó a cabo con una cámara de presión (Soil Moisture). Los tratamientos de sequía (por supresión de riego) y PQ (100 mM, 6 h) se iniciaron cuando las plantas tenían 30 días de edad. Los dos niveles de sequía (-1.3 y -1.9 MPa) se alcanzaron aproximadamente 7 y 9 días después.

Resultados y Discusión.

Las hojas sometidas a sequía moderada mostraron ya síntomas incipientes de estrés oxidativo, tales como un incremento de la actividad CuZn-superóxido dismutasa (SOD) del citosol y cloroplastos y de la Mn-SOD de mitocondrias, así como del contenido de peróxidos de lípidos (malondialdehído) y de proteínas modificadas oxidativamente (grupos carbonilo). La sequía severa produjo un descenso generalizado de los nucleótidos de piridina y de los antioxidantes (catalasa, enzimas y metabolitos del ciclo ascorbato-glutación). De hecho, en las hojas sometidas a sequía, este ciclo estaría limitado no sólo por la inhibición de los correspondientes enzimas sino también por la reducción del aporte de NADPH fotosintético, necesario en último término para reducir el peróxido de hidrógeno a agua. Además, la sequía severa indujo la acumulación de malondialdehído, proteínas oxidadas y Fe catalítico (Fe capaz de participar en reacciones Fenton generando radicales libres). El tratamiento con PQ provocó también una importante disminución de la capacidad antioxidante de las hojas y la acumulación de proteínas oxidadas. Sin embargo, hubo diferencias importantes entre los efectos de la sequía severa y el PQ. Así, el PQ disminuyó el contenido de ascorbato y NADPH y las actividades ascorbato peroxidasa y Fe-SOD, pero aumentó los contenidos de glutatión oxidado, NAD⁺, NADH y Fe catalítico.

Toda esta información nos ha servido para investigar, entre otros aspectos, la implicación del aumento de Fe catalítico y de la disminución de la capacidad antioxidante en el inicio del estrés oxidativo, así como para evaluar la utilidad de los métodos de cuantificación de la oxidación de lípidos y proteínas como marcadores de estrés en plantas.

Escuredo y cols. (1996) *Plant Physiol.* 110: 1187-1195

Gogorcena y cols. (1995) *Plant Physiol.* 108: 753-759

Moran y cols. (1994) *Planta* 194: 346-352

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PB95-0091 de la Dirección General de Enseñanza Superior (MEC).

Efeito do défice hídrico e de temperaturas outonais elevadas no desenvolvimento de anomalias e abscisão de gomos florais no damasqueiro

M. C. Medeira

Estação Agronómica Nacional,

Quinta do Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

O défice hídrico e temperaturas elevadas, durante o Outono, têm sido considerados como responsáveis pelo aparecimento de anomalias e pela queda de gomos florais no pessegueiro e damasqueiro (Brown, 1958; Carraut, 1968; Monet e Bastard, 1971; Viti e Monteleone, 1991).

Neste trabalho pretende-se estudar a acção conjunta ou isolada do défice hídrico e de temperaturas elevadas outonais na queda de gomos, aparecimento de anomalias, e esterilidade, utilizando para o efeito a variedade CNEFF1 que sofre, geralmente, intensa queda de gomos florais.

Foram utilizadas árvores envasadas, com três anos, enxertadas em *P. armeniaca*. As plantas foram observadas em quatro tratamentos. Dez árvores foram submetidas a temperatura elevada. Cinco estiveram em permanente disponibilidade hídrica e cinco foram submetidas a quatro períodos de seca, entre 20 de Outubro e 11 de Novembro, intercalados por ligeira hidratação. Dois grupos de cinco árvores permaneceram à temperatura exterior. Um dos grupos também deixou de ser regado a 20 de Outubro, segundo o procedimento anteriormente descrito e o outro foi mantido em permanente disponibilidade hídrica.

As determinações do potencial hídrico foram efectuadas com a bomba de pressão de Scholander, num grupo de esporões, com a mesma dimensão, com localização semelhante no copado e à sombra. Foram retiradas amostras de gomos florais, para estudo histológico, no início, no decurso e após os tratamentos.

O défice hídrico (potencial hídrico variando entre $-3,61 \pm 0,03$ MPa e $-3,78 \pm 0,21$ MPa, no final de cada período de seca), em condições de temperatura elevada ($7,5^\circ\text{C}$ a 36°C) aumentou significativamente o destaque de gomos florais pelo receptáculo e pelo *axis*. O défice hídrico (potencial hídrico variando entre $-3,20 \pm 0,21$ MPa e $-3,60 \pm 0,08$ MPa, no final de cada período de seca) aumentou significativamente o destaque de gomos florais pelo receptáculo e pedúnculo, à temperatura ambiente ($3,8^\circ\text{C}$ a $29,7^\circ\text{C}$).

O défice hídrico teve um efeito significativamente mais nefasto do que a temperatura elevada no destaque de gomos florais ao nível do receptáculo e *axis*, após o final dos tratamentos.

Nas zonas pelas quais os gomos se separam foi observada a diferenciação de seis a doze camadas de células, no parênquima medular da região de transição entre pedúnculo e *axis*, nas quais foi observada plasmólise, colapso de protoplastos, rotura de paredes celulares e formação de lacunas que se unem e levam à separação do gomo. Tais zonas devem ser verdadeiras zonas de abscisão. Diferentemente do que foi descrito no pessegueiro (Zanchin *et al.*, 1995), formam-se muito precocemente, observando-se primeiro o colapso dos protoplastos e só depois a rotura das paredes celulares.

Noutros casos, as áreas pelas quais os gomos se destacaram, corresponderam a zonas de lise originadas por organismos plasmodiais das brácteas que penetraram o receptáculo e o pedúnculo.

O déficit hídrico aumentou a ocorrência de gomos com lesões associadas a organismos plasmodiais, quer no tratamento a temperatura elevada, quer à temperatura ambiente. A ocorrência de maior número de gomos com anteras danificadas no tratamento de rega a temperatura elevada deve estar associada ao maior número de formas de resistência e de células amiboides desses organismos, observado na cavidade do receptáculo ou à superfície das anteras. A destruição de anteras e pistilos por organismos que atingiram a cavidade do receptáculo e que tiveram capacidade de penetração e invasão dos tecidos internos destes órgãos, levou à indução de esterilidade masculina e feminina.

Brown D.S., 1958. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 71: 77 - 87.

Carrut A., 1968. *Acta Hort.* 11(3):479-484.

Monet R., Bastard Y., 1971. *Physiol. Vég.* 9(2):209-226.

Viti R., Monteleone P., 1991. *Acta Hort.* 293 (1): 319-326.

Zanchin A., Marcato C., Trainotti L., Casadoro G., Rascio N., 1995. *New Phytol.* 129:345-354.

Efecto de la inoculación con hongos ectomicorrícicos en la respuesta a la sequía de plantones de *Pinus radiata*

M.K. Duñabeitia, S. Hormilla, B. González-Moro, A. Muñoz-Rueda,
C. González-Murua

Dpto. Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, U.P.V/E.H.U

La simbiosis ectomicorrícica puede mejorar la respuesta fisiológica de la planta a situaciones adversas de crecimiento. Entre otras ventajas, la simbiosis ectomicorrícica permite a la planta incrementar la superficie de contacto suelo-raíz, incrementar la absorción de agua y nutrientes y mejorar la tolerancia de la planta a condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, como ya ha sido demostrado en varias ocasiones, los posibles beneficios aportados por el hongo ectomicorrícico a la planta varían dependiendo de la especie fúngica asociada.

El objetivo planteado en este trabajo es el de determinar el modo en el que la simbiosis ectomicorrícica modifica la respuesta fotosintética de plantones de *Pinus radiata* sometidos a un estrés de sequía edáfica, así como evaluar la respuesta de la planta dependiendo de la especie fúngica asociada.

Para llevar a cabo el estudio, plantones de *Pinus radiata* de un mes se separaron en siete grupos, uno de los cuales se mantuvo sin inocular (control) y cada uno de los seis grupos restantes se inoculó con una especie fúngica ectomicorrícica diferente (*Boletus pinophilus*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arhizus*, *Rhizopogon vulgaris*, *Rhizopogon luteolus* y *Scleroderma citrinum*). Transcurridos desde la inoculación cinco meses de crecimiento en invernadero, se determinaron los porcentajes de micorrización para cada especie fúngica y posteriormente, las plantas se sometieron a un estrés de sequía edáfica por suspensión de riego. La determinación de las diferencias en la respuesta de las plantas inoculadas con las anteriores especies fúngicas se llevó a cabo midiendo el potencial hídrico foliar, los parámetros de intercambio gaseoso y los parámetros de fluorescencia.

El potencial hídrico foliar descendió progresivamente a medida que aumentaba el tiempo transcurrido sin riego, observándose un retraso en el tiempo que tardan las plantas micorrizadas en alcanzar los potenciales hídricos más bajos (aproximadamente 10 días en condiciones de estrés hídrico severo). Los resultados indicaban que la inoculación con *R. vulgaris*, *L. bicolor* y *S. citrinum* contribuía al mantenimiento de un potencial hídrico mayor en la planta así como a una mejora en la eficiencia en el uso del agua. En las plantas inoculadas con *R. vulgaris* y *S. citrinum* se apreciaban tasas de fotosíntesis mayores a lo largo de todo el periodo de sequía, y en el resto de las especies las tasas de fotosíntesis eran superiores al control, excepto a los 40 días. Igualmente, en el caso de las plantas inoculadas con *R. vulgaris*, *L. bicolor* y *S. citrinum* el retraso en el descenso del potencial hídrico permitió a las plantas micorrizadas mantener una eficiencia de carboxilación mayor respecto a las plantas no inoculadas a lo largo de todo el periodo de sequía. Se observó el mismo efecto sobre este parámetro durante los 30 primeros días en plantas inoculadas con *R. luteolus*, *P. arhizus* y *B. pinophilus*.

Los parámetros de fluorescencia indicaron que, en general, tanto en plantas inoculadas como en controles, no se producía fotoinhibición durante los primeros 20 días, tiempo en el que las plantas controles alcanzaban valores del potencial hídrico de -1,8 MPa. A partir de los 30 días se producía un daño fotoquímico, siendo las plantas controles así como las inoculadas con *P. arhizus* las más sensibles. Por el contrario, en las plantas micorrizadas con *R. vulgaris*, *L. bicolor* y *S. citrinum*, la eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) se mostraba mucho menos alterada, produciéndose un daño fotoinhibitorio significativamente menor.

Podemos concluir que en todos los casos, la micorrización mejora la respuesta de la planta a la sequía, sobre todo en estrés hídrico moderado (-1,2 MPa a -2,2 MPa), si bien el grado de mejora es variable dependiendo de la especie fúngica asociada. Destaca la mayor tolerancia a la sequía de las plantas micorrizadas con *Rhizopogon vulgaris*, *Scleroderma citrinum* y *Laccaria bicolor*, produciéndose una mejora de las relaciones hídricas de la planta, así como una mayor protección del aparato fotoquímico.

Relaciones hídricas y fotosíntesis en plantas de pimiento infectadas con *Verticillium dahliae* Kleb

N. Goicoechea¹, J. Aguirreolea¹, S. Cenoz² y J.M. García-Mina²

¹Departamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona

²Departamento de Investigación y Desarrollo, Grupo Inabonos-Roullier, c/ Ferrocarril s/n, 31012 Pamplona

Los hongos del género *Verticillium* son patógenos que causan marchiteces vasculares en una amplia variedad de plantas. En el caso del pimiento, la marchitez o "seca" inducida por *V. dahliae* Kleb constituye un importante factor limitante de su cultivo, especialmente en el área mediterránea. Su incidencia es notable en Navarra al ser la planta de pimiento del "Piquillo" una de la más sensibles a la infección (García-Mina y col., 1996).

El hongo causal es un patógeno edáfico que penetra a través del sistema radicular e invade sistémicamente al hospedador vía xilema. Los síntomas se caracterizan por marchitez, clorosis, defoliación prematura y necrosis vascular.

A pesar de que la enfermedad ha sido descrita en diversos cultivos, no están aún dilucidadas las bases fisiológicas de la marchitez; por ello, el propósito de este trabajo ha sido estudiar, en condiciones controladas, el desarrollo de la enfermedad en pimiento del "Piquillo de Lodosa", mediante la medida de los siguientes parámetros: estado hídrico (contenido hídrico relativo CHR, y potencial hídrico foliar Ψ_a), fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, niveles de ácido abscísico xilemático, y parámetros de crecimiento. Las medidas foliares se realizaron en la tercera y cuarta hoja totalmente desarrolladas, empezando por el ápice.

Los parámetros más sensibles a la infección fueron el potencial hídrico foliar y la conductancia estomática, cuyo descenso fue acusado a partir de la primera semana de la inoculación. El inicio de la defoliación y una reducción notable en la fotosíntesis se observaron a partir de las dos semanas de la infección, mientras que el contenido hídrico relativo y el nivel de clorofilas sólo descendieron en las etapas medias y finales de la enfermedad. No se observó correlación entre los niveles de ácido abscísico xilemático y la conductancia estomática.

Los efectos de *V. dahliae* sobre las plantas infectadas, a diferencia de lo observado en el caso de infección por *Phytophthora capsici* (Aguirreolea y col., 1995), están en relación con la disminución progresiva del Ψ_a y CHR foliares. Sin embargo, la intensa y precoz defoliación observada sólo podría explicarse por un posible efecto toxigénico del patógeno y alteración en el balance hormonal.

El presente trabajo ha sido financiado en parte con una ayuda del Grupo Inabonos-Roullier.

García-Mina J.M., Jordana R., Aguirreolea J., Hernández M.A. (1996). The effect of a special organic amendment on the development of pepper plants cultivated in a soil infested with *Verticillium dahliae*. *Fertilizers and Environment* (Ed. C. Rodríguez-Barrueco), Kluwer Academic Publishers, pp. 301-303.

Aguirreolea J., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M., Salaverri J. (1995). Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit. *Plant Pathology* 44: 587-596.

Cambios en la actividad fotosintética de plantas infectadas por tobamovirus

J. Rahoutei¹, I. García-Luque² y M. Barón¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas (CSIC), Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

²Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Velázquez, 144, E-28006 Madrid

Numerosos factores de estrés para las plantas tienen un efecto primario sobre el proceso fotosintético, afectando la estructura y función del cloroplasto. En el caso de una infección viral, existen muy pocos estudios que evalúen los daños causados por los virus en el aparato fotosintético y relacionen éstos con la aparición de los síntomas de la infección en las plantas (1, 2, 3).

En estudios preliminares encontramos diversas alteraciones en el aparato fotosintético de plantas infectadas por distintos tobamovirus (4). En el presente trabajo, plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron infectadas con dos cepas del virus del moteado suave del pimiento, una del de la paprika (PMMV-S, PMMV-I y PaMMV) y virus con genomas híbridos de los anteriores (THI-3 y THG-2) (5). Los efectos de la infección viral en fotosíntesis se midieron en hoja y en distintas preparaciones cloroplastídicas como cloroplastos íntegros, membranas tilacoidales y partículas de Fot II aisladas de plantas infectadas. Para el análisis de los distintos parámetros fotosintéticos, distinguimos entre material procedente de hojas sin síntomas, que estaban plenamente desarrolladas en el momento de la infección y hojas que, tras producirse ésta, habían desarrollado los correspondientes síntomas. Con ellas se llevó a cabo la determinación de la operatividad del transporte electrónico con el electrodo de O₂ y diversas medidas con el fluorímetro PAM de fluorescencia variable (curvas de inducción, curvas de relajación, y seguimiento de los distintos coeficientes de quenching) en hoja y en distintas preparaciones cloroplastídicas. Asimismo se realizó el análisis electroforético del patrón polipeptídico de membranas tilacoidales procedentes de plantas infectadas, comparándolo con el de plantas sanas. La presencia de la proteína de cubierta viral en cloroplastos procedentes de plantas infectadas fue detectada por inmunoblotting.

Las determinaciones anteriores se realizaron en distintos estadios de la infección, comparando los resultados con aquellos obtenidos en plantas sanas.

De cara a identificar las regiones virales implicadas en la inhibición del proceso fotosintético, finalmente comparamos las alteraciones del aparato fotosintético producidas por la infección con las cepas del virus del moteado suave del pimiento y la paprika (PMMV-S, PMMV-I y PaMMV), con aquellas inducidas por virus con genomas híbridos de los anteriores.

1. Banerjee N., Wang J.Y. and Zaitlin M. *Virology*, 207, 234, 1995.
2. Dawson. W.O. *Virology*, 186, 358, 1992.
3. Reinero A. and Beachy R.N. *Plant Physiol.* 89, 111, 1989.
4. Barón M., Rahoutei J., Lázaro J.J. and García-Luque I. En: *Photosynthesis from light to biosphere*. vol.4, 897. P. Mathis, ed. Kluwer Academic Publishers, 1995.
5. de la Cruz A., López L., Tenllado F., Díaz Ruiz J.M., Sanz A.I., Vaquero C., Serra M.T., García Luque, I. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, 10, 107, 1997.

Efectos de las infecciones por hongos fitopatógenos sobre la ultraestructura celular y el contenido en citoquininas (ribósido de zeatina) en diversas especies vegetales

M. López-Carbonell, A. Moret y M. Nadal

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de Barcelona,
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

El sistema de defensa de los vegetales frente a estreses bióticos y abióticos viene controlado por las fitohormonas (Vizárová, 1993). Las citoquininas son reguladores endógenos del desarrollo vegetal que están involucradas en el desarrollo de síntomas visibles de enfermedades producidas por hongos patógenos (Dermastia y Ravnikar, 1996). Cuando ciertos hongos infectan las hojas de las plantas vasculares, se originan unas zonas necróticas que, conforme la hoja envejece, quedan rodeadas por áreas de células todavía verdes cuyo contenido en citoquininas es superior al del resto de la hoja (Greene, 1980). El objetivo del presente trabajo es doble: 1- estudiar las alteraciones ultraestructurales y 2- estudiar el contenido en ribósido de zeatina (RZ) de hojas con zonas infectadas (senescentes) y con zonas aún sanas ("islas verdes") de distintas especies vegetales, entre ellas: *Hedera helix*, *Pelargonium zonale*, *Prunus avium* y *Rubus fruticosus*.

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras foliares se procesaron según las técnicas usuales de doble fijación con glutaraldehído (2%) y con tetróxido de osmio (1%) según Parker y Ford (1982) y se incluyeron en resina Spurr (Spurr, 1969). Se realizó una doble tinción de los cortes ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las fotomicrografías se obtuvieron con un microscopio Philips 301. El contenido de RZ se determinó según adaptación del método descrito por Prinsen *et al.* (1995) y esencialmente según Thomas *et al.* (1995). Tras obtener los extractos en metanol (80%) durante una noche (-20°C) y centrifugar a 24.000 g, 15 min., 4°C, se purificaron a través de dos cartuchos C₁₈ de fase reversa y se eluyeron con metanol (80%). Los eluidos se evaporaron *in vacuo*, se redisolviéron en agua destilada y se analizaron mediante un test ELISA con anticuerpos monoclonales específicos anti-RZ (Phytosciences, Francia).

Respecto a la ultraestructura celular, debemos resaltar que las células de hojas infectadas presentan importantes alteraciones, tanto a nivel de orgánulos (principalmente cloroplasto) como de membranas (plasmalema y tonoplasto). Los cloroplastos muestran un aspecto hinchado, desorganización tilacoidal y estructuras electrodensas (unas esféricas y otras fibrilares) de dimensiones variables. Las células están, en la mayoría de los casos, plasmolizadas; las membranas presentan marcadas ondulaciones que en ciertos casos llegan a fragmentarse. En cuanto al contenido en RZ, indicaremos que todas las muestras foliares estudiadas presentan unas concentraciones superiores en las zonas verdes respecto a las de las zonas infectadas. Así pues, las islas verdes en hojas de hiedra tienen casi 20 veces más RZ (219.8 pmol g⁻¹, pf) que las zonas senescentes (8.1 pmol g⁻¹, pf). En algunos casos, como en el del geranio, el contenido de RZ es tres veces superior (263.8 pmol g⁻¹,

pf) en las zonas verdes respecto al de las zonas senescentes (73.6 pmol g^{-1} , pf). De forma similar, las áreas verdes de las hojas de cerezo tienen cinco veces más RZ ($462.2 \text{ pmol g}^{-1}$, pf) que las áreas amarillentas (78.3 pmol g^{-1} , pf). Finalmente, el contenido de RZ de las islas verdes en hojas de zarzamora es seis veces superior ($441.6 \text{ pmol.g}^{-1}$, pf) al de las zonas senescentes (73.9 pmol g^{-1} , pf). Estos resultados, si bien preliminares, apoyarían el hecho ya conocido de que las "islas verdes" tienen un contenido en citoquininas superior al del resto de la hoja infectada (Greene, 1980) y, por otra parte, confirmarían el papel de estas fitohormonas en el retraso de la senescencia (Letham y Palni, 1993). Sin embargo, son necesarios más datos para profundizar en el estudio de las respuestas de las plantas frente a este tipo de estreses bióticos.

Estudio de la potencialidad antifúngica de flavonas polimetoxiladas presentes en *Citrus*

M. C. Arcas, A. Ortuño, O. Benavente, F. Sabater y J. A. Del Río
Departamento de Biología Vegetal (Unidad Fisiología Vegetal), Facultad de Biología,
Universidad de Murcia. 30100 Murcia, España

Las flavonas polimetoxiladas son flavonoides que presentan numerosas funciones fisiológicas, tanto desde el punto de vista ecológico, ofreciendo protección a la propia planta, como desde el punto de vista de su aplicación farmacológica.

Aunque la concentración de estos compuestos en los cítricos es baja, se sabe que existen tejidos en los se detectan mayores niveles, como es el caso del flavedo en los frutos, habiéndose descrito también su presencia en algunos subproductos de la industria de los cítricos, como los aceites esenciales.

En este trabajo se procede a la extracción selectiva mediante disolventes orgánicos de las flavonas polimetoxiladas presentes en aceites esenciales de diferentes especies cítricas (pomelo, limón, clementina, naranja amarga y naranja dulce), para analizar la capacidad que tales compuestos presentan sobre los procesos de crecimiento de tres hongos muy importantes para los cítricos, debido a las pérdidas económicas que ocasionan en la postcosecha, como son *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* y *Geotrichum sp.*

La aplicación de la fracción polimetoxilada, de los aceites esenciales, al 1% en el medio de cultivo, revela que dichas flavonas muestran propiedades antifúngicas frente a los tres hongos analizados, detectándose inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum* en un 100% para los extractos procedentes de los cítricos denominados "dulces" (limón, clementina, y naranja dulce), y una inhibición del 77% para los denominados "amargos" (aceite de pomelo y aceite de naranja amarga).

Phytophthora citrophthora es inhibido en un 100% por los extractos denominados "amargos" (pomelo y naranja amarga), detectándose una inhibición de un 72% para el aceite de clementina, del 47% para el aceite de limón y del 14% para el aceite de naranja dulce.

Geotrichum sp. muestra mayor sensibilidad a los extractos "amargos", detectándose una inhibición alrededor del 57% para los extractos procedentes de aceite de pomelo y de naranja amarga; mientras que para los extractos procedentes de aceite de clementina, naranja dulce y limón, se produce una inhibición del 47%, 34% y 8%, respectivamente.

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT: Proyecto ALI95-1015, España.

Potato plants treated with decis®: effects on RuBisCo activity and on tuber starch content

F. Fidalgo, I. Santos and R. Salema

Departamento de Botânica e Centro de Citologia Experimental (IBMC),
Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 823, 4150 Porto, Portugal

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the world's major food crops and produces more dry matter and protein per hectare than the major cereal crops.

Decis® (deltamethrin as active ingredient), an insecticide of the pyrethroid group, is currently used in Portugal by local farmers to control the Colorado potato beetle, the more destructive insect pest that can attack the potato plants. This pest is present in various European countries and when uncontrolled, cause total crop loss.

Since the most widely way to control potato beetle is the use of pyrethroid insecticides and the knowledge about their effects on the plants is limited, it was considered important to study how the physiological processes of this crop are affected and its consequences on tubers by the agrochemical decis®, under field cultivation.

Potato plants (cv. Désirée) were grown in the field at density of four plants/m² in four 6.7x3.5 m plots, about 3 m apart; two plots were assigned for the control, where the beetles were daily collected manually and the other two for insecticide treatment. The plants were sprayed with decis®, at the recommended dose (7.5g active ingredient/ha) at 21, 38 and 52 days after emergence of plants (dae) and three days after each spraying (24, 41 and 55 dae) leaf samples were collected for activity determination of the key photosynthetic enzyme RuBisCo. At the end of the period of cultivation, after harvest, larger tubers were selected and used for enzymatic quantification of starch.

In general treated plants appeared more green than control ones, showing far less pronounced symptoms of senescence. The activity of RuBisCo in control leaves decreased gradually with time; by day 41 was found a decrease of about 7% in relation to the value quantified on the 24 dae; an additional decrease of 14% was determined at 55 dae. A different behaviour was found in treated leaves; at 24 and 41 dae, RuBisCo activity was very similar to the values found for control leaves. On the contrary, in the last quantification (55 dae) the activity was 25.4% higher than in the controls (control=40.89±1.65 nkat NADH/gf.w.; treated= 51.29±2.07 nkat NADH/gf.w.) with a value similar to that found at 41 dae in these treated plants, indicating maintenance of RuBisCo activity between 41 and 55 dae. Analysis of the tuber quality concerning the starch level revealed that the treatment of plants caused a significant increase of this polysaccharide as compared to control tubers, with a difference of 6%.

The higher starch content in tubers produced by insecticide treated plants is consistent with the maintenance of higher levels of RuBisCo activity in treated leaves and with the delay of senescence of the foliage of these plants promoted by the application of decis®.

The insecticide treatments lengthened the life cycle of the potato plants allowing that the leaves act as sources for carbohydrates for a long period and as result an increase in the supply of assimilates to sink organ - the tuber - certainly occurred.

The data obtained show that the treatment of potato plants with the synthetic pyrethroid decis® had no negative effects on the RuBisCo activity and even maintained higher levels of RuBisCo through the life cycle of these plants; this effect indirectly allowed the accumulation of starch in the tubers, for a longer period, thus making them with a nutritional value higher than control tubers.

Since Colorado potato beetle might deeply affect crop yield and the chemical treatment of the plants is an obligatory practice to control this insect, it can be concluded that the application of decis® is recommended whenever this dangerous pest might occur.

Efeitos da temperatura de crescimento no aparelho fotossintético e na termotolerância de *Lupinus albus* L.

M. L. Osório, J. Osório, J. S. Pereira e M. M. Chaves

Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa,

Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa, Portugal

Alterações estruturais e funcionais no aparelho fotossintético de *Lupinus albus* L. cultivados em dois regimes térmicos (25/20°C and 15/10°C) foram examinadas em folhas recém-expandidas de plantas no mesmo estágio de desenvolvimento. A “performance” do aparelho fotossintético foi inferida a partir de medições das taxas de libertação de oxigénio e da fluorescência modulada clorofila *a* em diferentes condições de temperatura e luz. A uma densidade de fluxo fotónico de 175 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e à medida que a temperatura de medida foi incrementada (de 25 a 40°C) a taxa de libertação de O_2 e o rendimento quântico do transporte de electrões pelo PSII (ϕ_{PSII}) decresceram, enquanto o quenching não fotoquímico da fluorescência da clorofila *a* (NPQ) e o quenching fotoquímico da fluorescência basal (q_o) aumentaram em folhas de ambos os regimes térmicos. Estes efeitos foram mais drásticos para o regime 15/10°C. Os decréscimos no ϕ_{PSII} estão correlacionados com decréscimos no quenching fotoquímico da fluorescência (q_p) e na eficiência intrínseca dos centros abertos do PSII durante a iluminação (F' / F'_m). Quando a temperatura decresceu (de 25 a 10°C) os efeitos na actividade fotoquímica do PSII *in vivo* foram similares em ambos os tipos de folhas, no entanto as folhas de 15/10°C exibiram taxas de libertação de O_2 (por área foliar) muito maiores do que as folhas crescidas a 25/20°C. Comparando as curvas de resposta à luz verificou-se que as taxas de fotossíntese máxima foram afectadas pela temperatura de crescimento sendo mais elevadas em plantas crescidas a 15/10°C, enquanto que a eficiência quântica aparente da fotossíntese não sofreu alterações. Constatou-se que folhas de plantas cultivadas a 15/10°C eram capazes de manter uma fracção maior de Q_A oxidados relativamente a Q_A reduzidos a elevada PFD, independentemente das medições serem feitas a altas ou baixas temperaturas, enquanto que as folhas do outro regime só mostraram este efeito a elevadas temperatura de medida. Por outro lado, observou-se que a temperatura crítica que provoca efeitos irreversíveis na fotossíntese (T_c) foi maior, cerca de dois graus centígrados, nas folhas das plantas cultivadas a temperatura mais elevada. Pode-se concluir que o crescimento a temperaturas mais elevadas resulta: i) numa “performance” fotossintética menor de *L. albus* a temperaturas inferiores a 25°C, contrariamente a *L. albus* cultivado a temperaturas mais baixas; ii) num aumento da “performance” fotossintética a temperaturas muito elevadas; iii) num incremento da estabilidade do PSII nestas plantas comparativamente às cultivadas a 15/10°C.

sHSP de *Quercus suber* : Clonaje y su patrón de expresión en embriones somáticos secundarios

D. Verdaguer*, G. Huguet,# P. Puigderrajols# B. Llompart#, A. Nadal#,
M. Pla# y M. Molinas#

* *Departament de Ciències Ambientals, Unitat de Biologia Vegetal*

Departamento de Biología, Unidad de Biología Celular, Facultat de Ciències,

Universitat de Girona, Campus de Montilivi,

17071 Girona, Espanya

Todos los organismos responden a temperaturas elevadas con la producción de proteínas que se inducen por choque de calor (HSPs) (Waters et al., 1996). Además los últimos resultados indican que varias HSPs también protegen a las células de otros streses.

Las HSPs de tamaño menor (sHSPs) (17 a 30 KDa) son especialmente abundantes y diversas en plantas superiores. Se ha sugerido que *in vivo* actúan como chaperonas, contribuyendo al desarrollo de la resistencia al estrés.

Nuestro equipo ha aislado y secuenciado un nuevo clon de cDNA, Qs shsp17, procedente de *Quercus suber*. La secuencia muestra que el clon de cDNA Qs shsp17 contiene una ORF de 154 aa, y presenta una masa molecular aproximada de 17.38 KDa. La comparación de la secuencia revela un alto grado de homología con las proteínas pequeñas inducidas por choque de calor de la clase I.

En algunas especies se ha visto que las sHSPs de la clase I se expresan sin necesidad de estrés durante el desarrollo del embrión. Primero son detectadas en la fase tardía de la maduración del embrión, luego aumentan en las semillas deshidratadas y rápidamente su presencia disminuye durante la germinación (Wehmeyer et al, 1996). Su expresión se ha descrito a nivel de tejido meristemático y provascular. Se ha postulado que la presencia sHSP esta relacionada con la tolerancia del embrión a la desecación (Prändl et al., 1995).

En nuestro laboratorio hemos analizado el patrón de expresión de Qs shsp17 en embriones somáticos secundarios (Puigderrajols et al., 1997) mediante la hibridación *in situ*. Experimentos preliminares muestran que mRNA de Qs shsp17 son abundantes en el tejido provascular del pecíolo cotiledonar, en el eje embrionario, y también en el tejido meristemático del apex caulinar, aunque no haya tenido lugar el proceso de desecación característico de los embriones zigóticos. Otros experimentos están en proceso para entender mejor el papel de sHSPs en la embriogenesis somática repetitiva.

Prändl, R., Kloske, E. y Schöffl, F., 1995. *Plant Mol. Biol.* 28: 73-82.

Puigderrajols, P., Fernández-Guijarro B., Toribio, M. and Molinas, M., 1996. *Int. J. Plant Sci.* 157(6): 674-684.

Waters, E.R., Lee, G.J. and Vierling, E., 1996. *Journal of Experimental Botany* 296: 325-338.

Wehmeyer, N., Hernández, L.D., Finkelstein, R.R. and Vierling, E., 1996. *Plant Physiol.* 112: 747-757.

**Reacciones oxidativas de defensa en raíces aeropónicas estériles de
plántulas de girasol (*Helianthus annuus*, L.)
desencadenadas por tratamiento con Metil-Jasmonato**

I. Garrido, F. Espinosa, M.A. Paredes y M.C. Alvarez-Tinaut
U.E. Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Extremadura, 06071-Badajoz

Las infecciones por patógenos desencadenan una amplia gama de reacciones de defensa en las plantas. Entre los procesos más rápidamente detectados tras el ataque microbiano se encuentran la producción de O_2^- y H_2O_2 , siendo ampliamente estudiado el "burst" oxidativo que provoca el tratamiento con diferentes elicitors en cultivos celulares (Apóstol et al. 1989). En la síntesis de estas especies activas están involucradas diferentes actividades enzimáticas exocelulares (óxido-reductasas, peroxidasas y superóxido-dismutasa - SOD-), discutiéndose en la actualidad la relación con la cadena redox del plasmalema (Auh y Murphy, 1995) y con los sistemas de transporte de H^+ y K^+ de dicha membrana (Murphy y Huerta, 1990; Vera-Estella et al, 1992). En el presente trabajo se trata de estudiar la inducción de algunas de estas reacciones por la aplicación de Metil-Jasmonato (MeJA), que se ha propuesto como una de las señales químicas implicadas en el desencadenamiento de las reacciones de defensa.

Se han utilizado plántulas intactas de girasol enano, cultivadas durante 36 h en la oscuridad a 27° C, en las condiciones de esterilidad normalmente usadas en los cultivos "in vitro", realizándose las medidas con las raíces sin cortar de la plántula en presencia o no de 1.8 μ M de MeJA.

El consumo de O_2 se midió polarográficamente, cada 5 min, tras encerrar herméticamente la raíz de una plántula ($n \geq 6$, en cada tratamiento) en la cámara de un oxígrafo Hansatech LD2, saturando el medio (2 mL Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM, pH 6.0) con aireación entre dos medidas. La actividad peroxidasa ácida exocelular se midió por el método de Ngo y Lenhoff (1980) modificado, con una raíz ($n \geq 6$, en cada tratamiento), con aireación, midiéndose los cambios de absorbencia del medio a 590 nm, cada 5 min. La actividad SOD exocelular de las raíces se midió mediante el método de Giannopolitos y Ries (1977) con dos raíces ($n \geq 6$) tras inducir la reacción durante 1 min por iluminación. Las actividades enzimáticas también se midieron en el fluido extracelular obtenido por centrifugación de las raíces de plántulas intactas, refiriéndose a μ g proteína medidos por el método de Bradford. Igualmente se hicieron controles con peroxidasa y SOD de rábano (Sigma).

El consumo de O_2 por la raíz de las plántulas intactas y la actividad peroxidasa ácida exocelular, medidas en el mismo material y condiciones, daban una respuesta similar a la aplicación de MeJA, mostrando un "pico" de consumo de O_2 que oscilaba entre 1400 y 1500 μ L O_2 /h.raíz, que coincidía con el "pico" de máxima actividad peroxidasa exocelular. La aparición de estos "picos" de actividad oxidativa puede variar, según la raíz, entre 5 y 15 min después de la aplicación de MeJA. Las raíces control, no tratadas, mostraban un

consumo de O_2 que oscilaba entre 700 y 1000 $\mu\text{L } O_2/\text{h.raíz}$, pudiendo algunas de estas raíces mostrar espontáneamente un mayor consumo de O_2 , siempre inferior al de las tratadas (como máximo de 1200 $\mu\text{L } O_2/\text{h.raíz}$) y siempre a tiempos más largos (a partir de 15 min). Esta respuesta también se observa en la actividad peroxidasa, interpretándose como indicación de que la reacción puede producirse también espontáneamente por el estrés de manipulación de las raíces, pero la aplicación de MeJA la desencadena de manera más temprana e intensa.

Los controles realizados demuestran que el MeJA empleado no afecta a la actividad peroxidasa ni SOD de rábano, ni tampoco interfiere con los sustratos de las respectivas reacciones de medida. Igualmente, tampoco afecta apreciablemente la actividad SOD exocelular soluble medida en el fluido intercelular de la raíz. En consecuencia, las diferencias que se observan en la actividad SOD exocelular de raíces de plántulas intactas han de ser atribuidas a diferencias de sustrato endógeno (radicales O_2^-). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento con las raíces intactas no nos permiten dilucidar, inequívocamente, si la función de la SOD exocelular es actuar sobre dichos radicales O_2^- , presumiblemente producidos por la cadena redox del plasmalema, para formar el H_2O_2 necesario para la actuación de la peroxidasa exocelular, como se ha propuesto (Auh y Murphy, 1995). En la actualidad se realizan experiencias con inhibidores específicos que nos permitan conclusiones definitivas.

**Obtención de callos de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.)
tolerantes al herbicida 2,6-diclorobenzonitrilo: caracterización
preliminar de la tolerancia**

A.E. Encina, R.M. Moral, J.M. Sevillano, J.L. Acebes, J. M. Alvarez
Dept. Biología Vegetal, Lab. Fisiología Vegetal, Fac. de Biología,
Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24007 León

El 2,6-diclorobenzonitrilo (DCB) es un herbicida preemergente que inhibe la biosíntesis de celulosa (Montezinos y Delmer, 1980). Los cultivos celulares, por su mayor homogeneidad celular, son sistemas óptimos para estudiar el modo de acción del herbicida así como para caracterizar el mecanismo de adquisición de tolerancia. Se han descrito líneas celulares tanto de dicotiledóneas (tabaco y tomate) como de monocotiledóneas (cebada) tolerantes al herbicida que muestran alteraciones en la estructura y composición de la pared celular (Shedletzky y col, 1990, 1992).

Nuestro objetivo se centra en el estudio del mecanismo de tolerancia al DCB en cultivos celulares de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.). Para ello se han obtenido callos a partir de yemas apicales de plantas jóvenes. En ausencia del inhibidor y tras 3 semanas de cultivo, los callos multiplican por 2.81 y 2.55 sus pesos frescos y secos iniciales respectivamente. La I_{50} de los cultivos (concentración que inhibe el 50% del crecimiento) está entorno a $0.1\mu\text{M}$ de DCB. Concentraciones $0.3\mu\text{M}$ de DCB producen la muerte de los cultivos. Mediante subcultivo en concentraciones crecientes del herbicida se han obtenido callos capaces de crecer en concentraciones de DCB $4\mu\text{M}$. Estos cultivos, tolerantes al herbicida, crecen de manera similar a los control multiplicando, durante idéntico tiempo de cultivo, por 1.91 su peso fresco inicial y por 2.81 su peso seco inicial.

Se han extraído y fraccionado paredes celulares procedentes de callos control y tolerantes a de DCB $4\mu\text{M}$. Los polisacáridos pécticos fueron extraídos secuencialmente con ácido ciclohexano-diamino-tetraacético (CDTA) y carbonato sódico. El residuo despectinado se extrajo con KOH al 4, 24 y 35% para obtener las diferentes fracciones hemicelulósicas. El residuo final se lavó con etanol y agua obteniendo una fracción soluble de lavados de la α -celulosa y por último la fracción de α -celulosa.

El análisis de las diferentes fracciones polisacáridicas revela cambios en el contenido de azúcares totales, neutros y ácidos urónicos de dichas fracciones. Como era de esperar las paredes celulares procedentes de callos tolerantes poseen un menor contenido en celulosa. De manera característica presentan un incremento en el contenido de pectinas que resultan enriquecidas en ácidos urónicos. A su vez, presentan un menor contenido en polisacáridos hemicelulósicos, descenso que es muy notable para la fracción obtenida con KOH al 35%. Se observa también un descenso en el porcentaje de azúcares totales y ácidos urónicos de la fracción de lavados de α -celulosa, que en los controles aparece enriquecida en ácidos urónicos.

Estudios mediante microscopía óptica de callos tolerantes y control revelan diferencias substanciales en cuanto a la morfología celular. A diferencia de las células control cuya apariencia es más o menos isodiamétrica, las células tolerantes presentan un aspecto más irregular.

Los resultados obtenidos apuntan a que el mecanismo de tolerancia reside en un incremento de los componentes pécticos de la pared celular así como en un mayor grado de entrecruzamiento de los mismos.

-
1. Montezinos, D., Delmer, D. P. (1980). Characterization of inhibitors of cellulose synthesis in cotton fibers. *Planta* **148**: 305-311.
 1. Shedletzky, E., Shmuel, M., Delmer, D.P., Lampert, D.T.A. (1990). Adaptation and growth of tomato cells on the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile leads to production of unique cell walls virtually lacking a cellulose-xyloglucan network. *Plant Physiol.* **94**: 980-987.
 1. Shedletzky, E., Shmuel, M., Trainin, T., Kalman, S., Delmer, D. (1992). Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol.* **100**: 120-130.

Sección C4:

Estreses bióticos y abióticos (II)

Efeito do NaCl no metabolismo fotossintético em plantas de *Lupinus albus* L.

F. M. Fernandes e M. C. Arrabaça

*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal*

A salinidade é um factor edáfico que limita a distribuição das plantas em alguns habitats naturais o que constitui um problema agrícola em muitas zonas da terra. O efeito do stress salino (50, 100 e 150 mM NaCl), no metabolismo fotossintético, foi estudado em plantas de *Lupinus albus* L., variedade regional. Esta espécie é especialmente importante pela qualidade da proteína das suas sementes e pelo enriquecimento em azoto, do solo onde é cultivada. Com o stress salino registaram-se alterações no crescimento, na sobrevivência e na morfologia das plantas. O stress salino provocou o decréscimo das taxas fotossintética e transpiratória, e do conteúdo em proteína solúvel total. O conteúdo em clorofila total e em carotenóides também decresceu nos tratamentos com 100 e 150 mM NaCl. As actividades da sacarose fosfato sintase (SPS; EC 2.4.14) e sacarose sintase (SS; EC 2.4.1.13), foram determinadas em plantas controlo ao longo do período de iluminação. Obteve-se uma maior actividade das referidas enzimas após 4 horas de luz, pelo que a colheita das folhas, para determinar as actividades enzimáticas e o conteúdo em açúcares, foi feita após este tempo. O tratamento com sal, levou ao aumento da actividade da SS, à diminuição da actividade da SPS e não fez variar a percentagem de activação desta enzima. A actividade da invertase ácida (EC 3.2.1.26) foi maior com a concentração de 50 mM NaCl, sendo semelhante no controlo e 150 mM NaCl, enquanto que a actividade da invertase alcalina (EC 3.2.1.26) subiu com a concentração salina até 150 mM NaCl. O teor de glucose foi menor nas plantas tratadas, e o teor em sacarose quase triplicou nas tratadas com 150 mM NaCl e não se modificou nas tratadas com 50 mM NaCl. O conteúdo em frutose não foi alterado com o sal.

Efecto del estrés salino sobre la actividad H^+ -ATPasa de membrana plasmática de raíces de girasol

E. Ballesteros, B. Kerkeb, J. P. Donaire y A. Belver

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas,
Estación Experimental del Zaidín, C.S. I.C., E-18008 Granada, España

En trabajos previos, se ha encontrado que el estrés salino moderado y severo estimulaban el transporte de H^+ dependiente de ATP y PP_i e inducían una actividad de intercambio Na^+/H^+ en vesículas de tonoplasto de raíces de plántulas de girasol. En este estudio, se ha caracterizado la actividad H^+ -ATPasa sensible a vanadato en vesículas enriquecidas en membrana plasmática aisladas por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa de raíces de girasol (*Helianthus annuus* L.) expuestas durante 3 días a 75 y 150 mM de NaCl. Inmunoblots ensayados con anticuerpos policlonales contra la ATPasa de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* reveló la existencia de una banda típica de 100 kDa, la cual se enriqueció en la fracción aislada de la interfase 32/43% de sacarosa. En esta fracción, la actividad hidrolítica de ATP se inhibió fuertemente por vanadato, y escasamente por azida, oligomicina, nitrato y molibdato, indicando que esta fracción de membrana estaba enriquecida en vesículas de membrana plasmática. En general, las propiedades de la actividad ATPasa sensible al vanadato de raíces de girasol tales como sensibilidad a inhibidores, pH óptimo, especificidad de sustrato, efecto de iones y datos cinéticos fueron claramente coincidentes con aquellos encontrados para la ATPasa de membrana plasmática de otros orígenes. Si bien, el perfil de pH, dependencia de iones, K_m aparente y cantidad de proteína antigénica no se afectaron por el estrés salino, se redujo la V_{max} de la actividad ATPasa sensible a vanadato en función de los tratamientos salinos. Asimismo, mientras el estrés salino moderado y severo redujeron un 35 y un 55% la actividad hidrolítica de ATP (medida en ausencia de detergente), la actividad de transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a vanadato no se afectó. Como consecuencia, la razón entre la actividad de bombeo de H^+ y actividad fosfohidrolasa basal se incrementó proporcionalmente. Globalmente, estos resultados y aquellos previamente obtenidos en tonoplasto de girasol sugieren que el comportamiento de las bombas primarias de H^+ de raíces bajo estrés salino forman parte de un mecanismo de respuesta adaptativo en plantas de girasol, el cual podría regular los flujos de iones Na^+ y Cl^- a través del tonoplasto y membrana plasmática de las células de la raíz.

Extrusión de H^+ como una respuesta al estrés salino en células de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) controles y adaptadas al NaCl

L. Kerkeb, M^a P. Rodríguez Rosales y J.P. Donaire

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas,
Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C., Profesor Albareda 1,
18008 Granada

Para que las plantas puedan adaptarse a la salinidad, tienen que activarse procesos claves en la célula capaces de potenciar las condiciones de tolerancia, siendo fundamental, para poder definir una estrategia mediante la cual controlar e inducir las respuestas de estrés y de adaptación, el conocimiento de los mecanismos responsables de la sensibilidad y tolerancia de las plantas a este factor. Teniendo en cuenta que la exposición a un medio con elevada concentración de NaCl, provoca en las plantas una inhibición del crecimiento, debida a la inducción de efectos osmóticos, iónicos y nutricionales, a la hora de investigar una estrategia de adaptación a la sal, especial importancia deben tener aquellas cuya función sea regular estos procesos. Ello relaciona directamente estas estrategias con el transporte a través de las membranas intracelulares, y, muy especialmente, con el gradiente electroquímico de H^+ creado por la actividad de las bombas primarias de H^+ (H^+ -ATPasas), ubicadas en el plasmalema y en el tonoplasto, las cuales al dirigir la extrusión de H^+ al exterior celular o hacia la vacuola, deben estar implicadas en la tolerancia de las plantas a la salinidad, al regular la acumulación de Na^+ y Cl^- en el citoplasma.

Nuestro grupo, está investigando en suspensiones celulares de líneas de tomate tolerantes a niveles de 100 mM NaCl, los mecanismos implicados en el transporte de H^+ y la relación de dicho transporte con la aclimatación a la sal. El hecho de que la extrusión de H^+ en diferentes tejidos de plantas superiores se vea estimulada por los iones monovalentes, particularmente, por el K^+ , ha sido importante en este estudio, cuyo objetivo primario ha consistido en comparar el efecto del estrés por NaCl o KCl sobre la actividad de extrusión de H^+ de células controles y adaptadas a condiciones de 100 mM NaCl; así mismo, se ha determinado la actividad extractora en presencia y en ausencia de fusicocina, una toxina fúngica que activa específicamente la extrusión electrogénica de H^+ dependiente del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema.

Los resultados obtenidos han demostrado una inferior tasa de extrusión de H^+ en las células de tomate adaptadas a 100 mM NaCl, respecto a las células controles. En el caso de las células testigos o adaptadas a 100 mM NaCl, las condiciones de estrés, definidas por la adición de 100 mM NaCl o de KCl al medio de reacción, promovieron significativamente la acidificación de dicho medio, siendo el incremento de la extrusión de H^+ del mismo orden en ambos tipos de células y tras estresar las células con NaCl o con KCl. Del mismo modo, cuando se adicionó fusicocina al medio de reacción, conteniendo células controles, adaptadas o sometidas a un estrés por 100 mM NaCl o KCl, se pudo comprobar un efecto

positivo sobre la extrusión de H^+ , no observándose diferencias significativas, en función del tipo de célula y del tratamiento salino. El hecho de que la fusicocina actúe hiperpolarizando la membrana plasmática, al activar específicamente la H^+ -ATPasa de plasmalema sensible a vanadato, favoreciendo con ello la extrusión electrogénica de H^+ , y que su adición al medio de reacción, donde se lleva a cabo la medida de la extrusión de H^+ , estimule de forma similar la extrusión de H^+ por las células controles, adaptadas o, posteriormente, estresadas con 100 mM NaCl o KCl, permite sugerir que el grado de acoplamiento entre los H^+ extruidos y el K^+ absorbido, en presencia de esta toxina, es del mismo orden, tanto en las células controles como adaptadas a 100 mM NaCl.

Estos resultados no parecen acreditar la inducción por la sal de un sistema antiporte Na^+/H^+ a nivel del plasmalema de las células de tomate objeto de estudio. La fuerte actividad extractora de H^+ , observable inmediatamente después de provocado el estrés, más bien, debe atribuirse al componente hiperosmótico del propio estrés, que, como se ha demostrado en diferentes orígenes vegetales, tiende a despolarizar la membrana, provocando cambios en el metabolismo y en el pH intracelular, capaces de activar la acidificación del medio externo.

Trabajo financiado por la CICYT (Proyecto PB94-0118-C02-01)

Sistemas antioxidantes y estrés salino: estudio en dos cultivares de guisante con diferente sensibilidad frente al NaCl

J.A. Hernández, A. Jiménez, P. M. Mullineaux¹ S. Karpinski¹ and F. Sevilla

Departamento de Nutrición y Fisiología Vegetal, Centro de Edafología y Biología

Aplicada del Segura, CSIC, Apdo 195, E- 30080. Murcia

¹Department of Applied Genetics, John Innes Institute,

Norwich NR4 7UH, England

Los mecanismos implicados en la tolerancia al NaCl en plantas no-halófitas no se conocen con exactitud. Algunas evidencias sugieren la existencia de una **relación entre resistencia al estrés oxidativo** y respuesta al crecimiento en condiciones de salinidad^{1,2}. Sin embargo no hay información precisa sobre la respuesta conjunta de los **antioxidantes enzimáticos** y no enzimáticos frente al estrés por ClNa y esta información es **necesaria considerando** la importancia que las interacciones entre dichos componentes antioxidantes **tiene** en la adaptación de las plantas a condiciones de **estrés ambiental**³.

Recientemente en nuestro laboratorio, utilizando plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) con **diferente sensibilidad a la salinidad**, demostramos que el estrés por ClNa **inducía** el establecimiento en mitocondrias y cloroplastos de un estrés oxidativo mediado por radicales O_2^- y H_2O_2 que podrían estar implicados en los mecanismos de la toxicidad del NaCl en estas plantas^{2,4}. En este trabajo, hemos estudiado el efecto del estrés salino (70 mM NaCl) sobre los contenidos de ascorbato y glutatión así como sobre los niveles de actividad SOD y de las **enzimas del ciclo ASC-GSH** junto con la **expresión de las isoenzimas Mn-SOD mitocondrial, Cu,Zn-SODs citosólica y cloroplastídica, ascorbato peroxidasa (APX) citosólica y glutatión reductasa (GR) citosólica**, utilizando **dos cultivares de plantas de guisante** que previamente se **seleccionaron como** relativamente **tolerante** y **sensible a la salinidad**, respectivamente². **Estos estudios se efectuaron en la fracción soluble y en las fases iniciales (2, 4, 8 y 24h) y tras 15 días de tratamiento de las plantas con ClNa**.

Durante las primeras 24h del tratamiento con NaCl y en los dos cultivares de guisante, no se **observaron** cambios significativos en los contenidos de antioxidantes y en las actividades enzimáticas analizadas. Tras 15 días de tratamiento salino, en plantas tolerantes **se producía** un aumento en la actividad específica de MDHAR, DHAR, GR y APX, manteniéndose los niveles de SOD. En estas **plantas los** cambios anteriores eran paralelos a un acumulo en los transcritos de las enzimas **antioxidantes** correspondientes no modificándose de forma significativa dichos niveles de expresión en la variedad sensible, en la que **se producía** una disminución en la actividad SOD y en la que **las enzimas del ciclo ASC-GLU no se inducían. También se encontró un patrón diferencial en los contenidos de ascorbato y glutatión entre ambos cultivares, que se veían considerablemente reducidos por efecto del ClNa en las plantas sensibles.**

Los resultados anteriores **sugieren** que sólo en plantas relativamente **tolerantes** parece tener lugar una estimulación de la síntesis de las enzimas **antioxidantes** en condiciones de

salinidad. Este hecho puede considerarse como un mecanismo de adaptación de las plantas tolerantes al NaCl, como protección celular frente al estrés oxidativo que se induce en plantas de guisante por efecto del estrés salino.

1. Gosset et al (1996) *Plant Physiol.*, **112**: 803-809.
2. Hernández et al., (1993) *Physiol Plant*, **89**: 103-110.
3. Hernández et al., (1995) *Plant Sci*, **105**: 151-167.
4. Karpinski et al., (1997) *Plant Cell* (en prensa)

(Financiado por el Proyecto PB95-004-C02-02 DGES)

Absorción y distribución de iones Cl^- en patrones de cítricos sometidos a estrés salino. Efecto de los iones Ca^{2+} y NO_3^-

J. L. Moya, R. Romero-Aranda, F. R. Tadeo, M. Tulón, E. Primo-Millo

Departamento de Citricultura y otros frutales, I. V. I. A.

46113 Moncada de L'Horta (Valencia), España

Se estudió la absorción y distribución de iones Cl^- y el efecto de los iones calcio y nitrato en dos patrones de cítricos que difieren en su tolerancia a la salinidad, Mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) considerado tolerante y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Rafinesque) considerado sensible.

En un tipo de experimentos, se cultivaron ambos patrones en medio líquido con una solución nutritiva aireada y suplementada con diversas concentraciones de NaCl , KNO_3 , CaCl_2 , y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Durante un mes se determinó la pérdida de iones Cl^- en la solución nutritiva, así como la acumulación de los mismos en los distintos órganos de las plantas al final del experimento. Los resultados mostraron que la velocidad de absorción del ion Cl^- es muy similar en ambos patrones y que ésta se incrementa de forma lineal a medida que aumenta la concentración externa. De forma general, se observó que las concentraciones foliares de los iones Cl^- fueron mayores en Carrizo que en Cleopatra, aunque no se detectaron diferencias significativas en otros órganos como raíces, tallos o savia entre ambos patrones. En este tipo de experimentos el crecimiento de las plantas no se afectó, y por otro lado, la adición de sales de calcio y/o de nitrato no modificó significativamente la velocidad de absorción de cloro ni su distribución.

En experimentos sobre arena y con tratamientos más prolongados, hasta un mínimo de seis meses, se comprobó que el ion Cl^- redujo el crecimiento, el área foliar, el contenido en clorofilas, la asimilación de CO_2 y la eficacia en el uso del agua, y por otro lado aumentó la defoliación y el índice de succulencia. El calcio no tuvo ningún efecto sobre estos parámetros aunque alivió el crecimiento y redujo el porcentaje de abscisión.

En conjunto, los resultados obtenidos en ambos patrones son compatibles con la idea de que la absorción de iones Cl^- se realiza de forma pasiva dependiente del área total del sistema radicular y del potencial de transpiración de las hojas. Uno de los componentes que puede explicar el efecto aliviador del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en las plantas de cítricos sometidas a estrés salino parece relacionarse con el estímulo del crecimiento, que permitiría la dilución de la concentración foliar del ion Cl^- .

Efecto de la salinidad y la transpiración sobre la absorción del nitrato en cítricos

M. Cerezo¹, E. Primo-Millo² y P. García-Agustín¹

¹Unidad de Biotecnología Vegetal, Departamento de Ciencias Experimentales, Universitat Jaume I, Apartado 224, 12080 Castellón, Spain

²Departamento Citricultura, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial 46113, Moncada (Valencia), Spain

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de los pretratamientos con soluciones de NaCl sobre la absorción de NO_3^- por plántulas de citrange Troyer (híbrido de *Citrus sinensis* X *Poncirus trifoliata*).

A través de distintos experimentos se trató de distinguir entre los efectos, sobre la absorción neta de NO_3^- producidos por la acumulación del ion Cl^- en los tejidos o los debidos a la reducción de la transpiración inducida por la salinidad.

Para ello, se pretrataron durante 3 semanas plántulas de 2 meses de edad, con soluciones que contenían 0, 30, 60 y 120 mM de NaCl.

Posteriormente, se midió la absorción de nitrato después de exponer las plántulas durante 24 horas a una solución que contenía 6 mM de $^{15}\text{NO}_3^-$ con un 95% de átomos en exceso de ^{15}N , en ausencia de NaCl.

La acumulación de ^{15}N disminuyó al incrementar la concentración externa de NaCl durante los pretratamientos. La absorción de NO_3^- se correlacionaba negativamente con la concentración de Cl^- en los tejidos y positivamente con la tasa de transpiración.

En un experimento posterior se midió la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$, en plántulas, pretratadas o no, durante tres semanas con 60 mM NaCl, determinando el efecto de distintas intensidades luminosas (oscuridad, 40 y 120 PAR) y de la defoliación, con objeto de separar los efectos de la transpiración de los debidos a un antagonismo iónico.

En este experimento, se observó que en las plántulas no salinizadas, al disminuir la intensidad luminosa, disminuía la transpiración así como la acumulación de ^{15}N . Sin embargo, en todos los casos se observó una reducción significativamente mayor de la concentración de ^{15}N en las plántulas pretratadas con NaCl. Estas diferencias indicaron que hay un efecto adicional de la concentración interna del ion Cl^- , que es independiente del nivel de transpiración.

Dicho efecto se confirmó al comparar la absorción de $^{15}\text{NO}_3^-$ en plántulas defoliadas inmediatamente después de los pretratamientos con y sin sal.

Efeitos do NaCl e NO_3^- no crescimento e na concentração de solutos de uma halófita - *Aster tripolium* L.

M. Hipólito, M.A. Carmona, M.L. Cabral e M. Santos

Departamento de Fisiologia Vegetal, Estação Agronómica Nacional,
2780 Oeiras, Portugal

Têm vindo a ser realizados estudos com *Aster tripolium* (Huiskes *et al.*, 1993) visando a obtenção de uma hortícola regada com água salgada e com as características organolépticas que correspondem a um teor de 7g NaCl/Kg PF nas folhas. Contudo constatou-se que para obter este teor de salinidade será necessário utilizar água de rega com salinidade superior a 25% da água do mar, o que reduziu o crescimento (Martins *et al.*, 1995). Para aumentar a produção de biomassa nestas condições, pensou-se que o azoto poderia reduzir os efeitos depressivos da salinidade.

Assim o objectivo deste trabalho foi o de estudar a influência, ao longo do tempo, do ião nitrato (7 e 15 mM NO_3^-) em vários parâmetros fisiológicos e qualitativos de plantas sujeitas a 0, 125 e 250 mM NaCl, em cultura hidropónica.

Os resultados de peso fresco, peso seco e área foliar obtidos indicam que o nível de nitrato mais elevado só contrariou a redução nas salinidades mais baixas.

A salinidade provocou uma redução dos potenciais hídrico e osmótico das folhas, verificada desde o início dos tratamentos, indicando um ajuste osmótico para o qual contribuíram, como acontece frequentemente em halófitas (Jacoby, 1994), a acumulação de iões, assim como o aumento de cerca de duas vezes verificado na concentração de açúcares e de prolina.

O aumento da resistência estomática verificado com a salinidade atingiu valores máximos, principalmente na página adaxial, em plantas sujeitas aos níveis mais elevados de nitrato e NaCl. As curvas de resposta à luz dão também uma indicação dos efeitos conjuntos do azoto e salinidade, apresentando as plantas que cresceram com 15 mM NO_3^- e 125 mM NaCl os valores mais altos de fotossíntese aparente máxima.

O aspecto qualitativo estudado foi o da composição da folha, no respeitante ao teor de fibras, uma vez que já se sabia que o *Aster tripolium* apresenta redução na área específica das folhas (SLA) quando regado com água salgada (Martins *et al.*, 1995). Os resultados obtidos com o fraccionamento da parede celular mostram que a salinidade originou um ligeiro aumento no teor de hemicelulose e celulose, que se manteve constante ao longo do período experimental e foi maior nas plantas que cresceram com 15 mM NO_3^- .

Huiskes, A.H.L. *et al.* 1993 - Annual report of project "A contribution to the diversification of vegetable crops by research on cultivation methods and selection of halophytes", AIR3-CT92-0198.

Jacoby, B. 1994 - Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In: Handbook of plant and crop stress, ed. M. Pessarakli.

Martins, J.C., Carmona, M.A., Oliveira, M.D., Hipólito, M. and Pêgo R. 1995 - International symposium on salt affected lagoon ecosystems, Valencia, 228-229.

Respuesta de la simbiosis *Cicer arietinum*-*Rhizobium ciceri* a distintas dosis de NaCl aplicadas en el crecimiento vegetativo

M. Soussi, H. Ben Abdelkhalek, C. Lluch y A. Ocaña

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,
Campus de Fuentenueva s/n, 18071 - Granada

El garbanzo, leguminosa grano sensible a la salinidad de los suelos que es un problema importante de las zonas mediterráneas, ha sido poco estudiado bajo este estrés. El aporte de compuestos carbonados por la planta hospedadora para sostener la fijación del nitrógeno en nódulos, ha sido ampliamente estudiado en nódulos exportadores de ureidos (Day y Coppeland, 1991; Gordon, 1992), en cambio, en nódulos indeterminados como los de *Cicer arietinum* L., que son exportadores de amidas, este metabolismo es poco conocido. La fijación simbiótica del nitrógeno bajo estrés salino ha sido estudiada en garbanzo por Elsheik y Wood (1990) y Mamo *et al.* (1996) entre otros.

El trabajo que presentamos, pretende abordar el efecto de la aplicación de sal en el periodo vegetativo, sobre el metabolismo nodular y su relación con el proceso fotosintético y la fijación de nitrógeno. Se ha utilizado el ecotipo ILC1919 (ICARDA), inoculado con la cepa R-CH-191 de *Rhizobium ciceri*, cultivado con solución nutritiva (Rigaud y Puppo, 1975) con 2 mM de KNO₃. Se adicionó 50, 75 y 100 mM de NaCl a los 17 días de cultivo con nódulos ya aislables. Se realizaron cuatro recogidas, los días 21, 24, 28 y 31 de cultivo. Se determinaron los parámetros de crecimiento y nodulación siguientes: a) Peso seco de nódulos (PSN), peso seco de la planta (PSP); b) Actividad nitrogenasa específica (ARA) y por planta (ARAP); c) Enzimas del metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos: actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), glutamina sintetasa, (GS) y glutamato sintasa (GOGAT); d) Fotosíntesis: actividad Rubisco y contenido en clorofilas, e) Contenido de osmolitos: prolina y azúcares solubles en hoja y nódulo.

La acumulación de materia seca no disminuyó significativamente con 50 y 75 mM NaCl. 100 mM de sal produjo un descenso del crecimiento en todos los muestreos. La nodulación se vio severamente disminuida por la sal. En las dos primeras recogidas, el ARA se mantiene con 50 mM de NaCl respecto al control, descendiendo drásticamente en la última recogida con 100 mM de NaCl. En las dos primeras recogidas, el tratamiento salino condicionó el aumento de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado, mientras las del nitrogenado se mantuvieron respecto al control. La dosis alta de NaCl provocó un descenso acusado de estas actividades en la última recogida, salvo la MDH que solo pierde un 30% de su actividad respecto al control. El contenido en osmolitos aumenta más en hojas que en nódulos con la sal. La Rubisco en el primer muestreo solo se afectó por 100 mM NaCl, mientras que en los siguientes se inhibe con 50 y 75 mM.

En resumen, se considera al ecotipo ILC1919 tolerante a la salinidad, con una disminución del 20% del crecimiento (100 mM NaCl). La disminución de la fijación de nitróge-

no puede estar mediada más por la inhibición de la asimilación del amonio que por efecto sobre el metabolismo carbonado, según las correlaciones encontradas entre GS, GOGAT, ARA y nodulación.

Day, D.A. y Copeland, L. (1991) *Plant. Physiol. Biochem.* **29**: 185-201.

Elsheikh, E.A.E. y Wood, M. (1990) *J. Exp. Bot.* **41**: 1263-1269.

Gordon, A.J. (1992) C.J. Pollock, J.F. Farrar y A.J. Gordon (eds.), Ed: *Env. Plant Biol. series*. Bios Scientific Publisher. pp 132-162.

Mamo, T., Ritcher, C. Y Heiligtag, B. (1996) *J. Agron. Crop Sci.* **178**:235-247.

Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PB95-1159 y INCO950717.

Efecto del cloruro de sodio en el crecimiento, fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado en plantas inoculadas de judía

L. Pliego, M. Khadri, C. Lluch y A. Ocaña

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,
Campus de Fuentenueva s/n, 18071 - Granada

El estrés salino impone una limitación significativa en la productividad de las leguminosas, teniendo una relación directa con el efecto adverso en el crecimiento del *Rhizobium*, el proceso de infección y el desarrollo y metabolismo del nódulo (Buttery *et al.*, 1992). En leguminosas los mecanismos de tolerancia se han estudiado a nivel de planta entera, no conociéndose bien los procesos que se afectan en el nódulo radical (Delgado *et al.*, 1993). La identificación de solutos intracelulares como son prolina, azúcares, aminoácidos, etc. en condiciones de estrés salino pueden usarse potencialmente para la selección de cultivares adaptados y/o tolerantes.

En este trabajo se estudian los cambios que provoca la sal, aplicada desde la siembra, sobre el crecimiento, desarrollo y metabolismo nodular y bacteroidal en plantas de judía var. Africa inoculadas con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899. Se cultivaron con solución nutritiva (Rigaud y Puppo 1975) con 1 mM de KNO_3 y concentraciones de 0, 50 y 100 mM de NaCl. Se determinaron diversos parámetros de crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación de metabolitos como prolina, almidón y azúcares solubles en hojas, raíz y nódulos, y actividades enzimáticas del citosol nodular y bacteroidal.

El crecimiento se afectó significativamente con la sal. Así, el peso seco de parte aérea disminuyó un 54% con 100 mM. Sin embargo, en raíz la disminución fue del 35% con 100 mM respecto al control. En consecuencia, la relación raíz/parte aérea se incrementó con la sal. Los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, a excepción del peso normalizado de nódulos, se vieron afectados significativamente por el NaCl. Así el peso seco de nódulos disminuyó el 23% con 50 mM y el 63% con 100 mM; la actividad nitrogenasa, medida como ARA, se inhibió con la sal en porcentajes similares y, en consecuencia, la ARAP decreció un 80 % con 100mM de sal.

El análisis de algunos metabolitos en los diferentes órganos de la planta, evidencia que el estrés salino induce la acumulación de azúcares solubles como mecanismo de osmoregulación en nódulos (Fougere *et al.*, 1991) y en hojas, no observándose este efecto en raíces. Los azúcares solubles se acumularon prioritariamente en el nódulo, seguido de la parte aérea y raíz. La concentración de almidón no se vio afectada por la sal en ninguno de los órganos ensayados, si bien la concentración fue mayor en hoja que en nódulo y raíz. Los resultados detectados del contenido en prolina, osmolito frecuentemente asociado a los mecanismos de tolerancia al estrés salino, indican que se acumula con la sal y, teniendo en cuenta que las plantas estaban sometidas a dicho estrés desde el inicio del cultivo, podría ser una adaptación a las condiciones ambientales (Amzallag y Lerner, 1995). La acumulación de prolina es mayor en nódulo y parte aérea que en raíz y proporcional al nivel de

NaCl. Las variaciones observadas en las diferentes actividades enzimáticas estudiadas evidencian distintos comportamientos provocados por el estrés salino.

-
- Amzallag G.N. y Lerner H.R. (1995) En: Handbook of Plant and Crop Physiology (M. Pessarakli, ed.) pp. 557-576. Marcel Dekker Inc. New York. USA.
- Buttery B.R., Park S.J. y Hume D.J. (1992) Can. J. Plant Sci. 73: 323-349
- Delgado M.J., Garrido J.M., Ligeró F. y Lluch C. (1993) Physiol. Plant. 89: 824-829.
- Fougere F., Le Rudulier D. and Streeter J.C. (1991) Plant Physiol. 96:1228-1236.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) J. Gen. Microbiol. 88: 223-228.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PB95-1159 y INCO950717.

Influência de distintas concentrações de NaCl no crescimento de calos embriogênicos de milho (*Zea mays*)

J. Bezerra, T.R. Camara

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

CEP 52.171, Brasil

O crescimento de calos envolve uma complexa relação entre o explante utilizado, a composição do meio e as condições ambientais durante o período de incubação. Com o objetivo de estudar a resposta de calos embriogênicos de milho, da cultivar Jatinã C3 anão, a crescentes concentrações de NaCl, foram avaliados o crescimento e o conteúdo de prolina dos mesmos. Calos embriogênicos, derivados de embriões imaturos, foram obtidos e cultivados, durante dois meses, em meio N6 modificado com 6,0mM de prolina (Claparols, I. et al. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, v.34, p.1, 1993). Posteriormente os calos foram submetidos a diferentes concentrações de NaCl (0,0; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2%) durante tres repicagens, de 20 dias cada. A adição de baixas doses de NaCl (0,3 e 0,6%) favoreceu um aumento no crescimento na ordem de 67%, o qual coincidiu com um incremento no conteúdo de prolina, sugerindo um efeito positivo da acumulação deste aminoácido em resposta ao estresse salino. Por outro lado, em elevadas concentrações salinas (0,9 e 1,2%) observou-se um decréscimo no crescimento dos calos. Simultaneamente, foi detectado uma redução nos teores de prolina o que provavelmente reflete um aumento da fração não embriogênica dos calos.

Projeto financiado pelo CNPq e FACEPE

Influence of NaCl stress on sunflower plants and *calli* growth and osmotic adjustment

C Santos, S Andrade, A Sousa and G Caldeira

Department of Biology, University of Aveiro, 3800 Aveiro, Portugal

We have compared the salt tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Girapac SH222, supplied by SCLEPAL, Portugal-Semillas Pacífico) plants and *calli*, to 1) evaluate the possibility of using tissue culture for routine evaluations of salt tolerance in sunflower, and 2) select and characterise salt tolerance cell lines in this genotype. Sunflower plants were exposed to a range of NaCl concentrations (0, 50, 100, 200 and 300 mM) in a greenhouse, and the effects of salinity on relative growth rate (RGR), leaf area ratio (LAR) and net assimilation rate (NAR) and solute accumulation were evaluated. At low salt stress there was a small decrease in shoot growth (length, fresh and dry weight). Salinity decreased shoot growth, LAR and NAR but increased root length. The inhibitory dose for plants (ID_{50}) could be calculated on 66 mM NaCl. There was a significant increase in Na and Cl content in the whole plant, whereas K^+ , SO_4^{2-} and NO_3^- levels decreased in whole plant and Ca^{2+} and Mg^{2+} levels decreased in the shoots. The individual osmotic contribution of inorganic and organic solutes (reducing sugars and sucrose, and total aminoacids and proline) was determined.

Sunflower *calli* had a higher salt tolerance than plants showing an $ID_{50} = 183$ mM NaCl. Therefore there is no linear correlation between plants and *calli* with respect to NaCl tolerance. Increased salinity decreased *calli* fresh and dry weight, and it was established a correlation between increasing salt tolerance and the development of more compact and dark green *calli*. Stressed *calli* suffered an increase in Na^+ and Cl^- levels and a decrease in SO_4^{2-} , NO_3^- and K^+ contents, whereas the other ion contents were not affected. Also, reducing sugars and sucrose levels increased, as well as total aminoacids and proline content. Finally, α -amylase activity increased in stressed *calli*, particularly for intermediate levels of salinity (50 and 100 mM). *Calli* tolerant to high levels of NaCl (200 and 300 mM) lethal to plants have already been selected and their osmotic adjustment analysed.

Comparative effect of Na_2SO_4 and PEG stresses on *Helianthus annuus* plants and calli

C Santos, S Almeida, MJ Pereira and G Caldeira

Department of Biology, University of Aveiro, 3800 Aveiro, Portugal

Sunflower (*Helianthus annuus* L. cv Girapac SH222 supplied by SCLEPAL Portugal) plants and calli were exposed to Na_2SO_4 and osmotic stresses. Na_2SO_4 50 mM stress was much drastic than the corresponding osmotic stress imposed by PEG 6000. Calli were more tolerant to salt and osmotic stress than plants, although calli became necrotic one month after stress imposition. Osmotic adjustment in plants and calli was analysed. Na^+ and SO_4^{2-} contents increased, but Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , NO_3^- and Ca^{2+} decreased significantly both in plants and calli. There was no significant variation or there was a decrease insoluble sugars. Fresh and dry weight, relative growth rate (RGR), leaf are ratio (LAR) and net assimilation rate (NAR), were severely affected by Na_2SO_4 whereas plants exposed to PEG were only significantly slightly affected during the last days of stress imposition. Plants and calli exposed to Na_2SO_4 did not show any solute accumulation for osmotic adjustment besides the increase in Na^+ and SO_4^{2-} and proline. Other inorganic solutes decreased as well as soluble sugars, and amino acids. Micronutrients were also severely affected by salt stress and not affected by PEG. Reducing sugars and sucrose, as well as amino acids increased in the whole plant and calli exposed to PEG. It was also observed a variation in ammonia content in plants and calli exposed to PEG and salt. The osmotic contribution of these solutes to the total osmotic potential of the cells under stress was calculated but the final value is a small percentage of the total osmotic potential. Na_2SO_4 stress had a negative effect on calli morphogenesis as they grew slowly and developed a dark colour not developing shoots and roots.

Caracterización fenotípica de plantas de tomate transformadas con el gen TPX1 de peroxidasa

I. El Mansouri¹, J.A. Mercado¹, S. Jnez-Bermudez¹, F. Pliego¹,
V. Valpuesta² y M.A. Quesada¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Málaga, Campus de Teatinos S/N, 29071Málaga

Se han obtenido plantas transgénicas de tomate, cv. Pera expresando el gen TPX1 de esta especie (Botella et al., 1994) con el fin de evaluar el efecto que la sobreexpresión del mismo tiene sobre el fenotipo de estas plantas así como para profundizar en su función.

Los resultados obtenidos confirman las características bioquímicas y la localización celular de TPX1 predichas por su secuencia. Por otro lado, la introducción de copias adicionales de este gen en el genoma del cultivar Pera modifica el desarrollo vegetativo de esta planta resultando en un aumento de la relación parte aérea/ raíz. La sobreexpresión del gen en hoja modifica la morfología de ésta lo que aparece más acentuado en distintos momentos del desarrollo de la planta, como la floración, o durante episodios puntuales de estrés, como la aclimatación. La frecuencia de transformación obtenida así como las experiencias de organogénesis realizadas con hojas sugieren la posibilidad de que la organogénesis se vea también afectado por el transgén. Por otro lado no apareció el fenotipo de marchitamiento previamente descrito en tabaco sobreexpresando una peroxidasa aniónica. Se está en el proceso de obtención de plantas homocigotas para el transgén para proceder a una evaluación más exhaustiva del fenotipo y su segregación.

Botella, M.A., Quesada, M.A., Knonowicz, A.K., Bressan, R.A., Pliego-Alfaro, F., Hasegawa, P.M. y Valpuesta, V. (1994). Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant. Mol. Biol* 25: 105-114.

Excesso de cobre em células de *Acer pseudoplatanus* L. Interação do cobre com outros cátions

M. Pádua,* M.L. Carvalho** e A. Casimiro*

*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Bloco C2, Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal

**Centro de Física Atómica da Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 2,
1699 Lisboa, Portugal

O cobre, quando em excesso no solo, induz toxicidade nas plantas. Através da cadeia trófica ou por acção de poluentes, a toxicidade pode também atingir os animais e o homem. Os efeitos do excesso de cobre nas células, vegetais e animais, estão bem documentados, mas o conhecimento dos mecanismos subjacentes à toxicidade é ainda escasso. O processo de transporte do cobre para o interior da célula, a competição com outros cátions, a influência da concentração externa de cobre no "uptake" são algumas das problemáticas ligadas à toxicidade do cobre que estão mal esclarecidas.

O objectivo deste trabalho foi estudar, utilizando células de *Acer pseudoplatanus* L. em suspensão, a influência de uma gama crescente de concentrações de cobre no meio sobre: a taxa de crescimento da cultura, o conteúdo celular em cobre e a indução de interações do cobre com outros cátions.

As células de *Acer* foram cultivadas em meio líquido tendo sido utilizadas as seguintes concentrações de cobre: 0,1 μM (controlo), 5, 20 e 50 μM . As culturas foram seguidas durante um período de 12 dias. As determinações de massa de peso fresco por volume de cultura foram realizadas com intervalos de 48 horas. Ao 12º dia as células da cultura de 50 μM de cobre foram repicadas para o meio controlo. Após o período experimental as células das diferentes culturas foram liofilizadas e utilizadas posteriormente para análise de elementos por fluorescência de raios X. O cobre e outros cátions - K, Ca, Fe, Mn e Zn - foram quantificados por processamento dos espectros respectivos.

A análise das taxas de crescimento das culturas, em função do aumento de peso fresco, não mostrou diferenças entre as culturas controlo e 5 μM de cobre. No que concerne as culturas de 20 e 50 μM , verificou-se um desfasamento entre os momentos de paragem de crescimento (48 horas antecipado para a cultura 50 μM).

A análise elementar por fluorescência de raios X revelou que ao aumento progressivo de cobre no meio de cultura corresponde um aumento, também progressivo e proporcional, do conteúdo celular em cobre. Nas células repicadas para o meio controlo, após terem sido cultivadas em condições de excesso de cobre (50 μM), a concentração de cobre é semelhante à das células controlo. Relativamente às interações do cobre com outros cátions, os resultados já obtidos apontam para um sinergismo entre Cu, Ca, Mn e Fe. A concentração celular de Zn parece diminuir em condições de excesso de cobre. No que respeita ao K verificamos uma diminuição da concentração de K nas células submetidas ao excesso de cobre. Os resultados sugerem prováveis alterações da condutância da membrana plasmática e consequentes mudanças das taxas de influxo admitindo-se a possibilidade de efluxo para o K.

Efeito da fonte de azoto na tomada e distribuição do cobre em *Halimione portulacoides*

Carvalho, L.M., Caçador, I., Cruz, C. & Martins-Loução, M.A.

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Campo Grande Bloco C2, Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal

email: luis.carvalho@fc.ul.pt

Os sapais são ecossistemas sugeridos como “sinks” naturais para metais pesados contribuindo a vegetação halófila para o aprisionamento desses metais.

A forma de azoto desempenha papel importante na tomada de outros nutrientes e no balanço iónico resultante. Por outro lado pode indirectamente ajudar a planta a tolerar a toxicidade provocada por metais pesados presentes no solo.

Actualmente o conhecimento que se tem sobre a tolerância de *Halimione portulacoides* é apenas baseado em testes radiculares desconhecendo-se quais os mecanismos que estão subjacentes à sua capacidade de colonizar solos ricos em metais pesados.

Com o objectivo de avaliar o efeito da fonte de azoto na tomada e distribuição do cobre, foram cultivadas plantas de *Halimione portulacoides* em hidroponia com 4 mM de N fornecido a diferentes proporções de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$. O pH foi mantido constante durante toda a experiência. Após 1 semana de cultura hidropónica, adicionou-se cobre em concentrações superiores aos índices de tolerância anteriormente determinados. Medidas de biomassa, conteúdo em cobre, proteínas, malato e actividade da nitrato reductase foram efectuadas para avaliar a resposta fisiológica das plantas à toxicidade pelo cobre. Sabe-se que o balanço iónico é um parâmetro determinante da sobrevivência das plantas. A forma de azoto tem papel importante na regulação deste balanço particularmente na concentração de ácidos orgânicos e na partição entre a raiz e a parte aérea.

Os resultados obtidos serão discutidos no sentido de esclarecer o mecanismo pelo qual a forma de azoto pode interferir na tolerância das plantas ao cobre.

Vías alternativas de transporte electrónico en fotosistema II inducidas por toxicidad en cobre

M. Barón¹, J. B. Arellano¹, M. Droppa² y G. Horváth²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de Plantas (CSIC), Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

²Department of Plant Physiology, University of Horticulture and Food Industry, Budapest, PO Box 53, H-1502

El punto y mecanismo de acción del Cu a concentraciones tóxicas en el fotosistema II (PSII) ha suscitado una amplia controversia en los últimos años (ver revisiones 1,2). En publicaciones recientes hemos propuesto al lado donador del PSII como principal objetivo del Cu tóxico (3), por el bloqueo del donador fisiológico de electrones al centro de reacción, la tirosina Z (Tyr_Z) (4). Mediante experimentos de resonancia de espín electrónico identificamos asimismo un donador alternativo (5) a P680 que aparece en condiciones de toxicidad en Cu.

Para obtener mayor información sobre vías alternativas de transporte electrónico en PS II inducidas por inhibición de su lado donador, utilizamos la técnica de termoluminiscencia. Las señales de termoluminiscencia (TL) en PSII se originan por la recombinación de cargas entre donadores electrónicos cargados positivamente y aceptores de electrones con carga negativa.

Las membranas tilacoidales o partículas de fotosistema II (BBY) operativas para el desprendimiento de O₂, exhiben bandas características de TL, dependiendo de las condiciones de medida (6). Las bandas que aparecen entre -30 y -10 °C y +17 y +35 °C se denominan A y B, respectivamente. La banda A es debida a la recombinación de cargas S₃Q_A⁻; la banda B integra a dos bandas: B₁ (+17 °C) y B₂ (+37 °C) correspondientes a los pares recombinantes S₃Q_B⁻ and S₂Q_B⁻. La desactivación del sistema de fotólisis del agua mediante NH₂OH or TRIS elimina la banda B debido a la supresión de los estados S. Por el contrario la banda A resulta ser resistente a dichos tratamientos. En las anteriores preparaciones de PSII aparece una nueva banda A_T, a una temperatura similar a la de la banda A en un PSII intacto. Si ambas bandas tienen un origen similar es objeto actualmente de debate.

En el presente trabajo, hemos estudiado las características de TL de preparaciones de membranas tilacoidales intactas y de BBYs tratadas con Tris en condiciones de toxicidad en Cu. En tilacoides la banda B decrece por el tratamiento con Cu y presenta un desplazamiento de su máximo hacia temperaturas más bajas. La banda A permanece inalterable en su intensidad, presentando sólo un desplazamiento de su máximo a temperaturas más altas. La banda A_T, característica de las preparaciones con un sistema de oxidación del agua desactivado, tampoco se ve modificada por el tratamiento con Cu. El hecho de que las bandas A y A_T permanezcan inalteradas en condiciones en que el Cu ha inhibido la función de la Tyr_Z sugiere la existencia de vías alternativas de transporte electrónico al centro de reac-

ción del PSII en las que no se requiere Tyr_Z y plantea una interesante discusión sobre el origen de ambas bandas en condiciones de inhibición del lado donador del PSII por toxicidad en Cu.

-
- 1.-Droppa, M. and Horváth, G. (1990) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 9, 111-123.
 - 2.-Barón, M., Arellano, J. B. and López Gorgé, J. (1995) *Physiol. Plant.* 94, 174-180.
 - 3.-Arellano, J. B., Lázaro, J. J., López-Gorgé, J. and Barón, M. (1995) *Photosynth. Res.* 45, 127-134.
 - 4.-Schröder, W. P., Arellano, J. B., Bittner, T., Barón, M., Eckert, H.-J. and Renger, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32865-32870.
 - 5.-Jegerschöld, C., Arellano, J. B., Schröder, W. P., van Kan, P. J. M., Barón, M. and Styring, S. (1995) *Biochemistry* 34, 12747-12754.
 - 6.-Horváth, G. (1986) *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 293-310.

Efectos positivos del sílice sobre la tolerancia al aluminio en maíz

J. Barceló, I. Corrales y Ch. Poschenrieder

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias,

Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra. FAX 93 5812003;

E mail: j_barcelo@cc.uab.es

Diversos estudios con plantas cultivadas en suelos ácidos o en soluciones nutritivas con alta disponibilidad de Al han demostrado que el suministro de sílice disminuye los efectos fitotóxicos del Al (Foy et al., 1978; Barceló et al., 1993). Parece ser que la formación de complejos Al-Si en el sustrato reduce la disponibilidad del Al y, con ello, los efectos fitotóxicos. Sin embargo, algunos autores han sugerido que una interacción entre Si y Al en los propios tejidos vegetales o un aumento de la tolerancia al Al inducida por el Si también podrían jugar un papel en este fenómeno (Hodson y Sangster, 1993; Barceló et al., 1993). Para separar los posibles efectos del suministro de Si en las plantas de las interacciones Si-Al del sustrato, en el presente estudio se analizó la influencia del Al sobre el crecimiento y la absorción del Al en plantas pretratadas o no con Si.

Plantas de *Zea mays* de una variedad sensible al Al (BR 201F) fueron cultivadas en solución nutritiva (pH 4.4) con 1 mM Si (+Si) o sin suministro de Si (-Si). Después de 72 h las plantas fueron transferidas a soluciones nutritivas nuevas con 0, 20, 40, 60 o 80 μ M Al, en las cuales crecían durante 24 h más. Se determinó la tasa de elongación radicular, un parámetro muy utilizado para la evaluación de la tolerancia al Al, la concentración de Al en las raíces (digestión ácida y análisis mediante ICP-ES) y la presencia de Al en las puntas de las raíces mediante la técnica de tinción con hematoxilina.

Las plantas precultivadas en soluciones con Si y tratadas después con Al mostraron mejor crecimiento que las plantas -Si expuestas a las concentraciones de Al correspondientes. Las raíces de las plantas +Si y tratadas con Al, apenas se tñieron con hematoxilina, mientras que las de las plantas -Si mostraron coloración significativa en las puntas. El análisis de la concentración de Al en las raíces de las plantas de ambos tipos de pretratamiento mostró que las plantas +Si absorbieron significativamente menos Al que las plantas -Si. Las tasas relativas de elongación radicular de las plantas de todos los tratamientos estaban inversamente relacionadas con la concentración radicular de Al ($R = -0.9334$; $n = 10$). Esta relación altamente significativa indica que la menor absorción de Al en las plantas +Si podría considerarse como el factor de máxima responsabilidad del efecto protector del Si frente a la toxicidad por Al. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, esta menor absorción de Al no puede atribuirse a interacciones Al-Si en el sustrato.

Barceló, J. et al. 1993. *Plant Soil* 154: 249-255

Foy, C.D. et al., 1978. *Annu. Rev. Plant Physiol* 29:511-566.

Hodson, M.J. y Sangster, A.G. 1993. *Ann. Bot.* 72, 389-400.

Agradecimientos: Subvencionado por la CE (TS3*-CT92-0071 y IC 18-CT96-0063) y en parte por DGICYT PB 94-0738-CO2-01.

Caracterización de dos cDNAs de *Cicer arietinum* que codifican para dos posibles metalotioneínas de clase I

R. V. Ullán, S. Romo, E. Labrador y B. Dopico

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal),

Facultad de Biología, Universidad de Salamanca,

Campus Miguel Unamuno, Avda. Campo Charro s/n, 37007 Salamanca,

España. Email: bdr@gugu.usal.es

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína y que se unen a metales (Kojima, 1991). Las MTs han sido clasificadas en tres clases (Kägi et al., 1984). Las MTs de las clases I y II son polipéptidos codificados por genes, mientras que las de la clase III, también llamadas fitoquelatinas (Grill et al., 1985) son sintetizadas enzimáticamente.

Dos nuevos cDNAs que codifican para dos diferentes MTs de clase I, han sido aislados de una genoteca de cDNA procedente de epicotilos de *Cicer arietinum*. Ambos clones, denominados CanMT-1 y CanMT-2, aumentan su expresión durante el crecimiento de los epicotilos, aunque no parecen estar relacionados directamente con este proceso, ya que tratamientos que inhiben o inducen el crecimiento, no modifican los niveles de transcritos de una forma correlacionada.

Distintas condiciones de estrés modulan la expresión de los genes correspondientes a estos clones. Además, el incremento en los niveles de transcritos de ambos clones producido por el ABA, sugiere una relación entre estas MTs de garbanzo y las respuestas de estrés mediadas por ABA.

El incremento de la expresión del clon CanMT-1 en respuesta al Cd sugiere que esta MT de clase I está implicada en los procesos de tolerancia al Cd, en contra de la hipótesis de que las fitoquelatinas son las únicas moléculas implicadas en la tolerancia a Cd en plantas. El clon CanMT-2 no está inducido por Cd, lo cual indica una función diferente para cada clon en *Cicer arietinum*.

Los genes correspondientes a ambas MTs presentan una expresión diferencial en las plántulas de garbanzo. Los mayores niveles de expresión de ambos clones aparecen en los cotiledones. El clon CanMT-1 muestra mayor expresión en raíces que en epicotilos, mientras que los niveles de expresión del CanMT-2 son similares en ambas zonas.

En plantas adultas los mayores niveles de transcritos, tanto del CanMT-1 como del CanMT-2, aparecen en entrenudos basales si bien el CanMT-1 también presenta elevada expresión en hojas.

Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH: Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc Natl Acad Sci USA 86: 6838-6842 (1989).

Kägi JHR, Vasak M, Lerck K, Gilg DEO, Hunziker P, Bernhard WR, Good M: Structure of mammalian metallothionein. Environmental Health Perspectives. 54: 93-103 (1984).

Kojima Y: Definitions and nomenclature of metallothioneins. Methods Enzymol 205: 8-10 (1991).

Las poliaminas como bioindicadores vegetales de estrés ambiental en atmósferas urbanas contaminadas

S. V. Caffaro¹, J. G. del Monte², S. Mata² y C. Vicente²

¹Departamento de Biología Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo

²Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid

La evolución de las poliaminas endógenas del trigo (*Triticum aestivum* cv. Andy), como bioindicadores vegetales de estrés ambiental, fue comparada con los valores de contaminación atmosférica de la ciudad de Madrid durante un período de trece meses. Para ello, se instalaron mensualmente lotes de plantas de trigo en cada una de las diez Estaciones de Medición de la Contaminación Atmosférica distribuidas en zonas urbanas de alta, media y baja contaminación de la ciudad de Madrid, respectivamente. Al cabo de un mes de exposición a las condiciones atmosféricas naturales propias de cada Estación, el contenido endógeno de la fracción libre de putrescina, espermidina y espermina de esas plantas de trigo fue analizado por HPLC. Cada Estación midió los niveles atmosféricos de SO₂, NO₂, NOx, CO, O₃ y temperatura. El contenido atmosférico de cada contaminante varió de modo diferente a lo largo del año. El nivel endógeno de putrescina libre respondió principalmente al SO₂ cuando éste se presentaba por encima de un determinado umbral (> 60 µg SO₂/m³, aproximadamente). Este umbral se sobrepasó durante los meses de otoño e invierno. El nivel de SO₂ ejerció un efecto directo *per se* pero también un efecto multiplicativo ante la presencia de NO₂. El NO₂ no ejerció ningún efecto directo pero si también un efecto multiplicativo en presencia de NOx. El nivel endógeno de espermidina respondió al SO₂ de modo similar que la putrescina. La temperatura también ejerció un efecto directo sobre el nivel de putrescina y de espermidina. Se obtuvieron modelos de respuesta de las poliaminas a las condiciones atmosféricas de la ciudad de Madrid en que la suma de los efectos directos de cada contaminante más sus interacciones conforman una situación ambiental multivariable. Las poliaminas demostraron ser un sensible bioindicador que se expresa previamente a cualquier síntoma de afección directa por contaminantes atmosféricos como es el caso del SO₂.

Fluorescencia modulada de la clorofila a en *Avena sativa* cultivada en una región con alta concentración de contaminantes atmosféricos

Jose L. Carrasco-Rodríguez, Eulogio Aleixandre*, Miguel Juan-Delhom*
y Secundino del Valle-Tascón

Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Valencia,

Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia. *Estación Experimental Agraria de
Carcaixent, Partida Barranquet s/n, 46740 Carcaixent, Valencia

Las condiciones ambientales desfavorables producen efectos deletéreos en los vegetales. En la Comunidad Valenciana se está observando un aumento en la concentración de los contaminantes atmosféricos. La presente comunicación está centrada en el estudio de los posibles efectos de contaminantes atmosféricos en la actividad fotosintética de plantas cultivadas.

Los estudios se han realizado en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia) que dispone en la actualidad de un equipo de medidores de contaminación ambiental (NO , NO_2 , O_3 y SO_2) así como de factores ambientales (temperatura, radiación solar, lluvia, presión atmosférica, dirección y velocidad del viento y humedad relativa). Además, la Estación dispone de las instalaciones adecuadas para realizar los cultivos en óptimas condiciones agronómicas. El equipo de medición de contaminantes se encuentra en funcionamiento desde enero 1996. La evolución de los contaminantes atmosféricos siguen un perfil diario y estacional; es de destacar las elevadas concentraciones de contaminantes observadas durante el período de crecimiento de los diferentes cultivos. El equipo de medida de factores ambientales se encuentra en funcionamiento desde enero del presente año, y por tanto, no se puede presentar una visión general.

Se ha observado la presencia de síntomas visibles foliares (clorosis y necrosis) en los cultivos realizados. Estos síntomas se aprecian ya en las primeras etapas del desarrollo de las plantas y por tanto claramente diferenciables de la senescencia.

La aplicación de la fluorescencia modulada de la clorofila a y de los dobles pulsos de luz ha permitido la determinación *in situ* e *in vivo* de los siguientes parámetros fisiológicos: Flujo fotosintético de electrones, atenuación fotoquímica y no fotoquímica y rendimiento cuántico actual de la actividad del PSII en condiciones ambientales.

El rendimiento cuántico máximo, estimada por el cociente F_v/F_m , presenta una variación con la intensidad de la luz ambiental y los síntomas visuales observados en las hojas. La atenuación no fotoquímica y fotoquímica también presentan una dependencia de los síntomas visibles. Estos resultados de la fluorescencia se relacionan con las inmisiones y con las condiciones ambientales.

Efecto del confinamiento del sistema radical de girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre el metabolismo de carbohidratos en la raíz

I.M. Serrano¹, M. Benlloch¹, M. Guzmán² y J. Jorrín²

Dptos. de Agronomía¹ y Bioquímica y Biología Molecular². ETSIAM,

Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba

En sistemas agrícolas las raíces de las plantas están frecuentemente sometidas a estrés mecánico, como es el caso de cultivos sobre suelos secos o compactados. En estas situaciones, el volumen de suelo disponible para el desarrollo del sistema radical suele verse limitado. Se ha observado que el estrés mecánico provoca una disminución del crecimiento de la parte aérea (Masle y Passioura, 1987; Ternes *et al.*, 1994), pero también se han detectado cambios metabólicos en la raíz, como la acumulación de azúcares en plantas creciendo sobre suelos compactados (Atwell, 1988). El principal problema para el estudio de este tipo de estrés es que con frecuencia lo acompañan una disminución en la disponibilidad de agua y nutrientes, lo que hace difícil separar los efectos debidos únicamente a la impedancia mecánica.

Se cultivaron plantas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Sun-gro 380) en medio hidropónico y condiciones de cultivo controladas, utilizando un sistema de confinamiento de la raíz en pequeños contenedores y diseñado para evitar la existencia de estrés hídrico o nutricional (Ternes *et al.*, 1994). Las plántulas fueron sometidas a tres tratamientos distintos: a) plantas con el sistema radical confinado, b) plantas con el sistema radical libre y c) plantas a las que se les liberaba del confinamiento 21 horas antes de la recogida del material vegetal. El estrés por confinamiento provocó la acumulación de sacarosa y azúcares reductores en la raíz, junto a una drástica reducción de la actividad invertasa ácida (EC 3.2.1.26) respecto al tratamiento control. La salida del estrés generó una respuesta rápida: se reestableció parcialmente la actividad invertasa y disminuyeron los contenidos de azúcares. Estos resultados sugieren que en la transducción del estrés mecánico interviene el metabolismo de azúcares.

Atwell, B.J. (1988). Physiological responses of lupin roots to soil compaction. *Plant and Soil* 111, 277-281.

Masle, J. and Passioura, J.B. (1987). The effect of soil strength on the growth of young wheat plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 643-656.

Ternes, M., Andrade, A.P., Jorrin, J. and Benlloch, M. (1994). Root-shoot signalling in sunflower plants with confined root systems. *Plant and Soil* 166, 31-36.

Sección C5:

**Fotosíntesis y metabolismo
del carbono**

Espectro de acción de la incorporación de bicarbonato en *Monoraphidium braunii*

N. Giráldez y P.J. Aparicio

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, E-28006 Madrid

El alga verde *M. braunii* utiliza bajas irradiancias de UV y azul para activar el sistema (o sistemas) de transporte de los aniones monovalentes NO_3^- , NO_2^- y Cl^- . Los espectros de acción de las incorporaciones de NO_3^- y de Cl^- resultaron casi idénticos, lo que permite sugerir que la transducción de la señal luminosa la lleva a cabo un único fotorreceptor. Estos espectros mostraban tres bandas de acción con máximos a 260, 370 y 450 nm que coincidían con las bandas de absorción de los pigmentos flavínicos. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de pigmentos pterínicos en este fotorreceptor, ya que la banda de acción de 370 nm es más pronunciada que la de la zona del azul.

Más recientemente hemos puesto de manifiesto que la radiación azul es esencial para que estas células incorporen el anión HCO_3^- . A pH's alcalinos la mayor parte del carbono inorgánico del medio se encuentra en forma de HCO_3^- por lo que, en estas condiciones, estos organismos se encuentran obligados a incorporar este anión como fuente principal de carbono al carecer estas células de anhidrasa carbónica periplásmica. De hecho los inhibidores de esta enzima no afectan la actividad fotosintética dependiente de HCO_3^- . Sin embargo, los inhibidores de las ATPasas plasmáticas eliminaban la estimulación inducida por la luz azul del desprendimiento de O_2 , lo que indicaba que el transporte de este anión dependía de energía quimiosmótica. La luz roja por sí misma se mostró incapaz de proporcionar los niveles de desprendimiento de O_2 que cabía esperar de las concentraciones de HCO_3^- en el medio, siendo preciso iluminar simultáneamente las células con radiaciones de corta longitud de onda, luz azul o UVA, para obtener niveles de actividad fotosintética similares a los generados por luz blanca.

La activación del desprendimiento de O_2 dependiente de HCO_3^- tenía lugar de forma casi instantánea tras la iluminación de las células con pulsos saturantes de luz azul. El tiempo de respuesta era del orden de 2 a 4 s, también similar al encontrado para el NO_3^- y Cl^- . Este hecho situaría al fotorreceptor (o fotorreceptores) en la membrana plasmática, próximo a los sistemas de transporte de los aniones monovalentes.

El espectro de acción de la estimulación de la actividad fotosintética dependiente de HCO_3^- en células mantenidas a pH 9 mostraba una banda en la zona azul con dos picos diferenciados a 480 y 450 nm y otra en la zona UVA con un máximo a 370 nm muy similares a las bandas encontradas para el NO_3^- y Cl^- . Entre 500 y 750 nm, todas las radiaciones se mostraron inefectivas, como ocurría con la activación de la incorporación de los aniones mencionados anteriormente.

Estos resultados sugieren la existencia en *M. braunii* de un único fotorreceptor, probablemente de naturaleza flavo-pterínica, responsable de la activación del transporte de los aniones monovalentes de mayor significado fisiológico para los organismos fotosintéticos como son el HCO_3^- , el NO_3^- y el Cl^- . Resultados de otros grupos de investigación atribuyen a la nitrato reductasa (una flavo-pterin proteína) unida a la membrana plasmática la recepción y transducción de la señal luminosa.

Crescimento do *Quercus suber* L. em dois níveis de azoto e CO₂: fotossíntese, fotorrespiração e respiração

N.R. Canta, P. Santos, E. Breia, T. Faria, M.M. Chaves, J.S. Pereira

Departamento de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia,

Tapada da Ajuda 1399 Lisboa, Portugal

Plantas de *Quercus suber* L. com 3 meses de idade foram transferidas do viveiro para condições controladas de humidade e temperatura em estufa sendo sujeitas a duas concentrações de CO₂ (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e 350 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). As plantas cresceram durante um período de 29 meses em contentores sendo regadas com solução nutritiva com diferentes concentrações em azoto (high-N 6 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e low-N 1 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Aos 20 meses (Inverno), 25 meses (Primavera) e 29 meses (Verão) foram retiradas amostras para realizar as medições de crescimento, respiração nocturna, capacidade fotossintética e fluorescência da clorofila. A massa seca total e área foliar total foram superiores nas plantas high-N e idênticas para ambos os tratamentos de CO₂. O crescimento da parte aérea foi mais importante nas plantas high-N. Como consequência, 29 meses após o início do ensaio, a proporção de folhas na biomassa total das plantas foi mais elevada nas plantas high-N. Na Primavera a fotossíntese medida para cada uma das concentrações de CO₂ foi maior nas plantas crescidas em CO₂ elevado, tornando-se, no Verão, inferior à das plantas crescidas em CO₂ atmosférico, sugerindo a ocorrência de "down-regulation" na fotossíntese dessas plantas. A capacidade fotossintética foi superior nas plantas high-N, independentemente do tratamento de CO₂. A respiração nocturna foi menor nas plantas sujeitas ao CO₂ elevado em todos os períodos de medição.

Regulación por fosforilación reversible de la PEPC de semillas de trigo y cebada

L. Osuna¹, M.C. González², J.N. Pierre³, R. Alvarez¹, F.J. Cejudo², J. Vidal³
y C. Echevarría^{1*}

¹Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda Reina Mercedes nº6, 41012 Sevilla, e-mail echeva@cica.es; fax 4615780

²Inst. Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de investigaciones "Isla de la Cartuja", Avda Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla

³Inst. de Biotech. des Plantes, UA CNRS D 1128, Bâtiment 630, Univ. de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Cedex, Francia

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima citosólica de muy amplia distribución. Cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO_3^- y Me^{2+} rindiendo oxaloacetato (OAA) y Pi (1). Esta enzima ha sido muy estudiada en plantas C_4 y CAM, en las que juega un papel esencial en el metabolismo fotosintético del carbono. En estas plantas, la PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible y circadiano, descubierto en 1986 (1). La PEPC fosforilada en un residuo de Ser, en el extremo N-terminal de la proteína, es menos sensible a la inhibición por su efector negativo L- malato en condiciones subóptimas de ensayo (pH 7,1, 2.5 mM PEP) y es más activa (6-8 veces) a pH subóptimo de 7,1 (2). La PEPC-quinasa implicada en este proceso es una Ser/Thr quinasa Ca^{2+} -independiente cuando se obtiene semipurificada en una columna de azul dextrano agarosa (BDA PEPC-quinasa) (1). Un incremento de pH citosólico, una salida de Ca^{2+} de la vacuola y la activación de una quinasa Ca^{2+} -dependiente son algunos de los elementos esenciales identificados en la cadena de transducción de señales que provoca la activación de la PEPC-quinasa (3) en un proceso en el que, además, está implicada una síntesis proteica (4). La fosforilación reversible de la PEPC ha sido puesta en evidencia en isoenzimas no fotosintéticas de raíces, estomas, hojas C_3 deficientes en nitrato y en nódulos (1).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la PEPC de semillas de trigo y cebada también se regula por fosforilación durante la germinación. Durante este proceso, la actividad total PEPC se mantiene constante y la actividad específica aumenta en un 50%. Utilizando anticuerpos anti-PEPC de hojas de sorgo, se identificaron dos polipéptidos: uno, de 103 kD, de naturaleza constitutiva y otro, de 108 kD, que se indujo tras unas 6 horas de imbibición (6). La utilización de anticuerpos específicos anti-N y C-terminal de la proteína mostraron que ambos son polipéptidos completos y no productos de degradación. El uso de anticuerpos específicos anti-sitio de fosforilación (APS-IgGs) identificaron la presencia de un motivo de fosforilación equivalente a los encontrados en otras PEPC de plantas (6). La unión de estos anticuerpos a la PEPC de semilla promovió cambios en sus propiedades enzimáticas y de regulación equivalentes a los causados por fosforilación (6), como fue previamente demostrado para la PEPC C_4 de hojas de sorgo (5). La

PEPC de semillas se fosforiló tanto *in vitro* como *in situ*, además, la relación de la actividad PEPC, determinada en condiciones óptimas y subóptimas de pH, 8 y 7,1 respectivamente, disminuyó durante la germinación, indicando cambios en la velocidad catalítica de la enzima relacionados con un proceso de fosforilación *in vivo* (6).

A partir de protoplastos de células de aleurona de cebada se ha obtenido la BDA PEPC-quinasa y, utilizando diferentes inhibidores que demostraron ser útiles para el estudio de la cadena de transducción de señales que opera para la fosforilación de la PEPC C_4 (W7, TMB-8 y cicloheximida) (3), hemos puesto en evidencia que esta vía de señalización no es funcional durante la germinación y que la fosforilación de la PEPC de semillas corre a cargo de una PEPC-quinasa presente ya en la semilla seca y, a diferencia de lo establecido, su actividad durante la germinación no es dependiente de síntesis proteica.

1. Chollet y col. (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:273-298.
2. Echevarría y col. (1994) *Arch Biochem Biophys* 315:425-430.
3. Giglioli-Guivarch y col. (1996) *Plant Cell* 8:573-586.
4. Jiao y col. (1991) *Proc Natl Acad Sci* 88:2712-2715.
5. Pacquit y col. (1995) *Photosynth Res* 43: 283-285.
6. Osuna y col. (1996) *Plant Physiol* 111: 551-558.

Características fisiológicas e produção de plantas de *Coffea arabica* enxertadas sobre *Coffea canephora*

J.I. Fahl, M.L.C. Carelli e P.B. Gallo

Departamento de Fisiologia, Instituto Agronômico de Campinas, Caixa Postal 28,
CEP 13.001-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: fahl@barao.iac.br

A enxertia de cultivares de *Coffea arabica* sobre *C. canephora* vem sendo utilizada como uma alternativa para o cultivo do café em áreas infestadas por nematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, devido à resistência de *C. canephora* a esses parasitas. Em adição, foi observado que a enxertia promoveu o desenvolvimento de plantas jovens, mesmo em solos isentos de nematóides.

Neste trabalho foram avaliadas, durante três ciclos consecutivos após a recepção das plantas, as características fisiológicas e a produção do cultivar de *C. arabica* (Catuai - IAC 2077-2-5-81) enxertado sobre a progênie de *C. canephora* (Apoatã - IAC 2258), em solos não infestados por nematóides.

A fotossíntese líquida (P_N), determinada ao longo do dia, foi sempre maior nas plantas enxertadas do que nas não enxertadas, sendo que essa diferença foi mais acentuada no período compreendido entre 9:30 e 11:00 h. Para os dois tratamentos os valores de P_N aumentaram no início da manhã, atingiram valores máximos ao redor de 10:00 h, e decresceram posteriormente com o aumento da temperatura. A relação entre a transpiração e a resistência à difusão de vapor de água foi maior nas plantas enxertadas e apresentou valores máximos ao redor das 12:00 h. As plantas enxertadas mostraram maior altura (28%), maior diâmetro da copa (14%) e maior área foliar total por planta (52%), em relação às plantas não enxertadas. Esses acréscimos foram consequência de aumentos no comprimento e número de ramos, no comprimento de internódios, no número de pares de folhas, e na área foliar individual. A produtividade acumulada, durante três anos consecutivos, foi 170% maior nas plantas enxertadas em relação às não enxertadas, refletindo a melhor performance das características fisiológicas das plantas enxertadas.

Projeto parcialmente financiado pelo CNPq

Discriminação isotópica do carbono e trocas gasosas em espécies de *Coffea* cultivadas em diferentes níveis de irradiância

M.L.C. Carelli¹, J.I. Fahl¹, P.C.O. Trivelin² e R.B. Queiroz-Voltan¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto Agrônomo de Campinas, Caixa Postal 28, CEP 13.001-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: carelli@barao.iac.br

²Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil

A discriminação isotópica do carbono (Δ) contra o isótopo estável ^{13}C , que ocorre durante a fixação fotossintética do CO_2 , tem sido usada como uma medida integrada das trocas gasosas fotossintéticas para avaliar o efeito das condições ambientais.

A discriminação isotópica do carbono, as trocas gasosas fotossintéticas e o crescimento foram avaliados em duas espécies de *Coffea* (*C. arabica* L. cv. Catuai Vermelho e *C. canephora* L. cv. Apoatã) cultivadas em vasos, em condições de campo em três níveis de irradiância: a. pleno sol (S), b. 50% luz solar (50% S), c. 20% luz solar (20% S). A taxa de assimilação de CO_2 (A) foi maior em *C. arabica* do que em *C. canephora*, mas as duas espécies mostraram o mesmo tipo de resposta aos níveis de irradiância. Para *C. arabica* e *C. canephora* A foi, respectivamente, 2,1 e 1,7 vezes maior nas plantas S do que nas plantas 20% S, mesmo em temperaturas da folha tão elevadas como 33 °C. Não houve diferença significativa entre as plantas S e as plantas 50% S. A condutância estomática (g) nas plantas de Catuai aumentou com o nível de irradiância, mas esse aumento foi menos evidente do que o observado para A . Consequentemente, a relação A/g , que expressa a eficiência intrínseca do uso da água, foi maior nas plantas S e 50% S do que nas plantas 20% S. O nível de irradiância não alterou g em *C. canephora*, que mostrou menor relação A/g do que *C. arabica*. Os valores foliares de Δ foram menores nas plantas S do que nas plantas 20% S. Esse decréscimo em Δ foi associado com maior aumento em A (91%) do que em g (35%). Os valores de Δ foram altamente correlacionados com as medidas instantâneas de A ($r = -0,92$) e fracamente com g ($r = -0,80$). As plantas cultivadas a pleno sol mostraram maiores teores foliares de nitrogênio do que as plantas de sombra. O aumento no nitrogênio foliar com os níveis de irradiância foi fortemente correlacionado com A ($r = 0,99$) e Δ ($r = -0,94$), resultando em relações lineares entre essas características fotossintéticas.

Projeto parcialmente financiado pelo CNPq.

Acotación de errores en la determinación espectrofotométrica de clorofilas

N. Nicolás, A.L. García

Departamento de Química Agrícola, Universidad de Murcia, P.O. Box 4.021,
E-30071 Murcia, España

Se procede a la extracción y separación de clorofilas mediante TLC, y su redisolución posterior en: éter etílico, acetona 80% y DMF, obteniéndose las disoluciones stock A_0 y B_0 de clorofila a (*Cl a*) y clorofila b (*Cl b*) respectivamente. Las disoluciones stock fueron sometidas a tests de pureza: espectro de 2ª derivada, determinación HPLC, propiedades espectrales y relaciones de Soret. No se detectaron impurezas de *Cl a* en disoluciones de *Cl b* y viceversa, ni productos de degradación. A partir de estas disoluciones stock, se prepararon 6 disoluciones: $A_1, A_2, A_3; B_1, B_2, B_3$, con absorbancias a su λ máxima en la zona roja del espectro de: 0.8, 0.5, 0.25; 0.6, 0.4, 0.15 aproximadamente. Estas, se cuantificaron mediante la determinación del Mg por absorciometría atómica. A partir de estas concentraciones, se calcularon los coeficientes de extinción (α). No se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de extinción de las disoluciones $A_1, A_2, A_3; B_1, B_2, B_3$ y los calculados para los intervalos respectivos $A_1 \rightarrow A_3, B_1 \rightarrow B_3$ (éter etílico, 100.78 ± 0.78 y 61.71 ± 0.96 ; acetona 80%, 85.56 ± 0.74 y 51.47 ± 0.84 ; DMF, 83.53 ± 1.02 y 49.91 ± 0.83 para *Cl a* y *Cl b* respectivamente). Con los α determinados, se obtuvieron ecuaciones para el cálculo de las concentraciones de *Cl a* y *Cl b*. Se prepararon mezclas de *Cl a/Cl b* con relaciones de concentración de 1, 2 y 3 y se aplicaron las ecuaciones propuestas, obteniéndose diferencias entre los valores de concentración al aplicar dichas ecuaciones y los valores reales. En éter etílico, se obtuvieron errores positivos (valores de concentración superiores a los reales), 4-7% para *Cl a* y 3-6% para *Cl b*; en acetona 80%, se obtuvieron en todos los casos errores negativos, aumentando estos al hacerlo la relación *Cl a/Cl b*; para DMF, los errores fueron positivos para *Cl a* y para *Cl b* pasaban de positivos a negativos al incrementarse la relación *Cl a/Cl b*. Por último, comparamos las ecuaciones propuestas con las dadas por otros autores: Para las disoluciones etéreas (Comar - Zscheile y Wellburn), los errores dados por las tres ecuaciones para *Cl a* son similares (4-7%), mientras que para *Cl b* son aleatorios. En acetona 80% (Porra et al. y Wellburn), para *Cl b* el error se incrementa al aumentar la relación, si bien, para *Cl a* todas las ecuaciones dan errores bajos (1-5%). En DMF (Porra et al. y Wellburn), para *Cl a* los errores son positivos en relaciones *Cl a/Cl b* bajas y negativos para la más alta ensayada; en *Cl b* los errores son bajos, positivos para los datos obtenidos con las ecuaciones propuestas y negativos cuando se aplican las ecuaciones de Porra et al. y Wellburn.

Energética del citocromo *b559* en el Fotosistema II

J. M. Ortega, M. Roncel y M. Losada

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y CSIC,

Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja,

Avda. Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla

El citocromo *b559* es una proteína hemínica de 14 kDa que se encuentra estrechamente asociada al centro de reacción del fotosistema II (PS II) en todos los organismos con fotosíntesis oxigénica (cianobacterias, algas eucarióticas y plantas superiores). Aunque no se conoce aún ni la estructura ni la organización del citocromo *b559* en el PS II, se sabe que está constituido por dos subunidades polipeptídicas unidas entre sí a través de un grupo hemo y que en conjunto las dos cadenas atraviesan completamente la membrana fotosintética. Su función en el PS II es también desconocida. Parece, sin embargo, demostrado que no participa en las reacciones primarias de la transferencia electrónica inducida por la luz. Diversos autores han propuesto recientemente su posible participación en procesos redox secundarios relacionados con la protección del PS II frente a la fotoinhibición. En los últimos años nuestro grupo ha estudiado las características termodinámicas y funcionales de esta hemoproteína en diversos organismos fotosintéticos (Ortega et al. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 449-455; Ortega et al. (1995) *Photosynth. Res.* 46, 185-191). Las conclusiones más relevantes se resumen a continuación:

1. El citocromo *b559* se presenta en la membrana como **dos pares redox** con potenciales de óxido-reducción muy diferentes: i) par de alto potencial (HP), HP_{red}/HP_{ox} ($E_m = +380$ mV), y ii) par de bajo potencial (LP), LP_{red}/LP_{ox} ($E_m = +100$ mV). Ambos pares redox presentan **distinta estabilidad**: la forma oxidada del par HP es inestable y tiende a transformarse en LP si se someten las preparaciones a tratamientos que alteren la estructura de la membrana. El estado LP puede reconvertirse en HP reestableciendo las condiciones de integridad de la membrana.

2. El citocromo *b559* se presenta también en la membrana como **dos pares ácido-base** con pK_a diferentes: i) par de las formas reducidas, HP_{red}/LP_{red} ($pK_{a(red)} = 7,6$), y ii) par de las formas oxidadas, HP_{ox}/LP_{ox} ($pK_{a(ox)} = 3,6$). En ambos pares la forma HP es la protonada. Cada uno de los dos pK_a corresponde a un grupo ionizable diferente situado en la proteína en lados opuestos de la membrana. La transformación del estado HP al LP parece estar relacionada con la pérdida del protón inducida por los tratamientos que alteran la membrana.

3. El citocromo *b559* participa en una ruta de **transferencia electrónica secundaria** inducida en el PS II cuando la vía principal se encuentra bloqueada. La forma LP_{ox} recibe electrones de la feofitina cuando la transferencia electrónica se encuentra bloqueada en el aceptor primario (Q_A). La forma HP_{red} dona electrones al par especial de clorofilas en su estado oxidado ($P680^+$) cuando el sistema de rotura de agua no es funcional.

Nuestra propuesta establece que el citocromo *b559* podría participar en una vía cíclica de transferencia de electrones en el PS II que se induciría en determinadas circunstancias

fisiológicas (estrés luminoso, inoperancia del sistema de rotura de agua, etc.), cuyo objetivo sería eliminar el peligro de acumulación de especies tóxicas que podrían dañar la estructura del PS II (daño fotoinhibitorio). El funcionamiento de este ciclo implicaría la interconversión entre los estados HP y LP y la posible **translocación de protones** del exterior al interior de la **membrana fotosintética**.

Acumulação de açúcares, ajustamento osmótico e actividade fotossintética de *Helianthus annuus* sujeito a défice hídrico

F. Fonseca, M.M. David, I. Barrote, M.J. Correia
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias (C.D.C.T.P.V.),
Universidade do Algarve

Em plantas envasadas, com um mês de idade, foi gradualmente imposto o défice hídrico, fornecendo 50% da água perdida por transpiração no dia anterior, durante 14 dias. No final deste período as plantas foram regadas abundantemente e deixadas recuperar durante dois dias. As medições foram efectuadas no último dia de tratamento e no último dia de recuperação em folhas de diferentes idades (jovem, madura e velha), seleccionadas com base no LPI.

A secagem do solo foi acompanhada pelo desenvolvimento de défice hídrico foliar, com uma diminuição significativa do potencial de pressão (Ψ_p), apesar de ter ocorrido um decréscimo do potencial osmótico (Ψ_π). Após o período de recuperação verificou-se uma acentuada diminuição do potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi \max}$), em folhas jovens e maduras.

A actividade fotossintética ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), medida a 5% de CO_2 , decresceu em todas as idades, tendo recuperado para níveis próximos do controlo após o período de rehidratação, excepto nas folhas velhas. Na situação de défice hídrico verificou-se, em relação às plantas controlo, um aumento da concentração de clorofila total ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$) nas folhas maduras e jovens, não se tendo encontrado alterações significativas na concentração ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$) de RuBisCO e proteína solúvel, em qualquer das idades. Na recuperação, aqueles três parâmetros apresentavam valores semelhantes aos das plantas controlo, para todas as idades.

O ajustamento osmótico bem como o decréscimo na actividade fotossintética serão discutidos em relação com a concentração de açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) e a concentração de amido.

Aclimação a dois regimes de temperatura em *Cynara cardunculus* L.

P. Santos, M.M.Chaves e J.S.Pereira

Instituto Superior de Agronomia,

Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex, Portugal

A temperatura é um dos factores ambientais que mais influencia as plantas durante o seu crescimento, desenvolvimento e produção, sendo também um factor de selecção, uma vez que muitas espécies estão adaptadas a temperaturas de crescimento extremas. O presente trabalho teve como objectivo o estudo dos efeitos da temperatura no crescimento e nas respostas fotossintéticas de *Cynara cardunculus* L. Utilizaram-se sementes de uma planta-mãe cultivada no Instituto Superior de Agronomia (ISA), que se cultivaram em câmaras de crescimento com luz e humidade relativa controladas e dois regimes de temperatura, 15/10°C (dia/noite, respectivamente) e 25/20°C. Foram determinados parâmetros fisiológicos de crescimento e de fotossíntese. Para os primeiros, fizeram-se 3 colheitas, a partir das quais se calculou a taxa de crescimento relativo (RGR, $\text{g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$) e a área foliar específica (SLA, $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$); para os segundos, determinaram-se as taxas de fotossíntese em resposta a diferentes temperaturas. Observou-se uma aclimação da fotossíntese à temperatura, apresentando as plantas cultivadas na temperatura de 15/10°C um óptimo entre os 10 e os 20°C, enquanto que esse óptimo se situa entre os 20 e os 30°C nas plantas cultivadas a 25/20°C.

Localización de aminoácidos de tiorredoxina m implicados en la interacción con la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica de guisante

O.S. Wangensteen, A. Chueca, M. Sahrawy y J. López Gorgé

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Prof. Albareda, 1. 18009 Granada

Las tiorredoxinas (Trxs) son proteínas ubicuas de bajo peso molecular y con una secuencia en su centro activo altamente conservada: Cys-Gly-Pro-Cys. Juegan un importante papel en determinados procesos de oxidación-reducción, tales como reducción de ribonucleótidos, defensa frente a radicales libres y fotoactivación de enzimas cloroplastídicas. Hasta la fecha, tanto en bacterias como en mamíferos sólo se ha encontrado un tipo de Trx. En plantas, sin embargo, pueden encontrarse varias Trxs diferentes en una misma especie, clasificables, al menos, en tres grupos: h, f y m, dependiendo de su localización intracelular, su reactividad bioquímica y su secuencia aminoacídica. Las Trxs f y m se localizan en el cloroplasto, siendo la secuencia de la Trx f más parecida a la de mamíferos, mientras que la m presenta homología con las Trxs bacterianas.

Ambos tipos de Trxs cloroplastídicas presentan entre sí baja homología (25-30%) y diferente reactividad bioquímica. La Trx f interacciona fuertemente con la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica (FBPasa) y parece ser su activador natural. La Trx m, por el contrario, seguramente sea el activador natural de la NADP-malato-deshidrogenasa. La interacción entre ambas Trxs con la FBPasa ha sido caracterizada desde el punto de vista cinético, comprobándose que la Trx m, aún presentando una menor afinidad por la enzima que la Trx f, es capaz de activar a la FBPasa hasta V_{max} similares [1].

Se conoce la secuencia de aminoácidos de la FBPasa implicada en la interacción (^{149}Pro - ^{167}Gly en el caso de la enzima de guisante) [2], siendo notoria en la misma la gran cantidad de residuos cargados negativamente. Se desconoce, por el contrario, qué aminoácidos de las Trxs son los que interaccionan con la enzima.

El presente estudio trata de localizar, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, los restos de aminoácidos de la Trx m de guisante potencialmente implicados en la interacción con la FBPasa homóloga. Se parte de la hipótesis de que esta interacción posee un fuerte componente coulombiano, avalado por la presencia de numerosas cargas negativas en la enzima y restos cargados positivamente en su activador tiorredoxina.

Para ello se ha realizado la mutación de varios aminoácidos de la Trx m supuestamente implicados en la unión, tales como ^{63}Glu , ^{70}Lys y ^{74}Arg . El cambio de estos aminoácidos se llevó a cabo por amplificaciones independientes por PCR de las dos mitades N-terminal y C-terminal de la Trx m. Se usó como molde el plásmido pMI [1], que porta el gen codificante de la Trx m, junto con los dos oligonucleótidos específicos finales y los internos, conteniendo las bases necesarias para cambiar ^{63}Glu por Gln, ^{70}Lys por Glu y ^{74}Arg por Glu. Mediante un segundo PCR se obtiene, con estas mitades como molde y los oligonucleótidos específicos del principio y final, el gen de la Trx m ya mutado. Después de su

ligación con el vector pET12a y posterior expresión en *E. coli* BL21, se obtiene y purifica la Trx m mutante correspondiente.

Los aminoácidos básicos están altamente conservados en las Trxs y cabe esperar que favorezcan la unión. Por el contrario, el ⁶³Glu no aparece en la Trx f de guisante, estando sustituido por glutamina, es presumible que este residuo ácido desestabilice la unión de la Trx m con la FBPasa. Se han comprobado experimentalmente las diferencias de comportamiento entre la Trx m silvestre y los mutantes, demostrando así la implicación de estos aminoácidos en la unión con la FBPasa de guisante.

-
1. López Jaramillo *et al.* *Plant Physiol.* En Prensa 1997.
 2. Hermoso *et al.* *Plant Mol. Biol.* 30: 455-465, 1996.

Actividade de enzimas fotossintéticas de folhas de *Setaria sphacelata* sujeitas a desidratação rápida

J. Marques da Silva, A. Bernardes da Silva e M.C. Arrabaça

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Edifício C2, Campo Grande, 1700 LISBOA, Portugal

Destacaram-se folhas jovens expandidas de exemplares de *Setaria sphacelata* (C₄) e induziu-se uma rápida desidratação por exposição à atmosfera do laboratório. Ao longo do tempo de desidratação (cerca de 5 horas) recolheram-se periodicamente amostras das folhas, que foram imediatamente congeladas em azoto líquido. Cada recolha de amostras foi acompanhada pela pesagem de um fragmento controlo semelhante, utilizado para monitorização do Teor Hídrico Relativo (THR). Os fragmentos recolhidos foram mantidos a -70 °C e ulteriormente pesados e esmagados em almofariz para extracção enzimática. Recolheu-se uma alíquota de homogenato para determinação do conteúdo clorofilino. Em cada extracto foram imediatamente determinadas as actividades das enzimas ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO, E.C. 4.1.1.39), fosfo *enol* piruvato carboxilase (PEPC, E.C. 4.1.1.31) e enzima málica dependente do NADP (NADP-ME, E.C. 1.1.1.40). A actividade inicial da RUBISCO foi medida logo após a extracção, por incorporação de ¹⁴CO₂, tendo a actividade total sido determinada pelo mesmo processo, após 5 minutos de incubação da enzima com CO₂ e Mg²⁺. A actividade fisiológica (medida a pH 7.2 e PEP 2.5 mM) e a actividade máxima (medida a pH 8.0 e PEP 12 mM) da PEPC, e a actividade da NADP-ME foram determinadas espectrofotometricamente. Resultados preliminares indicam que as actividades enzimáticas, expressas com base no peso seco, são afectadas pelo *deficit* hídrico induzido. A actividade máxima da RUBISCO parece aumentar ligeiramente com o *deficit* hídrico, sendo essa tendência mais notória na actividade inicial, pelo que se observa um acentuado aumento do estado de activação da enzima. Quer a actividade máxima quer a actividade fisiológica da PEPC diminuem acentuadamente com um *deficit* hídrico moderado, e recuperam para valores mais elevados à medida que o *deficit* se intensifica. Os dados de que dispomos não nos permitem ainda avaliar o efeito sobre a percentagem de activação da enzima, nem sobre a sua sensibilidade ao malato, considerada geralmente indicadora do seu estado de fosforilação. Também no que respeita à actividade da enzima NADP-ME foi, até ao momento, impossível encontrar um padrão comportamental definido. As actividades expressas com base na proteína solúvel poderão ajudar a elucidar os pontos menos claros (Marques da Silva e Arrabaça, 1995, *in* Photosynthesis: from light to biosphere, Mathis ed., vol. IV: 545-548, Kluwer Academic Publishers). A correlação das actividades enzimáticas com o tempo de stress, e não apenas com a sua intensidade, poderá também ajudar a elucidar alguns destes pontos. Está igualmente em curso o doseamento da proteína-RUBISCO pelo método do carboxiarabinitol bisfosfato marcado (¹⁴CABP) (Parry *et al.*, 1993. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 113-120).

Absorção de luz e emissão de fluorescência da clorofila *a* em diferentes grupos de microalgas: resposta fotoadaptativa e efeito da temperatura e intensidade luminosa

J. Serôdio, J. Marques da Silva* e F. Catarino

Instituto de Oceanografia e Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal

*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal

Nas zonas intertidais estuarinas, a produtividade primária é dominada por comunidades de microalgas bênticas, denominadas microfítobentos, que colonizam as zonas de sedimentos finos. Nestas comunidades, a produtividade primária é determinada, em escalas de tempo curtas, pela variação rítmica da concentração celular na zona fótica do sedimento, provocada pela migração vertical das células de e para a superfície do sedimento. Recentemente, a medição da emissão de fluorescência da clorofila *a* *in vivo* foi introduzida como forma de monitorizar, quantitativa e não-destrutivamente, os ritmos migratórios do microfítobentos (Serôdio *et al.*, 1997. *Journal of Phycology*, 33(3) *in press*). Neste trabalho, são apresentados resultados relativos à variabilidade da absorção de luz e emissão de fluorescência associada à fotoadaptação e variações de temperatura e intensidade luminosa em espécies representantes dos principais grupos presentes no microfítobentos: uma diatomácea (*Phaeodactylum tricorutum* (Bolin)), uma cianófita (*Spirulina maxima* (Setch. et Gard.)) e uma euglenófita (*Euglena granulata* (Klebs) Lemm.). Foram realizadas culturas unialgais sob uma radiação fotossinteticamente activa (PAR) de 50 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperíodo 14 h, 20 °C). As características de absorção de luz foram determinadas pela construção de espectros de absorção *in vivo* (normalizados pela concentração de clorofila *a*). Diferentes parâmetros de fluorescência (F_0 , fluorescência basal; F_M , fluorescência máxima; F_s , fluorescência no estado estacionário e F'_M , fluorescência máxima sob luz actínica) foram medidos sob PAR de 200 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e entre 3 e 50 °C utilizando um fluorómetro de pulsos modulados. Os resultados obtidos indicam ser F_0 (por unidade de clorofila *a*) o parâmetro de fluorescência menos variável entre grupos e menos afectado por alterações decorrentes da fotoadaptação (modificações no espectro de absorção devidas a mudanças na pigmentação). F_0 é virtualmente independente da temperatura entre 3 e 35 °C para as espécies testadas. Estes resultados são explicados pelo facto de a luz de medição de F_0 (650 nm) ser absorvida quase exclusivamente pela clorofila *a*, e pela invariância do rendimento quântico de F_0 relativamente ao funcionamento fotoquímico e bioquímico do aparelho fotossintético.

Expresión del gen plastidial *ndh F* en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de cebada

A. Guéra, R. Catalá y B. Sabater

Depto. de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá de Henares,
28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Los genomas plastidiales codifican varios polipéptidos (NDH A-K) que son homólogos de subunidades de la NADH-ubiquitina-oxidoreductasa (complejo I) de mitocondrias.

Actualmente se desconoce la función exacta de este complejo en cloroplastos, aunque se han apuntado varias hipótesis, entre las que destacan: 1. las que relacionan el complejo de la NAD(P)H deshidrogenasa de cloroplastos con fotofosforilación cíclica, y 2. las que proponen que este complejo participaría en un proceso respiratorio localizado en plastidios (clororrespiración). Una de las primeras aproximaciones a la hora de evaluar estas hipótesis, consiste en el estudio de la expresión de los polipéptidos que componen el complejo bajo distintas condiciones ambientales y de desarrollo que afectan a la expresión de otros genes plastidiales y a la propia funcionalidad de estos orgánulos. Para ello se ha obtenido un anticuerpo policlonal contra el polipéptido NDH-F. Dicho anticuerpo reconoce específicamente un polipéptido de 70 kD presente tanto en cloroplastos como en etioplastos. El anticuerpo no reacciona con mitocondrias purificadas u otras fracciones subcelulares libres de plastidios. El peso molecular de NDH-F, calculado por migración en SDS-PAGE, es unos 8 kD menor que el deducido a partir de la secuencia del gen correspondiente. Estos resultados son coincidentes con los descritos para otros productos de los genes *ndh*, indicando la posibilidad de que estos sean procesados post-traduccionalmente. En hojas verdes, NDH-F está asociado a la fracción tilacoidal de cloroplastos (coincidiendo con la localización descrita para otros polipéptidos del complejo), y en hojas etioladas se encuentra en la fracción membranosa de etioplastos. Durante la transición de etioplastos a cloroplastos, los niveles de NDH-F disminuyen, mientras que los de otras proteínas codificadas en cloroplastos (LSU, D1) aumentan. Esto nos indica que, al contrario de proteínas implicadas directamente en fotosíntesis, la expresión de NDH-F es independiente de la luz aunque pueda estar modulada por ésta. Como confirmación, hemos encontrado que los niveles, relativos a proteínas totales, de NDH-F en raíces eran más altos que en hojas. A lo largo de la ontogenia de la hoja, la cantidad de NDH-F disminuye durante la transición de hojas jóvenes a hojas maduras (en las cuales los niveles de clorofilas y LSU son máximos), para volver a aumentar cuando las hojas comienzan a envejecer (según queda determinado por la disminución en el contenido de clorofilas, proteínas totales y, en concreto, de LSU). Parte de los síntomas asociados al envejecimiento foliar parece mediado por especies tóxicas de oxígeno. Hemos comprobado que en hojas jóvenes la acumulación de NDH-F es estimulada por tratamiento con el herbicida paraquat, que actúa en cloroplastos generando especies tóxicas de oxígeno. Puede, pues, que exista una relación entre el aumento en la expresión de NDH-F durante el envejecimiento foliar y la acumulación de radicales libres.

Estos últimos podrían actuar, bien directamente como **una señal que** induciría la expresión del complejo; o bien indirectamente, provocando con **su acción la** aparición de **una señal** generada por la pérdida de funcionalidad fotosintética del cloroplasto. En cualquier caso, nuestros resultados apuntan claramente en la dirección de que la función del complejo NAD(P)H deshidrogenasa de plastidios no se puede limitar **al papel** de intermediario en el transporte **electrónico** cíclico de la fotosíntesis, sino que debe intervenir en otros procesos relacionados con la maquinaria metabólica de plastidios no fotosintéticos o de cloroplastos que están perdiendo esta funcionalidad. Es posible que la función del complejo de la NAD(P)H deshidrogenasa sea mantener un **balance** NAD(P)H/NAD(P) y ATP/ADP apropiado **para el** funcionamiento del metabolismo no fotosintético de plastidios.

Secuencia del gen *ndhD* de cloroplastos: "editing" del transcrito primario y características funcionales del polipéptido codificado

M. Martín, E.M. del Campo y B. Sabater

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal),
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, 28871-Madrid

El DNA de cloroplastos de plantas superiores contiene 11 genes *ndh* homólogos a otros mitocondriales o nucleares que codifican para polipéptidos del complejo I (NADH deshidrogenasa) del transporte electrónico respiratorio. Algunos polipéptidos codificados por los genes *ndh* han sido ya identificados en tilacoides estromales y también se ha identificado una actividad NADH deshidrogenasa cloroplástica que probablemente es producto de los genes *ndh*, pero la función de tal NADH deshidrogenasa y, en consecuencia, de los genes *ndh* es todavía desconocida. Se sugiere que participa en una clororrespiración y/o en el transporte fotosintético cíclico de electrones. En los casos más estudiados, se encuentra que la expresión de los genes *ndh* aumenta durante la senescencia y en condiciones de estrés fotooxidativo.

Frecuentemente, los transcritos de los genes *ndh* son policistrónicos presentando un complejo y poco conocido proceso de maduración que incluye el "editing" de algunas bases C a U para crear codones AUG de iniciación y codones para aminoácidos muy conservados en secuencias homólogas. Incertidumbres relativas a los aminoácidos codificados hacen difícil identificar las secuencias conservadas y obtener anticuerpos adecuados a partir de construcciones quiméricas basadas en las secuencias genómicas.

Dentro de un proyecto en el que investigamos el procesamiento de transcritos de genes *ndh*, su traducción y la función y localización mediante anticuerpos de las proteínas resultantes, comunicamos aquí los resultados con el gen *ndhD* que hemos secuenciado completo en cebada y estamos secuenciando en otras plantas.

En la mayoría de las plantas, el gen *ndhD* es el último de una unidad transcripcional que incluye los genes *ndhH*, *ndhA*, *ndhI*, *ndhG*, *ndhE*, *psaC* y *ndhD*. Por PCR y con siete cebadores deducidos de la secuencia conocida de maíz y dos de las secuencias parciales que íbamos obteniendo, con un equipo automático secuenciamos en cebada un fragmento de 1.776 nucleótidos que incluye: 60 nucleótidos delante del codón de iniciación (AUG), 1.503 nucleótidos que codifican al *ndhD* (incluyendo el de terminación (UAG) y los 273 nucleótidos que siguen al terminal 3' del anterior. Secuenciación parcial del cDNA del mRNA correspondiente para confirmar sitios sospechosos de "editing" reveló que en el transcrito maduro está editada a U la C de la posición 878. El cambio de codón (UCA a UUA) permite que, en lugar de una serina, se incorpore una leucina altamente conservada en la posición 293 de la proteína resultante. Al igual que en arroz y maíz, y en contra de las dicotiledóneas en que se ha secuenciado la zona de iniciación de la traducción, el codón de iniciación de la traducción no requiere "editing" en cebada. En la región anterior al codón de iniciación no encontramos secuencias típicas de promotores de transcripción, lo que

sugiere que el gen *ndhD* solo es transcrito como parte de unidades transcripcionales más grandes. Secuencias GAG y GGG del tipo Shine-Dalgarno de unión a ribosomas se encuentran en el mRNA mucho antes del codón de iniciación (posiciones -40 a -50).

La homología entre el gen *ndhD* de cebada y los conocidos hasta ahora en otros organismos fotosintéticos oxigénicos es alta: 94%, 93%, 83%, 74% y 62% con el de, respectivamente, arroz, maíz, tabaco, *Marchantia* y *Synechocystis*.

El polipéptido deducido que codifica el transcrito editado del *ndhD* de cebada es muy hidrofóbico, (fenilalanina + leucina + isoleucina + valina hacen 199 de un total de 500 aminoácidos) y probablemente contiene 12 hélices que atraviesan la membrana de tilacoides. Contiene 27 aminoácidos ácidos, 41 básicos y tiene un pI previsto de 8,81.

Se discutirán otras propiedades deducidas para el producto polipeptídico del gen *ndhD* de cebada y otras plantas.

Efecto del incremento atmosférico de CO₂ en la síntesis de almidón y sacarosa en guisante en simbiosis

P. M. Cabrerizo, C. Arrese-Igor y P. M. Aparicio-Tejo

Dpto. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra,

Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona

Uno de los principales efectos del incremento de la concentración atmosférica de CO₂ en el guisante (*Pisum sativum* L.), es el aumento de la tasa de fotosíntesis a la vez de una disminución en la transpiración, lo que implica un aumento de la eficiencia en el uso del agua (WUE). Este incremento fotosintético puede implicar a su vez un aumento en el contenido de azúcares tanto en el nódulo como en la planta. El incremento de CO₂ también mejora el crecimiento de las plantas cuando se encuentran en condiciones óptimas para su crecimiento. Uno de los principales factores que implican un mayor crecimiento de las plantas en condiciones de alto CO₂ es la concentración de fósforo disponible para la planta.

En nuestro estudio se crecieron plantas de guisante en simbiosis con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* NLV8, con dos concentraciones de CO₂: ambiental y elevada (1000 μmol CO₂ mol⁻¹) y con 4 concentraciones de fósforo en la solución nutritiva 0,765 mM (x1), 1,53 mM (x2), 3,06 mM (x4) y 9,18 mM (x12). Las plantas crecieron en cámaras de crecimiento de ambiente controlado (Heraeus-Vötsch) con fotoperíodo de 16 h, radiación 480 μE m⁻² s⁻¹ (PPF), 25/18 °C, 70/80% HR (día/noche), y fueron regadas mediante un sistema de riego por goteo controlado por un microordenador.

El aumento de la concentración de fósforo, en la solución nutritiva de las plantas crecidas en elevado CO₂ implica un aumento de crecimiento, mientras que en las plantas crecidas con la concentración ambiental de CO₂ no presenta ningún efecto sobre el crecimiento. El contenido en azúcares es superior en las plantas crecidas en alto CO₂, aunque se observan diferencias entre los diferentes tratamientos de fósforo, ya que la producción de sacarosa o almidón depende del contenido de fósforo presente en el citosol (Usuda y Edwards 1982). Si no hay suficiente concentración de fósforo en el citosol, los esqueletos carbonados que se producen en la fotosíntesis, se acumularán en forma de almidón en el cloroplasto, mientras que si la concentración de fósforo en el citosol no presenta déficit, las triosas fosfato producidas pueden transportarse al citosol y ser transformadas en otros azúcares.

Usuda H, Edwards GE (1982) Influence of varying CO₂ and orthophosphate concentrations on rates of photosynthesis, and synthesis of glycolate and dihydroxyacetone phosphate by wheat chloroplasts. *Plant Physiol* 69: 469-473

Asociación de ferredoxina-NADP oxidorreductasa con el complejo NADH deshidrogenasa cloroplástico en cebada

M.J. Quiles y J. Cuello

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia,
30100 Espinardo, Murcia

Se han utilizado hojas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) para aislar el complejo NADH deshidrogenasa de cloroplastos. Las fracciones cloroplásticas estromal y tilacoidal solubilizada con el detergente desoxicolato sódico se analizaron por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida con gradiente lineal 5-22 %, y los enzimas se detectaron tiñendo el gel con NADH más nitroazul de tetrazolio. Tres enzimas se revelaron por este método: uno (ES) en la fracción estromal y dos (ET1 y ET2) en la fracción tilacoidal solubilizada con desoxicolato. Las bandas del gel con actividad enzimática se escindieron y se sometieron a electroelución para el aislamiento de los tres enzimas. Todos ellos tenían actividades NAD(P)H-ferricianuro oxidorreductasa (NAD(P)H-FeCNR) y ferredoxina-NADP oxidorreductasa (FNR) (EC 1.18.1.2).

En los enzimas la actividad NADPH-FeCNR era inhibida por 2'-monofosfoadenosina-5'-bifosforribosa (PADR), que es un inhibidor específico de FNR, y por incubación de los enzimas con el ácido p-cloromercurifenilsulfónico (p-CMPS), NADPH y p-CMPS + NADPH. Las inhibiciones en todos los casos eran similares a las descritas para la actividad diaforasa de FNR procedente de diversas fuentes. Además, los valores de Km para NADPH de las actividades NADPH-FeCNR (55, 35 y 62 μM , para ES, ET1 y ET2, respectivamente) eran similares a los encontrados para la misma actividad de FNR. Estos resultados nos indican que las actividades NADPH-FeCNR de los tres enzimas eran debidas a la actividad diaforasa de FNR. En contraste con esto, las actividades NADH-FeCNR de los tres enzimas no eran inhibidas por PADR y no se afectaban (o se inhibían débilmente en algún caso) cuando los enzimas se incubaron con NADH, p-CMPS y p-CMPS + NADH.

A través de ensayos de inmunotransferencia encontramos que los tres enzimas contienen dos polipéptidos de 35 y 53 kDa, de ellos el de 35 kDa reacciona con el anticuerpo fabricado contra la FNR de cebada y el de 53 kDa con el anticuerpo fabricado contra la subunidad del complejo I de mitocondria bovina que se liga al NADH. Además también se han detectado, aunque sólo en el enzima ET1, un polipéptido de 29 kDa que reacciona con el anticuerpo fabricado contra la subunidad TYKY del complejo I de mitocondria bovina (subunidad que es homóloga al producto del gen *ndhI* de cloroplastos), y otro polipéptido de 35 kDa (diferente al que reconoce el anticuerpo anti-FNR) que reacciona con el anticuerpo fabricado contra el producto del gen *ndhA* de cloroplastos de cebada.

Los resultados obtenidos sugieren la idea de que los electrones procedentes de los dos donadores electrónicos (NADH y NADPH) entran en el complejo NADH deshidrogenasa cloroplástico por dos sitios diferentes. El NADPH a través de la FNR que está asociada al

complejo y el NADH uniéndose a una subunidad de 53 kDa que es homóloga a la subunidad que se liga al NADH en el complejo I mitocondrial. Es posible que de los tres enzimas estudiados, ET1 sea el complejo cloroplástico NAD(P)H deshidrogenasa que está asociado a la FNR, mientras que los otros dos enzimas, ES y ET2, serían subcomplejos del primero.

Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT: Proyecto PB94-1141

Mn mediated effects on rice (*Oryza sativa* L.) photosynthesis

F. Lidon¹, J. Ramalho², C. Carvalho³ and F. Henriques¹

¹Plant Biology Unit, Fac. Ciências Tecnologia, Univ. Nova Lisboa,

2825 Mte Caparica, Portugal

²ICT-CEPTA, Tapada da Ajuda, Ap. 3014, 1301 Lisboa Codex, Portugal

³Plant Physiol. Dept., Est. Agron. Nacional, Qta Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

It has long been reported that Mn excess does not significantly affect biomass production in the early stages of rice growth, although it severely decreases vegetative growth at later stages (4). In this work we measured several photosynthesis-related parameters in 14-days old rice plants grown hydroponically with varying Mn concentrations (0.5 to 32 mg/l). Plants were grown at 29/31-19/20°C day/night temperatures, with a PPFD of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under a 11 h-day period, in nutrient solutions (6) containing: N (40 mg/l); P (10 mg/l); K (40 mg/l); Ca (40 mg/l); Mg (40 mg/l); Cu (0.01 mg/l); Mo (0.05 mg/l); B (0.2 mg/l); Zn (0.01 mg/l); Fe (2 mg/l). The solution was daily adjusted to pH 4 and fully renewed after 5 days. Net photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and intercellular CO_2 were determined using a $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ porometer (CIRAS-1, PPSYSTEM, U.K.). Photosynthetic capacity was determined in a leaf disc oxygen electrode (LD2/2 Hansatech Ltd, U. K.) under 6-8% CO_2 , PPFD of 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at 25°C. Chlorophyll *a* fluorescence was measured using the PAM-2000 chlorophyll fluorescence measuring system (Walz, Germany). Soluble carbohydrates, starch and carotenoids were determined following (1), (3) and (2), respectively. It was found that between 0.5 and 32 mg/l Mn concentrations, photosynthetic capacity did not change significantly. For this same treatment range, intercellular CO_2 stayed unchanged, net photosynthesis, stomatal conductance and transpiration decreased 31.9%, 16.3% and 10.5%, respectively; starch and soluble carbohydrates concentrations decreased 34.3% and 30.4%, respectively. Carotenoids concentrations decreased 13.2% only in the highest Mn treatment. Between 0.5 and 32 mg/l Mn, basal and maximum fluorescence, as well as the ratio variable to maximum, did not vary significantly. The photochemical quenching decreased about 10% from the 2 mg/l to the highest Mn treatment, whereas the non-photochemical quenching did not show any significant change. From these data it appears that Mn concentrations in the range tested do not affect the energy transfer within the light harvesting complex II, neither the photochemical efficiency of photosystem II. Also, Mn concentrations above 2 mg/l caused only a small loss in the proportion of available excitation energy used photochemically. Thus, the impairment observed on net photosynthesis with increasing Mn concentrations does not seem to be attributable to effects of this metal on photosystem II. The observation that the decreases of net photosynthesis with increasing Mn concentrations are not paralleled by decreases in biomass production at this early stage of the plant development may be explained by a mobilization of seed reserves.

1. Ashwell, G. (1957). *Methods Enzymol.* 3: 84-85.
2. Jaspars, E.M.J. (1965). *Physiol. Plant.* 18, 933-940.
3. McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V. Owens, H.S. (1950). *Anal. Chem.* 22: 1156-1158.
4. Pannamperuma, F.N. (1976). Screening rice for tolerance to mineral stress. In: M.J. Wright Eds. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Spec. Pub., pp. 341-353.
5. Pannamperuma, F.N., Castro, R.U. (1972). Rice breeding. In: Rice Res. Inst. Philippines, pp. 677-684.
6. Yoshida, S., Forno, D.A., Cook, J.H., Gomes, K.A. (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice, 3rd Ed. The International Rice Research Institute, Laguna, Philippines, pp 61-65.

Mn mediated modulation of the photosynthetic electron transport in rice (*Oryza sativa* L.)

F. Lidon

Plant Biology Unit, Fac. Ciências Tecnologia, Univ. Nova Lisboa, 2825 Mte Caparica, Portugal

Rice tolerance to Mn excess has long been reported (9). Yet, the extent of this tolerance varies during the life cycle of rice (7). The effect of this tolerance on the photosynthetic electron transport, in the early stages of rice growth, prompted this study, being hypothesized that excess Mn is associated to an increasing protection/efficiency of the photosynthetic electron transport. The experiment was carried out using rice (*Oryza sativa* L. cv. Safari) plants hydroponically grown for 14 days at 29/31-19/20°C day/night temperatures and under a PPFD of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, over a 11 h-day period. The nutrient solution used (11) contained Mn concentrations ranging between 0.125 and 32 mg/l. Other nutrients were used at the following concentrations: N (40 mg/l); P (10 mg/l); K (40 mg/l); Ca (40 mg/l); Mg (40 mg/l); Cu (0.01 mg/l); Mo (0.05 mg/l); B (0.2 mg/l); Zn (0.01 mg/l); Fe (2 mg/l). The solution was daily adjusted to pH 4, being fully renewed every 5 days. Isolation of thylakoids and measurement of Hill and Mehler reactions followed (3). Chlorophyll and protein determination followed (1) and (6), respectively. The chloroplast isolation for cytochromes (cyt) determinations followed (10). The concentrations of cyt $b_{559\text{HP}}$, $b_{559\text{LP}}$ and b_{563} were determined after (5). Cyt *f* concentration was determined following (10). Plastocyanin was isolated and measured following (4) and (2). Subchloroplast fractions for determination of plastoquinone (PQ) content followed (3), the content being determined according to (8). Between the 0.125 and the 8 mg/l Mn treatments, the Hill reactions showed a 64% increase (a slight decrease occurring thereafter). The Mehler reaction showed a 28% increase until the 32 mg/l Mn treatment. Between the 0.125 and the 32 mg/l Mn treatments the concentrations of chlorophyll *a* and *b* as well as the ratio *a/b* decreased to 72.6%, 74.3% and 96%, respectively. The level of thylakoidal protein did not varied significantly until the 2 mg/l Mn treatment, but decreased thereafter to 67.8% until the 32 mg/l Mn treatment. Cyt $b_{559\text{HP}}$ and $b_{559\text{LP}}$ concentrations showed increases of 25% and 39% until the 8 mg/l Mn treatment, decreasing thereafter. The levels of cyt *f* and PQ increased 49% and 57% until the 32 mg/l Mn treatment. Cyt b_{563} concentration decreased to 87.5% until the 0.5 mg/l Mn treatment, but did not vary significantly thereafter. Plastocyanin did not show a clear trend with increasing Mn concentrations. This experiment showed an stimulation of the Mehler and Hill reactions. The similar patterns of cyt b_{559} and PQ until the 8 mg/l treatment suggested an increasing protection of photosystem II through the increase of the cyclic electron rate around P_{680} , covering quinone *a* and cyt b_{559} , what agrees with the increase of the rates of the Hill reactions. The increase of cyt *f* concentration seemed to be the requirement for Mehler reactions increase.

1) Arnon, D.I. (1949). *Plant Physiol.* 24: 1-15.

- 2) Davies, D.J., San Pietro, A. (1979). *Anal. Biochem.* 95: 254-259.
- 3) Droppa, M., Masojidek, J., Ręsza, Z., Wolak, A., Horváth, L., Farkas, I., Horváth, E. (1987). *BBA* 891: 75-84.
- 4) Hauska, G.A., M.C. Carthy, R.E., Berzborn, R.J., Racker, E. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: 3524-3531; .
- 5) Houchins, J.P., Hind, G. (1984). *Plant Physiol.* 76: 456-460.
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 7) Ponnamperna, F.N., Castro, R.U. (1972). Rice breeding. In: Rice Res. Inst. Philippines pp 677-684.
- 8) Redfearn, E.R., Friend, J. (1962). *Phytochem.* 1: 147-151.
- 9) Ried, DA (1976). Aluminum and manganese toxicities in the cereal grains. In: M.J.Wright Eds. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Spec. Pub., pp. 55-64.
- 10) Spiller, S, Terry, N (1980). *Plant Physiol.* 65: 121-125.
- 11) Yoshida, S., Forno, D.A., Cook, J.H., Gomes, K.A. (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice, 3rd Ed. The International Rice Research Institute, Laguna, Philippines pp 61-65.

Effects of excess Mn on thylakoidal acyl lipids and PSII activity in rice

F. Lidon¹, J. Ramalho², G. Barreiro³ and F. Henriques¹

¹Plant Biology Unit, Fac. Ciências Tecnologia, Univ. Nova Lisboa, 2825 Mte Caparica, Portugal

²Inst. Inv. Cient. Tropical-CEPTA, Tapada Ajuda, Ap. 3014, 1301 Lisboa Codex, Portugal

³Plant Physiol. Dept., Est. Agron. Nacional, Qta Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

Rice tolerance to Mn excess is well known (7). In order to understand how that tolerance affects the photosynthetic apparatus in the early stages of the plant's growth, the effects of excess Mn on the composition of thylakoidal lipid matrix and on PSII functioning were tested. Experiments were carried out using rice (*Oryza sativa* L. cv. Safari) plants hydroponically grown for 14 days at 29/31-19/20°C (day/night), under a PPF of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, over a 11 h-day period. The nutrient solution used (8) contained Mn concentrations ranging between 0.125 and 32 mg/l. Other nutrients were used at the following concentrations: N (40 mg/l); P (10 mg/l); K (40 mg/l); Ca (40 mg/l); Mg (40 mg/l); Cu (0.01 mg/l); Mo (0.05 mg/l); B (0.2 mg/l); Zn (0.01 mg/l); Fe (2 mg/l). The solution was daily adjusted to pH 4 being fully renewed every 5 days. Chlorophylls determination followed (1). Chlorophyll *a* fluorescence parameters were measured using the PAM-2000 chlorophyll fluorescence measuring system (Walz, Germany). Determination of antheroxanthin (*anth*), violoxanthin (*viol*) and zeaxanthin (*zea*) followed (5). Lipid peroxidation was estimated according to (4) on chloroplasts isolated as in (2). Ethylene determination followed (6). Acyl lipids were measured according to (3). It was found that total chlorophylls concentration decreased 27% between the 0.125 and the 32 mg/l Mn treatments. The estimation of the quantum yield of non-cyclic electron transport (ϕ_e) showed a 22% increase between the 0.125 and the 2 mg/l Mn treatments, followed by a slight decrease thereafter until the 32 mg/l Mn treatment. The ratio variable to maximum fluorescence under photosynthetic steady-state conditions (F_v'/F_m') remained quite constant, showing a 7% increase until the 32 mg/l Mn treatment. Between the 0.125 and the 32 mg/l Mn treatment *zea* and *anth* content increased 20% and 5%, respectively, whereas that of *viol* decreased 15%. Thylakoidal acyl lipids peroxidation did not vary significantly, whereas ethylene production showed a 40% decrease after the 0.5 mg/l Mn treatment. Between the 0.125 and the 32 mg/l Mn treatment phospholipids decreased 46.6%, whereas galactolipids showed a 7% increase. It was concluded that although chlorophylls concentration sharply decreased with excess Mn, the absence of negative effects on ϕ_e and F_v'/F_m' reflects that the functioning of photosystem II remained quite unaffected. Changes in contents of *zea* and *viol* also suggested an increase of photoprotection of PSII by the xanthophyll cycle. The absence of a significant acyl lipid peroxidation and the decrease of ethylene production with increasing Mn concentrations seems to point out for a limited oxy radical production associated with PSII. However, excess Mn seems to cause a decrease of thylakoidal phospholipids content by a yet unknown mechanism.

1) Arnon, D.I. (1949). *Plant Physiol.* 24: 1-15.

- 2) Böhme, H. and Cramer, W. A. (1971). *FEBS Lett* 15: 349-351.
- 3) Droppa, M., Masojidek, J., Rosza, Z., Wolak, A., Horváth, L., Farkas, I., Horváth, E. (1987) *BBA* 891: 75-84.
- 4) Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., Slater, T. F. (1982). *Biochem. J.* 208: 129-140.
- 5) Hager, A. and T. Meyer-Bertenrath (1966). *Planta* 69: 198-217.
- 6) Meigh, D. E., Norris, K. H., Craft, C. C., Lieberman, M. (1960). *Nature* 186: 902-903.
- 7) Nelson, L.E. (1983). *Agron. J.* 75: 134-138.
- 8) Yoshida, S., Forno, D.A., Cook, J.H., Gomes, K.A.(1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice*, 3rd Ed., The international Rice Research Institute, Laguna, Phylippines, pp.61-65.

Aclimação ao frio da gramínea em C_4 *Paspalum dilatatum* cv Raki: efeitos no teor de açúcares e na capacidade de regulação osmótica

A.M. Cavaco e M.C. Arrabaça

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal

Paspalum dilatatum Poir, uma gramínea de pastagem perene com metabolismo em C_4 , é considerada uma planta semi-tolerante ao frio. A capacidade de aclimação ao frio descrita para diversas espécies, aparece associada ao aumento de açúcares solúveis, de entre os quais a sacarose. Este açúcar parece funcionar como um crioprotector das membranas e ainda como um regulador osmótico, o que pode ser de extrema importância na **prevenção da** formação de gelo nos tecidos. Por outro lado, o aumento dos açúcares solúveis e uma consequente diminuição do potencial osmótico, parece nalgumas espécies, promover alterações do teor de ácido abscísico, resultando num aumento de proteínas com papel fundamental no processo de aclimação.

Plantas de *P. dilatatum* cv Raki foram crescidas durante **5 semanas** em solução nutritiva de Hewitt (1966) modificada, numa estufa com as seguintes condições: temperatura de 25/18 °C. PAR de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 16/8h (dia/noite). Ao fim das 5 semanas as plantas foram divididas em dois grupos: o primeiro foi mantido nas mesmas condições de crescimento (plantas controlo) durante 10-15 dias, enquanto o segundo grupo foi aclimatado a 10/8 °C durante um período de 25-30 dias (plantas aclimatadas). Ao fim de 4 horas de luz, folhas de plantas controlo e aclimatadas foram recolhidas em **azoto líquido** e mantidas a -70 °C até utilização. Foi feita a extração e doseamento de açúcares solúveis (hexoses-P, hexoses, sacarose, frutanos) e amido, bem como de frutose-2,6-bisfosfato (fru-2,6-P₂), o metabolito regulador da partição sacarose/amido nos tecidos fotossintéticos. Foram ainda **determinadas as** actividades dos enzimas directamente envolvidas no **metabolismo da sacarose (sacarose-fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (susy) e invertases).**

Estão **neste momento em curso** ensaios para determinação do potencial hídrico, potencial osmótico e ajuste osmótico celular em folhas de ambos os grupos de plantas.

Os resultados obtidos demonstraram que o teor de hexoses-P, açúcares solúveis e de amido aumentaram nas folhas de plantas aclimatadas. Verificou-se um decréscimo drástico de fru-2,6-P₂ nas plantas aclimatadas, o qual parece confirmar a tendência para o favorecimento da síntese de sacarose **neste grupo de plantas.**

A actividade da SPS, tanto em condições de V_{max} como em condições **fisiológicas**, aumenta nas plantas aclimatadas, enquanto a actividade das enzimas de degradação da sacarose não sofreu alteração.

Os resultados deste trabalho serão discutidos em termos do efeito da relação aumento de açúcares solúveis/**diminuição** do potencial osmótico, e da sua implicação no processo de aclimação da espécie *P. dilatatum* cv Raki.

Estudo da evolução dos mecanismos respiratórios durante o amadurecimento da maçã

P. Duque¹, M. G. Barreiro² e J. D. Arrabaça¹

¹Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal

²Estação Agronómica Nacional, Oeiras, Portugal

Na generalidade dos frutos, o amadurecimento está ligado ao abaixamento da taxa respiratória dos frutos intactos. Este processo pode ser revertido nos frutos com climactérico, durante o qual ocorre um aumento da respiração. Os mecanismos metabólicos da respiração, ligados ao processo fisiológico do amadurecimento, não são bem conhecidos, nomeadamente no que respeita ao envolvimento da respiração resistente ao cianeto. No presente trabalho foram medidos vários parâmetros fisiológicos do amadurecimento, como a dureza da polpa, o conteúdo em açúcares solúveis e a acidez. Simultaneamente, em mitocôndrias da polpa dos frutos, foram medidos o transporte de electrões, a fosforilação oxidativa e a capacidade da oxidase alternativa.

Os frutos (*Malus domestica* cv Reinette du Canada) foram inicialmente conservados em câmara frigorífica a 4 °C até à senescência. As mitocôndrias dos tecidos da polpa de maçã foram purificadas em gradientes contínuos de densidade. A taxa respiratória dos frutos intactos foi medida através da produção de CO₂, utilizando um cromatografo de fase gasosa. As taxas respiratórias mitocôndriais foram medidas polarograficamente usando um eléctrodo de oxigénio em fase líquida. A capacidade da via resistente ao cianeto foi determinada na presença do inibidor, com piruvato actuando como activador da oxidase alternativa.

A respiração dos frutos manteve-se relativamente constante até ao climactérico, quando sofreu um aumento significativo. A dureza da polpa e a acidez titulável decresceram ao longo do amadurecimento, em contraste com os sólidos solúveis.

Em mitocôndrias, o malato, o succinato e o NADH exógeno foram utilizados como substratos respiratórios, sendo o succinato o substrato de oxidação mais rápida. A taxa global de transporte de electrões nas mitocôndrias apresentou um padrão semelhante ao da respiração dos frutos. No entanto, verificou-se consistentemente um aumento da respiração, em presença de cianeto, anterior ao aumento climactérico. Aparentemente, a capacidade da oxidase alternativa aumenta imediatamente antes do aumento da taxa da respiração global. Este aumento pode ser devido à síntese *de novo* da oxidase alternativa, imediatamente anterior ao climactérico. Nesta fase, estando a oxidase alternativa estimulada pela presença de piruvato, nos ensaios *in vitro*, ou pelo fluxo de ácidos orgânicos glicolíticos, nos frutos intactos, parece haver desvio de electrões da via citocrómica para a via alternativa, mantendo-se constante a respiração global.

Acção de herbicidas sobre o transporte de electrões e a fosforilação oxidativa: efeitos do MCPA em mitocôndrias de tubérculo de batata

V. Vaz Pinto¹, A. M. Tenreiro¹, J. Vicente² e J. D. Arrabaça¹

¹*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1700 Lisboa, Portugal*

²*Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 3000 Coimbra, Portugal*

Alguns alcanóicos têm sido largamente usados como herbicidas, com acção desfolhante. Sabe-se que os herbicidas actuam em vários processos fisiológicos, como a respiração e a fotossíntese, assemelhando-se, por vezes, a sua acção, à de algumas hormonas. No entanto, os seus efeitos sobre o metabolismo celular não estão completamente esclarecidos. As mitocôndrias são o principal centro do metabolismo energético em tecidos vegetais não-fotossintéticos, e o metabolismo mitocondrial é afectado por vários compostos estruturalmente semelhantes a estes herbicidas. No presente trabalho, pretendeu-se estudar os efeitos destes compostos sobre a respiração mitocondrial e a fosforilação oxidativa, utilizando-se como modelo o ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético (MCPA).

Mitocôndrias de tubérculo da batata foram purificadas em gradientes contínuos de densidade. A respiração foi determinada polarograficamente, com eléctrodos de oxigénio ou espectrofotometricamente, medindo a taxa de oxidação de NADH e de ferrocianeto. Como substratos respiratórios foram utilizados o succinato e o NADH exógeno. Estes dois substratos dão electrões à cadeia respiratória através de enzimas específicos, a NADH desidrogenase existente na superfície externa da membrana interna, que oxida o NADH do espaço intermembranar e a succinato desidrogenase (complexo II), que é uma proteína intrínseca da membrana e oxida o succinato matricial. O rendimento em ATP é semelhante, com um cociente ADP/O próximo de 2. O tampão de ensaio não foi suplementado com cálcio exógeno e a taxa de oxidação de succinato foi sempre superior à do NADH.

Os sistemas de oxidação dos dois substratos parecem responder diferentemente à presença de MCPA. Em estado 4 (na ausência de ADP), a taxa de oxidação de succinato mantém-se relativamente constante até cerca de 0,5 mM MCPA. A taxa em estado 3 (fosforilação de ADP) é fortemente inibida a partir da mesma concentração de herbicida. Com NADH, a taxa em estado 3 é pouco afectada e a taxa em estado 4 aumenta.

Estes resultados podem ser explicados a partir de uma acção geral de desacoplamento, sendo, no entanto, possível que o MCPA afecte também os mecanismos de transporte do succinato na membrana interna ou que actue como inibidor da succinato desidrogenase. A utilização de dadores artificiais de electrões pode ajudar a esclarecer esta acção do herbicida.

La pirofosfatasa de la membrana vacuolar (tonoplasto) de *Antirrhinum majus*

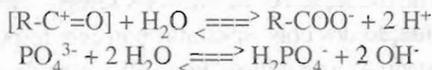
José R. Pérez-Castiñeira, Angel Mérida, José M. Romero, Manuel Losada y
Aurelio Serrano

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones Científicas
"Isla de la Cartuja", Avda. Américo Vespucio s/n,
41092 - Sevilla (España)

El pirofosfato inorgánico (PP_i) es un compuesto generado en muchas reacciones anaeróbicas que con su posterior hidrólisis por las pirofosfatasas solubles (sPPasas) desplaza el equilibrio de estas reacciones hacia la biosíntesis. El PP_i no es, sin embargo, sólo un producto final del metabolismo sino un compuesto energéticamente útil que puede reemplazar al ATP en diversas reacciones enzimáticas. De hecho, ATP y PP_i son en cierto modo equivalentes desde el punto de vista bioenergético, pues ambas moléculas contienen el grupo metafosfato rico en energía ($\sim PO_3^-$) unido en configuración tetraédrica por un anión óxido (O^{2-}) al ADP ó bien al ortofosfato (PO_4^{3-}). El grupo metafosfato es extraordinariamente reactivo, y su función en muchas reacciones bioquímicas es la de actuar como ácido y remover un anión óxido de una variedad de grupos, como el anión carboxilato ($R-COO^-$), que se energiza a catión acilio [$R-C^+=O$] a la par que el metafosfato se desenergiza a ortofosfato:



El catión acilio es, a su vez, un ácido fuerte con gran tendencia a liberar protones en su reacción con el agua, en tanto que el ortofosfato es una base fuerte con gran afinidad por los protones del agua, liberando iones hidróxido:



Esta secuencia de reacciones ácido-base (1,2) permite postular que la hidratación indirecta del metafosfato puede conducir a la generación de un potencial electroquímico de protones si ocurre cíclica y vectorialmente en una membrana translocadora de iones, en tanto que su hidratación directa por las sPPasas sólo permite la liberación de energía como calor:



Precisamente los organismos fotosintéticos presentan claros ejemplos de este tipo de reacciones. Así, los cromatóforos de ciertas bacterias fotosintéticas purpúreas no sulfurosas contienen una PP_i -sintasa "translocadora de H^+ ", mientras que las plantas superiores pose-

en en el citosol una PP_i -fosfofructoquinasa y en la membrana vacuolar (tonoplasto) una pirofosfatasa "translocadora de H^+ " (V-PPasa). El estudio de la V-PPasa del tonoplasto de plantas presenta varios aspectos de interés. Al estar implicada en el mantenimiento del equilibrio iónico celular, podría tener un papel relevante en la respuesta de la planta a diversas condiciones de estrés. Además, al ser un enzima relativamente sencillo, se podría utilizar como sistema de estudio del mecanismo del proceso ácido-base de transducción de energía propuesto.

A partir de una genoteca de cDNA de hojas de *Antirrhinum majus* se ha aislado un fragmento de 800 bp que codifica parcialmente una V-PPasa de dicha planta. Para la búsqueda se usó como sonda un fragmento del gen homólogo de *Arabidopsis thaliana* obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa de una genoteca de cDNA. Se han estudiado por "Northern blot" los niveles de expresión del gen de *A. majus* en los distintos tejidos de la planta, estableciéndose que la V-PPasa se expresa preferentemente en hojas e inflorescencias. Actualmente se lleva a cabo una búsqueda en la genoteca de cDNA de hojas con el fin de obtener el gen completo y caracterizar posibles isoformas del enzima; asimismo se investiga el efecto del estrés salino sobre la inducción del gen. Ya que hasta ahora sólo ha sido demostrada la presencia de la V-PPasa en plantas superiores, resulta de interés desde el punto de vista evolutivo su búsqueda en algas y otros organismos fotosintéticos primitivos. Utilizando como sonda el fragmento del gen de la V-PPasa de *A. majus* se ha comprobado por "Southern blot" la existencia de genes similares en microalgas eucarióticas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos: clorofíceas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*), rodofíceas (*Cyanidium caldarium*) y euglenofíceas (*Euglena gracilis*), así como en bacterias fotosintéticas (*Chromatium vinosum*, *Rhodospseudomonas palustris* y *Rhodospseudomonas viridis*). Estos resultados demuestran una distribución bastante amplia en los organismos fotosintéticos de las PPasas de membranas, la caracterización de cuyos genes está en proceso.

1. A. Serrano, M.I. Mateos y M. Losada (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 198:1348-1356.

2. M. Losada, M.A. De la Rosa, A. Serrano, M. Hervás y J.M. Ortega (1990) Bioelectrochem. Bioenerg. 23:105-128.

(Trabajo subvencionado por la DGICYT, PB 94-0033 y PB 95-1267, y la Junta de Andalucía).

Heterogeneidad molecular de las fosfatasa inorgánicas de organismos fotosintéticos y su relevancia para la filogenia de los plástidos

Rosario Gómez, Manuel Losada y Aurelio Serrano

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Univ. de Sevilla,
Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja, 41092-Sevilla

El pirofosfato inorgánico puede sustituir al ATP como compuesto energético donador de $\sim P$ en muchos organismos fotosintéticos. Estructuralmente el PP_i es mucho más sencillo que el ATP por lo que se considera como el compuesto que pudo anteceder al ATP en la bioenergética de los sistemas biológicos primitivos. Precisamente en los organismos fotosintéticos se encuentran todos los enzimas implicados en el metabolismo energético del PP_i : las pirofosfatasa solubles (sPPasas), presentes en todos ellos; b) las PPasas translocadoras de H^+ de la membrana vacuolar (tonoplasto), presentes en plantas superiores y probablemente también en microalgas eucarióticas, y c) las PP_i sintasa translocadoras de H^+ , hasta el momento sólo encontradas en la membrana de cromatóforos de algunas bacterias fotosintéticas (p.e., *Rhodospirillum rubrum*). Las sPPasas más estudiadas son las de *E. coli* (hexamérica, subunidad de 19kDa) y *S. cerevisiae* (dimérica, subunidad de 32 kDa) que se consideran como los enzimas tipo de sPPasas procarióticas y eucarióticas, respectivamente. A pesar de presentar diferencias notables en su estructura y secuencia de aa, ambos enzimas poseen un sitio activo muy conservado, habiéndose propuesto como ejemplos de evolución convergente. En esta comunicación se presentan los primeros resultados de un estudio sistemático de las sPPasas de organismos fotosintéticos muy diversos, las cuales se encuentran en el citosol o en los plástidos fotosintéticos, donde hidrolizan el PP_i que se forma en muchas reacciones biosintéticas y realizan una función esencial para la energética de estas reacciones, eliminando al mismo tiempo un compuesto tóxico en concentraciones del orden de mM. Nuestro objetivo es caracterizar las sPPasas de bacterias fotosintéticas (*R. rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodopseudomonas viridis*), cianobacterias unicelulares (*Synechocystis* PCC6803) y filamentosas (*Anabaena* PCC 7120), cianelos (*Cyanophora paradoxa*), algas rojas unicelulares con cianoplastos (*Cyanidium*) o rodoplastos (*Porphyridium*), microalgas clorofíceas (*Chlamydomonas*, *Monoraphidium*), así como plantas superiores (*Spinacea oleracea*), con el fin de hacer un estudio comparativo tanto bioquímico como de genética molecular. Todas las sPPasas de microalgas presentan una dependencia estricta de Mg^{2+} , no así las de bacterias fotosintéticas, pero presentan perfiles distintos de dependencia de pH de su actividad enzimática. Así, mientras que las cianobacterias y algas rojas primitivas poseen sPPasas neutras (pH óptimo, 7), las algas clorofíceas, más evolucionadas, presentan sPPasas alcalinas (pH óptimo, 8-9) similares a las de plantas. Se han purificado y caracterizado mediante cromatografía de filtración molecular (FPLC) y PAGE-SDS las sPPasas de organismos fotosintéticos pertenecientes a los diversos grupos filogenéticos citados, habiéndose encontrado una gran diversidad estructural.

	Subunidad	Estructura
Cianobacterias	19 kDa	Hexamérica
Cianelo	34 kDa	Monomérica
Algas rojas	38 kDa	Tetramérica
Plantas (cloroplasto)	37KDa	Monomérica

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las regiones N-terminal de estas proteínas pueden ser relevantes para la filogenia molecular de los plástidos. Así, las sPPasas de cianobacterias -similares a los endosimbiontes ancestrales que dieron lugar a estos orgánulos- se pueden clasificar como del tipo procariótico (hexaméricas, subunidad de 19 kDa) aunque sus secuencias de aa presentan ciertas peculiaridades. La secuencia de aa permitió el diseño de oligonucleótidos degenerados que se usaron para clonar por una estrategia de PCR el gen *ppa* que codifica la sPPasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803. Este gen se ha sobreexpresado en *E. coli*, y la proteína recombinante se ha caracterizado, resultando ser indistinguible de la natural. Asimismo se han obtenido anticuerpos mono-específicos contra este enzima que se están usando actualmente para estudios inmunológicos comparativos. Sorprendentemente, la sPPasa del cianelo de *C. paradoxa* -estructuralmente muy similar a las cianobacterias y considerado como un relicto evolutivo del ancestro de los actuales cloroplastos- es del tipo eucariótico tanto por su estructura (monomérica, subunidad de 33 kDa) como por su secuencia de aa y debe estar codificada por el genoma nuclear. Las sPPasas de algas rojas y cloroplastos de plantas tienen también estructuras de tipo eucariótico. La secuenciación de la región N-terminal de estas dos últimas proteínas está en proceso y puede esclarecer el conflicto entre estos resultados y la secuencia de aa, similar a las de sPPasas bacterianas, deducida del del único gen *ppa* de plantas (*Arabidopsis thaliana*) clonado hasta ahora. (Trabajo subvencionado por la DGICYT, PB 94-0033, y la Junta de Andalucía).

Efeito da irradiância fotónica no teor de clorofilas em plantas de *Castanea sativa* Mill. cv. Judia e Longal

J.C.E. Gomes-Laranjo, V.M.F. Galhano, M.S.B.C. Torres-Pereira e
J.M.G. Torres-Pereira

Unidade de Fotossíntese da Secção de Engenharia Biológica e Ambiental,
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apt. 202, 5001 Vila Real

Os níveis de irradiância fotónica desempenham um papel fundamental na arquitectura das membranas tilacóides dos cloroplastos. Estes, por sua vez, têm também capacidade de se adaptarem às condições do meio. Daqui resultam cloroplastos com mais grana, mais clorofila total e menor razão Cl_a/Cl_b quando há riqueza de PAR e vice-versa. Com o objectivo de caracterizar o comportamento de plantas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), efectuaram-se determinações da radiação incidente nas canópias, do teor em clorofilas totais (Cl_{total}) e razões clorofila a/b (Cl_a/Cl_b).

Os trabalhos foram realizados em 1995, entre Junho e Outubro. Foram escolhidas plantas em bom estado sanitário, com idade aproximada de 30 anos, das cultivares Judia e Longal, cujos compromissos fotossíntese/transpiração são significativamente diferentes. Estas plantas estão instaladas no mesmo microssítio, em Carrazêdo de Montenegro, Valpaços. Seleccionou-se uma zona de amostragem nas canópias, idêntica para todas as plantas, com orientação predominantemente Sul.

Os registos da PAR média incidente ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) nessa zona da canópia foram feitos com um radiómetro portátil (Macam, mod. Q102) às 11 h, 14 h e 17 h, de acordo com Galhano (1996).

As concentrações dos pigmentos clorofilinos foram determinadas espectrofotometricamente em acetona a 80%, usando as equações de Porra *et al.* (1989).

Tal como era esperado, a análise da PAR média incidente mostra que, de facto, as maiores intensidades são alcançadas nos meses de Julho ($\text{PAR}_{\text{Jd}} = 1144,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e $\text{PAR}_{\text{Lng}} = 928,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e Agosto ($\text{PAR}_{\text{Jd}} = 1041,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e $\text{PAR}_{\text{Lng}} = 987,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e as mínimas em Outubro ($\text{PAR}_{\text{Jd}} = 442,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e $\text{PAR}_{\text{Lng}} = 389,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

As plantas da cultivar Judia possuem, em média, maiores teores de Cl_{total} que as da Longal. Assim, para a Judia obtiveram-se os seguintes valores médios mensais: Junho = $43,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Julho = $53,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Agosto = $60,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Setembro = $51,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e Outubro = $43,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Para a Longal foram: Junho = $42,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Julho = $57,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Agosto = $58,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Setembro = $51,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e Outubro = $38,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Daqui resultam razões Cl_a/Cl_b variáveis em função do teor de Cl_{total} dado que as estruturas granares dos cloroplastos se autoajustam a fim de obterem o melhor compromisso entre o teor em pigmentos fotossintéticos e a eficiência na captação da PAR. Na cultivar Judia, os valores da razão Cl_a/Cl_b foram: Junho = 3,244; Julho = 3,206; Agosto = 3,359; Setembro = 3,066 e Outubro = 3,072. A Longal apresentou as seguintes razões: Junho = 3,485; Julho = 3,383; Agosto = 3,563; Setembro = 3,174 e Outubro = 3,106. Estes valores

indicam que as razões Cl_a/Cl_b diminuem com o decréscimo da PAR natural, mas também parecem demonstrar a existência de ciclos de autorrenovação da clorofila, podendo eventualmente a Cl_b estar mais dependente das condições hídricas do meio, por estar principalmente associada ao PS II, fotossistema onde ocorre a fotólise da água.

Em conclusão, a cultivar Judia, com maior teor médio em Cl_{total} e menor razão Cl_a/Cl_b , apresenta um aparelho fotossintético com características menos heliófilas que a cultivar Longal (Gomes-Laranjo *et al.*, 1993).

-
- GOMES-LARANJO JCE, PIMENTEL-PEREIRA MJ, TORRES-PEREIRA MSBC e TORRES-PEREIRA JMG (1993) Photosynthetic response of *Castanea sativa* Mill. cultivars to different microsites. Part III – Vinhais. **Em: Proceedings of the International Congress on Chestnut**. p.139-142. Antognozzzy E. (Org. Ed.). Comunità Montana Monti Martani e Serano of Spoleto and Istituto di Coltivazioni Arboree, University of Perugia, Spoleto
- GALHANO VMF (1996) *Efeito da Irradiância Fotónica na Composição Clorofilina em Castanea sativa Mill - Diferenciação das cultivares Judia e Longal em dois microssítios diferentes*. Relatório Final de Estágio em Eng. Agrícola. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real
- PORRA RJ, THOMPSON WA e KRIEDEMANN PE (1989) *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b with four different solvents: verifications of the concentrations of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*. Biochem. Biophys. Acta **975**: 384-394

Sección C6:

Interacciones planta-microorganismo

How is the oxidative burst activated in the defence response of tomato against the fungus *Cladosporium fulvum*?

P. Piedras, K. Hammond-Kosack, T. Romeis, K. Harrison
and J.D.G. Jones

The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH,
United Kingdom

Resistance (*R*) genes confer on a plant the ability to defend itself following attack by different pathogens such as virus, bacteria and fungus. Each *R* gene exhibits an extreme specificity and is only effective against a pathogen that has the corresponding functional avirulence (*Avr*) gene. The tomato resistance gene *Cf-9* confers plant disease resistance solely against races of the biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* that express the corresponding avirulence gene *Avr9*. *Cf-9* have been cloned and its sequence predicts a protein that is primarily extracytoplasmic, has extensive leucine rich repeat regions and a short C-terminal membrane anchor. The product of *Avr9* is secreted from the fungal cells and processed by fungal and plant proteases to produce a peptide of 28 aminoacids. When *Avr9* peptide is injected into the leaves or cotyledons of *Cf-9* tomato plants an array of defence responses are rapidly induced and lead to macroscopic tray necrosis within 12 hours. The tomato resistance gene *Cf-9* retains its specificity and activity when transferred to tobacco plants.

We have developed suspension cultures from these transgenic tobacco plants to study in detail the defence signal pathway activated by *Cf-9* and *Avr9*. One of the earliest events after pathogen elicitor challenge of plant tissues or suspension cultures is the production of active oxygen species (AOS). Hydrogen peroxide and superoxide radical anions have received considerable attention because they can act directly as antimicrobial compounds and as second messengers in the pathway leading to resistance. Challenge of the *Cf-9* tobacco suspension cultures with *Avr9* peptide produced an accumulation of AOS in the media that was detected in less than 10 minutes and that was dose-dependent. Control suspension cultures lacking *Cf-9* did not produce oxidative burst after challenge with *Avr9*. This oxidative burst was abolished by the addition of catalase, indicating that hydrogen peroxide was the predominant species detected. The inhibition of AOS production by diphenyleneiodonium, an irreversible inhibitor of the mammalian neutrophil NADPH oxidase, suggest that the enzyme responsible for AOS in tobacco could be a NADPH oxidase.

We have studied the possible components in the signal transduction activated after the interaction between the elicitor and receptor (possibly *Avr9/Cf-9*) that lead to the assembly of the oxidase and production of AOS. Our results indicate that uptake of calcium by the cells, activation of a protein kinase, and possibly phospholipase A2 are components of this pathway.

Efecto de la deficiencia de boro sobre la capacidad de los exudados de raíz de guisante (*Pisum sativum* L.) para inducir la transcripción de genes *nod*

E. Esteban¹, R. Rivilla², A. Gárate¹, R.O. Carpena Ruiz¹

¹Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid

Una de las etapas previas al establecimiento de la simbiosis efectiva entre guisante y *Rhizobium leguminosarum* es el reconocimiento mutuo, que se realiza mediante el intercambio de moléculas señal. Las raíces de las plantas liberan flavonoides a la rizosfera que, junto con el producto del gen *nodD*, activan la transcripción del resto de los genes *nod* (Fisher y Long, 1992).

El boro es esencial para la fijación simbiótica de nitrógeno en guisante, y su deficiencia afecta a la estructura y funcionalidad de los nódulos (Gárate y col., 1993; Bolaños y col., 1994). Por otra parte, se ha descrito que la deficiencia de boro en plantas produce alteraciones en el metabolismo fenólico en general y, en particular, en el contenido de flavonoides y en las proporciones relativas de los distintos tipos de los mismos en hoja, tallo y raíz (Carpena y col., 1984). Existe por tanto la posibilidad de que la deficiencia de B afecte a la composición de los exudados de raíz y a su capacidad para iniciar el proceso de nodulación.

Para estudiar este efecto, se realizó un cultivo hidropónico de guisante (*Pisum sativum* L. cv Argona) con aireación y en condiciones controladas (Gárate y col., 1993, disolución nutritiva 10 veces diluida para nitrato y 5 veces diluida para el resto de los elementos), con un tratamiento control (0.1 mg B/L) y otro sin B, al que se añadieron 0.5 g de Amberlita IRA 743, resina específica para retener B. A los 12 días, se recogió la disolución nutritiva, que se concentró haciéndola pasar por una columna cromatográfica rellena con Amberlita XAD-2. Los compuestos retenidos se eluyeron posteriormente con metanol, se concentraron y se analizaron por HPLC, utilizando una modificación del método empleado por Ferreres y col. (1995). La capacidad de estos extractos para inducir la transcripción de genes *nod* se probó midiendo la actividad β -galactosidasa de los mismos, utilizando una cepa de *Rhizobium leguminosarum* modificada (D24).

Los cromatogramas de los exudados obtenidos para plantas control muestran dos picos que no aparecen en el correspondiente a las plantas deficientes en boro. Además, en el cromatograma del exudado -B aparece un nuevo pico, que no había en el exudado control. Los espectros UV-visible obtenidos para los dos primeros picos permiten clasificarlos como una flavona y una flavanona/dihidroflavonol respectivamente, y el pico nuevo que aparece en los exudados de plantas -B es una mezcla de, al menos, dos sustancias. La actividad β -galactosidasa de los exudados control es seis veces mayor que la de los exudados

de plantas deficientes en boro. Por tanto, las diferencias observadas en la composición de los exudados de raíz producen una clara disminución de la capacidad de las plantas -B para iniciar el proceso de nodulación, impidiendo que se establezca una simbiosis efectiva.

Bolaños L., Esteban E., De Lorenzo C., Fernández Pascual M., De Felipe M.R., Gárate A., Bonilla I. 1994. *Plant Physiol.* 104, 85-90.

Carpena Artés O., Carpena Ruiz R.O., Zornoza P., Collado G. 1984. *J. Plant Nutr.* 7, 1341-1354.

Ferreres F., Esteban E., Carpena Ruiz R., Jiménez M.A., Tomás Barberán F.A. (1995). *Phytochemistry* 39(6), 1443-1446.

Fisher R.T., Long S.R. (1992) *Nature* 357, 655-660.

Gárate A., Esteban E., Lucena J.J., Carpena R.O., Bonilla I. (1993) En: *Plant nutrition: from genetic engineering to field practice*, 417-420, Kluwer Academic Press.

Ribonucleasas de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*

M.C. Rodríguez Cámara, M.T. Rodríguez Fernández, R. Ramírez Vera y P. Estévez López

Departamento de Biología Vegetal I, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040-Madrid

La ribonucleasa (RNasa) descrita en una gran variedad de material vegetal, experimenta cambios durante el desarrollo y en respuesta a diversos estímulos. Entre estos estímulos se pueden señalar el daño mecánico, el estrés ambiental y el ataque por patógenos.

Una respuesta muy frecuente en plantas al ataque por patógenos, es el incremento de los niveles de RNasas y/o la modificación del patrón de RNasas, siendo esta respuesta más acusada en la reacción compatible que en la incompatible (Green, 1994).

El objetivo de este trabajo ha sido analizar los cambios del patrón de RNasas en plantas enfermas y conocer algunas características bioquímicas de esta enzima, aspectos pocos conocidos en la patología vegetal.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, hemos identificado varias isoformas de RNasa presentes en raíces de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). Asimismo, se ha analizado la influencia del pH sobre la actividad de las mismas y su sensibilidad al EDTA.

A los treinta días de la infección por FORL, en las raíces de plantas de tomate se detectan 7 isoformas de RNasa cuyas características son las siguientes:

RNasa A: de peso molecular 35,30 kDa sólo muestra actividad a pH muy ácido (4,5-5)

RNasa B: de peso molecular 26,45 kDa sólo muestra actividad a pH ácido (4,5-6,5)

RNasa C: de peso molecular 17,33 kDa sólo muestra actividad a pH ácido (4,5-6,5)

RNasa D: de peso molecular 13,26 kDa sólo muestra actividad a pH muy ácido (4,5-5)

RNasa E: de peso molecular 9,65 kDa sólo muestra actividad a pH muy ácido (4,5-5)

RNasa F: de peso molecular 6,80 kDa muestra actividad a un amplio rango de pH (4,5-8)

RNasa G: de peso molecular 4,57 kDa sólo muestra actividad a pH alcalino (8)

Las RNasas B, C, D y E aparecen en plantas sanas e infectadas, mientras que las RNasas A, F y G son exclusivas de plantas infectadas. Las isoenzimas B y C son más activas en las plantas sanas, mientras que las D y E son más activas en las plantas infectadas. Las isoformas descritas no presentan actividad nucleasa y son insensibles al EDTA.

Proteínas-PR con actividad quitinasa en cultivos celulares de pimiento (*Capsicum annuum*) elicitados con *Phytophthora capsici*

M.D. García Pérez, C. Egea y M.E. Candela

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo,
30100 Espinardo (Murcia)

Una de las respuestas de las plantas al ataque patogénico es la inducción de proteínas llamadas PR (relacionadas con la patogénesis). Las proteínas-PR son de origen vegetal y algunas fueron identificadas como quitinasas (E.C. 3.2.1.14), las cuales hidrolizan quitina, componente de paredes de algunos hongos patogénicos. Los cultivos "in vitro" posibilitan los análisis repetitivos de reacciones celulares y el propósito de este trabajo es elucidar la respuesta en proteínas-PR, de células de pimiento (*Capsicum annuum*) a elicitores de *Phytophthora capsici*, hongo telúrico patogénico, causante de enormes pérdidas en las plantaciones afectadas.

Como material vegetal se han utilizado líneas celulares de tres variedades de pimiento de distinta sensibilidad a *P.capsici* como son: Yolo Wonder (YW) sensible, Americano (A) intermedio y Smith-5 (S-5) resistente. Suspensiones celulares de estos pimientos fueron subcultivadas cada 30 días en medio (M/S) suplementado con medio patata-dextrosa en el que crece el hongo. Como elicitores se utilizó a) micelio liofilizado: 120 µg/ml de medio fresco y b) filtrado: 10 ml del medio donde había crecido el hongo durante 30 días. Las suspensiones celulares se incubaron durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizó la extracción diferencial de proteínas de las células, fracción protoplástica y paredes y del medio, fracción extracelular. El análisis de proteínas se realizó en Phast-System (Pharmacia) (Egea et al., 1996) mediante Isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis en gel de poliacrilamida no-desnaturalizante (Nativa-PAGE), para proteínas ácidas y básicas, revelándose actividad quitinasa en una membrana puesta sobre el gel, y visible bajo UV de 366 nm.

Los resultados obtenidos muestran actividad quitinasa, a las 24 horas de la adición del elicitador, en las proteínas de la fracción protoplástica de células y en la fracción del medio extracelular, pero no se detectaron en paredes.

En el medio extracelular, la separación por IEF revela una quitinasa de pI 4.6 en A y S-5 al inocular con filtrado, y no aparece en YW. Una proteína de las mismas características se detecta en los extractos de medio extracelular de los tres cultivares, inoculados con micelio. En Nativa-PAGE estas quitinasas tienen un Rf de 0.4. Solamente en la variedad resistente S-5 aparece una quitinasa de pI 5.4 y Rf 0.7 tanto en extractos inoculados con filtrado como con micelio fúngico. No hay quitinasa en los controles de medio extracelular, realizados sin adición de elicitores fúngicos.

En la fracción protoplástica solo se detecta actividad quitinasa en el tejido sano de pimientos de la variedad S-5. La proteína detectada tiene un pI de 5.4 y un Rf de 0.7.

Estos resultados indican que hay una quitinasa constitutiva (pI 5.4 y Rf 0.7), detectada en la fracción protoplástica de la variedad resistente S-5 que no se detecta en las variedades sensibles. Puesto que esta proteína aparece en el medio extracelular después de la

elicitación con micelio o filtrado del hongo, solamente en la variedad resistente, puede tener implicación en la reacción defensiva de esta variedad, posiblemente siendo vertida desde su lugar de reserva en el protoplasto celular hasta el medio extracelular. A expensas de mas precisas comprobaciones sobre la identidad de este enzima, parece confirmarse una implicación directa de quitinasas en las reacciones de defensa de células de *C.annuum* despues de la infección por *P.capsici*. Sin embargo el hecho de que tanto la proteína que se vierte al exterior como la otra que se detecta después de la infección (pI 4.6 y Rf 0.4) tengan actividad quitinasa y se eliciten frente a un hongo en cuyas paredes no hay quitina sino glucanos, nos hace pensar que la producción de actividad quitinasa es un mecanismo de la defensa general que las células de pimiento desarrollan frente al ataque patogénico aunque no de manera específica contra *P. capsici*.

Egea, C., Alcazar, M.D. and Candela, M.E. Biol. Plantarum (1996) 38: 437-443

Agradecimientos - Proyecto AGF96-0761 de la CICYT, y al INFO por la Beca de C. Egea y Proyecto PS96-CA-FI de la Consej. Agricultura, de la Com. Aut. Región de Murcia.

Control de la respuesta defensiva de la planta en la interacción *Rhizobium*-leguminosa

P. Bueno², F. Martínez-Abarca¹, J.A. Herrera-Cervera¹, P. Rodríguez-Rosales², J. Sanjuan¹, J.P. Donaire y J.Olivares¹

¹Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

²Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda, 1, 18008 Granada

De la interacción *Rhizobium*-leguminosa se deduce una simbiosis mutualista por la que la planta puede aprovechar el nitrógeno molecular a través de su reducción a amonio llevada a cabo por el microsimbionte en los nódulos de las raíces. El hospedador ha de reconocer a *Rhizobium* como no patógeno o la bacteria tiene que eludir los mecanismos de defensa de la planta. Se ha descrito que algunos mutantes, como *exo* o *lps*, determinan en el hospedador una reacción que podría estar relacionada con la respuesta defensiva y que no aparece con las cepas parentales silvestres.

La respuesta defensiva de las plantas a patógenos (virus, bacterias u hongos) se ha asociado al incremento de los niveles basales de ácido salicílico (SA) en los tejidos próximos al sitio de contacto y en zonas más alejadas, así como al establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR), consecuencia de la respuesta hipersensible localizada (HR) desencadenada por el patógeno. Por otra parte, es un hecho conocido la participación de la catalasa en dicha respuesta defensiva, a través del control de los niveles de H₂O₂ y de otras enzimas (ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, y lipoxigenas), como reguladores de dicha molécula. de otras especies activas de oxígeno y radicales hidroperóxido.

Para conocer lo que puede ocurrir en el caso de la asociación *Rhizobium*-leguminosa, se han determinado los niveles de SA en raíces de alfalfa y veza inoculadas con cepas nodulantes (Nod⁺) o mutantes Nod⁻ de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae*, respectivamente, así como con especies de *Rhizobium* no específicas para la planta (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*-alfalfa). Los resultados obtenidos han mostrado que la inoculación de alfalfa o veza con cepas Nod⁺ de su *Rhizobium* específico, determina una ligera disminución de los niveles basales de SA, mientras que los correspondientes mutantes Nod⁻ y *Rhizobium* no específico, dan lugar a una considerable y significativa acumulación de SA. La inducción de la síntesis de SA es muy temprana y se puede apreciar ya a las 4 horas de la inoculación con las cepas no nodulantes. Paralelamente, en los experimentos con alfalfa se ha observado que bajos niveles de SA se corresponden con altas actividades de todas las enzimas ensayadas, excepto SOD, y viceversa, altos valores de SA conllevan una disminución de dichas actividades enzimáticas. De **estos resultados se** puede deducir que los factores Nod producidos por la bacteria cuando los correspondientes genes se inducen por los flavonoides exudados por la planta, juegan un papel esencial en el control de la respuesta defensiva de la leguminosa frente a *Rhizobium*. Las cepas incapaces de sintetizar factores Nod, por mutación en alguno de los genes clave que determinan su síntesis o por la falta de los

flavonoides correspondientes, inducen la acumulación de SA. Esto es señal de que la planta detecta un posible patógeno, que no se manifiesta como tal por no tener la capacidad de producir factores perjudiciales para el hospedador (toxinas, enzimas líticas de la pared celular y fitohormonas a altos niveles, etc.). Asimismo, el aumento observado en las actividades antioxidantes y LOX puede interpretarse como señal de una regulación de la producción de H_2O_2 e hiperóxidos lipídicos como posibles moléculas implicadas en la respuesta hipersensible de la planta en los estados iniciales de la infección. Como conclusión se puede afirmar que los factores Nod neutralizan la respuesta defensiva de la planta o bien enmascaran a *Rhizobium* para que no sea considerado como patógeno para ella.

Variación de los niveles de peroxidasa y *trans*-4-hidroxiestilbenos durante la interacción *Vitis*-*Agrobacterium*

E.M. Sánchez Escribano¹, A. Ros Barceló² y A.A. Calderón²

¹Departamento de Protección de Cultivos, CIDA, C/ Mayor, s/n,
30150-La Alberca (Murcia)

²Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo,
30100-Murcia

El género *Agrobacterium* ha sido extensamente utilizado como vector para la transformación genética de plantas. Sin embargo, para que la transformación tenga éxito, la bacteria debe ser capaz de superar las barreras defensivas que pone en juego la planta en respuesta a la invasión. En la vid, dos de los principales componentes de la respuesta defensiva son, por una parte, la acumulación de fitoalexinas de naturaleza 4-hidroxiestilbénica y, por otra parte, toda una serie de reacciones mediadas por la peroxidasa. En el presente estudio se describe el efecto que la inoculación con *Agrobacterium rhizogenes* ejerce sobre los niveles de peroxidasa y 4-hidroxiestilbenos en dos especies del género *Vitis*, una *vinifera* ('Thompson Seedless') utilizada para la producción de uva de mesa y una *rupestris* ('De Lot') utilizada como portainjerto.

La infección de segmentos nodales de vid cultivados *in vitro* con *Agrobacterium* provoca la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad conocida como 'raíces en cabellera'. El análisis de los niveles de actividad peroxidasa en los explantes infectados de *V. rupestris* muestra que no hay variación en dichos niveles, independientemente del sustrato empleado en la determinación. En el caso de *V. vinifera*, la actividad peroxidasa aumenta significativamente respecto a los explantes no infectados. En cuanto a la población de isoenzimas de la peroxidasa, se observa que apenas hay diferencias entre los segmentos infectados y los controles en el caso del portainjerto, mientras que en los segmentos tratados de la variedad 'Thompson', aparecen una serie de nuevas isoenzimas de punto isoeléctrico cercano a la neutralidad respecto al control. El revelado de las isoenzimas con un 4-hidroxiestilbeno (resveratrol), mostró para ambas variedades que únicamente las isoenzimas de naturaleza básica fueron capaces de oxidar este compuesto.

Los niveles de *trans*-4-hidroxiestilbenos en segmentos nodales de las variedades estudiadas aumentaron después del tratamiento con la bacteria, aunque en el caso de *V. rupestris*, el aumento fue mayor en términos absolutos. El análisis por HPLC de los extractos metanólicos mostró que los principales *trans*-4-hidroxiestilbenos que se acumulaban en respuesta a la infección fueron el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) y la piceida (el 3-O- β -glucósido del resveratrol), encontrándose que estos compuestos se acumulaban en diferentes proporciones en función de la variedad estudiada. Así, en la variedad 'De Lot', aparecía mayoritariamente la piceida, mientras que en la variedad 'Thompson' las proporciones de piceida y resveratrol fueron muy similares.

Los resultados obtenidos sugieren que *Agrobacterium rhizogenes* es capaz de llevar a cabo con éxito la infección de la vid, aun cuando la planta exprese algunos de los componentes de la respuesta de defensa. Por esta razón, *Agrobacterium* puede ser considerado como un buen vector de transformación para la obtención de nuevas variedades de vid.

Efectos de la inoculación con 6 hongos de la micorriza arbuscular sobre el crecimiento y absorción de nutrientes de *Anthyllis cytisoides* L.

C. Robles^{1, 2}, I. Jiménez¹ y J.M. Barea¹

¹Dpto. Microbiología, Est. Exp. del Zaidín (CSIC), Prof. Albareda 1
18008 Granada, España

²Dpto. Rec. Naturales, CIIDIR-IPN-Un. OAXACA, Ap.Post. 674 Oaxaca,
Oax. 68000 México

La albaida (*Anthyllis cytisoides* L.), leguminosa leñosa de distribución circunmediterránea, es una especie que ha sido propuesta como modelo en la revegetación para la protección y recuperación del suelo en áreas degradadas y con riesgo de desertificación (Salamanca, 1991; Requena et al., 1996). En esas condiciones, la pérdida de propágulos infectivos de hongos de la micorriza arbuscular (HMA), asociación que es necesaria para la sobrevivencia y crecimiento de la planta, hace pensar en la necesidad de aumentar su densidad y eficiencia por medio de la práctica de la inoculación. En este trabajo se ensayó la respuesta de la planta a la inoculación con 6 especies de HMA, creciendo en un suelo degradado.

El experimento combinó los factores tratamiento del suelo y especies de HMA bajo un diseño en bloques aleatorizados completos con 5 repeticiones. El suelo utilizado como sustrato es un Regosol Eutrítico (Requena, 1996) proveniente de la Sierra de los Filabres, Almería. Su análisis reportó contenidos muy bajos de materia orgánica, nitrógeno total y fósforo extraíble (Olsen). Su textura es arenosa y el valor del pH muy alcalino. La mitad de la muestra del suelo se sometió a esterilización por exposición a vapor fluyente por una hora durante 3 días consecutivos. El resto permaneció sin esterilizar. Las especies de HMA utilizadas fueron: *Glomus mosseae*, *G. microaggregatum*, *G. fasciculatum*, *G. etunicatum*, *G. deserticola* y *A. longula*. Se incluyó un tratamiento control sin inocular. El inóculo aplicado consistió en una mezcla de suelo, raíces infectadas, esporas e hifas. La dosis utilizada fue de 10 g por maceta con 1000 g de sustrato. Las semillas de albaida se escarificaron por un proceso mecánico para eliminar la testa y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico antes de la siembra. La cosecha se efectuó después de 6 meses de crecimiento, registrando como variables de respuesta: altura de la planta, número de ramas, pesos fresco y seco de las partes aérea y radical, % de raíz micorrizada, % de N y P en la parte aérea, y N y P absorbidos y acumulados en la parte aérea. El análisis estadístico de los datos incluyó un análisis de la varianza y prueba de separación de medias usando la DMS ($p < 0.05$).

El tratamiento del suelo no resultó determinante en la respuesta de la planta, excepto para la variable % de raíz micorrizada. El factor especie de HMA influyó en las variables altura, producción de biomasa aérea y radical, y N y P acumulados en la parte aérea, aunque esta respuesta estuvo en todos los casos condicionada a su interacción con el tratamiento del suelo. Se observó una respuesta positiva de la planta a la inoculación con las especies *G. microaggregatum*, *A. longula* y *G. fasciculatum*, al incrementar significativa-

mente el valor de sus parámetros de crecimiento y nutrición comparados con el control sin inocular, aunque esto ocurrió solamente en el suelo estéril. En el suelo sin esterilizar no se observó esta respuesta positiva a la inoculación con las diferentes especies de HMA. Este comportamiento lo habían reportado Díaz y Honrubia (1996), mencionando como posibles causas de esta falta de respuesta la actividad de la microflora nativa y su competencia con los hongos introducidos por agua, nutrientes y nicho ecológico.

Díaz, G. and M. Honrubia. 1995. *Biol. Plant.* 37:121-129

Requena, N. 1996. Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias. Univ. de Granada

Requena, N., I. Jiménez y J.M. Barea. 1996. In: C. Azcón-Aguilar and J.M. Barea eds. *Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development*. European Commission, Brussels.

Salamanca, P. 1991. Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias. Univ. de Granada

Inhibición de la nodulación en la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja por el herbicida glifosato

A. Hernández, J.I. García-Plazaola, L. Lángara, U. Artetxe y J.M. Becerril

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco,

Aptdo 644, 48080-Bilbao

El glifosato es un herbicida de amplio espectro con gran potencialidad futura para ser empleado en programas de obtención de plantas transgénicas resistentes a este herbicida. A pesar de conocerse muy bien su modo de acción sobre las plantas, sus efectos indirectos sobre otros organismos o procesos biológicos no son bien conocidos. Nosotros determinamos el efecto de este herbicida sobre la capacidad nodulante de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum*. Asimismo determinamos que parte del proceso de infección y desarrollo nodular resulta más sensible a la acción del herbicida. Para ello plantas de soja (*Glycine max* cv. "fiorir") y/o cultivos de *B. japonicum* fueron incubados con varias dosis subletales de glifosato a diferentes tiempos y estadios de inoculación para determinar su efecto sobre el macro y microsimbionte, así como diversos parámetros nodulares.

El tratamiento previo con el herbicida de células libres *B. japonicum* no tiene ningún efecto deletéreo sobre la capacidad infectiva de la bacteria, incluso a concentraciones tan altas como 1 mM. Sin embargo el propio establecimiento de la simbiosis se vio afectado a dosis tan bajas como 25 μ M de glifosato en el medio de inoculación. El análisis de esta inhibición indicó que la iniciación nodular fue el proceso más sensible, aunque también el posterior desarrollo del nódulo fue afectado. Este daño estaba más relacionado con la toxicidad al herbicida del macro que del microsimbionte. Cuando las plantas simbióticas tratadas con el herbicida durante el proceso de infección fueron devueltas a un medio libre del herbicida para completar su crecimiento, se produjo un fenómeno de autocompensación de la biomasa nodular de forma que estas plantas a pesar de poseer un menor número de nódulos por planta, el peso de cada nódulo en estas plantas fue significativamente mayor que el de los controles. La inhibición de la EPSPsintasa por el glifosato bloquea la producción de aminoácidos aromáticos esenciales y compuestos fenólicos tanto en planta como en microorganismos simbióticos. Sin embargo la inhibición de la infección y desarrollo nodular provocado por el glifosato no está causado por un déficit de estos compuestos.

Desarrollo de la nodulación en plantas de alfalfa tratadas con nitrato

F. Ligeró, L. Recalde y J.M. Caba

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,

Universidad de Granada

La inhibición de la nodulación por el nitrato es un fenómeno común entre las leguminosas, aunque con considerables variaciones en la magnitud de la respuesta incluso entre cultivares de una misma especie. El efecto del nitrato es rápido, hasta un 70% de inhibición en las primeras 18 h tras la inoculación, interfiriendo con la división celular en el córtex y la formación del cordón de infección (4). El nitrato incrementa la liberación de etileno en raíces de alfalfa y soja y la inhibición de la biosíntesis y/o acción del etileno en estas plantas disminuyó considerablemente el efecto inhibitorio del nitrato (1, 2, 3, Ligeró *et al.* 1997, enviado). Por ello pensamos que dicho efecto puede estar mediado por el etileno. Sin embargo, aún se desconoce la efectividad (en términos de tiempo) del nitrato para incrementar la producción de etileno en la raíz.

En el presente trabajo se compara la respuesta al nitrato de la nodulación y la biosíntesis de etileno en raíces de alfalfa. La aplicación de KNO_3 (10 mM) desde el inicio del cultivo de las plantas o bien en el momento de la inoculación inhibió la nodulación con igual intensidad (50%) respecto al control. Retrasando la aplicación del nitrato 24 h respecto de la inoculación, se obtuvo una fuerte disminución de la inhibición. En este mismo período de tiempo, el nitrato aplicado en la inoculación incrementó la producción de etileno de la raíz un 55% respecto al control. Se pone de manifiesto por tanto un estrecho paralelismo entre la inhibición de la nodulación y la estimulación de la biosíntesis de etileno en respuesta al nitrato en raíces de alfalfa. Por otra parte, el tratamiento con Ag^+ (10 μM), inhibidor de la acción del etileno, en la inoculación eliminó parcialmente el efecto del nitrato, mientras que retrasando su aplicación 48 h no se obtiene efecto alguno. Estos resultados constituyen un nuevo apoyo a la implicación del etileno endógeno en la inhibición de la nodulación por el nitrato.

1. Ligeró *et al.* (1986), *J. Plant Physiol.* **125**: 361-365.

2. Ligeró *et al.* (1987), *J. Plant Physiol.* **129**: 461-467.

3. Ligeró *et al.* (1991), *Plant Physiol.* **97**: 1221-1225.

4. Malik *et al.* (1987), *Plant Physiol.* **84**: 266-271.

Niveles de fitohormonas en raíces de soja: respuesta a la inoculación y al nitrato

J.M. Caba¹, M.L. Centeno², B. Fernández² y F. Ligeró¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,
Universidad de Granada

²Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,
Universidad de Oviedo

La nodulación de las leguminosas es un proceso regulado principalmente por la planta. Ésta controla la forma de los nódulos radicales y mediante un mecanismo denominado de autorregulación, también su número. Se han obtenido mutantes en diversas leguminosas carentes de la señal autorreguladora, por lo que nodulan profusamente, incluso en presencia de nitrato (mutantes nts). Esto sugiere una conexión entre regulación interna y externa de la nodulación. Como en otros procesos morfogénéticos, en el desarrollo de los nódulos radicales deben estar implicadas las fitohormonas.

En este trabajo se estudian las variaciones en el contenido de diferentes citoquininas, ácido indol-3-acético y ácido abscísico en raíces de soja cv. Bragg y del mutante supernodulante nts382 en respuesta a la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y al tratamiento con nitrato. Las plantas crecieron en cámara de ambiente controlado utilizando tubos de ensayo que contenían vermiculita y solución nutritiva. Se emplearon dos tratamientos de NO_3^- , 1 y 8 mM, considerados como no inhibidor e inhibidor de la nodulación respectivamente. Diez días después de la siembra, las plantas fueron inoculadas con *B. japonicum* USDA110 y 48 h más tarde se tomaron muestras de raíz, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas. Plantas no inoculadas de ambos tratamientos y genotipos sirvieron como control. Los reguladores fueron determinados, tras su extracción e inmunopurificación, mediante ELISA (citoquininas y AIA) o RIA (ABA).

El contenido de citoquininas en raíz varió notablemente en respuesta a la inoculación y sobre todo en función del genotipo de la planta. El mutante nts382 presentó mayor contenido de todas las citoquininas analizadas que Bragg (desde un 30% más en iPA hasta un 200% en DHZR). El efecto de la inoculación fue leve en las citoquininas tipo zeatina, mientras que en las tipo isopentenil (iP e IPA) su contenido incrementó como media un 100% 48 h después de la inoculación con *Bradyrhizobium*. Sin embargo y a pesar de este patrón general, hay que destacar diferencias notables en esta respuesta debidas al genotipo y al tratamiento con nitrato. Así, en el parental Bragg el efecto de la inoculación fue mucho más patente cuando las plantas crecieron con bajo nivel de NO_3^- en el medio (1 mM), mientras que en nts382 la respuesta fue similar con ambos niveles de NO_3^- .

En cuanto al contenido de AIA libre, las diferencias entre genotipos fueron menos acusadas, siendo menores los valores detectados en el mutante nts382, que por otra parte es menos sensible a la aplicación exógena de auxina. En cambio, el efecto del nitrato fue mucho más patente, ya que las plantas tratadas con 8 mM presentaron por término medio un contenido tres veces menor que las tratadas con 1 mM. Estos resultados y los anteriores

se vieron también reflejados en el balance AIA/Citoquininas, mayor en plantas de Bragg y con bajo nivel de nitrato.

Por último, las menores respuestas se encontraron en los niveles de ABA, aunque de nuevo con diferencias entre Bragg y nts382 (en el mutante se detectó un 40% menos de abscísico).

Los resultados indican por tanto diferencias notables en los balances hormonales (sobre todo AIA/Citoquininas) entre Bragg y el mutante supernodulante nts382, así como en sus respuestas a la inoculación y el nitrato. El mutante nts382 (carente de autorregulación) presentó un mayor contenido de citoquininas que Bragg y por otra parte el nivel de nitrato empleado (inhibidor de la nodulación) alteró el balance en ambos genotipos por una disminución del contenido en auxina.

Efecto de cambios del oxígeno rizosférico sobre el funcionamiento de nódulos de *Lupinus albus* L. mecanismos adaptativos

L. M. Guasch, M. Fernández Pascual y M.R. de Felipe

Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C., Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid

Se han aplicado diferentes concentraciones de O_2 a sistemas radiculares de plantas de *Lupinus albus* L. y se ha estudiado su efecto sobre crecimiento, actividad nitrogenasa, respiración radicular, contenido de glicoproteína, estructura y ultraestructura nodular, así como sobre la expresión del gen *Lenod2*. Con 1% de O_2 la actividad nitrogenasa fue medida mediante los sistemas convencional y de flujo continuo tras 1, 3 y 10 días de tratamiento. Después de 1 día de tratamiento, en el primero de los casos no se observaron diferencias con el control, mientras que en el segundo la actividad nitrogenasa era indetectable; incrementando la concentración de O_2 desde el 1% inicial, la actividad nitrogenasa recuperaba valores similares al control a partir del 10% de O_2 . Sin embargo después de 3 días de tratamiento con 1% de oxígeno, la inhibición producida sólo se recuperaba parcialmente al incrementar la cantidad de oxígeno; con el sistema convencional también se observa cierto descenso de la actividad nitrogenasa. Transcurridos 10 días la pérdida de actividad era total e irreversible.

Análisis paralelos llevados a cabo con plantas sometidas a 40% de O_2 , mostraron una pequeña bajada de la actividad nitrogenasa durante los 3 primeros días, para equilibrarse con el control transcurridos 10 días. En estos casos se produce un incremento en la resistencia a la difusión de O_2 . El sistema convencional también se mostró ineficaz para detectar cambios en estas condiciones.

El contenido de glicoproteína también varía gradualmente. En el caso del 1% disminuye, siendo este descenso más acusado a los 10 días. Con 40% hay un aumento inicial que todavía se observa a los 3 días, pero a los 10 días el contenido de glicoproteína no difiere del control. Mediante inmunolocalización se observa inicialmente un aumento de la oclusión de los espacios intercelulares de la corteza media por esta glicoproteína con el incremento de la concentración de O_2 , confirmando los datos anteriores.

A nivel ultraestructural, comienzan a detectarse cambios a los 3 días. En el 1% se observaron serias alteraciones de los bacteroides, lo que explica la pérdida de actividad nitrogenasa antes mencionada. Con 40% O_2 empiezan a detectarse aumentos en el tamaño de los bacteroides. Después de 10 días de aplicación del 40% de oxígeno el aumento del tamaño de los bacteroides es notable (x 1.4) y se produce un incremento considerable de los gránulos de polihidroxibutirato.

Asimismo se ha analizado el nivel de expresión del gen *Lenod2*. Este gen codifica para una proteína rica en hidroxiprolina, se expresa en la misma zona que la glicoproteína y también se le supone implicado en la difusión de oxígeno dentro del nódulo. Se ha observado un acusado descenso en el 1% de oxígeno en 3 y 10 días mientras que con 40% no se observan diferencias significativas. Esto parece indicar que siguen un patrón de expresión

similar a la glicoproteína, si bien los cambios son algo más tempranos lo que es lógico al tratarse de un mRNA.

En conclusión, con este trabajo se ha visto la necesidad del uso del sistema de flujo continuo para detectar cambios de la actividad nitrogenasa *in vivo* cuando se aplican distintas concentraciones de O_2 , siendo el sistema convencional capaz sólo de detectar cambios irreversibles. Por otro lado se ha puesto de manifiesto la capacidad de regulación del nódulo frente a cambios en la concentración de O_2 de la rizosfera, mediante mecanismos fisiológicos a los que suceden progresivamente alteraciones morfológicas.

Senescencia natural e inducida por oscuridad en nódulos de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa

M.J. Hernández, M. M. Lucas y M. R. De Felipe

Departamento de Fisiología Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C.,
Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid

La fijación de N_2 en leguminosas desciende cuando los nódulos radiculares senescen, habiéndose relacionado la pérdida de actividad nodular con un incremento en la tasa de producción de especies activas de oxígeno y cambios en los mecanismos de defensa antioxidante. En nódulos de lupino se han estudiado los procesos de senescencia natural y senescencia inducida por oscuridad, determinando cambios fisiológicos, bioquímicos, ultraestructurales e inmunoquímicos. Los resultados sugieren similitud en ambos procesos.

En plantas de lupino sometidas a 4 días de oscuridad, la actividad nitrogenasa se inhibió totalmente. En estadios de senescencia natural (9 semanas) e inducida por oscuridad (4 y 7 días), se observó disminución del contenido total de proteínas nodulares y variaciones en el patrón electroforético. Se produjo un descenso importante de leghemoglobina (Lb), disminución de un polipéptido de peso molecular superior a 92 kDa, y aumento de un polipéptido de 16 kDa, que reaccionó con un anticuerpo obtenido frente a la subunidad de 16 kDa de Cu/Zn-SOD de raíces de lupino. En nódulos de plantas sometidas a 7 d de oscuridad se detectó sobreexpresión de un polipéptido de 24 kDa, que fue reconocido por un anticuerpo anti-fitoferritina. Este anticuerpo también identificó dos polipéptidos de 26 y 28 kDa, que aumentaron en senescencia natural. El descenso de Lb en los nódulos coincidió con el aumento de fitoferritina, proteína almacenadora de Fe, que podría captar los iones Fe liberados en el proceso de degradación de la Lb.

El tratamiento con 7 d de oscuridad indujo un incremento del 80% en la actividad total superóxidodismutasa, semejante al observado en nódulos de plantas de 9 semanas respecto a los nódulos de plantas de 5 semanas. Los niveles de enzima ascorbato-peroxidasa aumentaron con la oscuridad y con la edad de la planta; en cambio descendió la actividad catalasa.

Respecto al daño oxidativo a biomoléculas, se detectó un aumento de proteínas oxidadas, mediante la determinación de grupos carbonilo, a los 7 d de oscuridad y en plantas de 9 semanas. Este aumento está correlacionado con un fuerte descenso del contenido de proteínas totales, debido probablemente a que la susceptibilidad a la degradación proteolítica aumenta en las proteínas modificadas oxidativamente. En cambio, no se detectaron cambios en el contenido de peróxidos de lípidos, mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) por HPLC.

Los tratamientos de oscuridad produjeron alteraciones en la ultraestructura nodular semejantes a las observadas en senescencia natural. En los nódulos de plantas tratadas con 4 d de oscuridad se observó degradación del citosol de los bacteroides, y en estadios más avanzados de senescencia (7 d oscuridad y plantas de 9 semanas), desintegración de la membrana peribacteroidal y del citoplasma de la célula vegetal. En la pared celular de los

bacteroides se detectaron cambios inmunoquímicos, consistentes en la sobreexpresión del epitopo proteico reconocido por el anticuerpo monoclonal 133.95 tanto en senescencia natural, como en los tratamientos de oscuridad.

En conclusión, el aumento de las actividades superóxidodismutasas y ascorbatoperoxidasa detectado en los tratamientos de oscuridad y en senescencia natural, no controlaron suficientemente las especies tóxicas de oxígeno, ya que se produjo daño celular, observándose serias alteraciones ultraestructurales, oxidación y degradación de proteínas y descenso en el contenido de leghemoglobina.

Efecto de diferentes presiones de oxígeno rizosféricas sobre los componentes de pared de los bacteroides en nódulos de *Lupinus albus* L.

M.M.Lucas, L.M. Guasch, M. Fernández-Pascual, N.J. Brewin*
y M.R. de Felipe

Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales,
C.S.I.C., Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid

*Department of Genetics, John Innes Institute, Colney Lane, Norwich, U.K.

En la zona infectada de los nódulos de leguminosas, los niveles de oxígeno deben estar regulados para permitir, por una parte la respiración de los simbiositos y por otra, el proceso de fijación de nitrógeno, que es altamente sensible a oxígeno.

Con objeto de estudiar el control de la difusión de oxígeno en las células infectadas, se ha determinado el efecto de concentraciones de oxígeno sub- y supra-atmosféricas sobre la pared celular de los bacteroides. Para ello se han empleado nódulos de *Bradyrhizobium* de plantas de *Lupinus albus* L., de 42 días, cuyas raíces se sometieron a las diferentes presiones de oxígeno (1, 21 y 40%) durante 1, 3 y 10 días. A partir de suspensiones de bacterias en vida libre y de bacteroides aislados en los diferentes tratamientos de oxígeno, se obtuvieron tres anticuerpos monoclonales (340.21, 72.30, 133.95), que han sido utilizados, en este estudio, para determinar cambios inmunoquímicos en dos componentes, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, de la pared celular bacteriana, empleando las técnicas de dot immunoassay, TDOC-PAGE, tinción con plata, y western blot para LPS, SDS-PAGE y SDS.urea-PAGE para proteínas e inmunocitoquímica para microscopía óptica y electrónica de transmisión.

El epitopo 340.21 se expresó en bacterias en vida libre y en bacteroides procedentes de todos los tratamientos. Dicho epitopo se encuentra en todas las bandas que constituyen el patrón de lipopolisacáridos. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal 72.30 sólo reaccionó (dot assay) con bacterias en vida libre y con bacteroides, aislados de nódulos grandes, procedentes del tratamiento de 10 días de oxígeno sub-atmosférico. El epitopo 72.30 se localizó en una única banda de LPS, de baja movilidad electroforética. Por otra parte, el anticuerpo 133.95 reaccionó ligeramente con bacterias en vida libre, y sólo se observaron reacciones traça con bacteroides, de nódulos control (21%). Una sobreexpresión de este epitopo se produjo en bacteroides aislados de nódulos grandes que han sido sometidos a presiones no atmosféricas de oxígeno. El epitopo 133.95 es sensible a temperatura y a proteinasa K.

El epitopo 340.21 se inmunolocalizó en la pared de los bacteroides estudiados, observándose una expresión radial del mismo, dentro del nódulo.

La concentración sub-atmosférica de oxígeno (1%) produjo importantes alteraciones en la ultraestructura de los simbiosomas, consistentes en la desaparición de la membrana peribacteroidal y una gran densidad electrónica del citosol de los bacteroides, que con frecuencia presentaban formas alteradas. El epitopo 72.30 se encontró asociado a la pared bacteroidal, pero también se observó una profusa localización en el citosol de algunos bacteroides.

En el tratamiento del 40 % de oxígeno los simbiosomas mantuvieron la membrana peribacteroidal, pero los bacteroides presentaban alteraciones. Estos, de mayor tamaño que los controles, poseían un elevado contenido de polihidroxibutirato. Además se observó mayor número de bacteroides por simbiosoma, que podría ser consecuencia de una fusión de las membranas peribacteroidales de varios simbiosomas o de la pérdida de sincronía en la división de los mismos. El inmunomarcado con 72.30 y 340.21 fue semejante al observado en los nódulos control, y la alteración de las cubiertas celulares se tradujo en una sobreexpresión del epítipo 133.95 inmunolocalizado en la pared bacteroidal.

Efecto de la salinidad en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con cepas isogénicas de *Rhizobium* sp. tolerantes y no tolerantes

C. Lluch¹, D. Zúñiga¹, A. Ocaña¹ y J. Sanjuan²

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada,

Campus de Fuentenueva s/n, 18071 - Granada

²Departamento de Microbiología, Estación Experimental del Zaidín,
CSIC, Granada

Las judías son consideradas como leguminosas-grano sensibles a la sal (Delgado *et al.*, 1994) en comparación a otros cultivos de leguminosas. Los problemas asociados con la salinidad en esta especie son generalmente más dramáticos en regiones áridas con irrigación. El efecto inmediato del exceso de la salinidad viene condicionado por la disminución o detención del crecimiento, especialmente reducción del área foliar y necrosis en el borde de las hojas. Esto puede reflejar la coexistencia de tres procesos: la sequedad fisiológica, debido a un potencial osmótico muy negativo (concentración alta de solutos), el desequilibrio de nutrientes producido por elevadas concentraciones de elementos específicos, especialmente sodio, y el efecto tóxico de ciertos elementos, en particular cloro y sodio. Las distintas especies de *Rhizobium* muestran una marcada variación en su tolerancia a la salinidad: algunas son inhibidas con 100 mM NaCl mientras que Nair *et al.* (1993) aislaron cepas capaces de crecer hasta con 1.88 M NaCl. Generalmente los rizobios son más tolerantes al estrés osmótico que sus leguminosas hospedadoras.

En este experimento se ha estudiado el efecto de la aplicación de diversas dosis de NaCl desde el inicio del cultivo sobre el crecimiento, la fijación de nitrógeno, el metabolismo carbonado de los nódulos y el contenido de osmolitos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Contender inoculadas con *Rhizobium* 9A y tres cepas isogénicas tolerantes a la sal, tratadas con tres niveles de NaCl. Las mutantes se obtuvieron por conjugación de la cepa de *Rhizobium* 9A con *E. coli* S17 que porta el vector suicida pSUP-2021. Posteriores estudios de hibridación de ADN genómico de la cepa 9A y de sus mutantes, digerido con Eco RI, con ADN del transposón Tn5, demostraron que la mutación original sigue presente en todas las cepas.

La inhibición del crecimiento por la sal es más acentuada en parte aérea que en raíz. Las plantas inoculadas con las cepas mutantes presentan una relación R/PA más pequeña que con la silvestre. De estos datos se deduce que una relación de 0.33 o incluso inferior indica cierta tolerancia a la salinidad. La sal inhibe la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH), aún cuando Delgado *et al.* (1993) describen el efecto contrario en *Pisum sativum*. Los nódulos formados por las cepas mutantes mostraron mayor actividad PEPC que los de la silvestre en el control. Las simbiosis formadas por las cepas mutantes, responden mejor a la sal acumulando mayor cantidad de azúcares totales solubles (AST) en hojas. El incremento de los AST en semillas de *Cicer arietinum* con-

tribuye a una efectiva osmorregulación en condiciones de estrés salino (Gupta *et al.*, 1993). Este proceso puede ser importante en el crecimiento vegetativo que es cuando se acumulan más osmolitos en las plantas inoculadas con las mutantes, coincidiendo con el mayor contenido de clorofila que muestran estas plantas en condiciones de salinidad.

-
- Delgado M.J., Garrido J.M., Ligeró F. y Lluch C. (1993) *Physiol. Plant.* **89**: 824-829.
Delgado M.J., Ligeró F. y Lluch C. (1994) *Soil Biol. Biochem.* **26**: 371-376.
Gupta A.K., Singh J., Kaur N. y Singh R. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 369-378.
Nair S., Jha P.K. y Babu C.R. (1993) *Microbios* **74**: 39-51.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PB95-1159 y INCO950717.

Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de hongos patógenos del pimiento (*Capsicum annuum* L.)

M.C. Prego, J. Díaz, M.A. Bernal y F. Merino

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Universidade da Coruña,
Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña

Una de las enfermedades que produce mayores pérdidas en los cultivos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) es la llamada "tristeza", de la que los hongos *Verticillium dahliae* y *Phytophthora capsici* son los principales agentes causales.

El contenido en determinadas fungitoxinas de naturaleza fenólica podría estar relacionado con el grado de resistencia que muestran algunas variedades de pimiento (Candela *et al.*, 1995). Algunos de esos compuestos fenólicos simples con actividad fungitóxicas detectados en otras variedades también aparecen en el pimiento de Padrón. En concreto, los compuestos fenólicos solubles mayoritarios en las plántulas de esta variedad son el ácido clorogénico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, presentes todos ellos en raíces, hipocotilo y hojas (Díaz *et al.*, 1997). Por ello, se ensayaron esos tres compuestos fenólicos principales sobre los hongos patógenos antes citados.

Para determinar el efecto de los diferentes compuestos sobre el crecimiento de los hongos *Verticillium dahliae* y *Phytophthora capsici*, se utilizaron placas con medio PDA suplementado con cada compuesto a las que se transfirieron fragmentos de 3 mm de diámetro de un cultivo del hongo correspondiente. Periodicamente se midió el crecimiento en diámetro de cada colonia, durante un periodo de 7 días en el caso de *Phytophthora* y de 20 días en el de *Verticillium*. Se ensayaron diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos. El grado de inhibición causado por cada concentración de compuesto fenólico fue determinado por comparación con un control.

Aunque todos los compuestos ensayados produjeron inhibición en alguna medida, el ácido clorogénico resultó ser el menos eficaz para controlar el crecimiento de ambos hongos. Los ácidos cafeico y ferúlico inhibieron moderadamente el crecimiento de *Verticillium* a concentraciones relativamente altas, mientras que en el caso de *Phytophthora* los efectos fueron más pronunciados, llegando a inhibir casi totalmente su crecimiento a una concentración 5 mM. Queda por determinar si estas sustancias causan un mayor mismo efecto inhibitorio sobre esporas, y si sus concentraciones se incrementan en la planta en respuesta a la infección.

Candela, M.E., Alcázar, M.D., Espín, A., Egea, C. & Almela, L. 1995. Plant Pathol. 44: 116-123.
Díaz, J., Ros Barceló, A. and Merino de Cáceres, F. 1997. New Phytol. 136 (en prensa).

Inducción de la respuesta de virulencia en *Agrobacterium tumefaciens* por tejidos embrionarios de *Pinus pinea* L.

J. M. Humara, M. López y R. J. Ordás

Dept. Biología de Organismos y Sistemas, Unidad de Fisiología Vegetal, Ftad. Biología,
C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, Universidad de Oviedo:
e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias-CNB
(CSIC), 33071 Oviedo, Asturias

La baja eficiencia de transformación génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* encontrada en cotiledones de embriones maduros de *Pinus pinea*, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que hubiera una inadecuada o escasa activación de los genes *vir* de la bacteria, o bien presencia de sustancias bactericidas o bacteriostáticas en los tejidos del pino.

Con el objeto de responder a estas cuestiones se realizó un estudio utilizando 6 construcciones que contienen el gen delator de la β -galactosidasa (*lac Z*) fusionado con los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* y *virG* individualmente (Stachel et al., 1985).

Para el estudio del crecimiento de la bacteria se utilizaron extractos y exudados de embriones de *P. pinea*, extraídos de semillas maduras esterilizadas e imbibidas en agua destilada durante 48 h. Los extractos y exudados se prepararon a partir de cotiledones y embriones de pino, en una proporción de 0,6 g de peso fresco por 10 ml de medio AB (Chilton et al. 1974) pH 5,8. Como control se utilizaron exudados de hojas de *Solanum tuberosum* obtenidas a partir de material cultivado *in vitro* (30 hojas por cada 10 ml de medio).

Los estudios del crecimiento se realizaron inoculando con el *A. tumefaciens* A348 pSM 202, 5 ml de extractos y exudados de cotiledones y embriones de pino, así como de exudados de patata y medio AB glucosa-sacarosa (0.5 %) pH 5.8 (con y sin acetosiringona 100 μ M). La densidad óptica a 600 nm se midió a las 0, 12, 16, 20, 24 y 36 horas. Los mayores crecimientos se observan en los extractos y exudados de pino, y en los exudados de patata, siendo menores en el medio AB (tanto con como sin acetosiringona). Estos datos indican que no hay sustancias ni bactericidas ni bacteriostáticas en los tejidos ensayados.

El estudio de los niveles de inducción de los genes *vir* se realizó según el protocolo de Usami et al. (1988). Para ello se utilizaron exudados de cotiledones y embriones de pino, empleando como controles el medio AB glucosa-sacarosa (0.5 %) pH 5.8 con y sin acetosiringona 100 μ M, y exudados de hojas de patata. Los datos de actividad β -galactosidasa se analizaron estadísticamente con la ayuda del SPSS[®].

Los datos indican que existe inducción de los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD* y *virE*, en exudados de cotiledones y de embriones completos. Los exudados de *P. pinea* parecen no ser capaces de inducir el *virG* de manera apreciable, aunque debe de haber un cierto nivel de inducción, puesto que genes que como el *virD* dependen de su activación en el mecanismo de virulencia, son activados por los exudados del pino.

Stachel et al. (1985). EMBO J. 4: 891-898.

Usami et. al. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 3748-3752.

Financiación: DGCYT AG95.0960-C02-01, DF95-217-1. J.M. Humara, beca predoctoral del II Plan Regional del Principado de Asturias.

Estudio y caracterización de bacterias PGPR y DRB de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. caracterización y ensayos biológicos de los metabolitos activadores e inhibidores

F.J. Gutiérrez Mañero, J.A. Lucas García, N. Acero, B. Ramos, M^a.L. Barrientos y A. Probanza

Departamento de Biología, Sección de Biología Vegetal, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, 28660-Boadilla del Monte, Madrid

Los estudios de la interacción bidireccional planta-microorganismos a nivel rizosférico tienen un interés doble: primero porque la rizosfera es una zona de frontera o ecoclina con características diferentes a la raíz y al suelo libre, lo que determina drásticamente la fisiología de la planta. En segundo lugar el manejo de las poblaciones rizobacterianas puede permitir la optimización de la producción primaria por control de bacterias deletéreas (Deletereous Rhizobacteria, DRBs) o utilización de bacterias promotoras del crecimiento (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPRs). La coexistencia de DRBs y PGPRs en la rizosfera, puede parecer una paradoja. Sin embargo este hecho ha de responder a una coevolución planta-bacteria que haya dado lugar a procesos mutualistas (PGPRs) o neutralistas, que eventualmente hayan derivado a cierto parasitismo (DRBs), si bien en equilibrio poblacional pueden actuar como "controladoras" de fitopatógenos. La introducción de PGPRs en sistemas agroforestales se perfila como una tecnología económica y limpia para incrementar la producción primaria: primero por la reducción del uso de fertilizantes y segundo por ser un sistema autosostenido en el tiempo.

En el presente trabajo se aborda en dos fases experimentales el estudio de las DRBs y PGPRs asociadas a la rizosfera del Aliso, *Alnus glutinosa*, planta utilizada como planta nodriza en explotaciones forestales así como por sus características de planta leñosa pionera.

En la primera fase se trabajó con 27 cepas (7 de *Pseudomonas* y 20 de *Bacillus*) seleccionadas como mayoritarias de un total de 600 cepas muestreadas estacionalmente en un bosque de alisos situado en San Martín de Valdeiglesias (Madrid). Los medios de crecimiento bacteriano libres de células (MBLC) se ensayaron sobre plantas de aliso noduladas (PN) o no noduladas (PNN) crecidas en vermiculita. Estas plantas procedían de semillas homogéneas genéticamente como mostraron los análisis de proteínas de reserva analizadas por SDS-PAGE. Tras 25 días se estudiaron en las plantas su contenido en nitrógeno (NT) superficie aérea (SA) longitud aérea (LA), superficie radical (SR) y longitud radical (LR) así como ARA y producción de CO₂ en PN. Con los resultados obtenidos se efectuó un análisis de componentes principales en el que se discriminaron tres grupos entre las 27 cepas: 3 cepas de *Bacillus* PGPRs, (incrementan hasta un 163% AS y un 182% AL respecto al control), 7 cepas de *Pseudomonas* DRB y un tercer grupo sin diferencias respecto al control. Mediante RAPDs-PCR se identificaron las cepas PGPR como *B. licheniformis* (cepas B3 y B21) y *B. pumilus* (cepa B12). Las 7 DRB se identificaron mostraron iguales patrones de bandas, identificándose como *P. fluorescens* bv II.

En la segunda fase del experimento se identificaron los metabolitos responsables. Las 7 cepas DRB son productoras de CNH en concentraciones que varían entre 1.6 y 2.4 mg/L, tal como se detectó por los métodos de Alstrom (1987) y Dartnall y Burns (1987). Mediante ensayos biológicos sobre PN y PNN análogos a los descritos previamente, el efecto detectado con el MBLC se mimetiza con CNK disuelto en medio estéril en concentraciones análogas.

Las 3 cepas PGPR producen compuestos auxínicos con espectros de absorción diferentes del triptófano y otros 6 compuestos indólicos usados como patrones, en concentraciones en torno a 1.8 mg/L, tal y como se detectó por TLC y HRGC. El ensayo biológico efectuado mostró que el efecto se podía mimetizar con concentraciones en torno a 1.8 mg/l de ácido indolacético. Actualmente está en fase experimental el estudio de otros metabolitos de las PGPRs tales como GAs (de las que producen GA4, GA20 y GA3 en cantidades de mg/L, tal y como reflejan los análisis por HRGC-MS) y los ensayos de inoculación directa en condiciones de invernadero para establecer la supervivencia del inóculo y el efecto biológico sobre el aliso. Así mismo se están simultaneando con inoculaciones en otras especies de interés agrícola (*Vicia villosa*, *Lupinus luteus* y *L.albus*) y silvícola (*Pinus pinea* y *Quercus ilex ssp ballota*).

Caracterización de una genoteca realizada a partir de ADNc de nódulos tardíos de *Lupinus albus*

I. Solís Martel, J.M. Peregrín Alvarez y M.A. Chamber Pérez

C.I.F.A. "Las Torres", Dpto. Fijación de Nitrógeno,

Apdo. Oficial, Alcalá del Río, 41200 Sevilla

Se ha realizado el clonaje de ADNc sintetizado a partir de ARN-poliadenilados extraídos de nódulos en plena actividad fijadora de N₂ de plantas de *Lupinus albus* cv. LA-26 con objeto de obtener clones de las principales nodulinas tardías. El clonaje se realizó en la díana Sma I del fagémido pBluescript SK+ II, y los clones que contenían plásmidos recombinantes fueron transferidos por duplicado a membranas de Nylon cargadas positivamente. Los clones con secuencias específicas para nódulos se seleccionaron por hibridación diferencial con sondas de ADNc de ARN-poliA de raíces y nódulos marcados con DIG-oxigenina.

De los 500 clones estudiados se han seleccionado un 15% aproximadamente, que en condiciones de alta restrictividad dieron señal positiva con la sonda de nódulos únicamente. A partir de estos clones se han purificado sus plásmidos correspondientes y se han liberado los insertos que contienen con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El tamaño de dichos insertos se ha determinado en electrofóresis en gel de agarosa del 1,2% y los geles se han transferido a membranas de Nylon para ser hibridados con sondas de clones de nodulinas tardías de otras leguminosas para la identificación de los clones homólogos.

Sección C7:

Metabolismo del nitrógeno

Regulación alostérica de la nitrato reductasa de hojas de cebada por G6P y Mg^{2+}

M. Boza¹, A. de Cires¹, A. de la Torre² y C. Lara¹

¹Dpto. de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

²Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla

La nitrato reductasa (NR) foliar de plantas superiores se inactiva in vivo de forma rápida y reversible en oscuridad o al inhibir la fijación de CO_2 en condiciones de iluminación. Los estudios realizados en espinaca ponen de manifiesto que el control de la actividad NR implica la fosforilación del enzima en el residuo de Ser543, localizado en el péptido de unión de los dominios estructurales que contienen al MoCo y al grupo hemo, respectivamente. Sin embargo, para producir la inactivación es necesaria además la unión, en presencia de Mg^{2+} , a una proteína inhibidora perteneciente a la superfamilia 14-3-3 (NIP), dando lugar al complejo NR-fosforilada/ Mg^{2+} /NIP, inactivo. Por otro lado, la reactivación cursaría a través de la defosforilación del enzima y/o la disociación del NIP. En cebada, no hay evidencias que indiquen la existencia de un mecanismo similar. Además, la inactivación in vivo por oscuridad de la NR es independiente de Mg^{2+} , aunque el enzima se inhibe in vitro en presencia de este ion.

Hasta el momento, la señal o señales que median la modulación de la actividad NR por luz o CO_2 permanecen sin determinar con claridad. Nuestro grupo ha puesto de manifiesto que la actividad NR se correlaciona con los niveles citoplasmáticos de hexosas 6-fosfato, concretamente de G6P que actúa como señal reguladora positiva, estableciendo un nexo regulador del metabolismo del carbono sobre la asimilación de nitrato. Además la G6P actúa in vitro protegiendo a la NR contra la inhibición por Mg^{2+} .

En este trabajo se han determinado los parámetros cinéticos de la NR en extractos crudos desalados de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad, y se ha analizado el mecanismo mediante el cual se produce el efecto inhibitor del Mg^{2+} , así como el de protección por G6P frente a esta inhibición. Los resultados ponen de manifiesto que, ambos efectores modifican los parámetros cinéticos del enzima, lo que sugiere una regulación alostérica que podría superponerse al mecanismo de modificación covalente.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PB94-1191-C02 de la DGIYT y por los grupos de investigación CVI-0149 y CVI-0134 del PAI (Junta de Andalucía). M.B. es becario de la Fundación Cámara de la USE.

Efecto de herbicidas de distinta naturaleza sobre el estado de activación de la nitrato reductasa en hojas de pepino (*Cucumis sativus* L.)

E. Agüera, P. de la Haba, A. González-Fontes, J.M. Maldonado

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, División de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba

Se ha estudiado el efecto de diferentes herbicidas sobre la fotosíntesis, actividad nitrato reductasa (NR) y contenido de nitrato y de carbohidratos en hojas de plantas de pepino. Para ello, plantas de 20 días cultivadas en medio sólido se trataron durante 48 horas con atrazina 50 μM , DCMU 50 μM y fenurón 50 μM , exponiéndolas, justamente antes de la recogida de muestras, a diferentes ciclos de luz/oscuridad. Como era de esperar, la fotosíntesis, medida como desprendimiento de oxígeno, se anuló en los tratamientos con herbicidas. La actividad NADH-NR (total) se ensayó en presencia y ausencia de Mg^{2+} 5 mM, determinándose a partir de dichos resultados el estado de activación de la enzima. En los tratamientos con herbicidas, la actividad NR (total) en presencia de Mg^{2+} se redujo, aproximadamente, en un 95% y en ausencia de Mg^{2+} en un 85%. Los estados de activación de la NR de plantas tratadas con atrazina y DCMU estuvieron en torno a un 15%, mientras que en el tratamiento con fenurón y en el control fueron del 30% y 75%, respectivamente. También se ensayaron las actividades diaforasa y terminal de la NR. Independientemente del tipo de herbicida, se observaron descensos aproximados en las actividades diaforasa y terminal del 40% y 90%, respectivamente, con relación al control. La actividad NR estuvo correlacionada con el contenido de NO_3^- en la hoja, siendo éste mayor conforme menor era el estado de activación de la NR. En cuanto al contenido de azúcares en las hojas, se observó en los tratamientos con herbicidas una considerable disminución en azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa). El contenido en almidón de las plantas tratadas con herbicidas también disminuyó notablemente, llegando a ser sólo del 5% respecto al control en el caso del tratamiento con fenurón.

Estas investigaciones han sido financiadas por la DGICYT (proyecto PB93-0718) y la Junta de Andalucía (grupo PAI CVI-0159).

Caracterización de mutantes afectados en la asimilación de amonio y aminoácidos en el alga *Chlamydomonas reinhardtii*

A.R. Franco, M. Pérez-Alegre y F.J. López-Siles

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto Andaluz de Biotecnología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba,
14004 Córdoba

El alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* representa un organismo modelo ideal para el estudio de la asimilación de nitrógeno. Esto se debe a que es un organismo haploide del que estirpes afectados tanto en mutaciones dominantes como recesivas pueden ser obtenidas con facilidad. Además, la mayor parte de los mutantes son espontáneos, surgen con una elevada frecuencia (aprox. 1×10^{-6} célula⁻¹), y se pueden caracterizar mediante cruces genéticos y la obtención de estirpes diploides estables.

Así, hemos obtenido mutantes resistentes a L-metionina-S-sulfoximina (MSX), un inhibidor irreversible de la actividad glutamina sintetasa (GS). El mutante ARF-1 mostró actividad GS resistente a MSX in vivo, aunque no in vitro, por lo que ni el consumo de amonio ni el crecimiento se vieron afectados en presencia de este inhibidor. Este mutante consumió MSX como única fuente de nitrógeno para el crecimiento. Este consumo tuvo lugar a través de la actividad L-aminoácido oxidasa (LAO) presente en el espacio periplásmico. Sugerimos que dicho mutante está afectado en el transporte de MSX. Otro mutante, denominado BC3, resultó tener alterada la actividad GS cloroplástica (GS2). Además de un mutante aislado en cebada, éste es el segundo mutante de este tipo jamás descrito. El mutante BC3 creció mal con amonio bajo todas las condiciones ensayadas, tanto en presencia como en ausencia de MSX. Este mutante asimiló amonio a una velocidad equivalente al 20% de la observada en la estirpe silvestre bajo las mismas condiciones, incluso en aquellas en las que se minimizó la fotorrespiración. Como consecuencia, el mutante BC3 acumuló grandes cantidades de almidón cuando creció en medios suplementados con amonio y un 5 % de CO₂. Estos resultados demuestran que, en *C. reinhardtii*, la GS2 es responsable del 80 % del consumo primario de amonio. Los cultivos del mutante BC3, cuando crecen en medios sólidos con amonio, presentaron una variegación sugerente de la implicación de transposones. Esta variegación fue consecuencia de una elevada reversión del mutante BC3, que rindió estirpes que tenían restaurada la actividad GS cloroplástica, no acumularon almidón, y mantuvieron una resistencia a MSX con las mismas características que el mutante ARF-1. Esto sugiere que el mutante BC3 está alterado en dos genes distintos, y que la resistencia a MSX no se debió a la presencia de una forma alterada de la GS2 resistente a MSX.

Además, se han caracterizado mutantes alterados en la capacidad de consumir aminoácidos como fuente de nitrógeno. Así, el mutante RP51 fue incapaz de consumir aminoácidos, y esto se debió a que tenía alterado el gen estructural LAO. Se muestran evidencias experimentales que sugieren que, de nuevo, un transposón causa dicha mutación. De hecho, el mutante RP51 fue capaz de revertir rindiendo colonias que crecieron con aminoá-

cidos y tenían completamente restaurada la actividad LAO. Otros mutantes, como RP2 y RP32, a diferencia de la estirpe silvestre, fueron capaces de consumir aminoácidos en ausencia de una fuente de carbono como el acetato. Además, el mutante RP2, fue capaz de consumir determinados aminoácidos, como glicina, que no son consumidos por la estirpe silvestre. Estirpes diploides obtenidas con el mutante RP2 no crecieron con glicina, lo que sugiere que este crecimiento con Gly no se debió a la presencia de una forma alterada de la LAO, ni a la sobreexpresión de dicha actividad.

Se han desarrollado estrategias que permitirán clonar los transposones implicados en estos mutantes, lo que podría permitir desarrollar un sistema de mutagénesis insercional en *C. reinhardtii*, en la que virtualmente cualquier gen afectado por estos transposones podría ser fácilmente clonado y caracterizado.

Caracterización de la familia de genes para la glutamina sintetasa de girasol

M. Montenegro, J.M. Maldonado y R. Pérez Vicente

Departamento de Biología Vegetal y Ecología, División de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071 - Córdoba

En las plantas superiores la glutamina sintetasa (GS, E.C. 6.1.3.2) aparece como diferentes isoformas codificadas por una familia de genes homólogos, cuya expresión es el principal mecanismo de control de la actividad GS.

Los datos en que se apoyan las afirmaciones anteriores provienen de estudios realizados en un buen número de especies de plantas, en su mayoría leguminosas, arroz, maíz y *Arabidopsis*. Muy poco es, en comparación, lo que se conoce de la GS de otras especies de no menor importancia agronómica como el trigo, la patata o el girasol. De ninguna de éstas últimas se ha establecido el número y tipo de genes que codifican sus isoformas GS, ni se ha estudiado la expresión de los mismos, lo que constituye un vacío considerable en la comprensión de su metabolismo del nitrógeno que no puede llenarse con resultados obtenidos en otras plantas.

Para caracterizar la familia de genes GS del girasol hemos aplicado un método de clonación rápido que consistió en amplificar simultáneamente los extremos 3' de los cDNA correspondientes a los distintos genes GS que se expresan en raíces y hojas mediante PCR con cebadores degenerados. Cada uno de los tipos de cDNA para GS amplificados se distinguió del resto por clonación en plásmido y análisis de restricción, y posteriormente se secuenció.

Con este método se han aislado siete tipos distintos de cDNA para la GS del girasol (cv. Peredovick) que muestran una elevada identidad de secuencia entre sí y con los cDNA para la GS de otras plantas. Cuatro de ellos, aislados mayoritariamente de raíz, codifican isoformas citosólicas y los tres restantes, aislados de hojas, isoformas cloroplásticas como se deduce de la presencia/ausencia de regiones específicas de isoforma. El examen de la secuencia de los tres cDNA que codifican isoformas cloroplásticas mostró que éstos son formas alélicas de un mismo gen, y que uno de ellos se originó por recombinación de los otros dos.

En conjunto, los resultados indican la existencia de una familia de genes GS en girasol con al menos cinco miembros, cuatro para isoformas citosólicas (*ggs1.1*, *ggs1.2*, *ggs1.3* y *ggs1.4*) y uno para la cloroplástica (*ggs2*).

A partir de los extremos 3' no traducidos de los cDNA se han obtenido sondas específicas para cada uno de los genes GS identificados. Con estas sondas se ha confirmado su presencia en el genoma de la variedad de donde fueron aislados y en el de la línea isogénica R-41 de girasol en la que se ha encontrado uno sólo de los alelos del gen para la GS cloroplástica.

Las sondas específicas de gen se utilizaron también para estudiar la expresión de los genes GS citosólicos en diferentes tejidos mediante análisis Northern del ARN aislado de hojas, raíces, inflorescencias y cotiledones jóvenes y senescentes. Los resultados revelaron diferentes patrones de expresión dependientes del tipo de gen lo que en general se acepta como indicativo de la existencia de diferentes misiones para cada gen GS. Sin embargo, la misión de algunos de ellos no parece ser vital para el desarrollo del girasol, ya que su expresión en R-41, una de las dos variedades ensayadas, fue indetectable.

Modulación de la actividad nitrato reductasa en raíces de pepino (*Cucumis sativus* L.)

L.B. Poblete, E. Agüera, J.M. Maldonado y P. de la Haba
Departamento de Biología Vegetal y Ecología, División de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba

Se ha estudiado si la actividad nitrato reductasa (NR) de raíces de plantas de pepino responde rápida y reversiblemente a los cambios de luz/oscuridad (45 min de luz/30 min oscuridad), tal como se ha demostrado que ocurre en hojas, especialmente cuando dicha actividad se ensaya en presencia de Mg^{2+} (Agüera et al., 1997). Las plantas crecieron durante 20 días en cultivos hidropónicos, determinándose la actividad NR en los 8 cm finales de la raíz, zona en la cual se comprobó que existía la máxima actividad. Cuando las plantas se sometieron a períodos largos de luz/oscuridad (16h luz/8h oscuridad) se observó un incremento de la actividad NR en la luz y una disminución en la oscuridad tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} , lo que puede atribuirse a un incremento de la síntesis de la enzima por la luz. Se investigó el efecto *in vivo* de diversos tratamientos -infiltración con N_2 u O_2 , o adición de manosa 50 mM o CCCP 10 μ M a los cultivos hidropónicos- que alteran los niveles de adenín nucleótidos en el tejido, sobre la activación/inactivación de la NR de la raíz. El tratamiento de las raíces con N_2 así como con manosa y CCCP originaron valores de actividad NR superiores a los observados en el control (aire), únicamente cuando la enzima se ensayó en presencia de Mg^{2+} , mientras que el tratamiento con O_2 produjo un descenso de la actividad. Estos resultados sugieren la participación de los adenín nucleótidos en la modulación *in vivo* de la actividad NR en raíces de pepino, probablemente a través de un mecanismo de fosforilación/desfosforilación similar al encontrado en hojas de pepino y de otras especies. Cuando el extracto crudo de raíces mantenidas en anoxia (2 h de infiltración con N_2) se preincubó a 25°C con ATP (2 mM) y Mg^{2+} (5 mM), la NR se inactivó, aproximadamente un 60 %, cuando la actividad se ensayó en presencia de Mg^{2+} pero no, en cambio, en ausencia del mismo. La adición de 5'-AMP (5 mM) al extracto crudo que contenía la NR inactivada con ATP, ocasionó una rápida reactivación (pérdida de la sensibilidad al Mg^{2+}) de la enzima. La NR extraída de raíces hiperoxigenadas (1 h de infiltración con O_2) y, por tanto, parcialmente inactiva (estado de activación 40 %), incrementó su actividad en presencia de Mg^{2+} cuando se preincubó con 5'-AMP (2 mM). La posterior preincubación del extracto con ATP (5 mM) y Mg^{2+} (5 mM) inactivó a la NR ensayada con Mg^{2+} . Conforme al mecanismo propuesto para la activación/inactivación de la NR de hojas de espinaca (Huber y Huber, 1995), la inactivación de la NR de raíces de pepino por ATP pudiera ser consecuencia de la fosforilación -por ATP- de la proteína, mientras que la activación por 5'-AMP puede ser el resultado de su desfosforilación, bien porque el 5'-AMP estimule la actividad de la fosfatasa de la NR o bien porque favorezca la disociación del complejo NR fosforilada-proteína inhibidora.

E. Agüera, P. de la Haba y J.M. Maldonado (1997) Modulación por la luz de la actividad nitrato reductasa de hojas de pepino (*Cucumis sativus* L.). En: IV Reunión Nacional de Metabolismo del Nitrógeno (en prensa).

S.C. Huber, J.L. Huber (1995) Metabolic activators of spinach leaf nitrate reductase: effects on enzyme activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta* 196:180-189.

Estas investigaciones han sido financiadas por la DGICYT (proyecto PB93-0718) y la Junta de Andalucía (grupo PAI CVI-0159).

Reducción del contenido de nitratos en *Spinacia oleracea* controlando la nutrición nitrogenada

J. Muro*, C. Lamfus**, I. Irigóien*

* Depto. Producción Agraria y ** Depto. Ciencias del Medio Natural,
Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía s/n,
Pamplona, CP 31006

Palabras clave: acumulación nitratos espinaca, nutrición nitrogenada, inhibidores nitrificación, DCD.

La legislación europea limita el contenido en nitratos que pueden presentar las espinacas por su efecto negativo sobre la salud humana. Con las actuales técnicas de cultivo y material vegetal, estos valores son frecuentemente sobrepasados tanto para consumo en fresco como industria. Es evidente la necesidad de incidir en algunos de los factores de producción para disminuir esa acumulación. Siendo el factor nutricional uno de los determinantes en el proceso acumulativo y a su vez uno de los más fácilmente modificables en condiciones de campo, parece evidente que la solución al problema pasa por el estudio detallado de dicho factor.

Con el fin de profundizar en el efecto de la nutrición nitrogenada sobre el contenido de nitratos acumulados en la parte aérea del cultivo, se han realizado en hidroponía varios ensayos con espinacas cultivadas bajo distintas proporciones de nitrato/amonio en la solución nutritiva. Los niveles de nitratos se han reducido drásticamente y se ha comprobado que es posible controlar la acumulación de nitratos en la parte aérea, incidiendo en la proporción de nitrato/amonio en el entorno radical.

Posteriormente se ha ensayado esta técnica en campo. Para conseguir permanentemente distintas proporciones de nitrato y amonio en el entorno radical se aplicaron distintas dosis de un inhibidor de la nitrificación, siendo el abonado nitrogenado utilizado en forma ureica.

Por otra parte se ha evaluado el efecto de distintas dosis del inhibidor sobre la liberación de nitrato y amonio en condiciones de laboratorio.

Posible mecanismo de la oxidación de la betanina catalizada por peroxidasa

J. Martínez-Parra y R. Muñoz

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal).

Facultad de Biología.

Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia

Las betalaínas constituyen una clase de pigmentos vegetales nitrogenados característica de las *Centrospermae* que muestran una variedad de colores en el rango del amarillo al violeta. El color de la raíz de la remolacha es debido a la presencia en las vacuolas de betaxantinas (amarillas) y betacianinas (rojas).

Aunque en las décadas de los 70 y 80 fue objeto de estudio la estabilidad química de las betalaínas, debido principalmente a su interés como colorantes naturales alternativos de los sintéticos en la industria agroalimentaria, son escasas las referencias existentes sobre su degradación enzimática. Soboleva *et al.* [Biochemistry (USSR), **41**:794-799,1976], describieron por primera vez la existencia en remolacha de una actividad enzimática capaz de decolorar betacianinas y Waserman y Guilfooy (Phytochem. **22**:2653-2656,1983) sugirieron que esta enzima puede ser peroxidasa (EC 1.11.1.7). En la presente comunicación, se presenta un posible mecanismo de la oxidación de la betanina (Bt), betacianina mayoritaria de la raíz de remolacha, catalizada por peroxidasa de rábano (HRP).

El análisis por HPLC de la composición del medio de oxidación de Bt por HRP a diferentes tempos de reacción reveló la presencia de dos productos mayoritarios (P_1 y P_2), y otros menos absorbentes en el visible y peor resueltos en el cromatograma (P_3) y que, mientras que P_1 se acumula continuamente durante la reacción conforme desaparece el sustrato, P_2 es un producto intermedio cuya concentración aumenta a tiempos cortos y mas tarde disminuye.

Una vez iniciada la reacción, el medio se filtró a través de una membrana de Amicon para separar la proteína. Su análisis posterior mostró una disminución continua de las concentraciones de Bt y P_2 y un aumento de la de P_1 .

Atendiendo a la naturaleza de monofenol de la Bt, el primer producto de su oxidación por peroxidasa debe ser su correspondiente radical aroxílico (rBt). La hidrólisis posterior de rBt genera ácido betalámico (AB), uno de los productos descritos de la hidrólisis química de la Bt (von Elbe *et al.*, J. Food Chem. **46**:1713-1715,1981). La identidad del tiempo de retención y espectro de absorción de P_1 con los descritos para el AB (Pourrat *et al.*, J. Food Chem. **53**:294-295,1988; von Elbe *et al.*, J. Food Chem. **46**:1713-1715,1981). apoyan su formación en la reacción. El otro producto de la hidrólisis debe ser el radical del ciclo DOPA 5-O-(β -D-glucósido (rCDG), el cual se estabiliza por deslocalización del electrón desapareado a través del anillo aromático. La unión no enzimática de dos unidades de rCDG generaría el dímero (CDG)₂, de manera similar a la formación de los dímeros de monolignoles en el proceso de lignificación, proceso también catalizado por de peroxidasa. Pero (CDG)₂ también puede reaccionar, o con rBt, produciendo el radical del trímero de

CGD y AB, u otro radical de polímero de CGD [$r(\text{CGC})_1$]. Así, $(\text{CDG})_2$ se forma y consume en el proceso y, por lo tanto, debe ser el producto intermedio P_2 observado en los cromatogramas del medio de reacción.

Los cambios no enzimáticos de las concentraciones de Bt, $(\text{CDG})_2$ y AB en el medio de reacción después de su filtración, pueden justificarse por la adición de Bt (con la consiguiente formación de AB) y $(\text{CDG})_2$ a los $r(\text{CGC})_1$.

Por último, los diferentes $r(\text{CGC})_1$ se unirían en cualquier etapa de polimerización produciendo una mezcla de polímeros de CDG que deben corresponder a los productos P_i que se detectan en los cromatogramas de los medios de reacción tanto en presencia como en ausencia de peroxidasa.

Este trabajo ha sido subvencionado por la CICYT, Proyectos ALI 573/93 y I018/95.

Residuos de aminoácidos implicados en la interacción entre Ferredoxina y Nitrito reductasa o Glutamato sintasa

M.I. García-Sánchez, J.R. Domínguez, C. Gotor, J.M. Vega

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones

Isla de la Cartuja, CSIC-Univ. de Sevilla, Avda Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla

Ferredoxina (Fd) es una proteína central que transfiere los electrones de la cadena fotosintética a diversos enzimas en el cloroplasto, como Nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1) y Glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.7.1). La Fd es una proteína monomérica de 12 kD y contiene una agrupación [2Fe-2S] como grupo prostético.

La incubación de Fd silvestre con extractos crudos de *Chlamydomonas reinhardtii* en presencia de un activador de grupos carboxilos da lugar a la formación de un único complejo covalente Fd:NiR de estequiometría 1:1 y dos complejos covalentes Fd:GOGAT, 1:1 y 2:1. Estos complejos covalentes son funcionales en presencia de metil viológeno reducido como donador de electrones. GOGAT parece contener dos dominios de enlace a Fd con similar afinidad.

Estudios de modificación química de Fd han puesto de manifiesto la importancia de sus grupos carboxilos para la interacción con estas proteínas y para actuar como donador de electrones en las reacciones catalizadas por NiR y GOGAT. Mediante mutagénesis dirigida con Fd recombinante hemos obtenido una serie de proteínas mutantes en los que residuos carboxílicos específicos han sido reemplazados por residuos cargados positivamente o neutros. Reacciones de formación de complejos con NiR y GOGAT, así como determinación de actividades enzimáticas, utilizando cada uno de estos mutantes de Fd, han mostrado la presencia de dos regiones en la molécula de Fd de *C. reinhardtii* implicadas en la interacción con NiR y GOGAT. Una de estas regiones incluye los residuos de aminoácidos asp-24, glu-27 y glu-28, y la otra incluye a los residuos glu-90 y glu-91. Nuestros estudios han mostrado también que un cambio en el residuo 90 en comparación con el 91, disminuye significativamente la eficiencia de la Fd tanto para interaccionar con otras proteínas como para actuar como donador de electrones, alcanzándose el mayor efecto cuando se reemplaza el residuo negativo por otro cargado positivamente.

El comportamiento similar observado en la interacción de NiR o GOGAT con los diferentes mutantes de Fd sugiere que ambas enzimas deben contener un dominio de enlace a Fd muy parecido, tal como se ha mostrado previamente mediante técnicas inmunológicas.

Regulación de la biosíntesis de cisteína por estrés salino en *Arabidopsis thaliana*

L.C. Romero, C. Gotor, C. Barroso, F.J. Cejudo y J.M. Vega

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones
Isla de la Cartuja, CSIC-Univ. de Sevilla, Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla

El azufre juega un papel esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. El sulfato inorgánico es reducido y asimilado hasta L-cisteína, que sirve como donador de átomos de azufre para la biosíntesis de L-metionina y otros metabolitos secundarios azufrados. La última etapa de la biosíntesis de L-cisteína está catalizada por la enzima O-acetilserina(tiol)liasa (OASTL) que incorpora sulfuro al esqueleto de la molécula de O-acetil-L-serina.

Trabajos recientes de nuestro grupo han permitido el aislamiento y caracterización del gen *Atcys-3A* que codifica la isoforma citosólica de la OASTL de *Arabidopsis thaliana*¹. Estudios de localización mediante hibridación *in situ*, mostraron una expresión inesperadamente alta en tricomas de hojas y tallos². Con objeto de profundizar en dicha observación, hemos investigado la regulación de la expresión de dicho gen en diferentes condiciones medioambientales. Análisis mediante Northern de la expresión de *Atcys-3A* mostró una significativa inducción en la acumulación de mRNA por estrés salino y metales pesados. La adición de NaCl a plantas maduras de *Arabidopsis* induce un rápido incremento de mRNA en hojas y en menor extensión en el tallo, pero restringido al tejido vascular de éste. Cuando se comparan las señales de hibridación *in situ* de plantas controles y tratadas, se observa un ligero incremento en la señal de hibridación detectada en la raíz de plantas estresadas. La adición exógena de la hormona ABA al medio, simula la respuesta de la planta, aumentando la cantidad de mRNA de *Atcys-3A* hasta los mismos niveles observados por estrés salino. Además, demostramos que la inducción específica de sal es mediada por la hormona ABA ya que los mutantes *aba-1* y *abi2* no son capaces de responder a la inducción por NaCl. Hemos observado que la sobreexpresión del gen en tricomas de plantas no tratadas no es detectada en plantas estresadas con sal.

Nuestros resultados apuntan a un aumento en las tasas de biosíntesis de L-cisteína por estrés salino, que podrían estar relacionado con la síntesis de compuestos azufrados requeridos como agentes de protección frente al estrés indicado.

1. Barroso, C.; Vega, J.M.; Gotor, C. (1995) FEBS Lett. 363: 1-5

2. Gotor, C; Cejudo, F.J.; Barroso, C.; Vega, J.M. (1997) Plant J. 11: 347-352

Thermal denaturation of aspartate aminotransferases isoenzymes. Kinetic and thermodynamic parameters

L. L. Martins, M. F. B. Mourato, F. M. Gírio^a, A. Varennes
Instituto Superior de Agronomia. Departamento de Química Agrícola e
Ambiental Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex
^aINETI, IBQTA - U. Microbiologia Industrial, Azinhaga dos Lameiros,
1699 Lisboa Codex

Two aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1.) isoenzymes (AAT) from white lupin leaves (*Lupinus albus* L. cv Estoril) were isolated and purified. Their kinetic and thermodynamic parameters were determined and compared with the results of the enzymatic activity of the crude extracts in order to characterize their thermal denaturation process.

Both isoenzymes have a high optimal temperature of activity, about 50-65°C, with residual enzymatic activity above 90%. They are very heat resistant, although AAT-2 seems to be more labile above 65°C than AAT-1.

The heat denaturation curves indicate a first order reaction kinetic for both isoenzymes, as well as for the enzymatic activity of the crude extracts. These curves give the rate constant and half-life times ($t_{1/2}$) at each temperature.

The activation energy (E_a) was calculated by Arrhenius equation and the free energy, enthalpy and entropy of activation (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) were calculated from the kinetic data based on Eyring theory. The parameters obtained show a high thermostability for both isoenzymes and the E_a , ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger values are consistent with a irreversible protein denaturation process and indicate that, during denaturation, the enzymes experienced a large change in conformation, rupture of several bonds, unfolding and deaggregation of the apoprotein.

Study of the kinetic mechanism of two aspartate aminotransferase isoenzymes using steady-state methods

L. L. Martins, M. F. B. Mourato, F. M. Gírio^a, A. Varennes
Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Química Agrícola e
Ambiental Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex
^aINETI, IBQTA - U. Microbiologia Industrial, Azinhaga dos Lameiros,
1699 Lisboa Codex

The kinetics of two-substrate enzyme-catalysed reactions are described by the general rate equation of Alberty. This applies for all reactions mechanism with two-substrate two-products which obey the Michaelis-Menten equation with respect to one substrate at constant concentration of the other. The most frequent two-substrate two-products reactions (bi-bi) are transfer reactions which are particular cases of the Alberty's equation and may proceed by different mechanisms: "ping-pong bi-bi", random-order ternary-complex mechanism and compulsory-order ternary-complex mechanism.

Many reactions catalysed by aminotransferase enzymes follow a "ping-pong bi-bi" mechanism with the formation of binary complexes between enzyme and substrates, also known as Koshland mechanism, two-step transfer mechanism, double displacement or Cleland mechanism.

In this work we studied the kinetic mechanisms of two aspartate aminotransferase isoenzymes (AAT) from lupin leaves as it is known that isoenzymes do not necessarily act by identical mechanism. The mechanism of a two-substrate reaction of AAT was investigated by "steady-state" methods, such as the use of primary plots at non-saturating concentrations of both substrates, the primary plots with the substrates concentrations at fixed ratio ($b=za$), and product inhibition studies. The mechanism can be distinguished by the pattern of the primary plots and of the product inhibition plots obtained. Those patterns can be conclusive for the definition of the kinetic mechanism. The results of these studies are consistent with a "ping-pong bi-bi" mechanism for both AAT isoenzymes.

Papel das micorrizas arbusculares no metabolismo de N de alfarrobeira

Martins-Loução, M.A., Correia, P.M., Pereira, F. & Cruz, C.

*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa, Campo Grande
Bloco C2, Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal email: maloucao@fc.ul.pt.*

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito da inoculação de fungos micorrízicos e da adição de fertilizante no metabolismo azotado de plantas de alfarrobeira. Os fungos arbusculares micorrízicos utilizados nesta experiência foram seleccionados **por serem** endófitos autóctones da alfarrobeira em condições naturais. O fertilizante utilizado **foi** um fertilizante comercial de dispersão lenta composto de uma mistura de azoto e fósforo. **Avaliou-se** a dependência relativa da planta para com a inoculação fúngica em presença ou ausência de fertilizante através de mudanças de biomassa, fotossíntese; e tomada e assimilação de azoto.

A presença de micorrizas, independentemente da presença ou ausência de fertilizante, originou um ganho em biomassa, uma diferente **partição de** nutrientes **entre** a parte aérea e parte radicular, um aumento da eficiência do uso do azoto e da água. **Embora** a dependência micorrízica da planta seja baixa, quando interpretada em termos **de peso** seco, **os efeitos** positivos observados em termos de área foliar, eficiência do uso da água e do azoto indicam que todo o comportamento fisiológico da planta foi beneficiada com a presença de endófitos micorrízicos **nas** raízes das plantas.

A **presença** de fungos na raiz aumenta a área de tomada, induzindo **uma** maior quantidade de **azoto** assimilado pela planta, particularmente sob a forma de **nitrato**. Importa salientar **que** os resultados até agora obtidos evidenciam a preferência desta **espécie** pelo amónio. **Por** outro lado, quando cultivada o fertilizante utilizado **é sempre** o sulfato de amónio.

Nas condições experimentais deste ensaio, a presença de fertilizante não teve qualquer efeito **sobre** a tomada do azoto, o que evidencia o papel particular da micorriza no metabolismo do **azoto**. Os resultados suportam a ideia de que a **alfarrobeira, embora** não totalmente dependente da micorriza para o seu crescimento, torna-se **mais eficiente** na utilização da água e nutrientes quando inoculada com fungos micorrízicos.

Este estudo mostra que as micorrizas **representam** uma estratégia ecofisiológica importante para a alfarrobeira particularmente tendo em conta que a água e o azoto são factores limitantes na região mediterrânica.

Metabolismo de contaminantes nitroaromáticos en bacterias

R. Blasco, P. García, R. Blanco, M. Martínez Luque-Romero y F. Castillo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias,

Avda. S. Alberto Magno S/N, 14071 Córdoba

Los compuestos aromáticos polinitrados son contaminantes muy abundantes y persistentes en el medio ambiente dado que son producidos en grandes cantidades por las industrias de fabricación de colorantes, plaguicidas, herbicidas y explosivos. Por otra parte, la presencia de varios grupos nitro en el anillo aromático le confiere una gran estabilidad frente a los ataques de tipo oxidativo. Las bacterias del suelo y de las aguas han desarrollado una serie de rutas metabólicas basadas en la catálisis enzimática de amplia especificidad de sustrato lo que les permite sobrevivir y proliferar en medios que contienen altas concentraciones de compuestos xenobióticos. La biotransformación de estos compuestos, usualmente muy tóxicos, puede sustentar el crecimiento bacteriano (metabolismo) o bien permitir el mismo utilizando sustratos alternativos (cometabolismo).

Las bacterias degradan 2,4-dinitrofenol (DNP) mediante dos tipos de procesos :

1) Reducción anaeróbica del grupo 2-nitroaromático.

La bacteria púrpura no azufrada *Rhodobacter capsulatus* fotorreduce DNP a 2-amino-4-nitrofenol (ANP) mediante una ruta que requiere un paso previo, inducible, de transporte del sustrato seguido de su reducción mediante una flavoproteína de 27 kDa que utiliza NAD(P)H como donador de electrones. La nitrorreductasa contiene un mol de FMN por mol de enzima y se inactiva irreversiblemente por oxígeno singlete generado en presencia de luz azul. El transporte de DNP se inhibe por amonio y la nitrorreductasa se regula mediante el sistema *nifR* que controla la fijación de dinitrógeno en estas bacterias. La metabolización posterior del ANP requiere una fase aeróbica y se acelera en presencia de amonio. En cualquier caso, la biodegradación del DNP por esta ruta es un proceso claramente cometabólico.

2) Reducción aeróbica del anillo aromático polinitrado.

La bacteria Gram + heterotrófica *Rhodococcus* sp. RBI, aislada de un lodo activado de una planta purificadora de aguas, mineraliza DNP aeróbicamente mediante una ruta inducible que requiere el transporte del compuesto, la reducción del anillo y la liberación de nitrito y un compuesto carbonado que son posteriormente utilizados como fuente de nitrógeno y de carbono. La fase reductiva consiste en la transferencia de un ion hidruro al anillo con formación de un derivado Meisenheimer que se ha detectado e identificado a partir del picrato (2,4,6-trinitrofenol). El compuesto reducido sufre un posterior ataque oxidativo que requiere dioxígeno y que libera nitrito en dos etapas: primero se produce, a partir de un mol de DNP, un mol de nitrito y un mol de 3-nitroadipato, que después se degrada a nitrito y un compuesto carbonado que se asimila probablemente a través de la ruta del 3-oxoadipato. Esta ruta no se regula por amonio, a excepción de la metabolización del nitrito a través de la nitrito reductasa asimiladora.

Análisis de los genes que codifican la nitrato reductasa periplásmica de *Rhodobacter sphaeroides*

M. Gavira, F. Reyes, F. Castillo y C. Moreno-Vivián

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias,
Universidad de Córdoba, Avda. S. Alberto Magno S/N, 14071 Córdoba

La bacteria fototrófica *Rhodobacter sphaeroides* DSM158S tiene una nitrato reductasa periplásmica que no se reprime por amonio o por oxígeno. En un fragmento *Pst*I de 6,8 kb se ha localizado el operón *napK-EFDABC* que codifica esta enzima. El análisis de la secuencia y la caracterización de distintos mutantes obtenidos por inserción de casetes de resistencia a antibióticos en cada uno de estos genes, revelan la posible función de las proteínas codificadas por los genes *nap*. Las proteínas NAPA y NAPB forman un heterodímero, siendo NAPA la subunidad catalítica de la nitrato reductasa periplásmica de esta bacteria. NAPA tiene un tamaño de 90 kDa y une un dinucleótido de molibdopterina y guanina, además de un centro sulfoférrico [4 Fe-4 S]. NAPB es un citocromo *c* de 15 kDa que posee dos grupos hemo. NAPC es de 25 kDa, posee 4 grupos hemo de tipo *c* y se encuentra anclada a la membrana plasmática. NAPP es una proteína periplásmica semejante a las ferredoxinas bacterianas, con 4 centros sulfoférricos y que media la transferencia electrónica entre el citocromo *c* de NAPC y el heterodímero NAPA y NAPB. NAPD es una proteína soluble que podría participar en la maduración de NAPA y, por último, NAPP y NAPE son pequeñas proteínas transmembranas de las que aún desconocemos su función.

Metabolismo del p-nitrofenol producido en la degradación de paratión

L.P. Sáez, M.D. Roldán, C. Moreno-Vivián, F. Castillo, F.J. Caballero

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias,
Universidad de Córdoba, Avda. S. Alberto Magno S/N, 14071 Córdoba

La bacteria roja fotosintética *Rhodobacter capsulatus* puede metabolizar distintos compuestos aromáticos derivados del fenol, entre los cuales se encuentra el 4-nitrofenol. Este compuesto xenobiótico, que aparece principalmente en la naturaleza como producto de la degradación del paratión, es mineralizado por dicha bacteria hasta CO_2 en la luz en condiciones de microaerobiosis. En el caso de la estirpe E1F1, que posee nitrato y nitrato reductasas, el grupo nitro de este xenobiótico también puede ser utilizado como fuente de nitrógeno.

La degradación del 4-nitrofenol transcurre con formación de 4-nitrocatecol, reacción que está catalizada por una monooxigenasa que requiere NADP(P)H. La apertura del anillo aromático del 4-nitrocatecol transcurre a través de una ruta de tipo orto (intradiol) que incluye un paso en el que se elimina el grupo nitro en forma de nitrito.

Mediante inserción al azar del transposón *Tn5* se han obtenido mutantes de *R. capsulatus* B10 afectados en la ruta de degradación del 4-nitrofenol. Se ha llevado a cabo una caracterización bioquímica parcial de los mismos y se ha secuenciado el ADN próximo a *Tn5* en el mutante LR1. El análisis de dicha secuencia ha mostrado la existencia de un ORF, cuya traducción a proteína presenta una elevada homología con la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de diversas acetaldehído deshidrogenasas bacterianas dependientes de NAD^+ y de CoA y que están implicadas en rutas catabólicas de diversos compuestos fenólicos.

La nitrato reductasa asimiladora de *Rhodobacter capsulatus*: una flavoproteína heterodimérica citosólica

R. Blasco, F. Castillo y M. Martínez Luque-Romero

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias,

Avda. S. Alberto Magno S/N, 14071 Córdoba

La bacteria púrpura no azufrada *Rhodobacter capsulatus* E1F1, cultivada en condiciones fototróficas (luz y anaerobiosis) puede asimilar nitrato y fijar dinitrógeno, mientras que en condiciones heterotróficas (oscuridad y aerobiosis) solamente puede asimilar nitrato. No obstante, el crecimiento en la oscuridad con nitrato es mucho menor que en la luz dado que el nitrito producido como intermediario inhibe fuertemente la respiración aeróbica. La asimilación de nitrato requiere una proteína periplásmica de 47 kDa que facilita el transporte de nitrato. En esta comunicación se presenta la purificación y caracterización molecular de la nitrato reductasa asimiladora de esta bacteria.

La nitrato reductasa de *Rhodobacter capsulatus* E1F1 se ha purificado alrededor de 400 veces hasta homogeneidad electroforética, con una actividad específica de 28 U/mg de proteína y un rendimiento del 2 %. El método de purificación incluye un paso inicial de fraccionamiento con sulfato amónico y el detergente MTA seguido de cromatografías de exclusión molecular, adsorción, intercambio iónico e hidrofóbica.

La enzima nativa tiene una masa molecular de 145 kDa según datos obtenidos por cromatografía en sephacryl S-300 y electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente de poro. La electroforesis desnaturizante en SDS reveló la presencia de dos subunidades de 46 y 95 kDa. La electroforesis en condiciones no desnaturizantes permitió la disociación de estas subunidades y reveló, mediante técnicas específicas de tinción de actividades, que la subunidad pequeña tenía actividad diaforasa mientras que la enzima nativa poseía actividades diaforasa y nitrato reductasa. La enzima nativa utiliza NADH o azul de bromofenol o metil viológeno reducidos como donadores de electrones. La diaforasa utiliza NADH para reducir citocromo *c* o DPIP. El análisis mediante HPLC de la nitrato reductasa nativa demostró que la enzima contiene un mol de FAD por mol de heterodímero. Como en la nitrato reductasa de eucariotas, el NADH inhibe la nitrato reductasa mediante la generación de radical superóxido. Las propiedades moleculares de la nitrato reductasa nativa no dependen de que el cultivo de las células haya sido fototrófico o heterotrófico.

Si bien las nitrato reductasas asimiladoras bacterianas purificadas y caracterizadas hasta la fecha son monómeros de 90-100 kDa que carecen de flavina y actividad diaforasa, la caracterización génica del operón *nas* de *Klebsiella pneumoniae* detecta la presencia de un gen que codifica una NADH-deshidrogenasa de 45 kDa, esencial para la asimilación de nitrato. Además, el transporte de nitrato en esta bacteria tiene tres componentes, uno de ellos una proteína periplásmica. Estos resultados sugieren que el sistema génico asimilador de nitrato en *Rhodobacter* es similar al de *Klebsiella*. En el trabajo que se presenta en esta comunicación se demuestra por primera vez que la nitrato reductasa asimiladora de bacterias fototróficas es una flavoproteína heterodimérica y que el NADH es el donador fisiológico de electrones para la asimilación de nitrato.

Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en la simbiosis de *Pisum sativum* con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*

M. Royuela, A. González, C. Arrese-Igor, P.M. Aparicio-Tejo y
C. González-Murúa*

Dpto. Ciencias del Medio Natural, Univ. Pública de Navarra, Campus Arrosadía,
31006 Pamplona. *Dpto. Biología Vegetal, Univ. del País Vasco, Apdo 644, 48080 Bilbao

Los aminoácidos de cadena ramificada (Val, Leu e Ile) son esenciales para mamíferos, pero son sintetizados por plantas y microorganismos. En su biosíntesis el primer enzima común para los tres aminoácidos es la acetolactato sintasa (ALS; EC 4.2.3.18). En plantas la ruta está localizada en plastidios y parece estar distribuida por toda la planta. El interés en los últimos años sobre el enzima ALS responde al desarrollo de herbicidas cuyo mecanismo de acción es la inhibición específica de esta actividad. En un estudio anterior (González y cols. 1996) se estableció que las plantas de guisante presentaban mayor tolerancia a uno de estos inhibidores, el imazethapyr, cuando estaban en simbiosis con *Rhizobium*. El objetivo de este trabajo es caracterizar la actividad ALS de plantas en simbiosis. Para ello se estudió, por una parte, la actividad ALS en hojas, raíz y nódulos de guisante, diferenciando en los nódulos la fracción vegetal de los bacteroides y, por otra, el efecto de la inhibición de la ruta. Se cultivaron plantas de guisante var. Frilene en cultivo hidropónico inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, y se crecieron en condiciones controladas durante 4 semanas, al cabo de las cuales se separaron raíz, hojas y nódulos para la extracción del enzima ALS. En hojas y raíces la extracción y semipurificación se llevó a cabo básicamente como describió Muhitch (1988), y en el caso de los nódulos, tras separar la fracción vegetal, los bacteroides fueron tratados como Weinstock y cols. (1992) con algunas modificaciones. La actividad ALS fue ensayada *in vitro*, con 40 mM de piruvato como sustrato y tiempos de reacción de 60 minutos. Se cuantificó el acetolactato formado tras su transformación en acetoína. En todos los casos se hicieron los chequeos apropiados de acetoína producida por otras vías, principalmente como consecuencia de la condensación del acetaldehído producido por la actividad piruvato descarboxilasa. Se observó idéntica actividad específica ALS en hojas y raíces. Sin embargo, la actividad extraída de la fracción vegetal de los nódulos fue el doble que las anteriores. Además, la actividad extraída del bacteroide fue unas 20 veces superior a la extraída de hojas o raíces. El hecho de que la expresión de la actividad ALS sea mayor en nódulos, indica que éstos podrían contribuir de forma importante a la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, como ocurre con tejidos meristemáticos en pleno crecimiento donde se observan altas actividades ALS. El herbicida imazethapyr, inhibidor de la actividad ALS, fue aplicado en distintas concentraciones al cultivo hidropónico en el que crecieron las plantas de guisante inoculadas con *Rhizobium*, con objeto de analizar el efecto que tenía la inhibición de esta ruta biosintética. Se analizó el contenido en proteína soluble, el total de aminoácidos libres y los niveles de aminoácidos libres de cadena ramificada tanto en nódulos como en raíz y hojas de estas

plantas. Los resultados muestran que, coherentemente con la expresión de la actividad ALS que hemos descrito en los distintos tejidos, el inhibidor tuvo un efecto muy distinto en los órganos estudiados. En hojas se produjo un incremento del total de aminoácidos libres de hasta dos veces el valor del control, mientras que el contenido en proteína soluble y aminoácidos ramificados descendió. Esto parece estar relacionado con el aumento de la velocidad de recambio de proteínas producido por la falta de aminoácidos ramificados al estar inhibida la actividad ALS. Sin embargo, en nódulos no hubo diferencias significativas en el contenido en proteína soluble, ni de aminoácidos libres ni de los ramificados. Los altos niveles de actividad ALS nodular detectados pueden ser la razón de que en este órgano, los efectos del inhibidor no sean apreciables, lo que puede explicar que la planta en simbiosis presente mayor tolerancia a este tipo de inhibidores.

González y cols. (1996) *Weed Sci.* 44: 31-37

Muhitch (1988). *Plant Physiol.* 86: 23-27

Weinstock y cols. (1992) *J. Bacteriol.* 174: 5560-5566

Efecto de la aplicación de lodo residual de depuradora en un cultivo de guisante

B. Lasa, S. Frechilla, M. Quemada, P.M. Aparicio-Tejo y C. Lamsfus

Dpto. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra,

Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona (Navarra)

La aplicación de lodos residuales a suelos agrícolas es una alternativa que puede ser considerada aceptable dentro de un marco económico y medioambiental.

El nitrógeno disponible para las plantas que proporciona la mineralización del lodo aportado al suelo, no satisface en muchas ocasiones los requerimientos necesarios de cultivos como el cereal. Sin embargo puede resultar de interés la aplicación de estos lodos residuales a suelos con cultivos que no requieren una fertilización nitrogenada, como pueden ser las especies fijadoras.

Este estudio se planteó con el objetivo de estudiar el efecto del aporte de dos dosis de lodo residual (40 t/ha y 80 t/ha), procedente de la EDAR de Arazuri (Navarra) sobre la evolución del N en el suelo y sobre parámetros de nodulación y producción en un cultivo de guisante (*Pisum sativum* L.).

Durante los meses de otoño, tras el aporte e incorporación del lodo en el suelo se observó una rápida mineralización del N orgánico procedente del lodo generándose grandes cantidades de nitrato que no fueron utilizadas por las plantas y se lavaron a través del perfil del suelo. La cantidad de nitrato lavado fue proporcional a la dosis de lodo utilizada.

Por otra parte la masa nodular de las plantas de guisante fue significativamente reducida por la presencia de lodo, sin embargo como la disponibilidad de N inorgánico en el suelo fue mayor a la de parcelas sin aporte de lodo, el contenido de N en el forraje no presentó diferencias significativas entre tratamientos, así como tampoco la producción final de la cosecha.

Efecto de la fuente de nitrógeno en la fisiología del girasol y su interacción con el magnesio

B. Lasa, S. Frechilla, M. Quemada, P.M. Aparicio-Tejo y C. Lamsfus

Dpto. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra,

Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona (Navarra)

La nutrición nitrogenada es un tema que está cobrando un enorme interés en la actualidad. Los problemas medioambientales que lleva consigo el aporte de determinados fertilizantes nítricos debido a su lixiviación y/o desnitrificación, se unen a la acumulación del ion nitrato en los tejidos de las plantas. El amonio aparece como un sustituto del nitrato como fuente nitrogenada.

Sin embargo, las respuestas fisiológicas de las plantas a las distintas fuentes nitrogenadas, nitrato y amonio, es variada. Generalmente la tendencia observada es que las plantas crecen mejor cuando el nitrato es utilizado como fuente de N que cuando utilizan amonio.

Esta ampliamente descrito un efecto tóxico por parte del amonio sobre las plantas cuando este se añade de forma continuada en las soluciones nutritivas. Este efecto en ocasiones a sido atribuido a una descompensación en el contenido de otros cationes.

Nuestro objetivo en este trabajo fue el estudio del efecto de las fuentes de N (nitrato y amonio) sobre el crecimiento, parámetros de intercambio gaseoso y contenido mineral de plantas de girasol *Helianthus annuus* L. y su relación con el nivel de magnesio aportado en las soluciones nutritivas.

Los resultados obtenidos indican que tanto el crecimiento como la tasa de fotosíntesis en las plantas crecidas con nitrato son independientes del nivel de magnesio añadido en la solución nutritiva, mientras que las plantas crecidas con amonio consiguen tasas de crecimiento y fotosíntesis similares a las de plantas con nitrato sólo cuando se realiza un aporte extra de magnesio. Por otra parte el análisis de elementos minerales mostró que las plantas de girasol que crecieron bajo nutrición nítrica contienen menor concentración de aniones y mayor de cationes que las plantas crecidas con amonio. La presencia de amonio como única fuente de nitrógeno disminuyó de forma significativa el contenido de magnesio en las hojas de girasol, mientras que un aporte extra de este ion en la solución nutritiva dio lugar a los contenidos necesarios para un óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas.

Effect of UV-B radiation on the enzymes involved in the nitrogen metabolism in *Zea mays*

I. Santos, J.M. Almeida and R. Salema

Departamento de Botânica e Centro de Citologia Experimental (IBMC),
Universidade do Porto, R. Campo Alegre, 823, 4150 Porto, Portugal

Enhanced level of UV-B radiation has been reported to affect several metabolic processes in plants. Considering the increase in UV-B radiation reaching earth surface due to the reduction of stratospheric ozone layer the effects of supplementary UV-B radiation on important agronomic crops has been under study in our laboratory.

Nitrogen availability is a determinant factor for plant growth and productivity and in higher plants its assimilation involved various enzymes and different cellular compartments. Nitrate taken up from the soil can be stored in roots as nitrate, transported to the shoots and reduced to ammonium via the actions of nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) in either root or leaves. The ammonium is then incorporated into the amide nitrogen of glutamine in a reaction mediated by glutamine synthetase (GS) and the synthesis of glutamate is mediated by glutamate synthase (Fd-GOGAT or NADH-GOGAT).

Following previous studies^(1, 2) the effect of UV-B radiation on NR and NiR and on GS, Fd-GOGAT and NADH-GOGAT was studied as well as nitrate level stored in either the root and the leaves. Two sets of maize plants (*Zea mays* L. cv. LG12) growing in half strength Hoagland's solution were organized, one used as control ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of PAR) the other under the same PAR and supplemented with UV-B radiation ($7.8 \text{ kJ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$). After 10 days leaf samples and the whole root system were used for biochemical quantifications which were done as previously reported⁽³⁾.

The activity of the studied enzymes was differently affected by UV-B treatment. No significant difference was found in NR activity whereas a decrease in activity of the NiR was quantified. These data are not in accordance with those found in maize plants grown in different conditions (2) which can be due to culture condition or also can be due to the different method used to quantify the NR activity. Concerning the UV-B effect on the enzymes involved in the nitrogen assimilation it was found a slight increase in the activity of Fd-GOGAT (control = $330 \text{ pkat/mg protein}$; UV-B = $420 \text{ pkat/mg protein}$). Values found for activity of both NADH-GOGAT and GS were higher in UV-B irradiated leaves; however, the increase in GS activity was larger. The amount of nitrate stored in the root system was not affected (69 mg/g d.w.) but UV-B treatment decrease it in the leaves (35.5 mg/g d.w. vs 22.7 mg/g d.w.).

The effect of UV-B radiation on nitrogen metabolism has only been studied on some marine diatoms, cyanobacteria and macroalgae and it was reported different responses to this stress condition⁽⁴⁾.

The data here reported show that UV-B radiation in the dose used in our experimental conditions had a negative effect on NiR and increased the activity of the enzymes involved in the ammonium assimilation in maize leaves. Taking into consideration that in maize NR

and NiR are located predominantly in mesophyll cells and GS and GOGAT are found in mesophyll cells and bundle sheath cells further studies to find out if the magnitude of the UV-B effect is dependent on the cellular and intracellular localization of the enzymes are necessary.

-
1. I. Santos, J.M.Almeida & R. Salema (1993) *J. Plant Physiol.* 141:450-456
 2. I. Santos, J.M.Almeida & R. Salema.(1995) IV Portuguese-Spanish Cong. *Plant Physiol.* pp. 324
 3. I. Santos and R. Salema (1992) *Plant Sci.* 84:145-152
 4. G. Dohler, E. Hagmeier & Ch. David (1995) *Photochem. Photobiol.* 63:179-187

Expresión del promotor del gen de la glutamina sintetasa de pino silvestre en cotiledones de pino silvestre y pino piñonero

M.Rey¹, J.M. Humara², R.J. Ordas², C. Avila³, P. Barnestein³,
R. Crespillo³ y F.M. Cánovas³

¹Lab. Fisiología y Biotecnología Vegetal, Fac. Biología y Ciencias del Mar,
Universidad de Vigo, 36200 Vigo

²Lab. Fisiología Vegetal, Dept Biología de Organismos y Sistemas,
Universidad de Oviedo, c/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo

³Lab. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias, Universidad de Málaga,
Campus de Teatinos, 29071 Málaga

La enzima glutamina sintetasa tiene un papel clave en la movilización del nitrógeno de la semilla para su utilización durante las fases iniciales del desarrollo de la plántula. El estudio molecular de esta enzima y su regulación en coníferas, utilizando pino silvestre como modelo experimental, tiene un gran interés debido a la capacidad de las coníferas de sintetizar clorofila y desarrollar sus cloroplastos en ausencia de luz (Cánovas et al. 1991, Planta 185: 372-378). Este objetivo se fundamenta en el estudio de la estructura de los genes que codifican para esta enzima, para poder luego estudiar su regulación. En este sentido tiene gran importancia el análisis funcional del promotor del gen de la glutamina sintetasa, para la identificación de posibles secuencias reguladoras implicadas en el patrón de expresión del mismo. Como primer paso se han preparado tres plásmidos conteniendo fragmentos del promotor del gen de la glutamina sintetasa de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) fusionados al gen marcador *gusA*, que codifica para la β -glucuronidasa.

La construcción C1 contiene el fragmento completo de la región cadena arriba del ATG, C2 contiene el mismo fragmento en el que se delecionó un elemento poli CT existente y C3 contiene la secuencia completa anterior al ATG y 37 nucleótidos de la zona codificante. Estos plásmidos se han introducido en cotiledones de pino silvestre y de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) mediante bombardeo de micropartículas, teniendo en cuenta la utilidad de este sistema para estudios de expresión transitoria (Rey et al. 1996, *Physiol. Plant.* 96: 630-636) en pino, utilizando partículas de oro de 1 μ m de diámetro. La expresión del gen *gusA* se ha estudiado 24 horas después del bombardeo utilizando tanto el ensayo GUS histoquímico como el análisis fluorimétrico de la actividad β -glucuronidasa. En todos los casos se han utilizado un control positivo (plásmido pBI121, conteniendo el gen *gusA* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) y otro negativo (plásmido pBI101, conteniendo el gen *gusA* sin promotor alguno).

La expresión del gen *gusA* dirigida por los fragmentos del promotor de la glutamina sintetasa de pino fue baja tanto en pino silvestre como en pino piñonero. En cotiledones de pino silvestre se observó únicamente expresión de este gen marcador en el constructo C1, en cotiledones escindidos de embriones cultivados durante 2 ó 3 días en medio $1/2$ LP con 5 μ M. bencilaminopurina. En pino piñonero, se pudo observar expresión GUS en los tres

constructos preparados en cotiledones escindidos de embriones cultivados en $1/2$ LP sin fitohormonas durante 1 día. De nuevo los mayores niveles de expresión se observaron en el constructo C1. Por otra parte, en cotiledones de embriones de pino piñonero cultivados en el mismo medio durante 3 días, solamente se observó expresión del gen *gusA* en el constructo C3. Los resultados obtenidos sugieren un papel importante del elemento poli CT en la funcionalidad del promotor.

Caracterización de la actividad degradadora de ureidoglicolato en garbanzo (*Cicer arietinum*)

A. Muñoz, P. Piedras, M. Aguilar y M. Pineda

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto Andaluz de Biotecnología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba,
Avda. San Alberto Magno, s/n. 14071-Córdoba

Los ureidos alantoína y alantoato son los principales compuestos usados por muchas leguminosas para transportar el nitrógeno desde los nódulos fijadores hasta las partes aéreas de la planta. El ureidoglicolato es un intermediario en el catabolismo de los ureidos, que va dirigido a la liberación del nitrógeno en las partes aéreas de la planta.

Una de las cuestiones más controvertidas de cuantas afectan al metabolismo del nitrógeno fijado en los nódulos de leguminosas es la diferenciación entre leguminosas ureidas (transportan fundamentalmente alantoína y alantoato) y amidas (transportan asparragina). En nuestro grupo estamos interesados en la regulación de este proceso de diferenciación metabólica, por eso estudiamos el metabolismo de los ureidos en plantas amidas y el de las amidas en plantas ureidas. En este contexto, hemos detectado la actividad degradadora de ureidoglicolato en el garbanzo (*Cicer arietinum*). Los niveles de actividad específica más elevados se han encontrado en los frutos en desarrollo, aunque también se ha encontrado actividad en semillas en germinación, hojas y plántulas. Se ha purificado esta actividad siguiendo un protocolo de purificación clásico: fraccionamiento con sulfato amónico, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, tratamiento térmico y electroforesis preparativa.

Hemos determinado la producción de amonio en extractos libres de ureasa, lo que ha permitido demostrar que la degradación de ureidoglicolato está catalizada por la ureidoglicolato amidohidrolasa y no por la ureidoglicolato urea-liasa. La enzima es estable en el rango de pH de 6 a 9, aunque su actividad sí se ve afectada en este rango, ya que presenta un pH óptimo entre 7 y 8. Se ha comprobado también el efecto sobre la actividad de distintos tampones y varios tipos de inhibidores. Asimismo, se ha hecho un estudio de los parámetros cinéticos de la actividad.

Tras realizar una completa caracterización de esta enzima, nuestra intención es obtener la secuencia de aminoácidos del extremo amino. A partir de esta secuencia, se podrán conseguir sondas homólogas degeneradas con el fin de clonar el gen que codifica esta enzima. La enzima pura también nos permitirá obtener anticuerpos policlonales, que se emplearán en estudios de localización a nivel subcelular así como en estudios de regulación mediante análisis de Western.

Clonación molecular del gen de la asparragina sintetasa de judía (*Phaseolus vulgaris*)

D. Osuna, M. Pineda y M. Aguilar

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto Andaluz de Biotecnología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Avda. San Alberto Magno, s/n.
14071 Córdoba

El nitrógeno se fija biológicamente en los nódulos radicales de las leguminosas. Las leguminosas noduladas tienden a exportar este nitrógeno hacia las partes aéreas de la planta en forma de ureidos (alantoína, alantoato) o en forma de amidas (glutamina, asparragina). La distribución relativa de ureidos y amidas en el xilema de las leguminosas está determinada por una serie de factores ambientales, nutricionales y genético-moleculares. Así, existen especies que se comportan generalmente como ureidas (soja, judía) y otras que se comportan como amidas (guisante, garbanzo, trébol). A pesar de lo bien establecidos que están estos hechos, se desconocen los mecanismos de control de este proceso de diferenciación metabólica. En nuestro proyecto pretendemos contribuir a la resolución de este problema y, con dicho propósito, estamos iniciando una aproximación molecular al estudio de una de las enzimas clave en la ruta de movilización del nitrógeno desde las raíces hacia las partes aéreas de la planta: la asparragina sintetasa.

En nuestro proyecto de clonación hemos seguido dos estrategias distintas, aunque convergentes: a) Construcción de una genoteca genómica de *Phaseolus vulgaris* en Lambda FIX II, y escrutinio en condiciones heterólogas empleando como sonda un cDNA completo de asparragina sintetasa de espárrago (*Asparragus officinalis*). Un Southern sobre DNA genómico total de *Phaseolus* sugiere la existencia de al menos dos genes de AS en judía. El escrutinio en condiciones heterólogas permitió aislar múltiples clones de un tamaño medio de 15 kb que contienen secuencias homólogas con AS de espárrago. Posteriores experimentos de subclonaje y secuenciación parcial han permitido identificar una región de aproximadamente 0,8 kb que contiene secuencias homólogas a una región interna de la secuencia de AS de diversas plantas superiores. b) Diseño de oligos degenerados a partir de secuencias conservadas entre diversas asparragina sintetetas de plantas superiores, y posterior clonación mediante PCR. Estos oligos degenerados, que cubren distinta regiones de la secuencia de AS mostraron su eficiencia en la amplificación de fragmentos internos de la secuencia de cDNA de AS de espárrago empleada como control. La utilización de estos oligos sobre DNA genómico total de *Phaseolus*, unido a un análisis posterior mediante Southern, reveló bandas simples de hibridación con la sonda heteróloga de AS de espárrago. Estos fragmentos se reamplificaron y se clonaron en un vector adecuado para su posterior secuenciación. El análisis de estas secuencias reveló una homología significativa con secuencias de AS de plantas superiores.

Una vez clonados estos fragmentos, nuestros objetivos inmediatos son realizar un completo estudio para determinar inequívocamente el número de genes de AS existente en *Phaseolus*, su posterior clonación y el análisis de su estructura, así como un análisis de la regulación de su expresión.

Alteraciones en la capacidad nodulante y fijadora de N_2 en isolíneas mutagenizadas de *Lupinus sp.* y *Cicer arietinum*

M. A. Chamber Pérez, I. Solís Martel y M^a Camacho Martínez

C.I.F.A. "Las Torres", Dpto. Fijación de Nitrógeno,

Apdo. Oficial, Alcalá del Río, 41200, Sevilla

Mediante mutagenización química (EMS y $NaNO_3$) y Rayos γ se han logrado obtener isolíneas alteradas en sus potenciales simbióticos, tanto en cuanto a la producción de masa nodular como en la eficiencia fijadora del N_2 atmosférico. Tras el tratamiento y selección sobre un total superior a las 10.000 plantas, poseemos en la actualidad líneas en generaciones M_4 a M_6 de los siguientes tipos de mutantes: No-nodulantes, ineficientes, hipernodulantes, supereficientes y nitrato-resistentes.

Las líneas no-nodulantes presentan gran interés para trabajos tales como evaluación de las tasas de fijación simbiótica mediante técnicas isotópicas, en lugar de utilizar como controles cereales u otras especies no-fijadoras, según se ha venido haciendo hasta ahora; de este tipo hemos conseguido hasta la fecha 4 mutantes de altramuces y 1 de garbanzos. Dentro de esta categoría de mutantes hemos de incluir aquellas formadoras de pseudonódulos y/o nódulos escasos y pequeños; muy útiles en estudios relacionados con los procesos de reconocimiento *Rhizobium*-leguminosa, infección y desarrollo nodular; se han obtenido 3 mutantes de altramuz y 4 en garbanzos.

Las mutantes ineficientes se caracterizan por alteraciones en algún paso del proceso de fijación, que reduce la productividad de la leguminosa, sin que por ello se haya visto modificada su masa nodular; poseemos 11 isolíneas de *Lupinus* y 8 de *Cicer*.

Las plantas hipernodulantes tienen la facultad de desarrollar una abundante nodulación, significativamente superior a las de sus respectivos patrones, pues, parece haberse alterado el proceso de autoregulación natural, sin que ello se traduzca necesariamente en unos mayores rendimientos de materia seca, salvo en casos excepcionales (Altramuz = 4 y garbanzo = 6). Por otro lado, las supereficientes originan altos rendimientos con masas nodulares similares a las de los cultivares de procedencia (Altramuz = 5 y garbanzo = 7).

Finalmente, las resistentes a nitratos se muestran insensibles a dosis elevadas de éstos en el medio de crecimiento (más de 5mM N), pudiendo, por tanto, nodular y fijar N_2 en cantidades equivalentes a las originadas en ausencia de nitratos (Altramuz = 5 y garbanzo = 3).

Desde un punto de vista ecológico y agronómico, pensamos que los grupos de isolíneas mutagenizadas, que más valor pueden tener para su futura comercialización son las supereficientes y las nitrato-resistentes, porque cada uno de ellos viene a resolver una problemática que tienen planteadas las leguminosas tradicionalmente, tales son sus bajas producciones frente a otras especies anuales, y su sensibilidad a los nitratos que contaminan los terrenos y acuíferos en la actualidad.

Papel de los fosfoinosítidos y del calcio en la actividad de la nitrato reductasa inducida por el fitocromo

C. Bergareche, E. Barraquán, E. Simón

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona

La nitrato reductasa (NR) cataliza la reducción de nitrato a nitrito. Experimentos previos con pulsos de luz indicaron una implicación del fitocromo en la actividad NR (NRA) en cotiledones de pepino (*Cucumis sativus*).

El papel del calcio extracelular sobre la NRA, mediada por el fitocromo, ha sido estudiado probando el efecto del ácido etilenglicol-bis(-aminoetiléter)-N,N,N',N'- tetraacético (EGTA), un agente quelante del calcio más específico que el EDTA, y del La^{3+} , que afecta bloqueando canales de calcio. Asimismo se examinó la posible implicación de fosfatidilinositol en el mecanismo de transducción de la señal probando el efecto del sulfato de neomicina, un inhibidor de la fosfolipasa C, y el del Li^+ como inhibidor de la inositol-1-fosfatasa.

La NRA se estudió en cotiledones escindidos de plántulas de pepino, crecidos en agua destilada y en oscuridad durante seis días a $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Los cotiledones escindidos se incubaron 7 h en nitrato de calcio 50 mM durante un corto periodo (24 h) de inducción de NR y posteriormente se aplicó un pulso de 2 h del inhibidor ensayado, tras el cual se irradió durante 15 min con un pulso de luz roja (R). Se prosiguió la incubación de los cotiledones en nitrato de calcio y en oscuridad durante 15 h más y a continuación se ensayó la NRA "in vivo".

Un aporte externo de EGTA disminuyó la NRA de los cotiledones de pepino y la magnitud del efecto era dependiente de la concentración de EGTA. Cuando la irradiación con luz R incrementaba el nivel de Pfr, el efecto inhibitor del quelante era evidente para todas las concentraciones probadas (20, 40 y 80 mM), las dosis más altas provocaban inhibiciones de hasta un 75% de la NRA con respecto al control. Esta inhibición revertía con la adición de calcio. El La^{3+} , suministrado como LaCl_3 y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, y con un rango de concentraciones de 0.25 a 1 mM, se utilizó para bloquear el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática e inhibió completamente el efecto estimulador de la luz R sobre la NRA, incluso a las concentraciones más bajas (0.25 mM).

La aplicación de sulfato de neomicina 30 μM inhibió completamente la NRA inducida con luz R. La adición de LiCl 10 μM también inhibió la NRA inducida con R y la aplicación de mio-inositol 1 mM revirtió el efecto inhibitor.

Los datos obtenidos a partir de los experimentos con **agentes quelantes** de cationes divalentes y con bloqueantes de canales de calcio mostraron que **la disponibilidad e incorporación del Ca^{2+} externo son esenciales** en la NRA y nos sugiere **la implicación del calcio como segundo mensajero del fitocromo**. El metabolismo de los fosfoinosítidos parece estar también implicado en el efecto promotor de R mediado por el fitocromo.

Eficiência do uso do azoto: Influência da concentração atmosférica de CO₂ e da fonte de azoto

C. Cruz, S.H. Lips & M.A. Martins-Loução

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa,
Campo Grande, Bloco C-2 Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal

A resposta das plantas a elevadas concentrações atmosféricas de CO₂ é um assunto que tem sido amplamente estudado. Revisões bibliográficas mostram que, em média, a produção de biomassa aumenta 42%, mas a gama de respostas varia entre -58 e +468%. Parte desta variabilidade é devida a efeitos de outros factores ambientais não contabilizados nas experiências, mas a variabilidade inter-específica das respostas é muito importante.

O aumento potencial da produção de biomassa em face do aumento da concentração atmosférica de CO₂ está muito dependente da interacção entre o CO₂ e o azoto, um dos factores mais limitantes do desenvolvimento vegetal no hemisfério Norte. O CO₂ e o azoto podem influenciar o desenvolvimento vegetal de várias formas. São muitos os estudos com plântulas que mostram uma diminuição da concentração de azoto em plântulas cultivadas com elevados níveis de CO₂ atmosférico. Outra possibilidade é o aumento da tomada de azoto. Alguns estudos mostram que o crescimento das plantas em presença de elevadas concentrações de CO₂ provoca uma maior acumulação de hidratos de carbono nas raízes, o que permite o maior desenvolvimento radicular e consequentemente melhor capacidade de exploração do solo.

Cultivaram-se plântulas de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L. Cultivar Mulata) em hidroponia, em presença de duas fontes de azoto (amónio e nitrato) e dois níveis atmosféricos de CO₂ (ambiente e 800 ppm). Ao fim de três meses observou-se que o aumento da produção de biomassa com o aumento de CO₂ atmosférico variou entre 13 e 100%, para plântulas cultivadas com amónio e nitrato respectivamente. A eficiência do uso do azoto (taxa líquida de fixação de carbono por unidade de azoto) aumentou mais para as plântulas cultivadas com nitrato do que para as cultivadas com amónio. O aumento da eficiência do uso do azoto das plântulas cultivadas com nitrato foi devido ao maior aumento da taxa fotossintética em relação à concentração de azoto presente nos tecidos.

Observou-se que a concentração de azoto nas plantas cultivadas com nitrato diminuiu ao longo do tempo, enquanto nas cultivadas com amónio se manteve quase constante.

O aumento da tomada de amónio e nitrato foi de 12 e 15%, respectivamente. Isto mostra que para as plântulas cultivadas com amónio os aumentos observados na tomada de azoto e na produção de biomassa foram semelhantes, enquanto nas plântulas cultivadas com nitrato o aumento de tomada de nitrato foi de 15% e o aumento de produção de biomassa foi de 100%. Esta diferença entre a tomada de azoto e a produção de biomassa leva à diminuição da concentração das plantas em azoto, que não pode continuar ilimitadamente.

De acordo com os resultados obtidos a fonte de azoto disponível para a planta tem uma importância fundamental na sua resposta a concentrações elevadas de CO₂ atmosférico. Devido à importância deste resultado, seria interessante saber se esta resposta (1) é característica da alfarrobeira ou se pode ser observada em outras plantas e (2) se é típica de plântulas ou se se mantém para as plantas adultas.

Sección C8:

Morfogénesis y cultivo *in vitro* (I)

¿Hay selección celular durante la criopreservación? Evaluación de la progenie de células de arroz criopreservadas

O. Moukadiri y M.J. Cornejo

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,
Avda. Vicente A. Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia

La criopreservación de diferentes tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.) muestra una gran variedad tanto en el porcentaje de células que sobreviven este proceso como en la duración de la fase lag (Bajaj YPS, En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, vol 14: 217-235, 1995) La reducción en el número de células viables puede conducir a la selección de tipos celulares específicos o a variaciones epigenéticas. Aunque la crioselección celular se ha aplicado ocasionalmente para intentar regenerar plantas tolerantes a la congelación (Kendall y col., *Plant Physiol.* 94:1756-1762, 1990), limitaría el uso de la criopreservación para mantener la estabilidad génica de clones con importancia agronómica.

La criopreservación de callos de arroz retiene su competencia para la integración estable y expresión de genes exógenos (Cornejo y col. *Plant Cell Reports* 4: 210-214, 1995). El hecho de que las divisiones celulares se reinicien solamente en algunas zonas específicas sugiere que puede haber ocurrido algún tipo de crioselección. La primera y segunda generación de plantas regeneradas a partir de líneas celulares que han sido criopreservadas y de líneas control nos han permitido investigar si la criopreservación mantiene intactas las características estructurales y fisiológicas de la variedad utilizada. Como la resistencia al estrés de congelación podría ser la característica implicada en la posible crioselección, hemos desarrollado y utilizado ensayos para evaluar *in vitro* la respuesta al estrés de congelación tanto en células indiferenciadas como en plántulas.

El modelo de respuesta al estrés de las plántulas procedentes de líneas criopreservadas y control fue similar en las diferentes líneas ensayadas. Los resultados indican que bajo el estrés más prolongado, existen diferencias significativas en el crecimiento posterior a la congelación, mientras que bajo un estrés moderado el crecimiento post-congelación es incluso más uniforme que en las plántulas no sometidas a estrés. Este efecto del estrés moderado se observa también en la estructura foliar. Las secciones transversales procedentes de hojas no sometidas a estrés, muestran algunas diferencias morfológicas y en el desarrollo del esclerénquima y del protoxilema, mientras que todas las hojas de plantas sometidas a un estrés moderado, con independencia de su origen, son más estrechas y presentan abundantes células buliformes.

Las líneas de callos establecidas a partir de plantas derivadas de células criopreservadas y control se han caracterizado mediante análisis de poblaciones de protoplastos por citometría de flujo y también en base a su respuesta al estrés de congelación.

Los resultados obtenidos indican que la progenie derivada de células criopreservadas es semejante a la de células control tanto en el grado de variabilidad estructural como en el modelo de respuesta al estrés por congelación.

Influencia del ácido jasmónico en la tuberización *in vitro* de segmentos uninodales de patata (*Solanum tuberosum* L.) en relación con el fotoperíodo y la madurez del cultivar

L. Arregui, J. Veramendi y A.M. Mingo-Castel

Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra,
Campus Arrosadía s/n, 31006 Pamplona

El ácido jasmónico ha sido reconocido como inductor de la tuberización de secciones etioladas de brote y estolones de patata obtenidos *in vitro* en los cv. Irish Cobber y Kennebec (Yoshihara et al 1989, Pelacho y Mingo-Castel 1991) en oscuridad. Posteriormente, en función del cultivar, se han detectado respuestas diferenciales con estolones *in vitro* trabajando en oscuridad (resultados no publicados). Los estolones obtenidos *in vitro* tienen en cultivo una vida limitada y son susceptibles de acusar en el tiempo alguna deficiencia metabólica en su desarrollo.

Para obviar estos problemas, se decidió investigar el efecto del ácido jasmónico utilizando como material segmentos uninodales obtenidos *in vitro* en condiciones de 16 h de fotoperíodo y $70 \mu \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de flujo fotónico. Estos segmentos pueden ser multiplicados indefinidamente. Se ensayaron 8 cvs. distintos pertenecientes a 4 grupos de madurez diferente: temprana (cvs. Jaerla y Zorba), semitemprana (cvs. Kennebec y Spunta), semitardía (cvs. Desirée y Turia) y tardía (cvs. Baraka y Fénix) y se trabajó con 4 combinaciones fotoperiódicas distintas, consistentes en precultivo en fotoperíodo de día corto (8 h) o de día largo (16 h) y cultivo en oscuridad o día corto.

Para todas las condiciones fotoperiódicas, en los cultivares Zorba, Spunta, Kennebec y Desirée, el ácido jasmónico ($5 \mu \text{M}$) aumentó significativamente la tuberización *in vitro*. Para estos cultivares, el efecto promotor del ácido jasmónico fue independiente del fotoperíodo.

Para precultivo en fotoperíodo de 16 horas y cultivo en oscuridad, el ácido jasmónico aumentó significativamente la tuberización con independencia del cultivar.

A.M. Pelacho, A.M. Mingo-Castel. 1991. *Plant Physiol* 97: 1253-1255.

T. Yoshihara et al. 1989. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2835-2837.

Efeito da indução micorrízica e de diferentes suprimentos nutricionais na morfologia radicular de plantulas de sobreiro micropropagadas

Camila Noronha and Maria Amélia Martins-Loução

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa,

Campo Grande, Bloco C2, Piso 4, 1700 Lisboa, Portugal,

email: maloucao@fc.ul.pt

Os efeitos das micorrizas na morfologia do sistema radicular tem sido frequentemente referenciado na literatura. Em condições naturais, as plantas de sobreiro encontram-se micorrizadas independentemente do tipo de solo e da exploração do montado.

Em condições *in vitro*, a aclimatização de plantulas provenientes da multiplicação de gemas retiradas de árvores adultas de sobreiro é beneficiada com a micorrização. No entanto, este processo ainda não está otimizado e particularmente ainda não se conhece quais os efeitos da micorrização e do tipo de nutrição na morfologia do sistema radicular das plantulas produzidas *in vitro*.

O objectivo deste trabalho foi comparar os efeitos da inoculação micorrízica e diferentes suprimentos nutricionais na morfologia do sistema radicular de plântulas de sobreiro produzidas *in vitro*.

A indução radicular foi comparada em diferentes substratos -agar, turfa/vermiculite, vermiculite e perlite- suplementados com meio nutritivo de Gresshoff & Doy (GD). Foram usados dois tipos de fungos ectomicorrízicos, normalmente associados ao sobreiro em condições naturais, *Pisolithus tinctorius* e *Hebeloma crustuliniforme* como inóculos micorrízicos. O meio nutritivo GD, adequado para a micropropagação do sobreiro foi comparado com o meio de Melin-Norkrans (MMN), que por seu lado está adaptado ao crescimento dos fungos ectomicorrízicos e geralmente usado para a síntese de culturas puras de micorrizas.

A percentagem de micorrização, o número e comprimento das raízes, o número de raízes laterais de primeira e segunda ordem ao longo de toda a raiz foram avaliados após 3 meses de inoculação. A perlite induziu a formação de raízes mais longas e mais ramificadas, morfologia radicular mais adequada para a infecção micorrízica. O meio GD mostrou-se ser mais adequado para o desenvolvimento do sistema radicular e sua micorrização. As implicações fisiológicas e práticas para a implementação dum sistema de produção em massa de plantulas de sobreiro são discutidas.

Efecto del CO₂ e intensidad luminosa sobre el crecimiento fotoautotrófico de plántulas micropropagadas de tabaco

B. Apesteguía, J. Aguirreolea y M. Sánchez-Díaz

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y

Farmacia, Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n,

31008 Pamplona.

El éxito en la micropropagación de plantas depende en gran medida de que, una vez transferidas a condiciones *ex vitro*, sean capaces de adaptarse a los nuevos parámetros ambientales. El deficiente estado hídrico de las plántulas así como el limitado desarrollo de su aparato fotosintético durante el cultivo *in vitro* son los principales impedimentos para una buena aclimatación al ambiente *ex vitro* (Pospíšilová y col. 1992; Baroja y col., 1995). La disminución del CO₂ en el recipiente de cultivo durante el periodo de luz, la baja intensidad luminosa y el alto contenido de azúcar en el medio (condiciones bajo las que normalmente se desarrollan las plántulas *in vitro*) parecen ser los principales factores que limitan su crecimiento.

A fin de demostrar el efecto del aumento en CO₂ e intensidad luminosa sobre el crecimiento fotoautotrófico de los cultivos *in vitro*, se compararon plántulas micropropagadas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Paraguay) crecidas en condiciones estándar (2% sacarosa, flujo fotónico fotosintético de 40 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y baja concentración de CO₂), con otras cultivadas en un medio con 0,5% de sacarosa y sometidas a mayores niveles de intensidad luminosa (125 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y CO₂ (5000 y 15000 ppm). Tres semanas después de haberse aplicado los tratamientos, las plántulas se transfirieron a condiciones *ex vitro*, bajo un PPF de 250 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO₂ ambiente, temperatura de 22°C y fotoperiodo 16/8 horas día/noche y se aclimatizaron durante tres días mediante reducción gradual en la humedad relativa.

A los 21 y 30 días de edad (*in vitro* y *ex vitro* respectivamente), se midieron parámetros de crecimiento (área foliar, pesos secos de raíz, hojas y total, peso foliar específico SLW, y tasas de crecimiento relativo RGR, y asimilación neta NAR). Asimismo, se realizaron curvas de saturación luminosa (a CO₂ ambiente) y de CO₂ (a intensidad luminosa de saturación).

La reducción de la sacarosa en el medio, unida al aumento en la intensidad luminosa y en la concentración de CO₂ estimuló, durante el cultivo *in vitro*, la producción de biomasa total e indujo la formación de hojas más grandes y gruesas. Asimismo, las tasas de crecimiento relativo y asimilación neta de las plántulas crecidas fotoautotróficamente fueron mayores a las observadas en las cultivadas en un medio con concentración de azúcar más elevada. La mayor eficiencia fotosintética de las plántulas desarrolladas con 0,5% de sacarosa (que poseían mayor capacidad fotosintética y puntos de compensación para el CO₂ más bajos), explicaría las diferencias en el crecimiento observadas entre ambos grupos de plantas.

En condiciones *ex vitro*, estas diferencias se mantuvieron aunque fueron mucho menos evidentes. De hecho, durante la aclimatización, se vió fuertemente estimulado el crecimiento de las plántulas cultivadas mixotróficamente. Ello demuestra que las anomalías observadas en estas plántulas durante el cultivo *in vitro* son transitorias, desapareciendo cuando las condiciones de luz y CO₂ se hacen no estresantes.

Pospíšilová J., Solárová J., Catsky J. (1992). *Photosynthetica* 26(1): 3-18.

Baroja E., Aguirreolea J., Sánchez-Díaz M. (1995). *Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures*. (Ed. F. Carre y P. Chagvardieff), pp. 187-188.

Efecto del ión Calcio y del etileno en cultivos indiferenciados de *Silybum marianum* Gaertn. (L.)

M. Cacho, M. Morán, A. Proença da Cunha*, M.T. Batista*
y J. Fdez-Tárrago

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,
Universidad de Salamanca, España. *Laboratório de Farmacognosia,
Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal

En este trabajo tratamos de determinar si la producción de flavonolignanos en cultivos celulares de *S. marianum* se ve influenciada por el ión calcio, como ocurre en *Digitalis thapsi*, y si este posible efecto guarda alguna relación con la síntesis del etileno.

Como material vegetal se utilizó la línea celular SIC, previamente establecida a partir de callos indiferenciados de cotiledón, mantenidas durante un ciclo de crecimiento (18 días) en medio MS completo al que se añadió 0.1 mg/l de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y 0.1 mg/l de Kin. (Kinetina); en el mismo medio sin calcio; y en medio completo con una de las siguientes sustancias: AgNO₃ (10 ó 20 μM) inhibidor de la acción del etileno, 50 μM de CoCl₂ inhibidor de la síntesis de esta hormona vegetal, o 50 μM de etefón (liberador de etileno).

Los cultivos control (línea SIC crecida en medio completo) presentan una cinética de crecimiento sigmoideal, observándose que la liberación de etileno incrementa durante los 4 primeros días, mientras que el contenido de flavonolignanos desciende durante este período. A partir del 4º día la liberación del etileno va disminuyendo ligeramente hasta alcanzar un mínimo a los 18 días coincidente con el máximo contenido de flavonolignanos.

La eliminación del ión calcio en el día 0, reduce el crecimiento pero incrementa de forma importante la producción de flavonolignanos a los 18 días de cultivo (fase estacionaria de crecimiento), sobre todo de la silibina (compuesto más activo). La liberación de etileno se ve también incrementada durante este período.

La adición de etefón disminuye el crecimiento, inhibe casi por completo la síntesis de flavonolignanos e incrementa la liberación del etileno aproximadamente 10 veces. Mientras que la adición de CoCl₂ no afecta al crecimiento, reduce ligeramente la liberación de etileno y disminuye de forma importante la producción de flavonolignanos.

La adición de un inhibidor de la acción del etileno (AgNO₃) al inicio del ciclo de cultivo inhibió la viabilidad casi un 80% así como el crecimiento y la producción de flavonolignanos, mientras que la liberación de etileno se incrementó de forma significativa; si este inhibidor se añadía cuando los cultivos tenían un crecimiento activo (7 días) la liberación de etileno se incrementó ligeramente pero la síntesis de flavonolignanos no varía.

Los resultados obtenidos no parecen indicar una relación directa entre la liberación de etileno y el crecimiento o la acumulación de flavonolignanos, aunque parece necesario un nivel determinado de esta hormona.

Este proyecto ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (SA22/92) y con una beca concedida a M. Cacho por el Ministerio de Asuntos Exteriores (Acuerdo Cultural Luso-Español).

Agradecemos a la Dra. M.T. Amaral de la U. de Coimbra su colaboración en el desarrollo de las técnicas analíticas.

Producción de etileno en cultivos celulares de *Digitalis thapsi* L.

M. Morán, M. Cacho, J. Fdez-Tárrago.

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Salamanca,
Salamanca, España

Cultivos celulares de *Digitalis thapsi* producen etileno en cantidades que varían a lo largo de su ciclo de crecimiento presentando dos máximos, uno al tercer día y el otro al séptimo, para descender a valores inferiores a $1\eta\text{l.g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ al final del período de cultivo.

Cuando las células crecen en presencia de Etefón ($35\ \mu\text{M}$), compuesto que libera etileno, la producción del mismo se mantiene constante y siempre con valores superiores a los de los cultivos control, descendiendo de forma acusada al final del periodo de crecimiento. La adición de este compuesto al medio de cultivo no afectó ni al índice de crecimiento ni a la viabilidad celular.

Al añadir a los cultivos $50\ \mu\text{M}$ de AVG, o $100\ \mu\text{M}$ de CoCl_2 , se inhibe la producción de etileno, no detectándose dicho gas a partir del tercer día de crecimiento. La AVG afectó de forma drástica la viabilidad celular y el índice de crecimiento de las células; por el contrario, el CoCl_2 no afectó a ninguno de estos dos parámetros.

El contenido en etileno aumentó al añadir al medio de cultivo la sal AgNO_3 a concentraciones de 25 y $50\ \mu\text{M}$. Sin embargo, la concentración mayor resultó tóxica para las células, provocando, a partir del tercer día del periodo de crecimiento, la muerte de las células en un porcentaje superior al 80%.

Cuando estos compuestos se añaden al medio de crecimiento de las células en el día siete, y se mantienen en contacto con ellos durante 72 horas, los efectos sobre la síntesis de etileno se conservan iguales a los obtenidos cuando se añaden al iniciar el cultivo. Sin embargo, ni la AVG ni el AgNO_3 reducen de forma tan acusada los parámetros de viabilidad celular e índice de crecimiento.

Evaluación de las relaciones entre especies de *Digitalis* mediante la generación de marcadores RAPD

S.G. Nebauer, J. Segura y L. del Castillo*

Departamento de Biología Vegetal y Departamento de Microbiología y Ecología(*),
Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n,
46100-Burjasot (Valencia)

La mejora genética en especies de *Digitalis* está limitada por la falta de información sobre la diversidad genética intraespecífica. La evaluación de dicha diversidad en estas especies puede ser de utilidad para la selección de genotipos altamente productores de glucósidos cardiotónicos, así como para la conservación del germoplasma. Por su simplicidad y repetitividad, la generación de marcadores RAPD se revela como una técnica adecuada para alcanzar estos objetivos.

Los análisis RAPD se aplicaron a las especies *D. obscura*, *D. lanata*, *D. thapsi*, *D. purpurea*, *D. Dubia* y *D. excelsior*. Se emplearon hojas de plantas crecidas en invernadero. El ADN se extrajo siguiendo el método previamente descrito por del Castillo y col. (1995) para *D. obscura*. Se seleccionaron los oligonucleótidos OPA10, OPB7, OPA13 y OPC5 (Operon), que habían dado un alto grado de polimorfismo en experimentos previos con *D. obscura* (Nebauer y col., 1995). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

El estudio de los patrones de bandas obtenidos demostró la existencia de polimorfismo interespecífico, aunque también se observaron algunas bandas aparentemente comunes a distintas especies, hecho que debe corroborarse mediante análisis de Southern y, eventualmente, de secuenciación.

Dentro de cada especie se observaron bandas características, así como la presencia de bandas polimórficas, lo que demuestra igualmente la existencia de biodiversidad intraespecífica.

Los resultados obtenidos confirman la viabilidad del análisis de marcadores RAPD para estudios posteriores de variabilidad a nivel de poblaciones naturales de especies del género *Digitalis*.

del Castillo Agudo, L., Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P., Segura, J. (1995). *BioTechniques* 18:766-768.
Nebauer, S.G., Gavidia, I., Segura, J., del Castillo Agudo, L., Pérez-Bermúdez, P. (1995). XI Reunión Nacional SEFV. Estoril.

Manipulación de la morfogénesis en pináceas

M.A. Uribe¹, L. Radojevic², M. Albuerne¹, R. Rodríguez¹

¹Unidad de Fisiología Vegetal, Depto. B.O.S. Universidad de Oviedo (España)

²Institute for Biological Research, Sinisa Stankovic, Department for Plant Physiology, Belgrado (Yugoslavia)

Las Pináceas son consideradas especies recalcitrantes a las prácticas convencionales de propagación vegetativa, sin embargo, el cultivo de tejidos ha permitido la micropropagación de plantas, generalmente juveniles. Pero la planta adulta necesita de un proceso previo de "revigorización", como hemos demostrado para la manipulación de adulto de *Pinus nigra* Arn. (Pacheco et al., 1996).

La micropropagación de especies forestales, principalmente a través de rutas organogénicas y embriogénicas a partir de materiales juveniles, se ha logrado en un considerable número de especies, apareciendo la organogénesis como la vía más utilizada en programas de clonación, dada su menor implicación en la inestabilidad genética de los tejidos durante el proceso (García-Férriz et al., 1994).

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos durante el desarrollo de diferentes vías de micropropagación en cuatro especies de Pináceas: *P. caribaea*, *P. nigra*, *P. pinea* y *P. radiata*.

- Caulogénesis adventicia a partir de cotiledones maduros: esta vía de micropropagación se consideró importante por su posible aplicación en programas de transformación génica.

Embriones aislados de *P. pinea* se cultivaron en medios DCR (Gupta y Durzan, 1985) y H-A (Hackman y Arnold, 1985) en presencia de diferentes concentraciones de citoquininas. En los cotiledones se cuantificaron respuestas variables de caulogénesis adventicia, cuyo índice de respuesta varía tanto en función de los medios como de las combinaciones hormonales. En general las respuestas más elevadas se cuantificaron en medio DCR y en condiciones favorables a BA (44,4 µM). La proliferación, elongación y multiplicación organogénica se realizó en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con macroelementos del medio QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), siguiendo la metodología empleada por Pacheco (1995) con algunas modificaciones. El estudio histológico realizado permitió la diferenciación de cuatro modelos caulogénicos.

- Caulogénesis adventicia a partir de otros órganos: meristemos y acículas aislados de *P. nigra* y *P. radiata* se cultivaron en medio DCR en presencia de diferentes concentraciones de citoquininas. Los porcentajes mayores de caulogénesis adventicia se obtienen en las concentraciones más elevadas de citoquininas pudiendo establecerse el siguiente orden de actividad BA > Z > Kn. La transferencia a medios QLPs facilita el desarrollo de las yemas inducidas y favorece la multiplicación caulinar.

- Micropropagación de material juvenil y adulto: se llevó a cabo a través de subcultivos seriados en medio QLP base y medios QLPs conteniendo BA y AIB, durante ciclos consecutivos de 45 días, de la siguiente manera: a) QLP1-QLP2-QLP, b) QLP2-QLP1-QLP

Tras estas tres secuencias se obtuvieron rendimientos específicos de proliferación. Siendo el medio con la concentración más baja de BA (4,44 μM) el que facilitó el mayor grado de proliferación de yemas axilares, presentando los mayores porcentajes de índice de proliferación. El aumento de BA disminuyó significativamente los rendimientos de proliferación de tallos. El medio base además de facilitar la elongación de los microtallos, promovió el proceso de proliferación de yemas cuando fue utilizado durante la fase de desarrollo.

Financiado por: Relaciones Internacionales, Universidad de Oviedo.
CE-96-FAIR-CT-1445.

Consumo de macronutrientes durante el cultivo vitropónico de *Populus tremula* L.

M.A. Fal, M.J. Cañal, R. Sánchez Tamés

Lab. Fisiología Vegetal, Dpto. B.O.S., Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático R. Uría s/n, 33071-Oviedo

Con el fin de racionalizar la gestión de nutrientes, como parte del proceso de optimización del cultivo vitropónico de *Populus tremula* L. (chopo), se aborda el estudio del consumo de macronutrientes de segmentos nodales de chopo cultivados en urnas ventiladas Sorbarod (SIGMA, S.A.) sobre soportes de celulosa, empleando medio líquido MS modificado, sin sacarosa (condiciones de cultivo fotoautotrófico) o con 15 ó 30 g/l de sacarosa (cultivo fotomixotrófico).

El análisis de los macronutrientes en forma de aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- y HPO_4^{2-}) presentes en muestras de medio tomadas al inicio y al final del cultivo (36-39 días) se realizó por electroforesis capilar iónica (CIA, Waters Cromatografía SA) basándonos en el método 601A propuesto en el manual de instrucciones del equipo, incluyendo en la programación del método de análisis un ciclo de lavado después de cada inyección, consistente en la limpieza del capilar con hidróxido de litio 100mM durante 2 minutos, seguido de un aclarado con agua de Milli-Q durante 1 minuto, reequilibrando posteriormente el capilar con electrolito antes de realizar la siguiente inyección.

Los resultados obtenidos podrían resumirse como sigue:

En concordancia con los resultados publicados para *Malus*, *Pirus* (Singha et al., 1987) y *Actinidia* (Mezzetti et al., 1991) el anión más consumido por *Populus* fue el fosfato, aunque aun así al final del cultivo todavía se detectó en el medio entre un 30 y un 40% de la cantidad inicial. Además, la cantidad de nutrientes presente en el medio al final del experimento indicó claramente que ninguno de los analizados se agotó durante el cultivo.

En algunos trabajos sobre nutrición *in vitro* (Dussert et al., 1995) se cita que la concentración de cloruro y potasio en el medio apenas varía a lo largo del cultivo, lo que se justifica porque dichos iones podrían ser tanto absorbidos como excretados al medio por los explantos, compensando así la carga iónica global del medio de cultivo. Sin embargo, en nuestro caso ni el cloruro ni ninguno de los otros aniones estudiados pareció comportarse de ese modo.

En cuanto a las principales diferencias obtenidas en función de la presencia o ausencia de sacarosa cabe destacar que los problemas de crecimiento en las urnas en condiciones de cultivo autotrófico se correspondieron con un menor consumo de todos los aniones estudiados. Sin embargo, al ser muy elevada la incidencia de necrosis, no podemos afirmar que los explantos desarrollados en condiciones fotoautotróficas hayan consumido menos nutrientes que en presencia de azúcar en el medio. Por otro lado, al comparar las dos condiciones de cultivo mixotrófico hemos observado que una reducción en la concentración de sacarosa en el medio lleva asociado un incremento en el consumo de fosfato, en concordancia con los resultados publicados para cultivos de fresa por Kozai

et al. (1991), aunque en nuestro caso el fósforo no llega a agotarse, probablemente debido a que la concentración inicial de este anión en el medio es más alta (el doble) que la empleada por Kozai et al (1991).

Dussert, S.; Verdeil, J-L; Rival, A.; Noirot, M.; Buffard-Morel, J. 1995. *Plant Sci.* 106: 185-193.

Kozai, T.; Iwabuchi, K.; Watanabe, K. & Watanabe, I. 1991. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 107-115.

Mezzetti, B.; Rosati, P. & Casalicchio, G. 1991. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 91-98

Singha, S.; Oberly, G.H. & Townsend, E.C. 1987. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 209-220.

Pauta de aplicación de BA al medio de cultivo y respuesta morfológica en explantos de *Actinidia deliciosa* cultivados *in vitro*

P. Moncaleán, M.J. Cañal, A. Rodríguez, I. Feito y B. Fernández

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Unidad de Fisiología Vegetal,
Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo

La excesiva concentración de BA en el medio de cultivo puede ser perjudicial para el crecimiento de los tallos y la expansión de las hojas (Dunstan et al., 1985), además de promover la hiperhidratación (Bornman y Vogelmann, 1984). La aplicación puntual de BA frente a su presencia continuada, minimiza la aparición de los efectos nocivos relacionados con esta citoquinina.

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la aplicación de pulsos de BA en la respuesta morfológica de explantos de *Actinidia deliciosa* cultivados *in vitro*.

Como material vegetal se utilizaron segmentos nodales formados por la yema apical y tres axilares. Los explantos se cultivaron en medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se añadió sacarosa (2 %, p/v), GA₃ (0,6 µM) y 8-[¹⁴C]BA (actividad específica 2.0 GBq mmol⁻¹, Amersham International), para dar una actividad de 14,8 KBq. El resto de BA, hasta completar la concentración de 4.4 µM, se añadió fría. Como soporte de los explantos se utilizaron tapones de celulosa.

Los explantos se cultivaron en este medio durante 4, 8 y 15 días, transcurridos los cuales eran transferidos a medio MS modificado. Este fue formulado de acuerdo a la estimación del consumo de macronutrientes llevado a cabo por los explantos durante los períodos mencionados. La estimación se realizó recogiendo el medio de cultivo en dichos días y valorando los aniones y cationes en un equipo de electroforesis capilar iónica (CIA- Waters Cromatografía, S.A.), conectado a un sistema de adquisición y proceso de datos (Millennium 2010 versión 2.1.) y empleándose un capilar de sílice fundido de 75 µm x 60 cm. Como control se utilizaron explantos del mismo tipo cultivados durante 35 días en el medio anteriormente citado. Transcurrido este período se analizó el porcentaje de supervivencia, y en los explantos vivos se valoraron el nº de tallos por explanto, el nº de éstos hiperhídricos, la presencia o no de callo y de raíces, así como la morfología de las hojas.

Bornman C.H. y Vogelmann T.C. 1984. *Physiol. Plant.* 61: 505-512.

Dunstan D.L., Turner K.E. y Lazaroff W.R. 1985. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 55-60.

Murashige T. y Skoog F. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Radicales libres y capacidad rizogénica en tejidos cotiledonares de nogal

M.A. Gea¹, E.E. Benson², M.J. Cañal¹, R. Rodríguez¹

¹Unidad de Fisiología Vegetal, Dpto. B.O.S., Univ. de Oviedo, Spain

²School of Molecular and Life Sci., Univ. of Abertay Dundee, Scotland

Para facilitar la comprensión real del proceso rizogénico, tan ligado a factores de edad y desarrollo, se seleccionó, como material vegetal, semillas de *Juglans regia* L. var. Serr, recolectadas en IRTA (Reus, Tarragona) en Septiembre de 1995. Los tejidos fueron cultivados en un medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) diluido a la mitad (medio base) al que se le añadió IBA 25 μ M (medio rizogénico). Los segmentos utilizados fueron: a) Ligamentos cotiledonares (LC), segmentos que rodean al embrión; b) Porciones cotiledonares (PC), fracciones obtenidas del corte transversal de los lóbulos cotiledonares. La principal característica de este sistema, es su homogeneidad tisular, lo que permite una manifestación radicular máxima. Por otro lado, nos permite utilizar porciones de distinta capacidad rizogénica en función de su proximidad al eje embrionario.

Los LC cultivados en medio base (MB) desarrollan una rizogénesis predeterminada, originando un programa rizogénico espontáneo. Cuando estos explantos son cultivados en presencia de auxinas (MR), se anula la manifestación rizogénica preformada, siguiéndose un programa inducido. La rizogénesis de las PC es inducida, siendo su competencia rizogénica inferior a la de los LC debido no sólo a su estado fisiológico si no a su organización tisular (Ríos, 1996. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo).

Tras 20 días de cultivo, el potencial rizogénico de las semillas, varía en función del período almacenamiento a 4°C al que fueron sometidas. La pérdida de competencia rizogénica fue cuantificada mediante porcentajes de enraizamiento. Estos descendieron desde 95.3-55.3% a un 10.6-0% tras 9 meses de almacenamiento.

Se ha cuantificado la expresión de las actividades enzimáticas antioxidantes: peroxidasa (PO, EC 1.10.3.1), catalasa (CAT, EC: 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1) y glutatión reductasa (GR, EC. 1.6.4.2). También se ha valorado el contenido en glutatión de los tejidos y los niveles de lipoperóxidos y aldehídos de degradación.

En semillas sometidas a largos períodos de almacenamiento, las actividades PO, CAT y GR, no muestran una actividad detectable durante todo el proceso rizogénico. Tampoco existen elevados niveles de glutatión, lo que se traduciría en una baja capacidad de mantener bajo control los radicales libres producidos en su metabolismo oxidativo. Si bien se muestra apreciable la actividad SOD, ésta no se activa antes de los 15 días de cultivo, cuando los daños causados por el ataque de los radicales ya podrían ser irreversibles, lo que justificaría el fuerte descenso de la competencia rizogénica. Así quedó de manifiesto durante el análisis del contenido en lipoperóxidos y aldehídos de degradación, mostrando niveles muy superiores a los esperados para tejidos de mayor competencia rizogénica.

Driver, J.A.; Kuniyuki, A.H. 1984. *Hortscience* 19: 507-509.

Financiación: AIR3-CT92-0132, DGICYT-UE95-0027 Y FICYT 2º Plan Regional de Investigación (Programa de Ayudas Predoctorales-97).

Estado de desarrollo y metilación del DNA genómico en Pináceas

M. F. Fraga, B. Berros, M. Uribe y R. Rodríguez*

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático Rodrigo Uría, E-33071-Oviedo, España

*Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA)

La determinación de indicadores moleculares o fisiológicos relacionados con la competencia morfogénica en especies forestales se considera un aspecto primordial en la determinación de pérdida de potencial morfogénico, y en general de la capacidad de regeneración, que está condicionada en gran medida por el estado de desarrollo.

El estado ontogénico depende en último término de la regulación de la expresión génica. Uno de los mecanismos más importantes descritos, implicados en esta regulación, es el control de la expresión mediante metilación "sitio-específica" del DNA. Teniendo en cuenta estos aspectos, la valoración del estado de metilación del DNA genómico en función de la competencia morfogénica, condicionada por el estado de desarrollo, constituye una estrategia eficaz en la búsqueda de marcadores moleculares de cambio de fase.

En programas anteriores desarrollados por nuestro grupo de investigación ("European development on walnut tress for wood and fruit production as alternative and extensive system"), en primer lugar se han puesto de manifiesto las diferencias en el estado de metilación "sitio-específica" del DNA genómico de tejidos de *Junglans regia L.* mantenidos o no, en cultivo "in vitro"; comparando la distribución de bandas del DNA genómico después de haber sido sometido a digestión con enzimas de restricción sensibles a bases metiladas tales como Hpa I y Eco R II.

Mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han obtenido porcentajes de metilación en el DNA genómico de tejidos en distintos estados de desarrollo de *Junglans regia L.* y *Corylus avellana L.*; sin embargo no se han encontrado resultados tan concluyentes como en experimentos anteriores debido a la variabilidad experimental implícita en los procesos de extracción del DNA genómico de tejidos vegetales.

Dentro del proyecto "Development, validation and application of molecular, morphological and physiological markers for juvenile and mature state characteritacion in woody plant species", nuestro grupo de investigación aborda estudios de metilación "sitio-específica" mediante el análisis de los patrones de distribución de bandas del DNA genómico después de ser digerido con enzimas de restricción sensibles a bases metiladas y determinando los porcentajes globales de metilación del DNA mediante cromatografía líquida de alta resolución. Las muestras analizadas pertenecen a individuos de diferentes edades seleccionados de plantaciones de *Pinus radiata D. Don.* (CIMA, País Vasco), a fin de poner de manifiesto diferencias en el grado de metilación del DNA genómico relacionadas con el estado de desarrollo.

Las variaciones observadas en la metilación "sitio-específica" del DNA genómico están a su vez relacionadas con los niveles de algunos reguladores endógenos estudiados,

tales como poliaminas, etileno, etc. Lo que pone de manifiesto la integración del metabolismo vegetal con procesos epigenéticos implicados en el control de la expresión génica. Se presentarán los resultados expuestos, así como las conclusiones a las que permitan llegar los análisis de los materiales que en la actualidad están en desarrollo.

Financiado por CE-96-FAIR3-CT-1445.

Edad cronológica y manipulación de la organogénesis en Pináceas

M.F. Fraga, J. Pacheco, B. Fernández, M.L. Centeno y R. Rodríguez*

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático Rodrigo Uría, E-33071-Oviedo, España

*Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA)

La obtención de especies forestales mejoradas genéticamente, es un proceso lento, basado en los pequeños avances obtenidos en programas de selección.

Determinado un árbol "plus", es deseable la producción de individuos genéticamente iguales, y la única forma efectiva de conseguirlo es vía micropropagación vegetativa. En la mayoría de las especies leñosas de interés, esto solo es posible con individuos juveniles, ya que en fase adulta se comportan como recalcitrantes para micropropagación y enraizamiento. Por todo ello, la micropropagación vegetativa de tejidos maduros implica el rejuvenecimiento a través de rebrotes epicórmicos, o rebrotes producidos mediante poda severa, procesos de desarrollo escaso en el caso de Pináceas.

En nuestros programas biotecnológicos sobre Pináceas ("Upgrading of southern pines" y "Development, validation, and application of molecular, morphological, and physiological markers for juvenile and mature state characterization in woody plant species"), en primer lugar, se han determinado las condiciones adecuadas para la revigORIZACIÓN de material adulto de *Pinus nigra Arn.* definiéndose las condiciones de cultivo y manejo que permiten la revigORIZACIÓN de material adulto mediante homo y heteromicroinjertos monofásicos. Durante el desarrollo de dichos sistemas los análisis de poliaminas en portainjerto y púa pusieron de manifiesto la participación de estas aminas biógenas en las diferentes fases de la consolidación del microinjerto y en los efectos revigorizantes que tiene el portainjerto sobre la púa.

El manejo de explantos derivados de individuos de diferentes edades seleccionados de plantaciones de *Pinus radiata D. Don.* (CIMA, País Vasco) ha permitido constatar la diferente capacidad organogénica de tejidos pertenecientes a árboles que se encuentran en distinta fase de desarrollo; mientras que explantos obtenidos a partir de progenies de cuatro años de edad son susceptibles de generar respuestas directamente "in vitro" y vía microinjerto, materiales adultos seleccionados sólo son capaces de presentar respuesta tras un proceso revigorizante, en el que la naturaleza del patrón impone mayor o menor grado de reactivación celular.

La manipulación de individuos sometidos a macroinjertos en cascada, revela que el grado de revigORIZACIÓN "ex vitro", facilita la implantación directa "in vitro", así como la consolidación de microinjertos de púas que han sido reactivadas previamente. Se presentarán los resultados expuestos y diferentes aspectos moleculares relacionados con el envejecimiento cronológico y procesos de revigORIZACIÓN.

Reguladores endógenos en explantos foliares de *Corylus avellana* L. en relación con su potencial embriogénico

M.L. Centeno, R. Rodríguez, B. Berros y A. Rodríguez
Lab. Fisiología Vegetal, Dpto. B.O.S., Fac. Biología, Univ. Oviedo,
C/ Catedrático Rodrigo Uría, s/n, 33071 Oviedo

La obtención de embriones somáticos a partir de tejidos cultivados de especies leñosas presenta numerosas dificultades. Entre otras, el proceso queda restringido, por lo general, a explantos que inicialmente muestran crecimiento activo y escasa diferenciación. El contenido hormonal de los mismos es un reflejo de su edad, genotipo, origen y estado de desarrollo. Por otro lado, de entre los factores de cultivo que afectan a la inducción de la embriogénesis somática, el tipo y la concentración de los reguladores del crecimiento aplicados resultan claves. Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo de este trabajo es establecer una relación entre el contenido hormonal de explantos foliares de *Corylus avellana* L. de diferente origen (cigótico o somático) y grado de diferenciación (maduros o inmaduros) con su diferente potencial embriogénico.

El análisis de ácido indol-3-acético (ALA), ácido abscísico (ABA) y citoquininas se realizó, por triplicado, siguiendo la metodología descrita por Fernández et al. (1995). Para ello se extrajeron 100 mg de peso seco de los siguientes materiales:

- a) hojas de origen cigótico y aspecto juvenil (maduras)
- b) hojas de origen cigótico y aspecto cotiledonar (inmaduras)
- c) hojas cotiledonares de origen somático

Los materiales **a** y **b** procedían de semillas de avellano var. Casina germinadas *in vitro*, de modo que algunas de ellas dieron lugar a fenotipos maduros (desarrollo juvenil), y otras a fenotipos inmaduros (desarrollo precoz). De ambos fenotipos se aislaron segmentos nodales que se cultivaron en medio T (Tulecke y McGranahan, 1985), el cual contenía 9 μM de kinetina (K), 5 μM de 6-benciladenina (BA) y 0.05 μM de ácido indol-3-butírico (IBA). Tras 40 días, a partir del desarrollo de las yemas se obtuvieron microtallos con hojas juveniles (**a**), o bien tallos precoces con hojas de aspecto cotiledonar (**b**). El aislamiento y subcultivo de las hojas **b** en medio T dio lugar a respuestas embriogénicas (32.73%), hecho que no ocurrió con las hojas **a**. El cultivo sucesivo en medio T de las hojas cotiledonares de embriones somáticos (**c**) obtenidos de este modo dio lugar a un aumento del potencial embriogénico (54.34%, 5^o subcultivo) (Berros 1996).

El análisis de reguladores en **a**, **b** y **c** demostró que:

1- El contenido en ABA fue característico del estado de madurez y grado de diferenciación de los explantos foliares, siendo doble en hojas juveniles (**a**) que en hojas cotiledonares (**c**) o de aspecto cotiledonar (**b**).

2- Hubo una relación directa entre el contenido en ALA de los explantos foliares y su potencial embriogénico, siendo mayor en **c** que en **b** y a su vez mayor que en **a**.

3- Los niveles endógenos de citoquininas, principalmente de isopenteniladenina, zeatina y su 9-ribósido, aumentaron con el tiempo de cultivo en medio T, lo que probablemente

te estuvo relacionado con la elevada concentración de K y BA en el mismo. Así, el contenido total en citoquininas fue el doble en **c** que en **a** y **b**, pudiendo asociarse también al mayor potencial embriogénico de los explantos **c**.

4- El balance endógeno citoquininas/ABA, y sobre todo la relación AIA/ABA parecen ser dos buenos índices fisiológicos de la competencia embriogénica de explantos foliares de avellano obtenidos *in vitro*.

Berros B (1995). Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo.

Fernández B, Centeno ML, Feito I, Sánchez-Tamés R, Rodríguez A (1995). *Phytochem. Anal.* 6, 45-54

Tulecke W y MacGranahan G (1985). *Plant Sci.* 7, 301-304.

Absorción de BA y nutrición en cultivos ventilados de explantos de kiwi

P. Fernández-López, B. Fernández y M.J. Cañal

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, U. de Fisiología Vegetal,
Universidad de Oviedo, C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo

El empleo de medios de cultivo líquidos, conlleva la aparición de efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de los explantos siendo el más perjudicial es la aparición de hiperhidratación en los mismos. Por ello, además de controlar las condiciones ambientales del recipiente, es necesario llevar a cabo una redefinición de los medios de cultivo (incluyendo nutrientes minerales y fuente de carbono) y realizar un control más estricto sobre el aporte de fitohormonas, ajustándolos a las necesidades del explanto. En este sentido, una vez conocido el comportamiento de los explantos en cuanto a estos parámetros en recipientes sin ventilación (Feito et al., 1995), el objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de los mismos una vez que introducimos ventilación en los recipientes, con el fin de optimizar el medio de cultivo para estas condiciones ambientales.

Como material vegetal se utilizaron segmentos nodales de kiwi (*Actinidia deliciosa*) formados por la yema apical y 3 axilares. Los explantos se cultivaron en medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se añadió sacarosa (2% p/v), GA₃ (0,6 µM) y 8-[¹⁴C] BA (actividad específica 2,0 GBq mmol⁻¹ (Amersham International) para dar una actividad de 14,8 KBq. El resto de BA, hasta completar la concentración de 4,4 µM se añadió fría. Como soporte de los explantos se emplearon tapones de celulosa (Sorbarod, Baumgartner Papiers S.A., Laussane, Suiza) y los recipientes de cultivo fueron cajas MagentaTM GA7 (Sigma S.A.) provistas de un tapa de polipropileno con un filtro de 10 mm de 0.22 µm de poro.

Los explantos se cultivaron durante 35 días, tomándose muestras del medio de cultivo a los siguientes tiempos: 30 min, 1 h, 2 h, 8 h, 16 h, 24 h, 15 días y 35 días, siendo almacenadas en alícuotas a -20°C hasta su posterior análisis. Posteriormente, se procesaron para el análisis de la evolución del consumo de macronutrientes, sacarosa y BA presentes en el medio inicial. El análisis de macronutrientes se realizó mediante el empleo de electroforesis capilar iónica (CIA, Waters Cromatografía S.A.). En cuanto al consumo de la fuente de carbono (sacarosa), se evaluó tanto el contenido de sacarosa que permanecía en el medio de cultivo, como la presencia de glucosa y fructosa debidas a la hidrólisis de la sacarosa tras el autoclavado del medio como a la actividad de los explantos. Para el análisis de las muestras se empleó el kit de Boehringer-Mannheim S.A. para la valoración de sacarosa/glucosa/fructosa muestra. La absorción de BA se evaluó de forma indirecta realizándose la medida del porcentaje de radiactividad que permanece en el medio en los periodos de cultivo estudiados.

Feito I., Rodríguez A., Centeno M.L., Sánchez Tamés R. y Fernández B. 1995. *Physiol. Plant.* 95: 241-246.
Murashige T y Skoog F. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Financiado por DGE PB 95-1045.

Influencia del etileno y CO₂ sobre la organogénesis *in vitro* de *Populus tremula* L.

L. Arigita, R. Sánchez Tamés, A. González

Lab. Fisiología Vegetal, Dpto. BOS, Facultad de Biología,

Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071, Oviedo. Asturias

El crecimiento y la diferenciación de tejidos vegetales *in vitro* pueden verse afectados por las sustancias volátiles acumuladas en los recipientes de cultivo dependiendo del tipo de cierre utilizado. De todos ellos destacan por su importancia el etileno y CO₂. Aunque las respuestas fisiológicas relacionadas con estos gases han sido bien estudiadas, todavía no se conoce la relación entre el efecto del etileno producido y acumulado en la atmósfera del recipiente de cultivo en relación con el CO₂ y con los procesos organogénicos *in vitro*.

Los niveles de estos gases fueron manipulados mediante la colocación de trampas en el interior de los recipientes con el fin de eliminar tanto el etileno (perclorato de mercurio) como el CO₂ (hidróxido potásico). Igualmente se estudió el efecto de atmósferas ventiladas mediante el cultivo del material vegetal en recipientes cerradas con tapas provistas de un filtro que permite mantener la concentración atmosférica de CO₂ (300 ppm) y facilita la difusión al exterior del etileno.

El material vegetal se cultivó en un medio MS, enriquecido en azúcar y solidificado con agar, en atmósfera libre de etileno en unos casos y libre de CO₂ en otros. En ambos casos se produjo un notable acortamiento en la longitud de los explantos y un menor número de yemas con respecto al control (cultivado en un recipiente cerrado con tapa de polipropileno sin filtro). Así pues, parece que la ausencia de estos gases afecta al desarrollo y elongación de los tallos.

En el caso de los cultivos ventilados, la reducción de la organogénesis fue más acusada, encontrándose diferencias con los anteriores tratamientos tanto en la longitud del tallo como en el número de yemas. Parte de la inhibición observada puede ser debida a las condiciones de estrés hídrico al que se ven sometidos los explantos por la mayor tasa de desecación del medio y la baja humedad ambiental.

Puesto que no se desarrollaron raíces en ninguno de los tratamientos, al contrario de lo que ocurre en el control, donde sí aparecen raíces, se realizó un estudio histológico de la zona basal de los tallos crecidos en los distintos ambientes. En el estudio de tallos cultivados en atmósfera libre de etileno se observaron numerosos primordios radiculares que nunca se desarrollaron a raíces, mientras que los tallos cultivados en atmósferas sin CO₂ y atmósferas ventiladas no presentan ninguna formación meristemática que nos indique un posterior desarrollo de primordios y raíces.

Cuando los explantos se cultivaron en condiciones de ventilación y en presencia de ACC, precursor del etileno en su ruta de biosíntesis, se obtuvieron más yemas y de mayor longitud que en el control ventilado. AVG, inhibidor de la ACC-sintasa, inhibió estos mismos parámetros. CEPA, compuesto que libera etileno a la atmósfera de cultivo, no tuvo

efectos sobre la organogénesis en este tipo de recipientes con ventilación, encontrándose valores similares a los medidos en el control.

Por otra parte, también se está estudiando la influencia que sobre el crecimiento y diferenciación de los explantos ejercen atmósferas enriquecidas en CO_2 (600 ppm) y en etileno (6 ppm). Para ello se hace pasar un flujo de aire de las características citadas durante todo el período de cultivo.

Caracterización de raíces de tabaco portadoras de diferentes fragmentos del TL-DNA de *Agrobacterium rhizogenes* A4

M.T. Piñol, J. Palazón, C. Morales, E. Moyano y C. Roig

Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona,
Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona

Introducción. Recientemente, hemos obtenido raíces de tabaco transgénicas para los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* del TL-DNA del plásmido Ri de *A. rhizogenes* A4, y hemos caracterizado a estas raíces atendiendo a su morfología, proporción de crecimiento y capacidad para formar nicotina (Palazón y col., 1997). Aquí, con el objeto de aportar información acerca del posible papel de otros genes localizados en el Ri TL-DNA, se describe el efecto sobre los parámetros indicados de la presencia de los tres genes *rol* (A, B y C) junto a aquella del ORF8 o de los ORFs13+14. Los segmentos de TL-DNA que incluyen a estos tres ORFs están altamente conservados en el T-DNA de todos los plásmidos Ri (Capone y col., 1989). Los resultados se comparan con los obtenidos para las raíces transgénicas para los tres genes *rol* y las raíces transformadas por *A. rhizogenes* A4 (raíces transformadas de tipo silvestre).

Materiales y Métodos. El establecimiento y cultivo de las raíces transgénicas y transformadas de tipo silvestre se realizó según se describe en Palazón y col. (1997). En el caso de las raíces transgénicas se utilizaron las construcciones: pPCV002(ABC) (raíces portadoras de los genes *rol*(ABC); pMOBI6(ABC+8) (raíces portadoras de los genes *rol*ABC y el ORF8), y pPCV002(ABC)/pBIN19(13+14) (raíces portadoras de los genes *rol*ABC y los ORFs13+14). La naturaleza transformada y/o la presencia de los genes considerados se determinó por hibridación Southern, utilizando como sonda los correspondientes fragmentos *EcoRI* y según se detalla en Piñol y col. (1996). La determinación del contenido alcaloídico se realizó según se describe en Palazón y col. (1997).

Resultados. Los resultados de la hibridación Southern confirmaron, en cada caso, la presencia en el genoma de las líneas de raíces transgénicas y transformadas de tipo silvestre de los genes del Ri TL-DNA esperados. Estas líneas presentaron considerables diferencias en su morfología, proporción de crecimiento y capacidad para formar nicotina. Las líneas portadoras a la vez de los genes *rol*ABC y los ORFs13+14 mostraron la más alta proporción de ramificación y consecuentemente de crecimiento, seguidas por orden de las líneas portadoras de los genes *rol*ABC+ORF8, de las líneas transformadas de tipo silvestre, y de las líneas portadoras de sólo los genes *rol*ABC. Contrariamente, la producción alcaloídica fué significativamente más alta ($p < 0,001$) en estos dos últimos tipos de líneas. Respecto a las líneas transformadas de tipo silvestre y las transgénicas para los genes *rol*ABC, la presencia del ORF8 redujo respectivamente la producción alcaloídica en hasta un 56 y 50%, y aquella de los ORFs13+14 en respectivamente hasta un 46 y 39%. Estos resultados en su conjunto sugieren, que si bien los productos de expresión de los tres ORFs considerados estimularon la producción de biomasa de las raíces, también afectaron negativamente a la diferenciación bioquímica necesaria para la formación de nicotina; todo ello posiblemente a través de afectar directa o indirectamente al balance hormonal de las raíces.

Cultivo de embriones somáticos de *Quercus ilex* L. en cuatro medios nutritivos tanto en medio líquido como en sólido. Comparación de resultados

P.V. Mauri, G. García y E. Fernández-Galiano

Servicio de Investigación Agraria, Consejería de Economía y Empleo,

Comunidad de Madrid, Finca El Encín, Apdo. 127, 28800

Alcalá de Henares (Madrid). e-mail = encpvma@encin. alcala.es

El objetivo de nuestro trabajo, es mejorar los factores limitantes del cultivo en medio sólido (medio solidificado con agar) de embriones somáticos de encina: el bajo número de embriones somáticos maduros obtenido y disminuir el trabajo en la separación de los embriones somáticos en las labores de repicado.

Dentro de las especies trufíferas más productivas se encuentran el *Quercus ilex* L. Estos árboles nos proporcionan la posibilidad de obtención de setas de alto valor comercial como la trufa; en la capacidad de micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt. Las poblaciones naturales de encina presentan una gran variabilidad, tanto cuantitativa como cualitativa, respecto a su micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt., que nunca ha sido aprovechada por el hombre. Este hecho, junto a la gran dificultad de su reproducción vegetativa, nos ha llevado a la mejora de su cultivo mediante la embriogénesis somática.

Embriones cigóticos inmaduros son utilizados para inducir embriogénesis somática en *Quercus ilex* L. La respuesta de embriogénesis somática aparece incluso en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento. Posteriormente se transfieren los embriones somáticos a un medio libre de reguladores de crecimiento, y la embriogénesis secundaria aparece repetidamente. En la embriogénesis secundaria aparece una continua producción de embriones somáticos que nos servirán para obtener grandes cantidades de plantas clonales; cuando se ponga a punto el protocolo de germinación de dichos embriones.

En este trabajo se cultivan embriones somáticos inmaduros de 4 mm. de longitud que son cultivados durante 30 días en 4 diferentes medios de cultivo: 1/2SH, SH, 2SH y MS, tanto en medio líquido (se repicó el material a medio fresco a los 15 días) y como en sólido. Después de 30 días de cultivo se tomaron los datos correspondientes al número de embriones que mostraban embriogénesis recurrente, maduración de embriones y el peso fresco de los embriones. Los resultados se estudiaron mediante una ANOVA. El peso fresco es más alto en los cuatro medios líquidos que en los sólidos. En el medio sólido SH aparece más embriogénesis secundaria y en el medio 1/2SH maduran más los embriones somáticos. Sin embargo en el medio líquido aparece embriogénesis secundaria en el medio 1/2SH aunque maduran también mejor que en los otros medios de cultivo.

Efecto de las distintas concentraciones de sacarosa y ABA en la maduración de embriones somáticos de alcornoque (*Quercus suber* L.) cultivados en medio líquido

G. García-Martín., E. Fdez-Galiano y P.V. Mauri
Servicio de Investigación Agraria, Comunidad de Madrid,
"El Encín", Apdo. 127, Alcalá de Henares, 28800 Madrid

El objetivo de este grupo de ensayos fue acercarnos a la obtención de un protocolo de cultivo *in vitro*, en medio líquido, de embriones somáticos de alcornoque que permitiera, por un lado, controlar de forma efectiva la incidencia de embriogénesis secundaria durante el cultivo y, por otro lado, dar un primer paso hacia la automatización del mismo, con la consiguiente disminución en el coste.

Una vez determinados el tipo de medio nutritivo más adecuado en cada una de las dos fases del proceso de maduración de los embriones, se procedió a estudiar la influencia de las distintas concentraciones de sacarosa, así como el efecto de la adición de distintas concentraciones de ABA, en cada una de las dos fases.

Basándonos en los datos de un ensayo realizado previamente se estudiaron concentraciones de sacarosa de 15 - 30 - 60 - 90 g/l durante la fase de división y expansión celular, mientras que durante la fase de acumulación de materia seca, se estudiaron concentraciones de 30 - 90 - 150 - 210 g/l. A partir de los resultados obtenidos con la aplicación de distintas concentraciones de ABA durante la maduración de embriones somáticos de alcornoque en medio sólido, se estudiaron las concentraciones de 10^{-7} M, 10^{-6} M y 10^{-5} M comparándolas con un control en las dos fases del proceso de maduración.

En relación a la concentración de sacarosa, se detectó que el óptimo, según nuestros datos, se situó en 15 g/l. para la primera fase de maduración. Con esta concentración de sacarosa se consiguió controlar casi totalmente la aparición de embriogénesis secundaria y los embriones, que se mantuvieron translúcidos, alcanzaron un tamaño mayor. En la segunda fase el mejor tratamiento resultó ser el de 90 g/l aunque los resultados no fueron significativamente diferentes de los tratamientos con 30 y 150 g/l. Con esta combinación se consiguió controlar los procesos de embriogénesis repetitiva y se obtuvieron embriones de tamaño y coloración adecuadas.

En el caso de la adición de ABA al medio de maduración se obtuvieron resultados muy diferentes a los logrados durante el cultivo en medio sólido. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de embriones maduros obtenidos en ninguna de las dos fases estudiadas. El único efecto observado que resultó significativo fue el aumento del porcentaje de embriones que permanecieron inmaduros durante la primera fase del proceso de maduración.

Estudio histológico, morfológico y ultraestructural de la embriogénesis somática en pétalos de *Araujia sericifera*

E. Fernández, L. Moyssset, J.M. Torné y E. Simón

Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Fisiología Vegetal,
Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 645, 08028 Barcelona

La embriogénesis somática es característica de las plantas superiores y se considera como el desarrollo de una estructura bipolar organizada, bien sea directa o indirectamente, a partir de una única célula.

En este trabajo se ha estudiado los cambios estructurales y ultraestructurales asociados a la embriogénesis somática a partir de pétalos de *Araujia sericifera* cultivados durante 40 días en medio nutritivo MS modificado según Torné y col. (1996) a 25°C y con un fotoperiodo 8:16 (90-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Periódicamente segmentos de la parte basal del pétalo se fijaron en 2% paraformaldehído-2,5% glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% y se deshidrataron mediante una serie de concentraciones crecientes de acetona. El material destinado para ser observado por microscopía óptica y electrónica de transmisión se incluyó en Spurr. El destinado para su observación por microscopía electrónica de barrido se secó mediante el punto crítico.

La embriogénesis somática es asincrónica, ya que se observan embriones de diferente tamaño y en diferentes etapas del desarrollo en una misma sección. Mediante microscopía de barrido se observa la proliferación de callos a partir de los bordes del explante y, entre éstos, se visualizan embriones.

La embriogénesis es precedida por un incremento de grosor de los pétalos, claramente visible a los cuatro días de cultivo, seguido por una importante proliferación de las células parenquimáticas, reducción de los espacios intercelulares y aumento de tamaño de algunas células. Todos estos cambios van asociados con una marcada alteración de las epidermis. Los tricomas pierden turgencia y disminuyen de tamaño y número. Los embriones somáticos se originan a partir de una célula parenquimática y son visibles a partir de los 17 días del inicio del cultivo. Quedan totalmente aislados del tejido que los envuelve por un engrosamiento de la pared de las células adyacentes y no se observan conexiones vasculares entre el explante y el embrión. En algunos casos estas zonas de elevada proliferación celular entre las que se encuentran los embriones emergen a través de alguna de las dos epidermis y esto permite encontrar embriones libres.

Las células del embrión difieren de las parenquimáticas por su tamaño y ultraestructura. El embrión está formado por células poliédricas con paredes delgadas y un citoplasma denso, altamente granular, con numerosos orgánulos sobretodo pequeñas vacuolas, mitocondrias y, en algunos casos, amiloplastos. El núcleo de gran tamaño contiene un voluminoso nucléolo. No se han visualizado grandes espacios intercelulares.

A los 38 días de cultivo los embriones presentan simetría bilateral. En uno de sus polos se distinguen células meristemáticas, de pequeño tamaño y con el citoplasma densamente teñido. Las células del polo opuesto son de mayor tamaño, univacuoladas y carecen de actividad meristemática. En la zona central se observan vasos.

Efecto del fotoperiodo en la biosíntesis de poliaminas y en la actividad TGasa durante la diferenciación de callos meristemáticos de maíz

I. Claparols, E. Bernet, L. Dondini*, M. Santos, J.M^a Torné y
D. Serafini-Fracassini*

Departament de Genètica Molecular, C.I.D., (C.S.I.C.), 08034-Barcelona

*Dipartimento de Biologia, Università di Bologna, Italia

Las poliaminas (PAs) son sustancias necesarias para completar el ciclo celular de las plantas y son importantes para el crecimiento y la morfogénesis, así como para prevenir la senescencia (Tiburcio et al. 1991; Torné et al. 1994; Guergué et al. 1996 y Serafini-Fracassini, 1991). Su función a nivel molecular es poco conocida, especialmente en el caso de las PAs libres. Respecto a las PAs ligadas, las más estables son las unidas covalentemente. Las transglutaminasas (TGAsas), (Serafini-Fracassini et al. 1995), catalizan la formación de enlaces entre γ -glutamil residuos de proteínas y PAs. Su modificación post-translacional puede afectar la conformación de la proteína (Del Duca et al. 1993).

El callo meristemático se obtuvo a partir de embriones inmaduros de la línea W64Ao2. Este callo se mantuvo en un medio conteniendo $9\mu\text{M}$ de 2,4-D. Es de color verde y está formado por meristemas superficiales capaces de desarrollar brotes y plántulas cuando se subcultiva en un medio de diferenciación sin 2,4-D (Torné et al. 1984).

En este experimento, los callos se subcultivaron en medios con o sin 2,4-D y se analizaron a distintos intervalos de tiempo hasta completar un ciclo de 24 horas de cultivo. Se determinó el contenido endógeno de PAs y las actividades de: TGAsa, ADC y ODC.

Se observó que la actividad de la ADC se incrementa durante las primeras horas de subcultivo. Este aumento es mayor en el medio sin auxina y puede deberse a la activación de este enzima durante la diferenciación (Torné et al. 1994) y/o al posible estrés causado por el propio subcultivo. Durante la noche, se observó un descenso significativo de esta actividad. Asimismo, la actividad de la ODC disminuyó en el medio sin auxina y se mantuvo sin cambios en el medio con auxina. De acuerdo con otros trabajos, este enzima se activa durante la división celular. Por otra parte, la actividad de la TGAsa presentaba un pico a las tres horas de cultivo y en ambos medios. Este incremento se correlaciona con las PAs conjugadas a moléculas de alto peso molecular y es mayor cuando el medio está sin auxina. Este efecto podría deberse a las mismas causas comentadas para la ADC. Durante la noche, se observa también otro incremento importante en el medio sin auxina.

Según los datos de otros autores, isoformas de TGAsa y ADC están presentes en los cloroplastos (Del Duca et al. 1994; Borrell et al. 1995). Por ello, aislamos cloroplastos de los callos para estudiar en ellos los mismos enzimas. Se observó, que la actividad de la ADC se incrementa más tarde que en los callos, al pasarlos a un medio de diferenciación. A su vez la actividad de la TGAsa de los cloroplastos presenta un máximo a las seis horas del subcultivo.

Como conclusión, podemos destacar que el cambio de medio causa la activación de los enzimas estudiados, especialmente en el caso del medio sin auxina. También la luz origina cambios importantes, ya que los cloroplastos aislados de las células reaccionan en tiempos más largos, aunque con patrones semejantes.

Sección C9:

Morfogénesis y cultivo *in vitro* (II)

Multiplicación “*in vitro*” del enebro marino *Juniperus oxycedrus* L. subsp *macrocarpa* (Sm.) Ball.

A. Clavijo, J.B. Amo-Marco

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de C.C. Biológicas, Universidad de Valencia, C/ Dr Moliner, 50, Burjassot 46100, Valencia

Se ha estudiado el efecto de los reguladores del desarrollo Kinetina (K), Benciladenina (BA) y 2 isopenteniladenina (2iP) así como diversas formulaciones de macronutrientes: MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y WPM (J.loyd y McCown, 1980) sobre la multiplicación “*in vitro*” de material adulto hembra de enebro marino *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa*.

El estudio se llevó a cabo con brotes de 5 a 10 mm de longitud, obtenidos tras el establecimiento y posterior multiplicación “*in vitro*” de yemas axilares en medio salino SH completado con glicina 2 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, tiamina 10 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, piridoxina 0.5 mg/l, BA 0.2 mg/l, sacarosa 3% y agar 0.8%. El cultivo de estos brotes se realizó en medios con los macronutrientes de MS, SH ó WPM y los micronutrientes de MS. Los medios de cultivo se completaron con los constituyentes orgánicos anteriores y con los reguladores del desarrollo K, 2iP o BA a 0, 0.02, 0.2, 0.5 y 1 mg/l.

Asimismo se estudió la evolución de la tasa de multiplicación con el número de subcultivos. Para ello se realizaron 4 subcultivos sucesivos con explantos en el medio salino WPM completado como en los casos anteriores y con el regulador 2iP a las concentraciones antes mencionadas.

Al cabo de 45 días se midió la respuesta obtenida, anotando para cada explanto el número de brotes que superan los 5 mm de longitud (susceptibles de multiplicarse de nuevo) y la longitud del brote más largo.

Cuando los explantos provienen de un medio stock con BA a 0.2 mg/l el análisis de los resultados obtenidos para el primer subcultivo mostró que respecto a los medios salinos existe un marcado efecto de la concentración salina total, obteniéndose los mejores resultados de multiplicación en el medio MS, con concentraciones bajas de citoquininas. Así el mayor número de brotes superiores a 5 mm se obtuvo con 2iP a 0.2 mg/l y la mayor elongación de éstos con K a 0.02 mg/l, si bien no existen diferencias significativas con respecto a los restantes reguladores y concentraciones.

Posteriormente, cuando estos explantos se mantuvieron durante un mes en un medio MS sin reguladores, los brotes formados anteriormente elongaron de forma significativa. Sin embargo, cuando los explantos se subcultivaron varias veces en MS sin reguladores o con una citoquinina a 0.2 mg/l, la tasa de multiplicación se redujo. Por ello el protocolo óptimo para una multiplicación eficaz del enebro marino consiste en un cultivo alterno: inicialmente en un medio salino MS con una citoquinina a concentraciones bajas y al cabo de un mes su traslado a un medio salino MS sin reguladores para que elonguen los brotes formados.

El análisis de la evolución de la tasa de multiplicación presentó un incremento significativo del 1º al 2º subcultivo para las concentraciones de 0.5 y 1 mg/l de 2iP, que se mantuvo en los subcultivos 4º y 5º sólo para la concentración de 1 mg/l.

Trabajo realizado gracias a una ayuda de la Consellería de Agricultura y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana.

Cultura *In vitro* das plantas halófitas *Aster tripolium* e *Crambe maritima* L.

A. A. Matos, J. Semedo e N. M. Marques

Departamento de Fisiologia, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal

A utilização destas plantas como hortícolas, parece ter aumentado bastante ultimamente. Devido simultaneamente aos baixos índices de germinação das sementes e ao seu alto preço, parece-nos de elevado interesse fazer o estudo da sua micropropagação, método que permite altas taxas de multiplicação.

Enquanto em *Aster tripolium* se fez uma cultura de cortes foliares, gomos terminais e axilares, em *Crambe maritima* foram feitos quatro tipos de cultura: discos peciolares e de limbo, radiculares e botões axilares.

A desinfecção foi semelhante em ambas as plantas, com ligeiro spray de etanol (30 s.), seguido de solução de hipoclorito de sódio a 20% (5-7.5 min.) e quatro lavagens em água destilada e esterilizada. Fizeram-se as culturas em meio MS contendo BA ou zeatina em concentrações de 0.5-1 mg/l, tendo também sido utilizado o mesmo meio com os macro e micronutrientes reduzidos a 1/2, 1/3 e 1/5. Isto permitiu em cultura de *Aster tripolium* um mais rápido alongamento dos rebentos. Ainda em *Aster*, na cultura de gomos axilares e terminais em meio com BA foi possível a obtenção de algumas centenas de rebentos dois meses e meio após a primeira cultura, enquanto que com zeatina apenas se obtiveram algumas dezenas. As culturas foram incubadas em câmara climatizada com temperatura próxima de 25°C., fotoperíodo de 16 horas de luz e 3000 lux de intensidade luminosa.

Em *Crambe maritima* foram determinados pesos verdes e secos dos discos e sua relação, durante mês e meio de cultura. Esta relação teve tendência para crescer em meio suplementado de zeatina. Quando o meio foi adicionado de NaCl, na cultura de discos de *Crambe maritima* observou-se uma ligeira diminuição do peso dos discos tanto nos meios adicionados de BA como de zeatina. Ainda na cultura de discos peciolares de *Crambe maritima* observou-se uma rápida formação calosa e posterior diferenciação de rebentos ao fim de 18-20 dias.

No enraizamento utilizou-se o mesmo meio (MS), reduzindo os macro e micro nutrientes a 1/2 e adicionando IBA ou IAA (0.5-1mg/l). Ambas as plantas responderam com praticamente 100% de enraizamento, embora este tenha sido mais rápido e com raízes mais destacadas em *Aster tripolium*. Também nesta planta foi mais fácil a sua passagem a vaso com maior percentagem de vingamento.

Peron, J. Y. and Regnier, E. 1987. *Can. J. of Botany*, **65**, 72-75.

Matos, A. A., 1996. *Plant Physiology and Biochemistry*. Special issue. 10th FESPP congress. Florence, Italy.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

Este trabalho fêz-se em cooperação com o projecto E. C. AIR-CT92-0198 (Saline Crops).

Eficacia de la micropropagación de clones de *Oxalis tuberosa* M. en diferentes niveles de sacarosa y pantotenato de calcio

R.M. Cueva, Ll. Martín-Closas y A.M. Pelacho
Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería,
Universidad de Lleida, España

La micropropagación permite clonar gran cantidad de material vegetal en poco tiempo, en condiciones bien establecidas, pero para que su aplicación sea factible en la práctica se requiere que el crecimiento sea vigoroso.

El objetivo del presente estudio es analizar la capacidad de micropropagación de *Oxalis tuberosa* M. en función de algunas variaciones en el medio de cultivo; para ello se dispusieron secciones uninodales de tres de sus clones en medio MS con o sin pantotenato cálcico (2 mg/l) y con 2, 3, 4 ó 6% de sacarosa. Se evaluaron parámetros de crecimiento vegetativo (longitud, número de nudos, área foliar y clorofila) y de biomasa producida (pesos frescos y secos de tallos, hojas, raíces y totales). A partir de estos parámetros se calcularon las relaciones de la superficie fotosintética con el peso de la parte aérea (LAR) y del peso de las hojas con el área foliar (SLM).

El pantotenato de calcio resultó beneficioso para la micropropagación, lo que se puso de manifiesto porque causó un aumento significativo de la longitud de los explantos, del número de nudos, del área foliar, del peso de los explantos y del LAR. Sin embargo el pantotenato hizo disminuir significativamente la cantidad de clorofila por superficie foliar y su SLM, es decir, aumentó la superficie foliar y su proporción respecto al peso desarrollado por la parte aérea, pero proporcionalmente disminuyó su peso. Se encontró también una diferente respuesta al pantotenato en función del aporte de sacarosa.

El aumento de concentración de sacarosa en el medio de cultivo incrementó significativamente el peso de los explantos, pero proporcionalmente potenciando más el de las raíces y menos el de las hojas. Conforme aumentó la cantidad de sacarosa del medio de cultivo también lo hizo la clorofila por área foliar y el SLM, pero el LAR disminuyó, es decir, disminuyó la superficie foliar respecto al peso seco desarrollado por la parte aérea, a la vez que aumentó su peso. Sin embargo otros parámetros muy directamente relacionados con la eficiencia de la micropropagación, como son el número de nudos y la altura total de los explantos, es decir el número de explantos útiles para un ciclo consecutivo de micropropagación, no incrementaron significativamente a partir de un aporte de 3% de sacarosa.

Aunque de vigor diferente, el aspecto de los tres clones estudiados muestra que el mayor vigor se obtuvo con pantotenato y con las mayores concentraciones de sacarosa en el medio. Sin embargo, en términos de eficacia de micropropagación, se discute la conveniencia de limitar su aporte al 3% o 4% según los casos. Se puede concluir que los explantos de los clones utilizados de *Oxalis tuberosa* M. poseen una muy buena capacidad de micropropagación en las condiciones ensayadas.

Efecto de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas *in vitro* de *Satureja fruticosa* L.

Aguila, N.M.¹, Cases M^a. A.², Manzanera J.A.³

¹UnJu, Jujuy-Argentina

²INIA-Madrid

³ETSI Montes-UPM- Madrid

En la presente comunicación se aborda la propagación *in vitro* de la especie aromática *Satureja fruticosa* ssp *fruticosa* - ajedrea blanca - por medio del cultivo de segmentos nodales en el medio de Murashigue and Skoog (MS, 1962) suplementado con una auxina (ANA) y dos citoquininas (BAP y TDZ). Se cuantificó el alargamiento de brotes, el coeficiente de proliferación (nº yemas/explanto), y el peso fresco de las porciones aérea y radicular.

Los valores más altos del coeficiente de proliferación y la biomasa aérea se obtuvieron con la combinación 0.01 mg.l⁻¹ de ANA con 1 mg.l⁻¹ de BAP; obteniéndose hasta 19 pares de yemas por cada explanto en los subcultivos con un desarrollo radicular del 85 % de los explantos cultivados. Cuando se empleó cualquiera de los reguladores de crecimiento por separado, no se observaron diferencias estadísticas en las respuestas de proliferación. Los medios suplementados con TDZ, no manifestaron gran incidencia sobre las tasas de proliferación de los explantos cultivados, ya sea cuando se adicionó solo o combinado con ANA. Además, mostraron mayor tendencia a formar tejido no diferenciado (callo) en la base de los explantos de hasta 1 cm de diámetro, a los 30 días del cultivo.

Las mejores respuestas de explantos, que implicaron diferencias significativamente superiores en la tasa de proliferación fue en la combinación BAP y ANA, en las proporciones de 10:1 y 100:1 de ambos reguladores, respectivamente. Este mismo comportamiento fue observado en otras especies aromáticas, para favorecer la formación de yemas, mientras que en el caso contrario induce la elongación de tallos; esto podría deberse a niveles endógenos bajos de citoquininas, que requieren de un mayor aporte exógeno para potenciar su acción. Mediante el coeficiente de proliferación se puede hacer una primera aproximación a la combinación de hormonas más adecuada cuando se trate de obtener un gran número de individuos. A mayor coeficiente mayor número de brotes producidos que se podrán separar del originalmente puesto cuando alcancen una longitud adecuada. La tasa de proliferación, y en general todos los procesos de crecimiento y organogénesis *in vitro*, son altamente dependiente de las interacciones de los reguladores naturales endógenos y los análogos de los reguladores añadidos al medio, por lo tanto, el estado fisiológico del material es de mayor importancia.

Estudio del crecimiento en suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. y el mutante mur-1

M.T. Herrera, E. Corredoira

Departamento de Biología Vegetal, Campus de Lugo,
Universidad de Santiago de Compostela

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. se ha convertido en el modelo de estudio de procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas. Esta mala hierba crece rápidamente, bajo una amplia gama de condiciones de cultivo, pudiendo completar su ciclo vital en sólo 5 ó 6 semanas, pero además posee una gran variedad de líneas mutantes, algunas de las cuales, presentan alteraciones específicas de los componentes de la pared celular, lo que permite obtener avances en el conocimiento de la composición y la estructura de la misma. Un ejemplo, es el mutante mur-1, que presenta menos del 2% de la cantidad normal de L-fucosa en las paredes celulares primarias de las paredes aéreas de la planta.

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* silvestre y de mur-1 permitió comparar el crecimiento de ambos, así como determinar la influencia de la mutación de la pared celular de mur-1 en su crecimiento.

A partir de callos de silvestre y de mur-1, obtenidos de las hojas de las plantas de ambos tipos crecidas en condiciones estériles, se establecieron las suspensiones celulares de silvestre y mur-1.

El estudio del crecimiento de las suspensiones celulares de silvestre y mur-1 se realizó estableciendo por una parte la cinética de crecimiento de ambos tipos y por otra evaluando la toma de nutrientes, con el fin de determinar el efecto que ejercen los componentes mayoritarios del medio de cultivo en el crecimiento de las células.

Los parámetros de crecimiento que se determinaron fueron el peso fresco, peso seco y viabilidad celular, pero además se determinó el consumo que las células hicieron de la fuente de carbono (sacarosa), de fosfato y de nitratos presentes en el medio de cultivo de silvestre y de mur-1.

Desde el primer momento mur-1 presentó un menor crecimiento que el silvestre, así las plantas de mur-1 tuvieron un menor tamaño y fueron más frágiles que las del silvestre, perdiendo la capacidad de mantenerse erectas.

La cinética de crecimiento fue en ambos tipos sigmoideal, pero en mur-1 se caracterizó por la presencia de una fase de latencia que se manifestó al inicio de la experiencia, condicionando su crecimiento posterior.

Los resultados obtenidos mostraron un menor crecimiento tanto en peso fresco como en peso seco de las células de mur-1 durante toda la experiencia. Así mismo, también mostraron un menor consumo de azúcares, fosfatos y nitratos que el tipo silvestre.

El análisis de los resultados obtenidos nos permite afirmar que mur-1 tuvo un menor crecimiento en cultivo *in vitro* que el silvestre, coincidiendo estos resultados con los obtenidos *in vivo* por Reiter y col. (1993) utilizando el mutante mur-1.

El patrón de consumo de los nutrientes mayoritarios en el medio de cultivo de silvestre y mur-1 no ofreció diferencias con los resultados obtenidos para otras especies (Stepan-Sarkissian y Grey, 1991).

1. Reiter, W-D, Chapple, C.C.S., Somerville, C.R. 1993. Altered growth and cell walls in fucose deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261 :1032-1035.
2. Stepan-Sarkissian, G., Grey, D. 1990. Growth determination and medium analysis. En: *Methods in Molecular Biology*. (J. Pollard, J.M. Walker, eds.), Vol. VI, pp :13-27. The Humana Press. New Jersey.

Embriogénesis sobre cotiledones de origen somático en *Quercus suber*

P. Puigderrajols, M. Toribio y M. Molinas

Laboratori del Suro, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, 17071 Girona

La embriogénesis secundaria, repetitiva o recurrente se muestra como una de las mejores vías para la propagación clonal del alcornoque (*Q. suber* L.)¹.

En esta especie, la formación de embriones secundarios no requiere inducción hormonal externa. En medio de cultivo sin adición de reguladores de crecimiento la formación de embriones secundarios se produce por gemación meristemática -origen multicelular- a partir de las células externas de la caliptra, células ya determinadas embriogénicamente -origen directo-². En estas condiciones, únicamente de modo muy excepcional se observa embriogénesis a nivel cotiledonar, desconociéndose en este caso, el origen histológico de los embriones.

La formación de embriones somáticos primarios sobre cotiledones se ha descrito en varias especies, principalmente en escutelo de monocotiledóneas y también en el embrión zigótico del alcornoque³. La formación de embriones somáticos secundarios está documentada en varias especies y en una quercínea *Q. robur* habiéndose propuesto en este caso el origen directo de los nuevos embriones⁴.

Nuestro objetivo es mostrar el efecto del eje del embrión y de la presencia de reguladores de crecimiento exógenos (PGRs) sobre la capacidad morfogénica y embriogénica de los cotiledones somáticos y determinar el origen histológico de los embriones. Con esta finalidad se han comparado cotiledones escindidos del cuerpo del embrión con cotiledones no escindidos, en ambos casos con y sin adición de PGRs en el medio de cultivo.

Se ha partido de embriones somáticos maduros enteros o sus cotiledones escindidos y su cultivo ha sido realizado en medio sólido con los macronutrientes de SH y el resto de componentes de MS. Cuando se requieren reguladores de crecimiento se añadieron 10µM de BAP+10µM de NAA al medio en condiciones de oscuridad a 25°C. A los 20 días desde el inicio del cultivo, las muestras se subcultivaron en medio con reguladores de crecimiento reducidos (0.5 µM de BAP+0.5 µM de NAA), disponiéndose bajo fotoperiodo de 16h a 25°C. A los 40 días se transfieren a medio sin PGRs, bajo las mismas condiciones de incubación. Se han tomado muestras cada 4-5 días.

Bajo estas diferentes condiciones, se ha observado una clara dependencia de la capacidad morfogénica y embriogénica de los cotiledones respecto a la presencia o ausencia de reguladores de crecimiento exógenos y sobretodo del aislamiento o no del efecto regulador del eje del embrión. Se observan diferencias no sólo por una mayor o menor capacidad para generar callo, raíces adventicias y/o embriones sino que además a nivel histológico se ha observado que el origen de los embriones somáticos puede variar según las condiciones.

1. Fernández-Guijarro B Celestino C Toribio M 1994 in J.A. Pardos et al. eds. Biotechnology of Trees. INIA (Madrid), Fuera de Serie 4:105-110.
2. Puigderrajols et al. 1996. Int. J. Plant Sci. 157:674-684.
3. Bueno MA, Astorga R Manzanera JA 1992 Physiol Plant. 85:30-34. Toribio M. 1986. Proc. 18th IUFRO World Congress. Ljubljana VII: 863
4. Gingas VM Lineberger RD 1989 Plant Cell Tis & Org Cult 17:191-203.

Multiplicación *in vitro* de espárragos autóctonos de Huétor-Tájar

C.L. Encina, J.M. Cazorla, I.G. Padilla, y E. Caro

Estación Experimental La Mayora (C.S.I.C.),

29750 Algarrobo-Costa, Málaga

A partir de rizomas establecidos *in vitro* por germinación aséptica de semillas de variedades comerciales de espárragos autóctonos de la zona de Denominación de Origen de Huétor-Tájar, se han realizado una serie de ensayos con objeto de poner a punto un método de multiplicación masiva de estos cultivares (variedades población).

Para ello se han estudiado los efectos morfogenéticos sobre dichos explantos de varios reguladores de crecimiento: citoquininas (Zeatina, Kinetina, Benciladenina) y auxinas (ácidos Indolacético, Indolbutírico y Naftalenacético) aplicados a concentraciones entre 0.05 y 1 mg/l.

Entre las citoquininas los efectos mas marcados los presenta la BA que provoca la casi total inhibición del enraizamiento de los rizomas y un gran aumento en el grosor tanto de los turiones como de los rizomas, tanto la KIN como la ZEA, prácticamente no alteran los procesos de formación de los turiones, que son largos y finos, pero si tienen una cierta influencia sobre la rizogénesis y el tipo de raíces inducidas, así la ZEA inhibe el enraizamiento de forma análoga a la BA, mientras que la KIN no modifica apenas el desarrollo de las raíces. Tanto ZEA como KIN permiten un buen desarrollo de los rizomas y los turiones, obteniéndose los mejores resultados en las dosis mas altas de KIN y en las mas bajas de ZEA.

Las auxinas también modifican la rizogénesis pero no alteran apenas el desarrollo de los turiones ni de los rizomas. El AIA produce los mejores resultados a la dosis mas alta y tanto el AIB como el ANA, son mas efectivos a baja dosis, mostrando cierta toxicidad a las concentraciones superiores.

La aclimatación en invernadero de grupos de rizomas con sus raíces ha sido buena, produciéndose la brotación de turiones y esparragueras rápidamente.

Cultivo *in vitro* de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng (*Ericaceae*)

N. Rodríguez, C. Martín y C. Pérez

Departamento de Biología Vegetal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid

La gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*) se cultiva, tradicionalmente por su interés como planta ornamental y melífera. También se utiliza como planta medicinal debido a sus propiedades antisépticas.

Se trata de una especie difícil de multiplicar por métodos convencionales, por lo que el desarrollo de métodos de micropropagación podría contribuir a solucionar los problemas de su propagación a escala comercial.

Como explantos primarios, se utilizaron segmentos nodales, con 2-3 yemas axilares, de plantas adultas de la variedad comercial "Radiant". Los medios base de cultivo, MS y $1/2$ MS se suplementaron con 3% de sacarosa, distintas concentraciones de BAP, ANA y AIB y de solidificaron con Bacto-agar (Difco) al 0,8%.

Los valores máximos de explantos con respuesta al tratamiento de proliferación se obtuvieron en medio MS suplementado con una concentración 4,4 μ M de BAP. Aunque concentraciones superiores de BAP aumentaban el número medio de tallos por explanto, el porcentaje de segmentos nodales que respondían al tratamiento era significativamente inferior.

La dilución a la mitad de las sales del medio MS fue imprescindible para lograr el enraizamiento de los explantos. Cuando se añadieron al medio bajas concentraciones de auxinas, enraizaban más del 80% de los tallos y la supervivencia de las plántulas, así obtenidas, fue del 90% tras su trasplante a tierra.

Conditions for proliferation of shoots on *in vitro* cultures of *Narcissus triandrus* L.

J. Santos, I. Santos and R. Salema

Dept. of Botany and Experimental Cytology Center (IBMC), University of Oporto,
R. do Campo Alegre, 823, 4150 Porto, Portugal

The natural propagation of *Narcissus* by offset formation has a low multiplication rate *per year*. Twin-scaling and chipping methods have been used to increase the yield of bulbs; however, despite the benefits these methods provide, micropropagation techniques are a very powerful alternative to achieve high numbers of new *Narcissus* plants.

Work to determine the culture medium composition and culture conditions appropriate to the large-scale micropropagation of bulbs of *Narcissus triandrus* L. is underway in our laboratory as a LIFE sponsored project. To achieve this eventual aim it is first necessary to find out the culture medium composition that enable abundant shoot proliferation.

Considering the results previously obtained¹ three different culture media, with different amounts of auxin (naphthalene acetic acid -NAA; indolbutiric acid -IBA) and cytokinin (benzylaminopurine -BA) added were assayed in combination with three temperature conditions.

Culture media were MS modified medium (MSM) according to Hussey², and supplemented as follows:

Medium A- MSM + 4 mg/L BA + 0.12 mg/L NAA

Medium B- MSM + 2 mg/L BA + 1 mg/L IBA

Medium C- MSM + 10 mg/L BA + 1 mg/L NAA

Each medium were used under three temperature conditions (I, II and III), *i.e.*, I=13°C, II=18°C and III=25°C, and all of them under a 16h photoperiod at 80 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of PAR. Culture media and temperature conditions were combined as nine sets of experiments.

Cultures of *Narcissus triandrus* were started using twin-scale explants cultured on medium A and medium C under III condition. These two media under this condition led to shoot proliferation. However, results were different since medium C induced abundant leafy shoots and fortunately flowers only in rare instances, in accordance to previous reported results³. On the contrary medium A at same temperature (III), produced only fewer and less stout shoots and frequent flowering. When material grown on this condition was subcultured to medium B at the same temperature the production of shoots was even lower than on both medium A and medium C at 25°C, and soon senescence signs developed in the leafy shoots. Using the same media (A and C) but lowering temperature from 25°C (condition III) to 18°C (condition II), reduction of flowering was obtained and in material cultured on medium A a significant increase in shoot proliferation occurred. Under the same temperature but on medium B (BII) a fair amount of shoots were produced but senescence appeared quite early. Lowering still further the temperature to 13°C (condition I) was enough to suppress growth of the material cultured on A and C media. Curiously, on B medium proliferation of leafy shoots was very abundant with slender leaves, growing

slowly up to 10 weeks without necessity of sub-culturing; this behavior strongly contrasted with cultures on the same medium but under higher temperature which demand sub-culturing every 6 weeks and showed lower shoot production.

It seem that the conclusion can be drawn on the adequacy of medium B at condition I (13°C) and medium C at condition II (18°C) for proliferation of leafy shoots. However, taking into account that eventually bulb formation is seek further experiments are needed to evaluate the bulb formation capacity of the obtained leaves under the two referred to conditions.

1. J. Santos, I. Santos and R. Salema, I Jorn. Tècnic. de Multiplic. Vegetativa, Alcobaca 1995;
2. G. Hussey - Ann. Bot., 49: 707-719 (1982);
3. A. Santos, J. Santos, I. Santos and R. Salema, XXXI Annual. Meeting of the Portuguese Society for Electron Microscopy and cell Biology (1996)

Propagación *in vitro* de tres especies de pequeños frutos a partir de segmentos nodales

M.V. González¹, M. López², E. Valdés² y R.J. Ordas²

¹Departamento de Biología Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo

²Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, C/ Catedrático Rodrigo Uría, 33071 Oviedo, Asturias

La regeneración de plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*), frambuesa (*Rubus idaeus*) y zarzamora (*Rubus sp.*) se ha realizado a partir de segmentos nodales de plantas adultas. Para la iniciación del cultivo se recogieron varetas de plantas en reposo invernal (enero) y en brotación (mayo) a partir de las cuales se obtuvieron los segmentos nodales utilizados como explanto de partida. El material recogido en invierno presentó contaminación fúngica, posiblemente desarrollada durante la fase de estimulación climática, hasta el punto de que no se pudo iniciar el cultivo en frambuesa. Sin embargo, en zarzamora y arándano se consiguió independientemente de la época de recolección del material.

En arándano, los segmentos nodales se mantuvieron durante 15 días en medio WPM (Lloyd y McCown, 1981. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421), modificado con las vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962. Physiol. Plant. 15: 473). A continuación los explantos se transfirieron al mismo medio con diferentes combinaciones hormonales con el fin de proceder a la fase de multiplicación. Los mejores resultados se obtuvieron con zeatina 20 μM . Por último el ensayo de enraizamiento permitió obtener altos porcentajes de enraizamiento *ex vitro* en una mezcla de turba:perlita con un 100% de aclimatación de los tallos enraizados.

En zarzamora, los segmentos nodales se cultivaron en medio MS durante 15 días y a continuación se transfirieron al mismo medio con diferentes combinaciones hormonales. Los resultados indicaron que la combinación BAP 4'5 μM más IBA 0'25 μM permitió obtener un alto número de tallos por explanto y con la suficiente longitud para su enraizamiento y aclimatación. Los tallos se enraizaron *ex vitro* en una mezcla de turba:perlita sin necesidad de inmersiones en soluciones hormonales.

En frambuesa, a partir de las varetas recogidas en mayo se aislaron segmentos nodales que tras un periodo de acondicionamiento de 15 días en medio MS se transfirieron al medio de multiplicación. Se ensayaron dos medios diferentes sin que se observasen diferencias significativas entre ellos sobre la capacidad multiplicativa de los explantos ni sobre la longitud de los tallos obtenidos. Los ensayos de enraizamiento mostraron una buena capacidad de enraizamiento, con porcentajes de respuesta en torno al 66% en condiciones *ex vitro* y sin inmersión previa en soluciones hormonales.

Conexión entre peroxidasas y acumulación de cardenólidos en cultivos de *Digitalis thapsi*: efectos diferenciales de agonistas/antagonistas de calcio

A. Paranhos*, J. Fernández-Tárrago y P. Corchete
Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia,
Universidad de Salamanca

La eliminación de iones calcio del medio de Murashige y Skoog induce la acumulación de cardenólidos en suspensiones celulares de *Digitalis thapsi*. La ausencia del catión también afecta a la liberación de peroxidasas al medio, inhibiéndola fuertemente. La inhibición no es consecuencia de la inactivación de la enzima extracelular puesto que la incubación de medios libres de células con CaCl_2 no altera la actividad enzimática "in vitro".

Ambas observaciones apuntan hacia una posible relación entre peroxidasas y producción de cardenólidos en la que el calcio ejercería un papel regulador.

Con el fin de investigar si estos parámetros dependen del calcio extracelular, del intracelular o de ambos, se han realizado diversos experimentos con agonistas y antagonistas del catión.

Trabajos previos llevados a cabo en los cultivos sugieren que la acumulación de cardenólidos está influenciada por la concentración de calcio extracelular, puesto que la adición de LaCl_3 o EGTA anula el efecto inhibitor del calcio en la producción de estos metabolitos. Estos tratamientos no afectan a la actividad peroxidasa expresada como unidades por ml de cultivo, pero, al inducir un incremento en la secreción de proteínas, la actividad enzimática específica se reduce. La acción de ambos compuestos sobre la actividad peroxidasa "in vitro" es, no obstante, diferente: los iones lantano no alteran la actividad enzimática mientras que el EGTA inhibe la enzima en un 50% después de 1 hora de incubación.

La adición a los cultivos de Rojo Rutenio, agente que bloquea canales de calcio intracelulares, reduce significativamente la acumulación de cardenólidos y estimula la liberación de peroxidasas. Ambos efectos son anulados en presencia de calcio extracelular.

Al elevar artificialmente los niveles de calcio citosólico mediante la adición del ionóforo A23187 aumentan los niveles de cardenólidos y se inhibe la liberación de peroxidasas pero sólo en cultivos crecidos en medio completo.

Estos datos sugieren que tanto la disponibilidad de calcio extracelular y las alteraciones del calcio citosólico influyen en la secreción de peroxidasas y producción de cardenólidos. Se discute la posibilidad de que el efecto positivo de la ausencia de calcio en la acumulación de metabolitos sea mediado por peroxidasas.

* Becario de Investigación. Programa PRAXIS XXI

Establecimiento de cultivos organogénicos transformados en especies del género *Digitalis*

E.Sales, S.G.Nebauer, I.Arrillaga, L. del Castillo* y J.Segura

Departamento de Biología Vegetal y Departamento de Microbiología y Ecología(*),
Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n,
46100-Burjasot (Valencia)

El cultivo de órganos transformados representa una importante alternativa para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los glucósidos cardiotónicos de *Digitalis*, cuya síntesis está ligada a diferenciación morfológica. En esta comunicación, se presentan los primeros resultados sobre la capacidad infectiva de la raza oncogénica, tipo nopalina, 82.139 de *Agrobacterium tumefaciens* (Michel y col., 1990) en *Digitalis dubia* y *Digitalis obscura*. Dicha raza, ha sido empleada con éxito para la inducción de tumores y tallos en varias especies arbóreas (Miranda y col., 1991).

Se utilizaron explantos (hojas y/o hipocotilos) procedentes de plántulas axénicas de *D. dubia* y *D. obscura* con 45 días, mantenidas en medio sólido MS0 (Murashige y Skoog, 1962, sin reguladores de crecimiento). La suspensión bacteriana, crecida durante una noche en medio YMB líquido a 28°C, se centrifugó (3000 rpm, 15 min), resuspendiéndose el precipitado en 10 ml de medio líquido MS0 con 100 µM de acetosiringona. Los explantos se sumergieron (20 min) en este medio y, una vez eliminado el exceso de *Agrobacterium*, se cocultivaron a 28°C durante tres días en medio MS0. Posteriormente, se transfirieron al mismo medio suplementado con 500 mg/l de cefotaxima. Paralelamente, se establecieron controles sin infectar. Todos los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo fotoperiodo de 16 h y 26 ± 2°C.

La formación de tumores (callos) sólo tuvo lugar en los explantos infectados con *Agrobacterium*. La frecuencia de tumoración fue superior al 30%. La transferencia de los tumores, una vez aislados, a medio de la misma composición, promovió su crecimiento y multiplicación. Algunos de estos callos diferenciaron espontáneamente yemas adventicias. Aunque la frecuencia de diferenciación fue baja (1%), las yemas neoformadas mostraron una gran capacidad proliferativa, siendo posible la obtención de más de 70 tallos. La naturaleza tumoral de los callos y tallos se ha demostrado, inicialmente, mediante el correspondiente ensayo de opinas. Los resultados obtenidos, aunque preliminares, corroboran la idoneidad de la raza 82.139 de *Agrobacterium tumefaciens* para la obtención de tallos que pueden ser utilizados para establecer cultivos de órganos transformados en *D. dubia* y *D. obscura*.

Michel MF, Miranda AC, Depierreux C, Otten L, Delmotte F, Jouanin L (1990) Appl Environ Microb 56:3537-3545

Miranda AC, Leplé JC, Muzzin J, Ounnoughi D, Michel MF, Jouanin L (1991) Plant Mol Biol 17:441-452

Murashige T, Skoog F (1962) Physiol Plant 15:473-497

Trabajo Subvencionado por DGICYT (Proyecto No. PB93-0695)

Cultivo “*in vitro*” y organogénesis en el helecho *Polypodium vulgare* tratado con las hormonas BA, NAA Y Kin

A. Bertrand, M.A. Albuérne, H. Fernández, R. Sánchez-Tamés

Unidad de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,
Universidad de Oviedo, Calle Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo

Siguiendo la pauta normal de desarrollo del helecho en la naturaleza, se parte de espora para micropropagar el helecho *Polypodium vulgare*. A partir de esta espora surge el gametófito, que en determinadas condiciones de cultivo, forma los órganos sexuales, anteridios y arquegonios y se reproduce sexualmente para dar lugar al esporófito constituido por frondes, rizoma y raíces.

El propósito de este trabajo es encontrar una vía más rápida que ésta para la propagación del helecho, con vistas a su utilización como planta ornamental. Se eligen como explantos, ápices de raíz, rizomas, base de pecíolos y base de frondes de esporófitos de 6 meses en cultivo y se estudia la influencia de las hormonas BA, NAA y Kin a las concentraciones de 2,5, 5 y 10 μM ; 0,057, 0,57 μM y 9,29 μM respectivamente, utilizando en total 13 combinaciones hormonales y el medio Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad. Se analizan los resultados a los 60 y 90 días de exposición a los distintos medios y después de retirar las hormonas durante 90 días. Por otra parte, se trituran rizomas y frondes, tratadas previamente con 5 μM de BA durante 60 días, y se exponen posteriormente a distintas combinaciones de BA y NAA, analizándose los resultados a los 90 días y después de retirar las hormonas a los 60 y 120 días. En todos los tratamientos hay algún tipo de respuesta organogénica en mayor o menor medida: El pecíolo y fronde desarrollan células que se agrupan en formas globulares, que algunos autores describen como cuerpos globulares verdes (GGB). El rizoma engrosa y también forma GGB. El ápice de raíz desarrolla gametófito, que al formarse a partir de células del esporófito, es apospóreo. Al retirar las hormonas del medio, estos GGB, desarrollan esporófitos, frondes y raíces ó GGB dependiendo de la hormona y de la concentración ensayada. El mayor o menor porcentaje de organogénesis depende de la distinta concentración y combinación de hormonas utilizadas. En general, a mayor concentración de BA mayor formación de GGB, mejorando esta formación al añadir simultáneamente al medio NAA, siendo la mejor concentración 10 μM de BA y 0,57 μM de NAA, donde engrosa el rizoma y se forman GGB en un 91,67 % de los casos. Se hace un estudio histológico de frondes y rizomas de *P. vulgare* antes y después de su triturado en diferentes concentraciones hormonales y se ve que la citoquinina BA induce la formación de varios centros de crecimiento tanto en el rizoma como en la fronde a partir de la concentración 2,5 μM , que en algunos casos derivan en primordios caulinares con vascularización basal. Con la auxina NAA también se observan centros de crecimiento a la concentración de 0,57 μM , pero la organogénesis no es tan clara y el tejido callogénico está más desorganizado. Cuando el material triturado es tratado sin hormonas se encuentran incluso raíces y yemas incipientes.

Agradecimientos: A la FICYT (Fundación para la Investigación Científica y Técnica del Principado de Asturias) por la financiación del Proyecto PTR95-01 y por la beca concedida a Ana Bertrand.

Efecto de un endurecimiento a frío de los tallos *in vitro* de lúpulo sobre la supervivencia de los ápices criopreservados

D. Martínez, R. S. Tamés y M. A. Revilla

Dpto. B.O.S. Unidad Fisiología Vegetal, Universidad de Oviedo, E-33071 Oviedo

Al menos cincuenta variedades de lúpulo se cultivan en el mundo, con características diferenciales en cuanto al aroma y sabor que proporcionan a la cerveza, debido a variaciones en los componentes de aceites esenciales y de resinas, las cuales varían considerablemente para un mismo cultivar, en función de la localidad y de la estación. Estos datos llevan a considerar la importancia que tiene crear un banco de germoplasma de *Humulus lupulus* L. que permita conservar la diversidad genética de esta especie. El almacenamiento de material vegetal a temperaturas ultra-bajas (criopreservación) supone una alternativa ventajosa a otros métodos tradicionales de almacenamiento al permitir conservar por congelación (-196°C) material vegetal libre de virus, que se puede revivir y propagar cuando sea necesario, independientemente de la época del año.

En esta comunicación se presenta un protocolo de criopreservación para ápices (apicales y axilares) de tallos (0.5-2.0 mm) de lúpulo del cv Nugget por el sistema de encapsulación/deshidratación, con resultados de supervivencia de hasta el 80% a partir de cultivos *in vitro* de tallos no sometidos a una aclimatación al frío. Ápices encapsulados en bolas de alginato cálcico, se precultivan en sacarosa, se deshidratan hasta aprox. un 16% de contenido hídrico y se introducen directamente en nitrógeno líquido (-196°C). La recuperación se hace por descongelación a temperatura ambiente y en medio de cultivo con GA₃ y BAP. Los ápices criopreservados muestran una capacidad de desarrollo y recuperación de tallos semejantes a los ápices control no criopreservados.

Con objeto de estudiar la resistencia de los ápices meristemáticos al tratamiento de deshidratación y congelación se sometieron los cultivos de tallos *in vitro* a bajas temperaturas durante distintos períodos de tiempo. Esta aclimatación incrementó los resultados de supervivencia a la congelación hasta porcentajes superiores al 90%, de forma similar a los ápices control no criopreservados.

Finalmente, se estudió el efecto de la velocidad de congelación en la supervivencia de las muestras probando distintas tasas de congelación desde +4°C hasta -40°C, para distintos tiempos de deshidratación. Parece ser que la congelación lenta no induce una deshidratación adicional del tejido, ya que los resultados de supervivencia son semejantes a los obtenidos con la congelación rápida por inmersión directa de los ápices encapsulados en nitrógeno líquido. Este resultado nos confirma la necesidad de una deshidratación del ápice hasta alcanzar un contenido hídrico tal que permita la cristalización en un estado vítreo, amorfo, sin que se formen grandes cristales de hielo que pudiesen romper el tejido.

Los datos obtenidos nos permiten proponer un protocolo para la futura elaboración de un banco de germoplasma de lúpulo, después de comprobar que el protocolo utilizado para el cv Nugget, es aplicable a otros cultivares.

(Trabajo financiado por la S.A.E. de Fomento del Lúpulo y por la Universidad de Oviedo, Proyecto FC-TA-96-517-5.)

Caracterización de líneas embriogénicas de *Pinus nigra* Am.

C. Alvarez, T. Salajová, L. Radojevic, R. Rodríguez*.

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,

Universidad de Oviedo,

C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33071 Oviedo-España

*Instituto de Biotecnología de Asturias

La producción de embriones *in vitro* constituye un sistema experimental clave en estudios sobre reactivación y división celular, organización tisular, competencia morfogénica, rejuvenecimiento, y permite ampliar las posibilidades de aplicación de técnicas biotecnológicas como producción de semillas sintéticas, obtención de embriones en biorreactores, cultivo de protoplastos, transformación génica, etc. La imposición de este proceso inductivo presenta aún limitaciones tan importantes como el desconocimiento del desarrollo embrionario, la falta de sincronía en la manifestación de respuestas, la variación somaclonal, además de otros condicionantes propios de la especie: genotipo de partida, tipo y estado de desarrollo del explanto primario y condiciones culturales utilizadas (Bajaj, 1995). Así, familias como las Pináceas, consideradas muy recalcitrantes, cuentan con escasos resultados en la inducción de Embriogénesis Somática, la mayoría de ellos desarrollados a partir de tejidos inmaduros; sin embargo, resultaría mucho más efectivo iniciar los cultivos a partir de explantos procedentes de individuos adultos, ya que la propagación de genotipos élite sólo es posible a partir de la selección de fenotipos interesantes en fase adulta.

Considerando la Embriogénesis Somática como un método eficaz de micropropagación y teniendo en cuenta el interés de las Pináceas en el Sector Forestal, se pretenden desarrollar vías de regeneración embriogénica a partir de embriones de *Pinus nigra* Arn., estableciendo simultáneamente marcadores micromorfológicos y moleculares que permitan diferenciar, no sólo las respuestas inducidas, sino también la diferente competencia embriogénica de los explantos utilizados. Para ello, se ha abordado la caracterización de líneas embriogénicas derivadas de embriones inmaduros de *Pinus nigra* Arn. y mantenidas en un medio en presencia de 2,4-Diclorofenoxiacético ($0.9\mu\text{M}$) y Bencilaminopurina ($2.22\mu\text{M}$), cuantificando rasgos fenotípicos como textura, coloración y organización del tejido que compone las masas callogénicas. La mayor competencia embriogénica corresponde a masas de callo de textura muy blanda y mucilaginosas y coloración blanco-translúcida, observándose histológicamente numerosas estructuras embriogénicas constituidas por grupos de células isodiamétricas de citoplasma denso, núcleo activo e importantes acúmulos de almidón entorno al mismo. En contraposición a estas características, una línea no embriogénica mantenida en las mismas condiciones de cultivo desarrolla un tejido callogénico poco disgregable y de coloración parda, con elevada tasa de proliferación celular y gran interconexión celular, aunque con escasa o nula organización. Simultáneamente, se han determinado los balances específicos de Poliaminas (PA_x) presentes en tejido de callo de líneas con diferente potencial embriogénico, observándose que la mayor competencia embriogénica a nivel micromorfológico se corresponde con valores máximos de PA_x , tanto

en la cuantificación total como en cada una de las PAs individuales analizadas: espermidina (Spd), espermina (Spm) y putrescina (Put). Con estos resultados, la caracterización de la Embriogénesis Somática en *Pinus nigra* Arn. y, posiblemente, en todas las Pináceas, se puede basar en los contenidos superiores de Spm y Spd, siempre que la Put no sea limitante. El balance Put/Spd puede considerarse como un indicador veraz y repetitivo a la hora de valorar la competencia embriogénica manifestada.

Inducción de Embriogénesis Somática en embriones maduros de *Pinus nigra* Arn.

C. Alvarez, L. Radojevic, M. Albuerne, R. Rodríguez*

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,

Universidad de Oviedo

C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33071 Oviedo-España

*Instituto de Botecnología de Asturias

La Embriogénesis Somática es el método más efectivo de micropropagación y, conceptualmente, este proceso implica el establecimiento del hecho inductivo y la manifestación del programa embriogénico. En consecuencia, esta vía de regeneración de plántulas representa también un modelo útil para estudios de Biología del Desarrollo. En Pináceas, la Embriogénesis Somática ha sido desarrollada en numerosas especies, aunque posiblemente por razones de evolución genética, dentro de las Coníferas el género *Picea* es mucho más competente para este tipo de respuestas. En general, los logros alcanzados a partir de tejidos maduros son, hasta la fecha, muy escasos. Por las razones expuestas, en el presente trabajo se exponen las condiciones de manejo y cultivo que permitieron la inducción y desarrollo de las primeras etapas de la Embriogénesis Somática a partir de embriones maduros de *Pinus nigra* Arn. Para conseguir este objetivo, embriones completos procedentes de semillas recogidas de árboles de polinización abierta en La Dehesa de los Palancares (Cuenca, España, ES 07A) en el año 1994 se cultivaron en diferentes medios basados en la composición mineral DCR (Gupta & Durzan, 1985), seleccionándose durante períodos de cultivo prolongados y seriados, diez líneas embriogénicas (LL1a, LL1, LL2, LL3, LL4, LL5, LL6, LL7, LL8, LL9, LL9h) y dos líneas organogénicas (LL1YA y LL2YA). De todas ellas, la línea LL1a se caracterizó por su elevado potencial embriogénico. Durante el período de cultivo bajo condiciones de oscuridad, se generaron estructuras potencialmente embriogénicas que se diferenciaron estructural y micromorfológicamente de las respuestas caulinares, llamando la atención el hecho de que todas ellas eran albinas, aspecto anteriormente citado en la Embriogénesis Somática descrita para otras especies. La transferencia de estos cultivos a fotoperíodo de 16 horas no favoreció la reversión de estos resultados aunque se mantuvo su excelente capacidad proliferativa.

El estudio histológico confirma la naturaleza embriogénica de dichas respuestas.

Influencia de IBA y de BA sobre el contenido y composición de la esencia de *Lavandula dentata*

C. Morales., M. Bonfill, R.M. Cusidó, J. Gonzalo, E. Moyano y C. Sudriá

Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona,

Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona

Introducción: Estudios realizados con ápices florales y con hojas de *Lavandula dentata*, muestran que su contenido en esencia es del 0.8 % referido a peso seco, y que su componente mayoritario es el 1-8 cineol. Mayoritariamente la esencia se encuentra almacenada en tricomas glandulares capitados y peltados distribuidos por la superficie de los peciolo y de las hojas. Estudios previos (Calvo y Segura 1989), han demostrado que la adición de fitohormonas al medio de cultivo sobre el que crecen plantas de *L. dentata* causa grandes efectos morfogenéticos que afectan a la formación de brotes de parte aérea, raíces y de tricomas no glandulares y glandulares, afectando al espacio para el almacenamiento natural de los aceites esenciales. Se intenta comprobar en este trabajo si estas fitohormonas actúan también sobre la actividad de enzimas implicados en los pasos de biosíntesis de los mono y sesquiterpenos y sobre la proporción de los distintos componentes de la esencia.

Métodos: El proceso de regeneración se inició a partir de segmentos apicales de plántulas crecidas en condiciones estériles sobre medio sólido de Linsmaier Skoog (LS). A las 6-8 semanas, se separaron puntas (20 mm) y se transfirieron a un subcultivo, en una cámara controlada (25°C, 40w/m² y 16 h de fotoperíodo), sobre un medio LS sin la adición de fitohormonas (plantas control) o a un medio LS suplementado con 6-benciladenina 0.1 mg/l (BA); ácido indol 3-butírico 0.1 mg/l (IBA) y ambas fitohormonas BA e IBA a 0.1 mg/l. La actividad HMG-COA reductasa fue ensayada usando el método de Bach y col. 1986. El contenido en aceites esenciales y su análisis cualitativo se determinó de acuerdo con Adzet y col 1989.

Resultados: Las plántulas crecieron 8 semanas en los distintos medios de cultivo, durante las cuales se determinó su crecimiento en longitud, peso fresco y peso seco. La adición de BA al medio de cultivo incrementó la longitud y el peso fresco, mientras que la adición de AIB incrementó el peso seco, es decir la obtención de biomasa real. Se observaron las hojas al microscopio electrónico de barrido, con el fin de determinar el número de tricomas glandulares y su integridad. El mayor número de estas estructuras por mm² correspondió a las plantas control. La adición de BA y en mayor grado de AIB inhibió la formación de tricomas glandulares. Se constató que con frecuencia estas estructuras estaban rotas. Por ello se procedió a calcular el espacio real de almacenamiento de esencias existente en estas plántulas, y se comprobó que el BA lo incrementaba, mientras que el AIB lo disminuía. El BA no pareció ejercer influencia sobre el porcentaje de esencia por peso seco de planta, mientras que el AIB lo disminuyó ligeramente, pero dado que el mayor peso seco de las plantas correspondió a las crecidas en este medio, el rendimiento por planta fue superior al obtenido en las plantas control. Es remarcable el hecho de que la adición de fitohormonas tuvo influencia sobre los niveles de los distintos componentes de

las esencias. El BA incrementó el nivel de alcanfor que llegó a ser superior a los niveles de 1-8 cineol, componente mayoritario en las plantas control mientras que el AIB incrementó la acumulación de fenchol y disminuyó notablemente la de 1-8 cineol. Como consecuencia la composición de la esencia varió notablemente.

Adzet T., Cañigueral S. and Ibáñez C. 1989. *Flav. Fragr. J.* 4 129-132. Bach T.J. 1987. *Plant Physiol Biochem*, 25 163-178. Calvo M.C., Segura J. 1989, *Plant Cell Tiss. and Org. Cul.* 19 33-42.

Efecto del elicitador abiótico VSO_4 sobre la producción de taxol y baccatina III en cultivos "in vitro" de *Taxus Baccata*

R. M. Cusidó, M.T. Piñol, M. Bonfill, A. Mallol, A. Navia-Osorio

Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia,

Universidad de Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona

Introducción. El taxol es un compuesto diterpénico sumamente eficaz frente a un gran número de procesos cancerosos. Su fuente natural, la corteza interna del *Taxus*, es relativamente escasa y su extracción siempre destructiva. Hasta el momento, ni la síntesis total en laboratorio ni el establecimiento de sistemas de cultivo "in vitro" de *Taxus* (Fett-Neto y col. 1994) destinados a la producción de taxol a pequeña/media escala han podido dar una respuesta satisfactoria a la enorme demanda mundial de este singular compuesto antineoplásico. Recientemente se ha demostrado el incremento en la producción de compuestos secundarios en cultivos "in vitro" por la acción de elicitores bióticos o abióticos (Ciddi y col. 1995). Por ello, en este trabajo se ha ensayado el efecto de la adición del elicitador abiótico sulfato de vanadio sobre el crecimiento y la producción de taxol y baccatina III, en cultivos de tejidos de callo y células en suspensión *T. baccata*. La actividad fenilalanina amonio-liasa (sensible a elicitores) es un parámetro indicativo de la posible competencia entre la biosíntesis de taxol y el metabolismo fenólico.

Materiales y Métodos. Los cultivos de callo y células en suspensión se establecieron a partir de una línea de callo seleccionada por su elevado crecimiento y se cultivaron en medio básico B5 suplementado con 4mg/l 2,4-D, 1mg/l kinetina y 0.5mg/l GA_3 , x2 de vitaminas y 3% de sacarosa. Sobre dicho medio (Control) se adicionó VSO_4 en concentraciones de 0.05 o 0.1 mM. El agente gelificante utilizado fue phytigel 2.7mg/l. La determinación de los taxoides estudiados se realizó por inmunoensayo (Grothaus y col 1995). La actividad específica de PAL se determinó según el método descrito por Zucker (1965) con algunas modificaciones.

Resultados. Los máximos niveles de producción de taxol de las piezas de callo crecidas sobre el medio control o en presencia de VSO_4 a las dosis ensayadas se obtuvieron a partir de la 6ª semana de cultivo, cuando el tejido de callo había alcanzado su fase de crecimiento estacionario. Los valores de taxol alcanzados por los callos crecidos en los medios suplementados con 0.05 o 0.1mM del elicitador fueron, respectivamente, 1.8 y 2 veces superiores a los obtenidos por los callos crecidos sobre el medio control. Un hecho destacable fue el distinto patrón biosintético de la baccatina III de los callos crecidos sobre medio control ya que la máxima productividad se alcanzó a la 6ª semana de cultivo. Sin embargo la presencia del elicitador (0.05 o 0.1mM) condicionó una producción continuada llegándose al final de la experiencia a niveles 6,2 y 5,8 veces superiores, respectivamente, a los obtenidos por los tejidos de callo crecidos sobre medio control. El VSO_4 en las concentraciones indicadas no solo provocó un marcado incremento en la producción de taxol y baccatina III en los cultivos de células en suspensión, sino también una marcada liberación de los taxoides estudiados al medio de cultivo. De todo ello se puede deducir una clara acción elicitora

del sulfato de vanadio sobre la producción de taxol y su precursor hemisintético la baccatina III, a la vez que se ratifica la idoneidad de los cultivos celulares en presencia de dicho elicitador para la producción y extracción de los mencionados compuestos secundarios. La actividad específica de PAL, incrementada en los callos crecidos en presencia de VSO₄, ratifica la acción elicitora de dicho compuesto ya que no solo la producción de taxoides resulta elicitada sino que también se observan importantes cambios en el metabolismo fenólico de los mismos.

-
- Ciddi, V. y col.(1995) *Biotech.Lett.* 17(12):1343-1346.
Fett-Neto, A.G. y col.(1994) *Biotech. and Bioeng.* 44:205-210.
Grothaus, P.G. y col.(1995) *J. of Nat. Prod.* 58(7):1003-1014.
Zucker, M. (1965) *Plant Physiol.* 40 (5): 779-784.

Producción de escopolamina mediante el cultivo en biorreactor de raíces transformadas de *Datura Metel*

J. Gonzalo, M. Bonfill, J. Palazón, A. Navia-Osorio, A. Esteve, C. Morales

Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia,

Universidad de Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona

Introducción. Los cultivos de raíces genéticamente transformadas con *A. rhizogenes*, producen los compuestos secundarios sintetizados en la raíz de la planta utilizada para establecer estos cultivos. Este hecho, unido a la estabilidad y el rápido crecimiento de las raíces transformadas en medios básicos sin fitohormonas, hacen a estos órganos especialmente adecuados para ser utilizados en la producción industrial de compuestos propios de la raíz de la planta de origen. El objetivo de este trabajo ha sido el establecimiento y cultivo a pequeña escala de 15 líneas de raíces transformadas de *D. metel*, su selección atendiendo a la capacidad para producir escopolamina, y el cultivo en biorreactor de la línea más productiva después de la optimización de las condiciones físicas y químicas del sistema.

Materiales y Métodos. Los cultivos de raíces transformadas de *D. metel* se establecieron y mantuvieron según se describe en Palazón y col. (1995). La confirmación de su naturaleza transformada y la determinación de escopolamina por HPLC se realizaron según se detalla en Piñol y col. (1996). Para el cultivo en biorreactor, se inocularon 12 g de raíces a un modelo "airlift" modificado (Applikon), cargado con 3,2 l de medio Gamborg (B5). El flujo de aire fue de 0,8 l/min y se controlaron la T, PO₂ y pH. El biorreactor se mantuvo durante 4 semanas en régimen continuo, y periódicamente (cada 2 semanas) se añadió "Tween 20" al 1% para estimular la liberación de escopolamina al medio de cultivo. 24 h después de cada adición de "Tween 20", el total del medio de cultivo se pasó a través de una columna de "Amberlita" con el objeto de extraer la escopolamina liberada por las raíces. Posteriormente el bioreactor se cargó con medio fresco.

Resultados. Los resultados obtenidos nos han permitido demostrar el potencial del cultivo de raíces transformadas de *D. metel* para la producción de escopolamina utilizando un biorreactor en régimen continuo. Los explantes (segmentos internodales de tallo) infectados con la cepa A4 de *A. rhizogenes*, desarrollaron en un 16 % raíces, que fueron cultivadas individualmente en medio B5. La caracterización de 15 líneas de raíces transformadas, previamente establecidas permitió seleccionar la línea M25, con una producción de biomasa a la 4ª semana de cultivo superior a 3,4 g y un contenido de escopolamina de 2,16 mg/g de peso seco, como la más productiva. Como etapa previa al cultivo en bioreactor las líneas seleccionadas se subcultivaron en medio B5 líquido, en agitación a 100 rpm, la producción alcanzada en este sistema por la línea M25 fue, en relación a la biomasa de raíz, superior a 7,1 g y en cuanto al contenido de escopolamina, del orden de 4,1 mg/g de peso seco. Por otro lado, nuestros resultados demostraron la baja liberación de producto al medio de cultivo en todas las líneas de raíces establecidas (inferior al 13 %). La línea de raíces seleccionada como más productiva alcanzó después de 4 semanas de cultivo en un bioreactor airlift

de 3 l, previamente modificado y con las condiciones de cultivo optimizadas, una densidad de 62 g de peso fresco/l y una producción de escopolamina de 2,9 mg/ g de peso seco. La adición del agente permeabilizante "Tween" 20 al 1% a la 2ª y 4ª semana de cultivo de las raíces en bioreactor, incrementó significativamente el % de excreción de escopolamina al medio (superior al 43,1%), a la vez que aumentó también ostensiblemente la producción de biomasa y escopolamina de las raíces.

Palazón y col. (1995) *Biol. Plant.* 37(2): 161-168

Piñol y col. (1996) *Botanica Acta* 109: 133-138.

Estudio de la producción de escopolamina en cultivos de raíces y plantas de *Duboisia* transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*

J. Palazón, M.T. Piñol, R.M. Cusidó, C. Roig, A. Mallol

Unidad de Fisiología Vegetal. Facultad de Farmacia,

Universidad de Barcelona,

Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona

Introducción: Las plantas de *Duboisia* y los cultivos de órganos y células derivados de ellas producen compuestos de interés farmacológico como los alcaloides escopolamina e hiosciamina (Oksman-Caldentey y Hiltunen, 1996). Los cultivos de raíces transformadas representan un sistema organizado de cultivo *in vitro*, compuesto por células genéticamente transformadas que producen elevados contenidos de los mismos tipos de alcaloides que la planta intacta (Muranaka y col., 1992). Respecto a estos cultivos y en términos de rentabilidad, la producción de compuestos de interés en cultivos a gran escala de raíces transformadas todavía no está resuelta. Por ello, estamos interesados en investigar si este sistema puede regenerar plantas, y si las plantas transgénicas regeneradas aumentan su productividad en relación a los cultivos de raíces que las han originado y a las plantas no transformadas de la misma especie.

Materiales y Métodos: Los cultivos de raíces transformadas se establecieron a partir de plantas estériles de *Duboisia* por cocultivo de segmentos de hojas con *Agrobacterium rhizogenes* A4 como se describe en (Palazón y col., 1997a). Después de varios subcultivos en medio B5/2 solidificado con gelrite, las raíces se cultivaron en medio líquido B5/2 en agitación (100 rpm), a 25°C y en la oscuridad durante períodos de 4 semanas. La comprobación de la naturaleza transformada de los cultivos establecidos se determinó por inmunodetección de la proteína codificada por el gen *rolC* (Piñol y col., 1996). El cultivo de las plantas transgénicas regeneradas a partir de las correspondientes raíces se realizó en medio B5 solidificado con gelrite, a 25°C y un fotoperiodo de 12 h. El análisis de alcaloides de las muestras liofilizadas (raíces y plantas) se realizó siguiendo el método descrito por Piñol y col. (1996).

Resultados: Inicialmente se establecieron 130 líneas de raíces de *Duboisia*, de las cuales se desechó un 51% de ellas por presentar un escaso crecimiento. En las 67 líneas restantes se comprobó su naturaleza transformada por inmunodetección de la proteína codificada por el gen *rolC* frente anticuerpos específicos. El estudio del crecimiento de las líneas de raíces transformadas, reveló que más del 55% de las líneas establecidas alcanzaba, a la cuarta semana de cultivo, una biomasa superior a 1,5 g, y una producción de escopolamina superior a 5 mg/g de PS. El pase de las raíces a medio líquido mejoró la producción. Espontáneamente, los cultivos en placa de raíces transformadas, desarrollaron plántulas que fueron separadas de la raíz de origen y cultivadas aisladamente. El fenotipo de las plantas transgénicas fue muy similar al descrito para las plantas transformadas de otras especies (Palazón y col., 1997b), caracterizado por la presencia de hojas gruesas y replegadas, gran proliferación de brotes y extraordinario desarrollo de la masa radicular. La pro-

ducción alcaloídica de estas plantas fue superior a la de las plantas control, crecidas en las mismas condiciones. Estos resultados podrían deberse a la mayor formación de biomasa de raíz que presentaban las plantas transgénicas en relación a las control, puesto que en *Duboisia*, el principal órgano de síntesis de alcaloides es la raíz. Por otro lado, la capacidad de enraizamiento de las plantas transgénicas cultivadas *in vitro* así como su adaptación a las condiciones de campo también fue superior al de las plantas control.

Muranaka T., Ohkawa H. y Yamada Y. (1992) *Appl Microbiol Biotech.* 37: 554-559.

Oksman-Caldentey K. y Hiltunen R. (1996) *Field Crops Res.* 45: 57-69.

Palazón J., Cusidó R.M., Roig C. y Piñol M.T. (1997a) *Plant Physiol. Biochem.* 35(2): 155-162.

Palazón J., Cusidó R., Roig C. y Piñol M.T. (1997b) *Plant Cell Rep. In press.*

Piñol M.T., Palazón J., Cusidó R. y Serrano M. (1996) *Bot. Acta.* 109: 133-138.

Bioproducción de Diosgenina por cultivo de callos de *Trigonella foenum-graecum*

R. Oncina, J. M. Botía, J. A. Del Río y A. Ortuño

Departamento de Biología Vegetal (Unidad Fisiología Vegetal). Facultad de Biología,
Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

La Diosgenina es una sapogenina esteroídica con importantes aplicaciones farmacológicas pudiendo citar, entre otras, su acción estrogénica (Aradhana y col., 1992), así como el importante papel que puede ejercer en el control del metabolismo del colesterol (Cayen y Dvornik 1979; Sauvaire y col., 1991; Roman y col., 1995).

Una posible fuente para el aislamiento de diosgenina son las plantas de *Dioscorea*, *Costus* y *Trigonella*. La ventaja de *Trigonella* frente a las anteriores radica en que se trata de una planta anual con un ciclo corto de cultivo. Sin embargo existe muy poca información sobre los procesos de síntesis de diosgenina y su localización en dicho material vegetal.

En estudios previos hemos puesto de manifiesto la expresión de dicha sapogenina en plantas *Trigonella foenum-graecum* (Ortuño y col., 1997), habiéndose analizado la distribución de los niveles de diosgenina en los diferentes órganos (raíz, tallo, hojas y frutos), así como la evolución de dichos niveles durante el desarrollo de la planta. Los resultados revelan que las mayores concentraciones de este compuesto secundario se detectan durante el desarrollo juvenil de las hojas, representando aproximadamente un 42% del total de diosgenina en la planta.

En este trabajo se analiza la capacidad de producción de diosgenina en callos cultivados "in vitro" a partir de diferentes explantos de *Trigonella foenum-graecum* (raíz, hoja y tallo). Los resultados revelan que los callos obtenidos en nuestras condiciones de cultivo acumulan diosgenina, al igual que ocurre en la planta madre, lo que indica que no se ha producido alteración en la ruta metabólica. Los niveles de diosgenina detectados en callos de hojas, tallos y raíz suponen un 13, 15 y 17% respectivamente, frente a los niveles detectados para dichos órganos en la planta madre.

Por otra parte, se observa que los niveles acumulados de diosgenina en los callos de hojas, durante la fase lineal de crecimiento, son del orden de 2 y 5 veces superiores a los detectados para los callos de tallo y raíz, respectivamente. De estos resultados podemos concluir que el material de partida idóneo para la obtención de diosgenina por cultivo *in vitro* son los callos de hojas.

Aradhana; Rao, A.R.; Kale, R.K. (1992) Indian J. Exp. Biol. 30, 367-370.

Cayen, M.N.; Dvornik, D. (1979) J. Lipid Res. 2, 162-174.

Ortuño, A.; Oncina, R.; Botía, J.M.; Del Río, J.A. (1997) Planta Médica (in press).

Roman, I.D.; Thewles, A.; Coleman, R. (1995) Biochem. Biophys. Acta 1255, 77-81.

Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J.C.; Loubatieeres-Mariani, M.M. (1991) Lipids 26, 191-197.

Organogenesis and plant regeneration from young seedlings of *Eucalyptus globulus* Labill

G. Pinto^{1,3}, C. Santos³, G. Caldeira³, S. MacRae^{2,3} and A. Correia³

¹Stora/Celbi, Portugal

²Stora Cell, Sweden

³Department of Biology, University of Aveiro, 3800 Aveiro, Portugal

Eucalyptus globulus is a hardwood species with great interest for the paper industry. The use of *in vitro* culture and molecular biology techniques in breeding programmes for the selection of economically important genotypes of this species is, therefore, of major importance. *In vitro* plant regeneration from *E. globulus* is, similarly to other woody plants, a difficult task. We are involved in a programme for *Eucalyptus* improvement through somatic embryogenesis and organogenesis and genetic characterisation of different clones.

We report here the efficient regeneration of plants of *E. globulus* by organogenesis. Sterilised seeds were germinated on hormone-free Murashige-Skoog medium (MS) containing 30 g.l⁻¹ of sucrose. Cotyledons and hypocotyls from seedlings were aseptically removed and tested for their ability to form *callus*. Eight different stages of germination (3, 6, 8, 10, 14, 17, 20, and 22 day old seedlings) were assayed for *callus* induction. Both cotyledons and hypocotyl were able to regenerate plants, with hypocotyl exhibiting an earlier response to *callus* induction. Two different types of tissue developed: a compact white *callus* produced both in cotyledons and hypocotyls and a friable white tissue produced mainly in hypocotyls. This last tissue is under study for embryogenic capacity.

In order to study the influence of physical factors on the regeneration efficiency we used nine modifications of MS medium (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 and C9 media) differing in nitrate levels, sugar type and concentration and the balance of the hormone regulator 2-4,D. All media succeeded in *calli* induction, except C5 and C6. Indirect root formation was obtained in all media with cotyledons being more successful. Roots were small, hairy and white. Shoots developed mainly on medium C3 and were frequently yellowish developing a green colour one-two weeks after formation. Plants developed within one-two weeks. Regenerated plants were then transferred to greenhouse. Acclimation to greenhouse is a very sensitive stage for these *in vitro* plants. We are studying the influence of several factors (%HR, soil moisture, medium composition and temperature) on plant survival.

We conclude that: 1) it is possible to regenerate routinely plants of *E. globulus* by indirect organogenesis; 2) endogenous factors (as tissue source and seedling age) play an important role on the ability of *Eucalyptus* seedlings to induce and proliferate *callus* and on the ability of these *calli* to differentiate and form plants; 3) physical conditions (light, temperature and media composition) are of major importance for plant regeneration and for plant acclimation.

Aspectos citológicos de embriones y plántulas androgénicas de *Aesculus Hippocastanum* L.

L.Radojevic(*), S. Jevremovic(*), M. Albuerne(**), R. Rodríguez(**)

(*), Instituto de Investigación Biológica,

11060 Belgrado 29 Novembra 142, Yugoslavia

(**) Unidad de Fisiología Vegetal,

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,

Universidad de Oviedo, calle Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo

El cultivo de anteras es, sin lugar a dudas, uno de los métodos más eficaces para la multiplicación de *Aesculus hippocastanum* L. (Radojevic, 1978). Las flores de esta especie son bisexuales y zigomorfas, las situadas en la región basal (A) de la panícula son femeninas y fértiles, mientras que las de la zona media (B) son bisexuales, y las de la zona apical (C) son masculinas con carpelos atrofiados. Anteras procedentes de las zonas A, B y C se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2,4 D y Kinetina (1 mg/l) junto con caseína y prolina (200 mg/l).

El mayor número de anteras embriogénicas (34%) se obtuvo cuando las anteras se aislaron de flores del segmento A (Radojevic y Marinkovic, 1994). También se obtuvieron diferencias significativas respecto al número de plántulas, en función del origen de las anteras. En este trabajo fue estudiada la viabilidad de los granos de polen y su diferenciación a embriones androgénicos (AE) mediante microscopia de luz visible y fluorescencia.

Se demuestra que existen diferencias en tamaño y número de microsporas en anteras de cada flor y entre flores distintas. Durante los primeros días de cultivo se estudia la diferenciación de microsporas hasta embrión androgénico, analizándose también la conformación de los diferentes estados embriogénicos. Asimismo, se presenta la organización histológica de las diferentes regiones de las plantas procedentes de embriones androgénicos de la zona basal (A).

Sección C10:

Nutrición: absorción y transporte

Respuesta fisiológica de las plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) a la salinidad y la adición de potasio

I.C. Delgado¹ y A.J. Sánchez-Raya²

¹Dpto. de Biología Vegetal, Producción Vegetal y Ecología. E.P.S.

Universidad de Almería, 04120 Almería

²Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Apdo. 419, 18080 Granada

La salinidad incide de manera negativa en el crecimiento vegetal, lo que se ha investigado en numerosas especies, poniéndose de manifiesto que tal salinidad en los suelos o en las aguas de riego reduce la germinación, el crecimiento vegetativo, el reproductivo y la producción de la mayoría de las plantas cultivadas. La rápida acumulación de sodio en las plantas está asociada a una reducción del contenido de potasio. Además, algunos autores observan que la absorción y el transporte de potasio, desde la raíz a la parte aérea, resultan inhibidos por los niveles salinos, lo que trae como consecuencia la limitación del crecimiento de las plantas.

En la nutrición del vegetal el K, Ca y Mg juegan un papel de suma importante como osmorreguladores y en el mantenimiento de los equilibrios electroquímicos, pudiendo sustituirse unos a otros. La presencia de Na en el medio de cultivo y su absorción por la planta hace que este intervenga en el equilibrio inter catiónico, causando, incluso, una disminución de la absorción y transporte de los otros tres elementos.

Distintos estudios sugieren la necesidad de incrementar la fertilización con potasio en los suelos salinos, para contrarrestar los efectos competitivos de las concentraciones altas de otros cationes, por lo que tratamos de conocer el efecto de la aplicación de potasio como único elemento. Se emplean semillas de girasol que se germinan con y sin sal (NaCl), desarrollándolas durante 25 días, al cabo de los cuales se recolecta el material vegetal y se determinan diversos parámetros fisiológicos que resultan afectados por la salinidad.

En nuestro experimento la adición de potasio en presencia de salinidad alta (100 mM) o sin salinidad resulta favorable para la germinación de las semillas de girasol, no viéndose alterada de forma significativa la germinación de estas con salinidad media (50 mM).

En ausencia de salinidad, en la etapa estudiada, el suministro de potasio hace aumentar con alta significación la biomasa de la plántula, que es reflejo de lo que ocurre en la parte aérea y la raíz, proporcionalmente, es mayor el incremento en el tallo que en las hojas. Sin embargo no hay variaciones de la superficie foliar.

En presencia de sal, la adición de potasio no altera significativamente la materia seca conseguida por la plántula, aunque sí hace aumentar la superficie foliar cuando la concentración salina es media (50 mM) en el medio radicular.

Efecto de la interacción K-Mo en plantas de tomate

C. Elvira, E. Benítez, M. Gómez y R. Nogales

Departamento de Agroecología y P. Vegetal, Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.),
Prof. Albareda 1, 18008. Granada

En el presente trabajo se ha estudiado, en medios hidropónicos, el efecto de la interacción K-Mo sobre el crecimiento y contenido de macronutrientes en plantas de tomate.

Semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Marglobe) se germinaron en vermiculita. Tras la emergencia, se trasplantaron a medios líquidos con solución nutritiva completa. A los catorce días de cultivo, las plantas crecieron en soluciones nutritivas que contenían tres niveles de potasio (3; 6 y 9 meq/l) y cuatro niveles de molibdeno (0; 0.05; 0.25 y 1.25 $\mu\text{g/g}$), según modelo factorial 3 x 4 con 4 repeticiones. El período de cultivo en estas soluciones diferenciales fue de 28 días. El ensayo se realizó en cámara de cultivo bajo condiciones ambientales controladas.

El peso seco de la hoja aumenta muy significativamente ($P < 0.001$) según las disponibilidades de potasio, siendo máximo para el valor más elevado. Los incrementos de peso seco son mayores en los niveles 2 y 3 de Mo, con diferencias significativas (Duncan $P < 0.05$) frente a los restantes; el nivel Mo4 determina el menor crecimiento.

El peso seco de la raíz presenta una tendencia similar a lo descrito en la hoja. El crecimiento máximo, tanto en hoja como raíz, corresponde a la combinación de niveles K3-Mo2.

El nivel de K afecta muy significativamente a los contenidos de P, K y Ca en hoja. Los mayores contenidos de P y K corresponden al nivel K3 y el mayor contenido de Ca se manifiesta en el nivel K1. En todos los elementos considerados, existen diferencias significativas entre los niveles indicados y los restantes niveles de K.

El nivel de Mo aplicado no afecta al contenido de Mg en hoja pero sí, con diferente nivel de significación, a los restantes elementos considerados. El mayor contenido de N, P, K y Ca en hoja corresponde al nivel Mo2 y sin diferencias significativas frente al nivel superior (Mo3), pero sí frente a los niveles extremos.

El nivel de K afecta muy significativamente a los contenidos de N, P, K, Ca y Mg en raíz, pero los niveles de Mo no afectan a los contenidos de N en raíz. Los mayores contenidos de P y K corresponden al nivel K3 y los valores superiores de N, Ca y Mg se manifiestan en K1. En todos los elementos considerados, existen diferencias significativas entre los niveles descritos y los restantes niveles aplicados.

Las correlaciones entre contenido de elementos en hoja son muy significativas ($P < 0.001$) en P/K, P/Mg, K/Mg y significativas ($P < 0.05$) en N/P y Ca/Mg, siendo correlación negativa y muy significativa K/Ca.

En raíz, las correlaciones entre contenidos de elemento son negativas y muy significativas en las relaciones N/P, N/K, P/Ca, P/Mg, K/Ca y significativa en K/Mg; las correlaciones son positivas y muy significativas en N/Ca, N/Mg, P/K y Ca/Mg.

Cambios en la asimilabilidad de K y Na al comparar las aplicaciones de alpechín y un fertilizante potásico mineral en suelo calcáreo

F. Gallardo-Lara, M. Azcón, J.L. Quesada y A. Polo*

Departamento de Agroecología y Protección Vegetal,

Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada.

** Departamento de Contaminación y Química Ambiental,*

Centro de Ciencias Medioambientales (C.S.I.C.), Madrid

En España actualmente se producen 2 millones de m³ de alpechín cada año (Borja Padilla et al., 1992), y tal cantidad de efluente encierra un gran potencial contaminante (Janer del Valle, 1980), que obliga a buscar procedimientos que logren eliminar el agua residual evitando los problemas de contaminación ambiental que puede ocasionar su descarga incontrolada. Un posible sistema de eliminación consiste en aplicar este efluente sobre el suelo tratando de aprovechar sus cualidades fertilizantes, tanto de su carga orgánica como de la inorgánica. En relación con esta vía de actuación, hemos ensayado la aplicación de dos dosis de alpechín sobre macetas que contenían suelo calcáreo y, así mismo, hemos preparado dos tratamientos mediante la adición de dos dosis de KCl que han aportado cantidades de K equivalentes a las que incorporan las mencionadas dosis de alpechín. En las macetas se ha sembrado ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Tove), que se ha recolectado mensualmente hasta obtener tres recogidas de materia vegetal, que se ha analizado en lo relativo a K y Na mediante fotometría de llama según Lachica et al. (1973). Después de la última recogida de planta se han tomado muestras de suelo, en las que se han determinado K y Na de cambio (Steinberg y Högel, 1990).

En el primer corte ambas dosis de alpechín y de K mineral generalmente incrementan significativamente la concentración de K en planta frente al control, constituido por suelo tal cual. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas al comparar los mencionados resultados con los obtenidos en el control más complementos minerales desprovistos de K. En sentido contrario, los tratamientos con alpechín o potasio mineral promueven valores de concentración de Na en planta inferiores a los observados en el control más complementos minerales.

En el segundo y tercer corte las dos dosis altas, lo mismo la del agua residual que la del fertilizante, provocan aumentos significativos de la concentración de K en ryegrass frente a los dos controles, pero no ocurre lo mismo al examinar los datos correspondientes a las dosis bajas. En dichos cortes, el aporte de alpechín tiende a incrementar la concentración de Na en planta frente al control, pero los valores de este último parámetro obtenidos en los tratamientos con alpechín o fertilizante potásico no presentan una tendencia clara cuando se confrontan con los del control más complementos minerales sin K.

De manera general, en todos los tratamientos los resultados más elevados de absorción de K por el cultivo se presentan en la primera recogida, y después se observa un descenso gradual en las dos siguientes. En cambio, la mayor absorción de Na, en prácticamen-

te todos los tratamientos, tiene lugar en la segunda recogida, experimentando un descenso brusco en la tercera.

Después de la recolección, se observa que los tratamientos con agua residual o fertilizante potásico han elevado la concentración de K de cambio en suelo frente a los dos controles, y las diferencias se muestran significativas en el caso de las dos dosis altas, tanto del efluente como del fertilizante mineral. También queda patente que los tratamientos con fertilizante potásico tienden a aumentar el contenido de K de cambio en suelo con respecto a los correspondientes tratamientos a base de alpechín.

Se han apreciado pocas variaciones en lo relativo a efecto residual de los tratamientos sobre el nivel de Na de cambio en suelo. No obstante, cabe indicar que la aplicación de la dosis alta del efluente industrial generalmente aumenta, de forma significativa, dicho nivel de Na en comparación con los controles y restantes tratamientos ensayados.

Borja Padilla, R., Martín Martín, A. y Durán Barrantes, M.M. 1992. *Grasas y Aceites*, 43, 82-86.

Janer del Valle, L. 1980. *Grasas y Aceites*, 31, 273-279.

Lachica, M., Aguilar, A. y Yáñez, J. 1973. *Anal. Edaf. y Agrobiol.*, 23, 1033-1047.

Steinberg, C.E.W. y Högel, H. 1990. *Chemosphere*, 21, 201-213.

Trabajo financiado por la CICYT (Proyecto N° AMB96-0473).

Inducción de la absorción de macronutrientes en un cultivo de *Capsicum annuum* L. con nutrición estresada en NPK

J.L. López-Moreno, M. Carvajal, J.J. Pastor* y C.F. Alcaraz
CEBAS-CSIC, Aptdo. 4195, 30080-Murcia. *E.P.S. Orihuela

Sobre plantas de *C. annuum* L., cv. Bunejo, en cultivo sin suelo en invernadero, bajo nutrición diferencial NPK en la fertirrigación, se analiza el efecto inductor del Ti^{4+} sobre la absorción de los macronutrientes NPK. Las dosis fertilizantes aplicadas, partiendo de un aporte Control con 270/90/300 UF/ha (N/P/K), se redujeron a 2/3 y 1/3 de cada elemento. La mitad de las parcelas se trataron, por rociado foliar, con una disolución 42 mM Ti^{4+} , en el momento de la diferenciación floral (15 mL.planta⁻¹) y al finalizar el cuaje del fruto (35 mL.planta⁻¹). Los parámetros determinados fueron: biomasa, concentración total de bioelementos (NPK) y concentraciones de $N-NO_3^-$, $P-PO_4^-$ y K^+ en raíces.

No aparecieron síntomas visuales de desequilibrios nutricionales en ningún tratamiento y las concentraciones de los macronutrientes estuvieron prácticamente siempre dentro de los niveles estadísticos de variación de las plantas control, pero las concentraciones iónicas en los tejidos de raíces se incrementaron fuertemente en las plantas tratadas con titanio, como índice de una mayor intensidad en la absorción de los tres bioelementos.

Esta mayor intensidad en la absorción de los macronutrientes se refleja claramente en los niveles de consumo, de cada uno de ellos, que presentan las plantas tratadas con el elemento traza, siendo tanto mayores cuanto más alta era la disponibilidad de los nutrientes en la disolución fertilizante.

La producción de biomasa de las plantas fertilizadas con las menores dosis N/P/K (90/30/100 UF/ha) y tratadas con titanio fue superior a la de las plantas control (270/90/300 UF/ha), lo que motivó que los índices de eficiencia en la utilización de los fertilizantes para la formación de biomasa, se incrementase entre valores del 150% para P y casi 200% para N y K.

Como conclusión, se puede reducir drásticamente el aporte de sales minerales en la fertilización, si se induce la absorción radicular de los elementos nutricionales, contribuyendo así, de manera importante, a la disminución del riesgo de contaminación de suelos y aguas residuales, por el exceso de sales utilizadas durante el cultivo, todo ello, sin merma en la rentabilidad de la producción de estas plantas que, por otra parte (como se desprende de estudios anteriores) incrementan los índices de calidad de sus frutos con el tratamiento del elemento traza, definido como inductor de la actividad biológica para las plantas de *Capsicum annuum* L.

Absorción y transporte de glucosa en raíces de girasol. Influencia del K^+ y del ABA

J.M. Quintero¹, J. Ramos², J.M. Fournier¹ y M. Benloch¹

Dptos. de Agronomía (1) y de Microbiología (2). E.T.S.I.A.M.

Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

La información que se conoce sobre el transporte de azúcares en plantas superiores hace referencia fundamentalmente a los movimientos de estos compuestos en los vasos del floema (Caspari y otros, 1994). Recientemente, se ha propuesto la presencia de transportadores de monosacáridos presentes, fundamentalmente, en células de zonas sumidero, que permitirían la entrada del correspondiente azúcar resultante de la escisión de la sacarosa presente en el floema (Sauer y otros, 1994).

En el presente trabajo se ha estudiado la posible absorción y transporte de glucosa durante el proceso de exudación en raíces de girasol con distinto contenido interno de K^+ . De igual forma, se estudió el efecto del ABA sobre la acumulación de dicho monosacárido. Para ello, se utilizaron raíces aisladas de plantas de girasol cultivadas durante 12 días en soluciones nutritivas con dos concentraciones de ClK (0,1 y 2,5 mM). Al inicio de la exudación, se añadió al medio externo glucosa marcada radiactivamente y ABA (4 μ M) en el caso de las raíces tratadas con dicha hormona. Durante 6 horas se recogió el líquido exudado libremente por los vasos del xilema.

Los resultados muestran que las raíces con un menor contenido interno de K^+ presentaban una mayor radiactividad, y que el ABA estimuló esta acumulación en las raíces ayunadas y no así en aquellas cargadas en K^+ . Al estudiar la radiactividad presente en el exudado, se observó que fue mayor en el caso de las raíces más ayunadas; la presencia de ABA incrementó la radiactividad en el exudado en ambos tipos de raíces, aunque la acción de dicha hormona fue más acusada en las raíces con menor contenido en K^+ . En los resultados también se puede observar como la radiactividad en la raíz fue 20-50 veces mayor que en el exudado.

Dada la presencia de radiactividad en células y en el exudado, y que el flujo de agua en la raíz es principalmente simplástico (Steudle y otros, 1993), nuestros resultados sugieren que las células de la raíz son capaces de absorber azúcares provenientes del medio externo, e incluso transportarlos hasta el flujo del xilema. Estos procesos podrían estar regulados por factores tales como el K^+ interno y la presencia de ABA.

Caspari, T., Will, A., Opekarová, M., Sauer, N. & Tanner, W. (1994). *J. exp. Biol.* 196: 483-491.

Sauer, N., Baier, K., Gahrz, M., Stadler, R., Stolz, J. & Truernit, E. (1994). *Plant Molecular Biology* 26: 1671-1679.

Steudle, E., Murrmann, M. & Peterson, C.A. (1993). *Plant Physiol.* 103: 335-349.

Respuesta de *Phaseolus vulgaris* L. al aporte de Vanadio: Crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles

P. San José, D. Saco y S. Martín

Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, España

El vanadio es un elemento de transición cuya función no está claramente establecida en los vegetales. No obstante, se han detectado algunas interacciones con el molibdeno y también su influencia en la absorción iónica, en la síntesis de clorofilas y en el proceso fotosintético.

El incremento de vanadio en la atmósfera se debe, principalmente, a las fuentes antropogénicas por lo que puede aparecer como una posible fuente de contaminación en las aguas de riego y afectar a los animales.

Aunque se han asignado al vanadio algunos efectos beneficiosos para los animales y las plantas, sobre todo para las algas, los estudios que versan sobre la incidencia de este elemento sobre las plantas vasculares son todavía escasos.

Este trabajo forma parte de los estudios que se vienen realizando sobre el carácter beneficioso del vanadio en *Phaseolus vulgaris* L. cv. contender. El objeto es conocer la dosis óptima del citado elemento sobre el crecimiento de los órganos aéreos y el contenido de los pigmentos fotosintéticos en *Phaseolus vulgaris* L.

Se han utilizado plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. contender, crecidas en vermiculita y en condiciones ambientales controladas. Se dispusieron cuatro lotes de plantas:

I. LOTE CONTROL.: recibió la solución nutritiva completa utilizada en trabajos anteriores.

II. LOTES 80V, 160V, 240V: recibieron la solución nutritiva completa y el aporte suplementario de 80 μM , 160 μM , 240 μM de vanadio ($\text{VO SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), respectivamente. Estas dosis de vanadio se han escogido en base a experiencias realizadas anteriormente.

La experiencia abarcó el período vegetativo de las plantas (20 días). Las determinaciones analíticas se realizaron en las hojas y en el tallo, estudiándose la evolución de los pesos (fresco y seco), las tasas de crecimiento y el contenido de pigmentos liposolubles (clorofilas a, b, total y carotenoides totales).

Estas dosis de vanadio no influyen, de forma significativa, sobre los parámetros estudiados en esta experiencia, al menos durante el crecimiento vegetativo de *P. vulgaris*. En algunos casos, coinciden con los obtenidos en plantas crecidas en ausencia de molibdeno.

Todo ello sugiere, que estas dosis de vanadio no alcanzan el umbral de toxicidad para la especie objeto de estudio.

Formas de calcio en melón tipo Galia bajo condiciones adversas para la absorción del calcio

A. L. Alarcón, R. Madrid, C. Egea, F. J. Sánchez

Dpto. Química Agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química,
Universidad de Murcia, Apartado 4021, 30080 Murcia

Se estudia la concentración de las distintas formas de calcio (soluble, ligado, insoluble inorgánico e insoluble orgánico) en las diferentes fracciones de plantas completas de melón tipo Galia (*Cucumis melo* L. cv. Revigal) muestreadas al final de su ciclo de cultivo, con el objetivo de conocer la distribución en la planta del calcio en sus diferentes formas bajo condiciones adversas para la absorción de este elemento. El calcio absorbido a través de la raíz está influenciado por la concentración salina de la solución, principalmente en sodio, y por factores que afectan la transpiración de la planta; se absorbe pasivamente, y una vez incorporado a la savia bruta se dirige preferentemente a las partes de mayor transpiración, siendo distribuido en la planta a través del xilema casi exclusivamente y no retransportándose apenas vía floema.

La experiencia se llevó a cabo en invernadero de policarbonato en la Universidad de Murcia. La humedad relativa fue mantenida al 65-85%, mientras que el intervalo de temperaturas fue de 15-25°C durante el día y por encima de 6°C durante la noche. La radiación lumínica sobre las plantas en ningún momento sobrepasó los 80 W/m². Se sembró en tacos de lana de roca el 21-9-95, el trasplante sobre tablas de lana de roca se realizó el 13-10-95 y el cultivo fue dado por finalizado el 5-2-96, con una duración de 116 días. Se empleó un agua de riego tratada con un equipo de descalcificación, obteniéndose valores inferiores a 0.01 mM en calcio y magnesio, sustituidos por sodio. El cultivo, se llevó a cabo bajo condiciones adversas para la absorción del calcio, debido a la baja intensidad lumínica, bajas temperaturas y elevado contenido de sodio en la solución nutritiva.

Se aporta el calcio en forma de Ca(NO₃)₂, en una concentración de 2-4 mM de Ca⁺² que se varía en función de los análisis quincenales efectuados en las soluciones de drenaje. El aporte hídrico se regula automáticamente mediante el uso de una bandeja de riego por demanda.

Las plantas una vez completado su ciclo de cultivo se fraccionan en hojas, tallos, peciolo, zarcillos y raíz, analizándose en cada una de ellas las distintas formas del calcio tras un proceso de extracción secuencial que separa cuatro formas de calcio de insolubilidad creciente, calcio soluble, calcio ligado (principalmente formando pectatos y acompañando a carbonatos), calcio insoluble inorgánico (formando fosfatos fundamentalmente) y calcio insoluble orgánico (en forma de oxalato); utilizando para ello los extractantes agua, nitrato sódico 2 N, ácido acético 10% y ácido clorhídrico 2 N, respectivamente. Los frutos recolectados una vez llegados a la madurez se fraccionan en corteza, pulpa y suero, determinándose igualmente sobre estas fracciones las distintas formas cálcicas.

Los resultados muestran como la fracción de calcio insoluble inorgánico es la mayoritaria en hojas, zarcillos, raíz y corteza de frutos; el calcio ligado es mayoritario en tallos, el

calcio insoluble orgánico en pulpa, mientras que la forma soluble es la predominante en peciolo. En cualquier caso, sólo en hojas y raíz las diferencias en favor de la forma mayoritaria son claramente significativas, siendo el calcio insoluble inorgánico (4.15% sobre materia seca en hoja y 0.88% en raíz) aproximadamente el doble que el insoluble orgánico (2.18% en hoja y 0.40% en raíz) que constituye la segunda forma cálcica en abundancia en ambas fracciones.

La forma minoritaria resulta ser el calcio insoluble orgánico en tallo, peciolo, zarcillos y corteza de frutos; y el calcio ligado en hojas, raíz y pulpa de frutos.

Atendiendo al calcio total (suma de las cuatro formas analizadas), la concentración expresada sobre materia vegetal seca, presenta de mayor a menor el orden siguiente: hojas (8.80%), peciolo (3.67%), zarcillos (2.58%), raíz (1.87%), tallos (0.90%), corteza de frutos (0.33%) y pulpa de frutos (3.47 ppm).

Interacción salinidad-magnesio en plantas de tomate

J. Abrisqueta, M. Carvajal, V. Martínez y A. Cerdá

Departamento de Nutrición y Fisiología Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC, Apdo. 4195, 30080 Murcia

En condiciones salinas el desarrollo de las plantas disminuye por un efecto osmótico, específico o nutricional. Este último efecto no solo puede inhibir la absorción sino también la translocación de algún elemento esencial. Es escasa la información relativa al efecto de la salinidad sobre la nutrición del magnesio. Plantas de tomate var. Daniella se han cultivado en invernadero en cubos de 120 L llenos de disolución nutritiva y dotados de un sistema de aireación permanente según un diseño experimental de bloques al azar. Los tratamientos consistían en cuatro niveles de Mg (0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM) y tres niveles salinos (1.0, 20.0 y 60.0 mM NaCl) dando un total de doce tratamientos distintos con tres repeticiones. Durante el experimento se controló semanalmente las variaciones en altura y la distancia en entrenudos. En floración (40 días después del transplante) se cosechó una planta por tratamiento para conocer la distribución de biomasa y de nutrientes en las distintas partes de la planta. En esta etapa también se determinaron los parámetros de relaciones hídricas y los contenidos en clorofila. Al final del experimento se determinaron el desarrollo vegetativo, los rendimientos en fruto y la calidad de los mismos. La salinidad disminuía tanto los rendimientos en fruto comercial como en biomasa. Los parámetros de relaciones hídricas y los contenidos de clorofila también disminuían con la salinidad, aunque los cambios dependían del nivel de Mg en el medio. La calidad de los frutos estaba relacionada con los niveles de salinidad y Mg. La incidencia de frutos con podredumbre apical estaba asociada con los niveles bajos de Ca en hoja y fruto. También se presenta la distribución de Mg en la planta y la influencia de los tratamientos en la composición mineral.

• Efecto del calcio sobre el transporte de agua a través de raíces de plantas de melón sometidas a estrés salino

M. Carvajal, J.M. Navarro, P. Flores y V. Martínez

Departamento de Nutrición y Fisiología Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura - CSIC, Apdo. Correos 4195, 30080 Murcia

El estrés salino normalmente produce una reducción del crecimiento de la planta debido a una deficiencia hídrica, toxicidad y desequilibrio iónico. Asimismo, se ha descrito el calcio es un factor importante implicado en la resistencia de las plantas a la salinidad, ya que reduce los efectos negativos de ésta. En este trabajo hemos estudiado la posibilidad de que el calcio intervenga en la regulación del paso de agua a través de las raíces de plantas de melón, y más concretamente a través de los canales de agua. Para ello, plantas de melón (cv. Bola de oro) crecieron durante 15 d en disolución nutritiva Hoagland aireada en cámara de cultivo. Los tratamientos con 50 mM de NaCl se aplicaron durante 3 d a algunas plantas control y a otras crecidas previamente (4 d) con 10 mM de CaCl₂. La conductancia hidráulica de las raíces disminuyó significativamente cuando se añadió NaCl 50 mM a la disolución nutritiva Hoagland, sin embargo, esta disminución fue menor cuando a estas plantas sometidas a estrés salino también se les añadió 10 mM de CaCl₂. Para establecer si las raíces de estas plantas tenían canales de agua sensibles al Hg, se añadió 50 µM HgCl₂ a la disolución nutritiva durante 5 min. La conductancia hidráulica experimentó una inhibición significativa. Esta inhibición fue mayor cuando la disolución nutritiva contenía 10 mM de CaCl₂. Los valores de conductancia hidráulica fueron revertidos a los iniciales cuando se añadió DTT (2 mM). La concentración de Ca intracelular disminuyó con respecto al control en las raíces de las plantas sometidas a estrés salino, aunque esta disminución no fue tan acusada en las raíces de las plantas estresadas a las que también se les añadió 10 mM de CaCl₂. Sin embargo, cuando se analizó el contenido de Ca en vesículas de membrana plasmática aisladas de las raíces, apareció un incremento en aquellas que habían estado creciendo con 10 mM de Ca, independientemente de que hubieran estado sometidas a estrés salino o no. De los resultados obtenidos podríamos decir que el Ca parece tener una intervención en la regulación de la funcionalidad de los canales de agua presentes en las raíces de las plantas de melón. Esta implicación podría ser directa, ya que como se ha propuesto, una fosforilasa Ca-dependiente podría ser la encargada de cerrar o abrir el canal de agua, o bien indirecta, por medio de la estabilización de los fosfolípidos de la membrana plasmática.

Efectos del As en la nutrición mineral de cultivos hortícolas

E. López, F. Burló, A. Carbonell y J. Mataix

Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Alicante, Apartado de Correos 99, 03080-Alicante, España

El arsénico (As) utilizado como pesticida en forma inorgánica en España hasta hace poco, había sido reemplazado en Europa por pesticidas arsenicales de origen orgánico, algo menos tóxicos y empleados en menores cantidades. En España, recientemente han comenzado a ser utilizados los pesticidas de origen orgánico. Los pesticidas arsenicales de origen inorgánico debido a su acumulación, a lo largo de los años, pueden ser perjudiciales para nuestros cultivos, sobre todo los hortícolas que son los que nos interesan en este estudio, y en especial rábanos y nabos.

Debido a que en cultivos de tipo hidropónico los nutrientes pueden acumularse en la parte externa de la raíz, hemos decidido distinguir entre piel y parte carnosa, para comparar mejor los efectos de absorción y adsorción y como interactúan el As con los demás nutrientes.

En la experiencia tras utilizar dos compuestos de origen inorgánico [As(V) y As(III)] y dos compuestos de origen orgánico [AMMA y ADMA] nos han salido los siguientes resultados:

La evidencia de que el As es químicamente similar al fósforo y que sustituye a éste en numerosos procesos metabólicos, nos han mostrado en diversos estudios como el As en forma de arseniato, compite con el fosfato como substrato en su sistema de absorción. Esto se observa a nivel radicular donde los niveles de fósforo en los tratamientos de As(V) son menores que en el blanco. De igual forma se observa un claro efecto antagónico en su adsorción, ya que la concentración de fósforo en la piel de la raíz disminuye conforme aumentamos los niveles de As en los tratamientos de As(V). Sin embargo en el tratamiento de AMMA ocurre todo lo contrario en la absorción radicular, es decir, al aumentar los niveles de As aumenta la cantidad de fósforo en la parte carnosa de la planta.

La adsorción de sodio en la piel de la raíz se ve afectada por la especie química de As utilizada, así para compuestos de origen inorgánico los niveles de sodio son menores que en los tratamientos en los que se han utilizado compuestos de origen orgánico. Esto puede ser debido a que como todos sabemos el sodio puede sustituir al potasio en algunas de sus funciones, y una de dichas funciones es la de neutralizar los ácidos orgánicos en el interior de la planta (Clarkson y Hanson, 1980).

Un efecto de sinergismo nos aparece en la adsorción y la absorción entre el manganeso y los compuestos que contienen As de origen orgánico, tanto en la piel (adsorción), como en la parte carnosa (absorción). Por otro lado, si nos fijamos en los niveles de manganeso, las cantidades de manganeso suelen ser superiores en aquellas plantas tratadas con As de origen orgánico. También se puede observar como todas las formas arsenicales provocan incrementos del nivel de manganeso en la parte aérea, (el AMMA hasta un 100%).

Las formas orgánicas AMMA y ADMA reducen el transporte de cinc a la parte aérea, acumulándose en la parte carnosa de la planta.

Absorción y transporte de As en cultivos hortícolas

E. López, A. Carbonell, F. Burló y J. Mataix

*Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Alicante, Apartado de Correos 99, 03080-Alicante. España*

El arsénico (As) ha sido utilizado en diversos pesticidas de carácter inorgánico. En la actualidad existen pesticidas de origen orgánico que continúan incorporándose. Estas circunstancias nos han hecho pensar en hacer un estudio para ver como ha podido influenciar este elemento acumulado en el suelo agrícola en plantas de origen hortícola, en este caso rábanos y nabos. Se trata de unos tubérculos cuya parte comestible se encuentra enterrada en el suelo de cultivo, lugar por donde la planta toma la mayoría de sus nutrientes y otros elementos como el As.

El hecho de que el As, en cultivos hidropónicos sobre todo, quede adsorbido en la parte externa de la raíz nos ha influenciado a separar parte carnosa y piel para observar con mayor detenimiento la absorción de As, y diferenciarla de la adsorción.

Este estudio se realizó con dos compuestos de origen inorgánico [As(V) y As(III)] y dos compuestos de origen orgánico [AMMA y ADMA]. Esto nos ayudará a comprender mejor los efectos de absorción y transporte en el interior de la planta.

Durante el crecimiento de las plantas se ha podido comprobar visualmente como en los tratamientos de AMMA la planta en su parte aérea se veía muy perjudicada, tanto en los rábanos como en los nabos, posiblemente debido a un alto transporte de As desde las raíces a las hojas. Este es un claro efecto motivado por la forma química en la que se encuentra el As, ya que en los otros compuestos de As no se observaron estos síntomas, ni siquiera en los tratamientos donde los niveles de As eran más elevados.

Los pesos de las plantas, y sobre todo en lo referente a la parte aérea se ha visto influenciado por el tratamiento aplicado, donde destaca los claros efectos tóxicos de la especie AMMA. Estos efectos se traducen en una disminución del peso ante estos tratamientos, respecto a los otros compuestos de As.

Los efectos nocivos del AMMA por su alta absorción y translocación dentro de la planta interfiere en el desarrollo de la misma afectando a sus pesos y en su aspecto.

Influencia del níquel sobre la nutrición mineral en dos especies de Crucíferas

Ch. Poschenrieder, M. Gomis y J. Barceló

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra. FAX: 93 581 2003.
E-mail: j_barcelo@cc.uab.es

El Ni es un micronutriente esencial para las plantas. Su función parece estrechamente relacionada con el metabolismo nitrogenado. No obstante, la concentración de Ni requerida es extremadamente baja y, desde el punto de vista agronómico, la toxicidad de Ni es mucho más relevante que su deficiencia. El descubrimiento de especies del género *Alyssum* con una alta capacidad de tolerar y de acumular elevadas concentraciones de Ni ha abierto la posibilidad de utilizar estas especies en la fitoremediación de suelos contaminados por Ni. En este trabajo se presentan los primeros resultados de un estudio comparativo de la tolerancia, de la capacidad de acumulación de Ni y de la influencia del Ni sobre la nutrición mineral en dos especies de la familia de las Crucíferas: *Sinapis alba* como especie no tolerante y *Alyssum pintodasilvae* como especie tolerante e hiperacumuladora de Ni. Las plantas fueron cultivadas en solución nutritiva completa (pH 6.5) con suministro de 0, 1 ó 10 μM Ni en el caso de *S. alba* y con 0, 10 ó 100 μM Ni en el caso de *A. pintodasilvae*. Se determinaron el crecimiento y la concentración de Ni, Fe, Mn, Zn y Cu en las raíces y partes aéreas. El tratamiento con 10 μM Ni fue tóxico para *S. alba*. En las raíces de esta especie se hallaron 200 y 670 μg Ni/g p.s. para los tratamientos con 1 ó 10 μM , respectivamente. El transporte de Ni hacia los tallos y hojas estaba restringido y en las partes aéreas se encontraron 1,2 y 94 μg Ni/g para los dos tratamientos respectivamente. El suministro de Ni influyó de forma muy negativa sobre el transporte de Cu, Fe y Zn desde las raíces hacia la parte aérea y se observó una fuerte inhibición de la absorción de Mn para el tratamiento con 10 μM de Ni. En *A. pintodasilvae* el Ni se acumuló preferentemente en las partes aéreas alcanzándose concentraciones de 0,5 a 1,2 % de Ni para los tratamientos con 10 y 100 μM , mientras que en las raíces la concentración no superó el 0,2%. También en *A. pintodasilvae* el suministro de Ni influyó negativamente en la translocación de Fe observándose una relación indirecta, altamente significativa entre la concentración de Fe en la parte aérea y el logaritmo de la concentración foliar de Ni. El Ni inhibió el transporte de Mn y Zn desde las raíces a las partes aéreas, pero las concentraciones de estos elementos se mantuvieron muy por encima de las observadas en *S. alba*. Al contrario de lo observado para *S. alba*, el suministro de Ni no afectó la concentración de Cu en las partes aéreas de *A. pintodasilvae*. Estos resultados no solamente confirman la extraordinaria capacidad de *A. pintodasilvae* de acumular Ni y su elevada tolerancia, sino también muestran la mayor capacidad de esta especie de evitar los trastornos en el balance de micronutrientes inducidos por el Ni. El fuerte efecto negativo del suministro de Ni sobre los niveles de Fe en las partes aéreas parece contradecir esta afirmación. No obstante, la especiación de los iones metálicos en la solución nutritiva mediante el programa GEOCHEM sugiere que el fuerte efecto inhibito-

rio del Ni sobre la translocación de Fe hacia las partes aéreas de ambas especies se debe, al menos en parte, al desplazamiento por parte del Ni del Fe del complejo de Fe-EDTA utilizado como fuente de Fe en la solución nutritiva. Este efecto a nivel de sustrato enmascararía las posibles diferencias entre ambas especies en mantener niveles adecuados de Fe en presencia de Ni.

Agradecimientos: Subvencionado por DGICYT PB 94-0738-CO2-01.

Caracterización de los ácidos grasos exudados por *Lupinus albus* y *Lupinus luteus* durante su ciclo fenológico

J.A. Lucas García, F.J. Gutiérrez Mañero, N. Acero, B. Ramos,
M^a.L. Barrientos y A. Probanza

Departamento de Biología, Sección de Biología Vegetal,
Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe,
28660-Boadilla del Monte, Madrid

La rizosfera se reconoce como la zona con mayor actividad microbiana (Hiltner, 1904), debido a la alta concentración de carbono orgánico y otros nutrientes, provocado en gran medida por la exudación radical. La liberación de sustancias orgánicas por las raíces es de vital importancia en la nutrición vegetal, ya que la mayoría de ellas son capaces de movilizar nutrientes, que de esta forma se ponen a disposición de la planta (Marschner, 1991; Vaughan et al., 1993). También intervienen en la formación de agregados del suelo, lo que de nuevo favorece la nutrición de las plantas (Forster, 1990). Un grupo de moléculas exudadas por las raíces y que intervienen en los procesos mencionados son los ácidos grasos (Lynch y Whipps, 1990; Bowen y Rovira, 1991).

Las plantas objeto de estudio son *Lupinus albus* y *Lupinus luteus*, dos especies de altramus utilizadas habitualmente como cultivo en zonas con suelos pobres y de naturaleza ácida. Las plantas muestreadas se recogieron en las parcelas de experimentación situadas en el Campus de la Universidad San Pablo CEU (Madrid). Tres parcelas estaban sembradas con una especie y otras tres con la otra, constituyendo cada parcela una réplica. Las plantas se muestrearon en dos momentos de su desarrollo, en floración y en fructificación, coincidiendo con los usos tradicionales de este cultivo. Las plantas se pusieron en tubos de ensayo con 60 mL de agua destilada y estéril y se introdujeron en una cámara de cultivo durante 24 horas, en este momento se cambian las plantas de tubo y se ponen en las mismas condiciones durante otras 24 horas, los líquidos de los tubos se mezclan y congelan hasta su análisis (Ström et al., 1994). La extracción y análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo según el método descrito por Frostegard et al., 1993. Una vez extraídos, las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases HP-5890 equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de 50 m HP-5 (fenilmetil silicona) e hidrógeno como gas portador. Se identificaron por espectrometría de masas 35 ácidos grasos de entre 14 y 20 átomos de carbono, y se cuantificaron comparando el área de pico con el de un patrón interno que era el ácido metil nonadecaico (19:0), para nombrarlos se siguió la nomenclatura de Tunlid y White (1992).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de componentes principales. En éstos se puede apreciar como las muestras se separaban en los dos componentes principales por especies, y por tiempos de muestreo, lo que nos indica un diferente patrón de exudación de ácidos grasos tanto entre especies, como entre estados fisiológicos. Entre los factores más importantes señalados por la bibliografía como determinantes de la naturaleza y cantidad de componentes orgánicos exudados por las raíces, se pueden citar la especie (Rovira y

Davey, 1974; Curl y Truelove, 1986) y la edad y estado de desarrollo de las plantas (Hale et al., 1978), junto con otros como pH, temperatura, disponibilidad de agua, condiciones de cultivo y factores nutricionales que en este caso eran todas comunes para las dos especies estudiadas. Por lo tanto las variaciones detectadas se pueden atribuir a los dos factores primeramente mencionados.

Actualmente se admite el importante papel de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular y de los aminoácidos en la adquisición de nutrientes por las plantas (Jones y Darrah, 1994; Ström et al, 1994), sin embargo no existen datos en cuanto al posible papel fisiológico de los ácidos grasos como componentes de los exudados radiculares que dado su elevado peso molecular deben clasificarse como secreciones cuya liberación requiere un proceso metabólico activo (Hale et al., 1978).

Las diferentes características y patrones de exudación detectadas en ambas especies en dos estados diferentes de su ciclo biológico, sugieren un papel fisiológico, probablemente definido por necesidades nutricionales, bien de las plantas, bien de los microorganismos que se desarrollan en su rizosfera

Sección C11:

**Regulación del crecimiento
y desarrollo**

Actividad Diamino oxidasa (DAO) en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum* L. durante las primeras horas de germinación

M. Bueno, S. García, A.M^a. Garrido y A. Matilla*

*Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología,
Universidad de Jaén, Paraje Las Lagunillas s/n 23071 Jaén*

* *Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Granada,
C/Fuentenueva s/n. 18001 Granada*

Las poliaminas son compuestos nitrogenados implicados en un buen número de procesos fisiológicos (Bagni y Torrigiani, 1992; Galston y Kaur-Sawhney, 1995); entre ellos se encuentra la germinación de algunas semillas (Matilla, 1996). La actividad DAO (enzima oxidativa que degrada diaminas como la putrescina y la cadaverina) ha sido estudiada en un gran número de plantas superiores; sobre todo en Leguminosas, en las que es muy activa (Federico y Angellini, 1991).

En la presente comunicación se muestran algunos datos del estudio que, sobre la actividad DAO, se está realizando en nuestro Grupo de Investigación. La medida de la actividad enzimática se lleva a cabo mediante un oxígrafo equipado con un electrodo Clark para medir el consumo de oxígeno ocasionado por la actuación del enzima; el sustrato utilizado fue la putrescina (Angellini y col. 1985). La actividad DAO se expresó como nmoles de O₂ consumido /mgr. proteína/min, y no es detectable a horas tempranas de germinación, comenzando a ser cuantificable a partir de las 42h., siendo mucho más activa en el eje embrionario que en los cotiledones. A los 3 días de germinación alcanza un máximo y a los 4 días su actividad desciende un 50%. La oxidación enzimática de la putrescina tiene diferente intensidad dependiendo de la zona del eje en que se haya valorado. Así, la máxima actividad DAO se encuentra en la zona de elongación y diferenciación, respectivamente. Esto está en concordancia con la hipótesis de Federico y Angellini (1986) quienes relacionan la DAO, localizada fundamentalmente en las paredes celulares y apoplasto, con los procesos de crecimiento y desarrollo de ambas zonas del órgano. También se presenta en esta comunicación la actividad DAO durante la embriogénesis de la semilla de garbanzo a partir del estado floral, así como en condiciones de germinación en que la ruta biosintética de poliamina está inhibida. (Proyecto DGICYT PB93-1113)

Angellini, R., Di Lisi, F. & Federico, R. 1985. *Phytochemistry* 24:2511-2513.

Bagni, N. & Torrigiani, P. (1992). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0-7923-1617-7.

Federico, R. & Angellini, R. (1991). In *Biochemistry and Physiology of Polyamine in Plants*, pp 41-56.

CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 0-8493-6865-0.

Federico, R. & Angellini, R. (1986). *Planta* 167:300-302.

Galston, A. W. & Kaur-Sawhney, R. (1995). In Davis, P. L. (ed.) Plant hormones. Kluwer Academic Publishers.

Matilla, A. J. (1996). Seed Science Research 6:81-93.

Modificaciones en la actividad ACC-oxidasa provocadas por las alteraciones en la compartimentalización del calcio celular de semillas de garbanzo*

M. Gallardo¹, M.C. Gómez-Jiménez^{2,3} y A.J. Matilla²

¹Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo,

Universidad de Vigo, 36200-Vigo, Pontevedra, España

²Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Granada, 18071-Granada, España

³Becaria de la "Fundación Ramón Areces"

Las células animales y vegetales necesitan unos niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular para llevar a término los procesos de transducción de señales extracelulares y convertirlas en procesos bioquímicos intracelulares (Bush, 1993; Bethke y cols., 1995). Los cambios intracelulares de Ca^{2+} están controlados, entre otros factores, por las fitohormonas (Bush, 1993). Sin embargo, existen muy pocos datos sobre el papel de la homeostasis celular del Ca^{2+} en la actividad de los enzimas implicados en la biosíntesis de las fitohormonas. Recientemente hemos demostrado que el último paso de la ruta biosintética del etileno, catalizado por la ACC-oxidasa (ACCO), tiene un importante papel en la germinación de semillas de garbanzo (Gallardo y cols., 1994; Muñoz De Rueda y cols., 1995). La presente comunicación muestra el efecto ocasionado por las alteraciones en la movilización del Ca^{2+} sobre la actividad ACCO *in vivo* e *in vitro* en ejes embrionarios de semillas de garbanzo.

La presencia de EGTA inhibe fuertemente la actividad ACCO *in vivo* e *in vitro*. Esta inhibición se revierte totalmente con Ca^{2+} exógeno, lo que nos sugiere un papel del Ca^{2+} en el proceso de activación del enzima. Si este Ca^{2+} es fundamentalmente apoplástico debe de ser posteriormente investigado. Cuando se quela el Ca^{2+} citoplasmático con TMB-8 se obtienen inhibiciones en la producción de etileno y en la actividad ACCO *in vivo* cercanas al 90%. Esta inhibición es del 100% cuando EGTA y TMB-8 están presentes. Al igual que sucede con el EGTA, la inhibición de la ACCO por TMB-8 puede ser revertida con Ca^{2+} ; sin embargo, no sucede lo mismo con la producción de etileno. Quizás sea debido a que las actividades ACC-sintasa y ACCO estén implicadas. La inhibición de los canales de Ca^{2+} con Verapamil provoca una inhibición total de la producción de etileno y de la actividad ACCO *in vivo*. Cuando este mismo experimento se realiza *in vitro*, la inhibición oscila entre el 85-90%. El Ca^{2+} exógeno no fue capaz de revertir la acción inhibitoria del Verapamil. En presencia de Cl_3La no se obtuvo producción de etileno, y la actividad ACCO *in vivo* se redujo un 84%. En estas condiciones, la ACCO *in vitro* fue estimulada sustancialmente. La comprensión de estos resultados referentes al posible papel del Ca^{2+} en la regulación de la actividad ACCO requiere un estudio a nivel de biología molecular sobre la expresión del ARNm de la ACCO y quizás de la actividad ACC-sintasa. Este es el objetivo actual de nuestra investigación.

*DGICYT PB93-1112.

Influencia del estadio de desarrollo y del tratamiento con auxinas en la regulación de la XET en pino

C. Barrachina y E.P. Lorences

Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50,
46100 Burjassot, València

El xiloglucano es el principal polisacárido estructural de las paredes celulares de dicotiledóneas y gimnospermas. El metabolismo del xiloglucano está directamente relacionado con la pérdida de rigidez de la pared celular, y por tanto del crecimiento vegetal. Hay numerosos enzimas implicados en este metabolismo, entre ellos glicosidasas, fucosidasas, glucanasas y la xiloglucano endotransglicosilasa (XET). Este enzima, mediante sucesivas reacciones de transglicosilación participaría tanto en la pérdida de rigidez necesaria para la expansión, y por tanto el crecimiento, como en la posterior incorporación de nuevas moléculas de xiloglucano a la red que forma la pared celular.

Nuestros trabajos anteriores en hipocótilos de pino muestran un descenso en la masa molecular media tanto en crecimiento intacto como en el inducido por auxinas. Todo ello hace pensar que la depolimerización del xiloglucano puede jugar un papel crítico en el proceso responsable de la extensión de las paredes y por tanto del crecimiento, tanto intacto como inducido por auxinas, en gimnospermas.

Con el fin de establecer una posible regulación de la XET ligada a la capacidad de crecimiento, en este trabajo hemos estudiado la actividad XET en diversos estadios del desarrollo de hipocótilos de pino (*Pinus pinaster* Aiton). Para ello, analizamos dicha actividad en las zonas subapical y basal de los hipocótilos, ya que a ellas corresponden la máxima y mínima capacidad de crecimiento respectivamente. Estudiamos a su vez hipocótilos en mitad de la fase de crecimiento rápido y al final de dicha fase. El estudio de la actividad XET se hizo en las distintas fracciones subcelulares: apoplasto, simplasto y pared celular (distinguiendo entre fracción iónicamente unida a la pared y fracción covalentemente unida a la pared).

Puesto que la XET ha sido propuesta como uno de los enzimas implicados en el crecimiento, estudiamos también su posible regulación por auxinas. Así, analizamos la actividad XET en segmentos de hipocótilos de pino previamente incubados con IAA. Utilizamos segmentos subapicales de hipocótilos en mitad de la fase de crecimiento rápido, puesto que es sobre ellos sobre los que el IAA ejerce principalmente su acción; de nuevo volvimos a realizar el estudio en las distintas fracciones subcelulares indicadas anteriormente.

En los resultados obtenidos se observa una relación entre actividad XET y capacidad de crecimiento, tanto en la actividad específica como en actividad total, cumpliéndose en algunas de las fracciones subcelulares esta relación, tanto a lo largo del hipocótilo como con la edad, lo que nos permite sugerir una regulación del enzima a nivel del desarrollo de la plántula. Sin embargo, en cuanto al estudio de la actividad XET en segmentos incubados con IAA, encontramos muy poca diferencia entre la actividad XET de hipocótilos incubados con tampón o con IAA, tanto si hablamos de actividad específica como de actividad total en todos los casos analizados.

Las giberelinas controlan el crecimiento del pedúnculo floral en *Pisum sativum*.

M.J. Rodrigo, Gil, J., Viana, R., López-Díaz, I. y J.L. García-Martínez
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas,
Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia

El pedúnculo floral de guisante crece entre unos cuatro días antes de antesis (d-4) y el día de antesis (d0), aproximadamente, momento en que alcanza su completo desarrollo. Los pedúnculos de las líneas de guisante V1 (tipo Alaska) y 205⁻ (*le*; fenotipo de tallo enano por tener parcialmente bloqueada la conversión de GA₂₀ a GA₁) son más cortos (aproximadamente un 50%) que los de las correspondiente líneas casi isogénicas V2 (*gio*; mutante aislado en nuestro laboratorio) y 205⁺ (*Le*), que poseen entrenudos más largos y mayor contenido de giberelinas (GAs) en el brote. La longitud de los pedúnculos en la línea silvestre V1 es también inferior a la longitud de los pedúnculos en la línea V51, seleccionada tras dos retrocruces de la línea 178 (*lacryc*; fenotipo de tallo "slender") con V1, y que presenta respuesta constitutiva a GAs.

La mayor longitud de los pedúnculos, al menos en la línea V2 (*gio*), es debido a que sus células son más alargadas que las del tipo silvestre (línea V1), aunque en ambas líneas las células poseen diámetros similares en secciones transversales. Los contenidos de GA₁, GA₈, GA₁₉ y GA₂₀ en pedúnculos V2 (*gio*) dos días antes de la antesis (d-2), momento en que presentan máxima tasa de crecimiento, son mayores que en pedúnculos de tipo silvestre. En el caso de GA₁, que es la forma activa propuesta para la regulación del alargamiento del tallo y la fructificación, su contenido en pedúnculos de *gio* es casi tres veces superior que en pedúnculos de tipo silvestre. No se encontraron diferencias, sin embargo, entre los contenidos de IAA o ABA. La aplicación de paclobutrazol (un inhibidor de la biosíntesis de GAs) en la solución nutritiva inhibe el alargamiento del pedúnculo, tanto en la línea silvestre como en el mutante *gio*. Todos estos resultados indican que el crecimiento del pedúnculo floral del guisante, igual que ocurre con el crecimiento del tallo y del fruto, dependen de GAs, probablemente de GA₁. Experimentos de escisión eliminando las hojas, el brote apical o la flor para conocer el posible control del desarrollo del pedúnculo por otros órganos, realizados con plantas silvestre tipo Alaska, ponen de manifiesto que la longitud final del pedúnculo está estrechamente relacionada con el brote y la flor en desarrollo. Con objeto de conocer la capacidad de síntesis de GAs de la flor y del pedúnculo se ha estudiado, mediante análisis Northern, los contenidos de RNAm de *ent-kaurino* sintasa A y GA 20-oxidasa (dos enzimas clave de la ruta de biosíntesis de GAs) en ambos órganos, utilizando como sonda dos clones de cDNA aislados de guisante. Se presentarán datos de dichos contenidos durante el desarrollo del pedúnculo y su posible correlación con la longitud final del mismo en líneas silvestres (V1 y 205⁺) y mutantes (V2 y 205⁻).

La sobreexpresión del gen *CONSTANS* acelera la floración en *Arabidopsis*

M. I. Igeño, R. Simon* y G. Coupland*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

Universidad de Córdoba, Avenida San Alberto Magno s/n, 140071 Córdoba

*Cambridge Laboratory, John Innes Centre,

Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK

En *Arabidopsis thaliana* el inicio de la floración está regulado por el fotoperíodo o tiempo que las plantas están expuestas a la luz durante el día. *Arabidopsis* ha sido clasificada como una planta de "día largo" puesto que fotoperíodos largos aceleran su floración. El mutante (*co*) de *Arabidopsis* no se ve afectado por la longitud del día y florece más tarde que la estirpe silvestre. Además, este mutante muestra una respuesta muy reducida a la vernalización. Esto sugiere que el producto del gen *CO* juega un papel muy importante en la regulación de la floración en respuesta a las condiciones ambientales. Para comprobar si una sobreexpresión constitutiva de este gen acelera la floración en *Arabidopsis*, se ha introducido en esta planta el gen *CO* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Se han obtenido 5 líneas de plantas transgénicas independientes en las cuales el gen *CO* se expresa a niveles más altos que en la estirpe silvestre. Se ha analizado el tiempo de floración y el fenotipo de estas plantas, y se ha observado que éstas son de reducido tamaño, con hojas pequeñas, tallos muy delgados y poseen una estructura carpeloide terminal. Son insensibles al fotoperíodo y muestran un fenotipo de floración temprana. Florecen antes que la planta silvestre tanto en condiciones de "día largo" como de "día corto" produciendo sólo 4 hojas de roseta en ambas condiciones, sin embargo no florecen inmediatamente después de germinar, lo que sugiere que el producto del gen *CO* no es suficiente para inducir la floración en etapas tempranas del desarrollo. No obstante, estos resultados demuestran que un aumento en la expresión del gen suprime el efecto del fotoperíodo sobre la floración en *Arabidopsis*. Por otra parte, se ha introducido la construcción 35S:*CO* en diferentes mutantes con el objeto de determinar si la sobreexpresión del gen *CO* puede anular el efecto de otras mutaciones que afectan al tiempo de floración.

Aislamiento y caracterización molecular de la ACC oxidasa en semillas de *Cicer arietinum*: expresión durante embriogénesis y germinación*

M.C. Gómez-Jiménez¹, A. Matilla, D. Garrido

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,

Fuentenueva s/n, 18071 Granada

La germinación de semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) es dependiente de la síntesis de etileno. Así, los factores que inhiben su producción también inhiben o retrasan la emergencia radicular. Los dos últimos pasos de la ruta biosintética de etileno están catalizados por las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa (ACCO). Debido a que se ha considerado la producción de ACC como el punto regulador en la biosíntesis de etileno, toda la investigación se ha centrado en el estudio de la regulación de la expresión génica de la ACC sintasa. Sin embargo, recientemente están surgiendo evidencias de que la ACCO también posee un papel regulador. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la enzima ACCO, tanto a nivel fisiológico como molecular, y sus implicaciones en el proceso de formación y germinación de semillas de garbanzo.

La actividad ACCO *in vitro* aumenta conforme progresa el proceso embriogénico, des- cendiendo bruscamente cuando la semilla alcanza el máximo desarrollo. En la semilla seca sólo se detecta actividad ACCO *in vitro* en el eje embrionario; mientras que a lo largo de la germinación esta actividad alcanza un máximo a las 24 h, no detectándose en los cotiledo- nes. En base a estos resultados, se utilizó el mRNA de los ejes embrionarios de semillas germinadas durante 24 h para el clonaje del cDNA de la ACCO. Para ello hemos empleado la técnica de PCR y oligonucleótidos degenerados diseñados en base a la homología de diferentes ACCO secuenciadas hasta la fecha. El resultado final ha sido un cDNA de cade- na completa (*gox-1*) de 1280 pb, con una pauta abierta de lectura de 316 aminoácidos que codifica una proteína de 36 KD. Este cDNA presenta una alta homología con otros aislados en diferentes especies, siendo la mayor con el cDNA de guisante (86% de identidad). El análisis de la organización genómica de la ACCO en garbanzo nos demuestra que está representada por una familia multigénica de al menos tres genes. La expresión del mRNA de *gox-1* nos demuestra que el transcrito está presente en el eje embrionario y en los cotile- dones de las semillas durante todo el período embriogénico; sin embargo, sólo pudo ser detectado en el eje embrionario de semillas secas. Durante la germinación, la actividad ACCO se correlaciona con la abundancia del ARNm ACCO; esto podría indicar que la acti- vidad ACCO esta regulada a nivel transcripcional durante la germinación del garbanzo.

Finalmente, el cDNA de la ACCO (*gox-1*) ha sido expresado en *E. coli*. Mediante el clonaje de *gox-1* en el vector de expresión pET28a(+) y transformación de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se ha podido detectar, tras inducción de las bacterias transformadas con IPTG, la presencia de una proteína de un peso molecular de unos 38 KD. Los extractos celulares de bacterias que han expresando la proteína inducida presentan una alta actividad ACCO *in vitro*, comparativamente al control, en el que no fue detectada.

* DGICYT PB93-1112.

¹Becaria de la Fundación Ramón Areces.

Algunas características fisiológicas de la actividad MACC-transferasa de *Cicer arietinum**

C. Martín-Remesal y A.J. Matilla

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,

Fuentenueva s/n, 18071 Granada

El enzima citosólico MACC-transferasa cataliza la transferencia de grupos malonilo desde el malonil-CoA al ACC, precursor inmediato del etileno. La conversión de ACC a MACC parece ser fisiológicamente irreversible y el producto final (MACC) un compuesto inactivo. Por consiguiente, la formación de MACC tendría como objetivo reducir los niveles de ACC-libre en el citosol y contribuir a la regulación de la producción de etileno, juntamente con la ACC-sintasa y la ACC-oxidasa.

Recientemente, en nuestro Grupo de Investigación se ha purificado parcialmente una MACC-transferasa a partir de ejes embrionarios de semilla de garbanzo (Martínez-Reina y cols., 1996). Este enzima tiene un pH óptimo de 7.5, un peso molecular de 54 ± 4 KD, y una Km para el ACC y el Mal-CoA de 0.4 mM y 90 μ M, respectivamente. Actualmente hay purificadas cuatro MACC-transferasas: tres en *Vigna radiata* (55KD, 36KD y 40KD) (Guo y cols., 1992; Benichou y cols., 1995; Chick y Leung, 1997) y una en tomate (Martin y Saftner, 1995).

En esta comunicación se estudia la actividad MACC-transferasa de *Cicer arietinum* bajo el punto de vista fisiológico, centrándonos en la embriogénesis de la semilla y en la germinación de la misma, proceso este último dependiente de la producción de etileno (Gallardo y cols., 1991, 1996).

La actividad MACC-transferasa sufre un aumento progresivo en los cotiledones conforme avanza la germinación. Por contra, su presencia decae sustancialmente en el eje embrionario, debido probablemente a la necesidad de una mayor canalización del ACC hacia etileno. Sin embargo, en presencia de NBD, que reduce ostensiblemente la producción de etileno, no se han encontrado alteraciones en la producción de MACC respecto al control. La inclusión de etileno provoca la reversión de la termoinhibición (30°C) en esta semilla y un concomitante aumento de la actividad MACC-transferasa en el eje embrionario y en los cotiledones. Esto parece indicar que es suficiente el etileno exógeno para provocar la germinación en semillas termoinhibidas, canalizándose preferentemente el ACC a MACC.

A temperaturas supraóptimas (30 y 35°C) la actividad MACC-transferasa es mucho mayor que en el control (25°C), lo que confirma una mayor canalización de ACC hacia MACC y por tanto, un descenso en la producción de etileno, induciéndose la inhibición de la germinación. Se estudia también la distribución de la actividad MACC-transferasa en planta entera y en ejes embrionarios. Hojas y raíces son los órganos con mayor actividad, mientras que en el tallo y en el cotiledón hipogeo se detecta aproximadamente la mitad que en aquellos. En el eje embrionario, la mayor actividad específica se localiza en la región sub-apical y de diferenciación, estando en estudio las alteraciones en el eje embrionario y cotiledones durante el periodo embriogénico de esta semilla.

*PB93-1112 (DGICYT).

**Evaluación de algunos efectos de CCC
(cloruro de 2-cloroetil-trimetil amonio) en el ciclo de vida
de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Alubia**

A. S. Romano y R.O. Romano

*Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento de Informática, Facultad de
Ciencias Agrarias, Alberdi 47, Universidad Nacional de Jujuy,
4600- San Salvador de Jujuy, República Argentina*

Este trabajo tuvo como objetivo, evaluar efectos del retardante de crecimiento CCC - mediante la imbibición de semillas - sobre diferentes etapas en el ciclo de vida de poroto Alubia.

Los ensayos se realizaron tratando semillas por imbibición con diferentes concentraciones del retardante. Los tratamientos fueron :

O: testigo ; I: CCC 250 ppm ; II: CCC 500 ppm ; III: CCC 1000 ppm y IV: CCC 1500 ppm.

Con sub-muestras de cada tratamiento, se evaluó :

- 1) Calidad de semillas: mediante pruebas de germinación standard y mediciones de conductividad eléctrica.
- 2) Emergencia de plántulas: por siembras a campo.
- 3) Variables del rendimiento: por siembras en macetas individuales, mantenidas hasta su cosecha.

Del análisis de los resultados, surge que las diferentes concentraciones de CCC- sin afectar la calidad de la semilla- modificaron la emergencia a campo, duración de las diferentes etapas fenológicas y algunos parámetros del rendimiento.

El tratamiento II(concentración de CCC 500 ppm) incrementó significativamente : % de plántulas que emergieron a campo y partición a semilla, determinando adelantos en los estados fenológicos, lo que a su vez se acortaron en el tiempo respecto del comportamiento del material testigo.

Papel de las giberelinas en el desarrollo floral de tomate

C. Payán¹, P. Gómez¹, R. Lozano¹, M.J. Rodrigo², J.L. García-Martínez²
y T. Angosto³

¹Dpto. Biología Aplicada; ³Dpto. de Biología Vegetal,

E. Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04210-Almería;

²I.B.M.C.P. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, 46022-Valencia, Spain

El desarrollo floral requiere de la transición de un período de crecimiento vegetativo a otro de crecimiento reproductivo, para lo cual un meristemo vegetativo se transforma en meristemo de inflorescencia y este posteriormente se determina como meristemo floral. Muchos factores controlan este proceso, tales como las señales eléctricas, los carbohidratos, las hormonas específicas de la floración (florigeno/antiflorígeno), además de otros reguladores del crecimiento. La giberelinas juegan un papel central en la formación de muchas especies, de hecho se produce un aumento transitorio en sus niveles previo a la antesis. También es bien conocida la influencia de las condiciones medioambientales, por ejemplo, la temperatura, sobre el desarrollo de los órganos florales. Las bajas temperaturas inducen un incremento en el número de pétalos, estambres, carpelos y lóculos en las flores de tomate. Esta respuesta es similar a la inducida por tratamientos con GA₃ 0,5 mM en Tween-20 al 0,02% mediante aplicaciones de 10 µl en la base de la hoja más próxima al meristemo, siendo los órganos más sensibles el gineceo y los estambres. Nosotros hemos demostrado que las giberelinas provocan un incremento progresivo en el tamaño del meristemo floral desde el estadio de prepétalo hasta precarpelo, al mismo tiempo que va perdiendo la forma redondeada para adquirir una forma elipsoidal ya que se produce un aumento mayor de uno de los ejes del meristemo. Al igual que ocurre con temperaturas bajas, los tratamientos con GAs también promueven la aparición de cambios homeóticos. Entre todas las posibilidades de órganos mixtos, los sépalos petaloideos, los estambres carpeloideos, con o sin óvulos externos, y los carpelos estaminoideos aparecen con una frecuencia del 8, 24 y 18%, respectivamente, de las flores analizadas. La transformación más frecuente (42%) es la aparición de carpelos dentro de los carpelos.

Los efectos de las temperaturas bajas sobre las flores de tomate pueden estar relacionados con un incremento en los niveles de giberelinas endógenas. Análisis realizados en flores mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) de las giberelinas indican que las plantas crecidas en condiciones de frío (17°C día/7°C noche) tienen niveles más elevados de GA₁, GA₃ y GA₁₉ que las plantas control (26°C día/18°C noche). Los niveles de GA₂₀ permanecen constantes en estas condiciones.

Tanto las alteraciones en el número como en la identidad de los órganos florales, representan efectos fenotípicos similares a los producidos por mutaciones en genes merísticos y homeóticos caracterizados en otras especies, lo que sugiere que las GAs podrían modificar la expresión de los correspondientes genes homólogos en tomate. Nosotros hemos analizado, mediante Northern-blot e hibridación *in situ*, los patrones de expresión de genes MADS-box de tomate (TM4, TM5, TM6 y TAG1) de flores de plantas tratadas con GA₃. Estos resultados son discutidos en relación a la importancia de las interacciones génico-hormonales requeridas para el control del desarrollo floral en plantas.

Desarrollo de un método de cromatografía líquida con detección electroquímica para la cuantificación de compuestos indólicos en extractos vegetales

*Marino B. Arnao, Germán Garrido,
José Sánchez-Bravo y Manuel Acosta*

*Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal),
Universidad de Murcia. 30100-Murcia*

Las plantas contienen en sus tejidos compuestos de naturaleza indólica en concentraciones muy bajas. El ácido indol-3-acético (AIA) y sus metabolitos relacionados presentan un particular interés fisiológico. El AIA, la auxina natural más importante, es una fitohormona con un papel relevante en aspectos del desarrollo vegetal tales como: el crecimiento celular, la promoción del enraizamiento, la diferenciación del tejido vascular, la dominancia apical, muchas respuestas trópicas, la partenocarpia, etc.

Desde la utilización de bioensayos para la determinación de la actividad auxínica, mucho han evolucionado las técnicas de detección y cuantificación de compuestos indólicos. Actualmente, las técnicas más utilizadas son las inmunológicas (Radioinmunoensayo y ELISA) y la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLU) es muy utilizada ya que presenta una excelente sensibilidad y selectividad, y a diferencia de la GC-MS, no precisa de procesos de derivación de la muestra. En cualquiera de las técnicas cromatográficas, el uso de estándares internos marcados con isótopos pesados o radioactivos se hace imprescindible para la exacta corrección de los datos debido a las pérdidas en el proceso de aislamiento y purificación. Otra técnica de detección de índoles acoplada al HPLC es la electroquímica. En ella, los índoles son oxidados selectivamente a unos valores de potencial determinados, apareciendo una señal en forma de corriente eléctrica. No obstante, a pesar de su buena sensibilidad y selectividad, la detección electroquímica es una técnica poco utilizada en la determinación de índoles en extractos vegetales.

En esta comunicación se presenta la puesta a punto de un método de determinación de índoles en extractos vegetales por HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC). Se utiliza para la cromatografía una columna de fase reversa (ODS) y una fase móvil conductiva que permite la elución y separación de los índoles: Indol-3-metanol; Ácido Indol-3-acético; Indol-3-aldehído y Ácido Indol-3-carboxílico. La identificación de los picos se efectúa mediante el registro de sus espectros de absorción por un detector de díodos acoplado en serie. La detección electroquímica de estos compuestos se realiza aplicando al electrodo de carbono un potencial entre +0.80 y +0.90V. En el caso del Indol-3-metanol y el Ácido Indol-3-acético, el límite de detección se encuentra en el rango bajo de nanogramos; en cambio el Indol-3-aldehído no es detectable en estas condiciones de voltaje. El método es utilizado para la determinación de índoles endógenos en extractos vegetales.

Características del transporte y metabolismo de AIA en esquejes de clavel

G. Garrido¹, E.A. Cano¹, M.B. Arnao, M. Acosta, y J. Sánchez-Bravo

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal),

Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100-Murcia

¹*Departamento de Investigación y Selección, Barberet & Blanc S.A.*

30890-Puerto Lumbreras, Murcia

El mantenimiento del transporte basípeto de ácido indol-3-acético (AIA) es esencial para el enraizamiento de esquejes de tallo en aquellas especies en que la formación de raíces adventicias (FRA) se produce de forma espontánea, como es el caso del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Aunque las distintas especies y variedades presentan diferencias en la cantidad de auxina necesaria para un enraizamiento óptimo, en muchos casos se ha comprobado que la FRA depende de la concentración de auxina acumulada en la zona del enraizamiento (base del esqueje), y que el proceso se inhibe a concentraciones supraóptimas. La capacidad para transportar y metabolizar el AIA en los esquejes, puede ser por tanto decisiva para regular la concentración de hormona implicada en el enraizamiento. El estudio se ha realizado en tres variedades de clavel (Oriana, Elsy y Virginie) pertenecientes al catálogo de Barberet & Blanc S.A. Se han utilizado secciones aisladas con distinta localización en el esqueje: región basal del esqueje (base) y del nudo inferior (nudo). Las secciones se colocan sobre discos de agar, y sobre la superficie apical se deposita [5-³H]-AIA. La radioactividad acumulada en el agar al variar el tiempo de transporte permite determinar la velocidad e intensidad del transporte por el método de Van der Weij. Al bajar la temperatura de 25°C a 4°C el transporte disminuye en las tres variedades estimándose valores de Q_{10} de 1,3 (Virginie), 2 (Elsy) y 2,5 (Oriana). La iluminación disminuye el transporte en Elsy y lo aumenta en Virginie. En las tres variedades, los valores de transporte en las bases son inferiores a los de los nudos, por lo que el nudo debe considerarse el factor que limita la concentración de auxina en la zona de enraizamiento. Cuando cesa el transporte (24 h después de la aplicación de AIA), las secciones se extraen sucesivamente con acetonitrilo y NaOH a fin de determinar el metabolismo auxínico (oxidación y conjugación, respectivamente). En general, el metabolismo aumenta cuando el transporte disminuye debido, en la mayor parte de los casos, a un aumento de la fracción acetonitrilo. Al estudiar la localización tisular del transporte no se encuentran diferencias significativas entre la capacidad de transporte de la médula y de los tejidos más externos (cilindro vascular, corteza y epidermis), y por tanto, a diferencia de lo que ocurre en los tallos de otras especies, el transporte polar de AIA en los esquejes de clavel no parece localizado en un tejido concreto.

Actividad α -fucosidasa y α -xilosidasa en *Brassica oleracea*

J. Sampedro, F. de la Torre, M.A. Rodríguez-Paradela, I. Zarra, G. Revilla
Lab. Fisiología Vegetal, Fac. de Biología, Univ. de Santiago de Compostela

El complejo xiloglucano-celulosa constituye una de las redes poliméricas que mantienen la estructura de las paredes celulares primarias. Este complejo está basado en la capacidad de unión mediante puentes de hidrógeno del xiloglucano (XG) a las microfibrillas de celulosa, de tal forma que una cadena de XG puede unirse a más de una microfibrilla, al mismo tiempo que una sola microfibrilla estará unida a varias cadenas de XG. La capacidad de formar puentes de hidrógeno entre las cadenas de xiloglucano y las microfibrillas de celulosa está condicionada por la estructura de las cadenas laterales del xiloglucano. Así, las cadenas Fuc→Gal→Xil→ estabilizan la cadena del xiloglucano aumentando su capacidad de unión a las microfibrillas, mientras que las cadenas Xil(no tendrían este efecto estabilizador. Por otra parte los oligosacáridos derivados del xiloglucano (oligo-XG), XXXG y XXFG pueden actuar como aceptores en la reacción de endotransglicosidación catalizada por la xiloglucan-endotransglicosidasa (XET), enzima que juega un papel importante en la extensión de la pared celular. La pérdida del resto de xilosa del extremo no reductor del oligo-XG produciendo GXXG y GXFG, anula su capacidad de actuar como aceptores de la XET. Finalmente el XXFG presenta actividad inhibitoria de la extensión de la pared celular, mientras que el XXXG la estimula. Por todo lo anteriormente expuesto, las modificaciones de las cadenas laterales del xiloglucano y de los oligo-XG, tienen gran importancia en la modulación de su función en la pared celular. Las enzimas implicadas en dicha modulación son α -fucosidasa, β -galactosidasa, α -xilosidasa y β -glucosidasa. En el presente trabajo se presentan los resultados de la purificación de dos de estas enzimas, α -fucosidasa y α -xilosidasa, a partir de extractos de hojas de repollo.

A las hojas jóvenes de repollo (*Brassica oleracea capitata* D.C. *alba*) se les eliminaron las nervaduras principales y se homogeneizaron en un mortero con medio tamponado. A continuación se realizó una precipitación fraccionada con sulfato amónico. Las fracciones conteniendo actividad α -fucosidasa y α -xilosidasa, posteriormente se sometieron a cromatografía de intercambio iónico en columnas de SP-Sepharose y Q-Sepharose, cromatografía de afinidad (Concanavalina A), e isoelectroenfoque. El grado de purificación se siguió mediante SDS-PAGE. La actividad α -fucosidasa se determinó frente a fucosil-lactosa, mientras que la α -xilosidasa se determinó como liberación de pentosas de oligo-XG obtenidos a partir de XG de Tamarindo.

El presente trabajo ha sido financiado por la DGICYT (PB95-0853).

Cambios estructurales asociados a los polisacáridos pécticos y su relación con el cambio de las propiedades viscoelásticas de la pared celular de pino durante el crecimiento

M. Goicoechea, G. Revilla, I. Zarra

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de Santiago, 15706 Santiago de Compostela

Para que una célula vegetal pueda crecer, elongarse, su pared celular ha de sufrir una serie de cambios bioquímicos en sus componentes estructurales que den como resultado la relajación de la pared celular¹. Esto supone un cambio en las propiedades mecánicas de la pared, entre las que se encuentra la capacidad de extensión. En la pared celular están presentes componentes que se extienden tanto elástica (reversible) como plásticamente (irreversible)². Está ampliamente aceptado que las pectinas determinan de manera considerable la extensibilidad plástica de la pared³. Es lógico suponer que la naturaleza gelificante de las pectinas actúa como un fluido viscoso que podría limitar parcialmente el deslizamiento de las moléculas responsables de la pérdida de rigidez. En este mismo sentido, las modificaciones estructurales de las pectinas podrían aumentar la porosidad de la pared permitiendo una mayor movilidad de las enzimas responsables de la relajación de la pared celular⁴. Entre los posibles candidatos responsables de las modificaciones estructurales de los polisacáridos pécticos están: la formación de complejos de boro, la formación de puentes de calcio, el grado de esterificación de los grupos carboxilo y la presencia de ramificaciones neutras asociadas a la cadena principal.

El objetivo de nuestro trabajo fue por lo tanto estudiar la variación de cada uno de los componentes anteriormente citados, así como los cambios en la extensión plástica y elástica durante el crecimiento del hipocótilo de pino (7, 10 y 16 días) y a través del gradiente de crecimiento del hipocótilo de 10 días (regiones I, II, III y IV). Para ello se realizó una extracción no degradativa de los distintos tipos de poliuronidos presentes en la pared de *Pinus pinaster* Aiton mediante el tratamiento secuencial con CDTA 50 mM y Na₂CO₃ 50 mM siguiendo el método descrito por Selvendran y O'Neill (1987)⁵. La composición en azúcares se analizó por GLC. El contenido de boro fue medido usando el método del azometino ácido⁶. El contenido de metanol liberado en cada una de las muestras fue cuantificado por GLC a 80° C usando una columna capilar SGL-20. El contenido en calcio se midió por espectrofotometría de absorción atómica.

Los resultados muestran como a medida que maduran los tejidos, es decir, a medida que disminuye la capacidad de crecimiento de la pared, tanto en la pared de hipocótilos de distintas edades como a lo largo del gradiente de crecimiento del hipocótilo de 10 días, hay un cambio en la capacidad de extensión plástica (irreversible) de la pared celular. Así mismo, observamos una disminución en el contenido de azúcares neutros asociados a las fracciones pécticas, en el contenido de calcio asociado a las paredes así como una disminución en el grado de metilesterificación de los grupos carboxilo presentes en estas pectinas.

La evolución en el contenido de boro en la pared por el contrario muestra un aumento a medida que se pierde la capacidad de crecimiento. La relación de cada uno de estos componentes con los cambios observados en la capacidad de extensión de la pared celular de pino se discutirá con más detalle.

-
1. Taiz L.1984. *Annu.Rev.Plant Physiol.*35:585-657.
 2. Cosgrove DJ.1987. *Plant Physiol.* 84:561-564.
 3. Jarvis MC.1984. *Plant Cell Environ:* 153-164.
 4. Cosgrove DJ, Durachko DM.1994. *J.Exp.Bot.* 45:1711-1719.
 5. Selvendran RR, O'Neill MA.1987. En:"*Méthods of Bioquematical Analysis*", pp 25-153. New York.
 6. Bingham FT.1992. En:"*Methods of Soil Analysis*".Part 2.Chemical and Microbiological Properties". pp. 431-447.

La autólisis incrementa la extensión inducida por pH ácido de paredes celulares aisladas de coleoptilos de maíz

M.J. Peña, I. Zarra, G. Revilla

Lab. Fisiología Vegetal, Fac. de Biología, Univ. de Santiago de Compostela

El crecimiento celular está condicionado por las propiedades mecánicas de sus paredes celulares. Los cambios bioquímicos que se producen en ellas durante el crecimiento se reflejan en cambios en estas propiedades, por lo que su determinación *in vitro* puede revelar importante información sobre la naturaleza de los cambios que se producen en la pared celular. Nuestro interés se centra especialmente en el mecanismo que da lugar a la relajación de la pared, el cual se ha relacionado con las enzimas hidrolíticas presentes en las paredes celulares, sin embargo, en ningún caso la adición exógena de estas enzimas a paredes aisladas ha provocado cambios en su extensión.

Esta situación ha cambiado desde el descubrimiento de las expansinas, proteínas que no hidrolizan enlaces, pero que son capaces de inducir *in vitro* la extensión de paredes aisladas sometidas a tensión a pH ácido (McQueen-Manson et al., 1992). Sin embargo, todavía queda por resolver el papel que desempeñan en la extensión las distintas enzimas hidrolíticas presentes en la pared. En este trabajo hemos estudiado el efecto de la actuación de estas enzimas en la extensión inducida por pH ácido en paredes celulares aisladas de coleoptilos de maíz.

Para ello, se utilizaron segmentos obtenidos de coleoptilos de 4 días de edad, que después de ser congelados y descongelados, se incubaron durante 24 h en condiciones de autólisis. Seguidamente, se fijaron en un extensiómetro para determinar sus propiedades mecánicas. Los segmentos sometidos a la tensión producida por una masa de 20 g, se incubaron con tampón Hepes 50 mM pH 6.8 que a los 10 in fue reemplazado por tampón acetato sódico 50 mM pH 4.5 o por el tampón inicial. Después de 30 min la masa fue retirada y se determinó la extensión total, plástica y elástica producida, así como el *creep*. De igual manera se realizaron estas determinaciones en otra serie de segmentos que no había sido sometida a autólisis. Como controles se utilizaron segmentos hervidos en agua destilada durante 2 min. Las inactivaciones se realizaron antes y después de la incubación autolítica, así como en segmentos sin incubación. En todos los casos, a partir de estos segmentos se prepararon paredes celulares y se determinó mediante Cromatografía de Gases su composición en azúcares neutros no celulósicos. De este modo se pudo comprobar que la autólisis había tenido lugar, ya que se encontró un importante descenso en el contenido de glucosa y en menor medida de arabinosa.

Los resultados obtenidos mostraron que la autólisis previa de las paredes celulares provocó un incremento en la extensión total, el *creep*, así como en la extensión elástica en respuesta al pH ácido. También puede observarse como la autólisis modifica por sí misma las propiedades mecánicas de la pared, si se considera que también se produce un incremento en la extensión elástica cuando se inactivan los segmentos después de la autólisis o cuando segmentos activos se someten a tensión a pH 6.8. Así pues, en base a estos resultados podemos decir como conclusión que los procesos autolíticos modifican las propiedades mecánicas de la pared celular incrementando su capacidad de extensión en respuesta al pH ácido.

S. McQueen-Manson, D.M. Durachko, D.J. Cosgrove. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.

Histochemical detection of H_2O_2 by tissue printing as a precocious "marker" of rhizogenesis

C. C. Neves, S. Q. Amâncio

Dept. de Botânica e Eng.^a Biológica, Instituto Superior de Agronomia da
Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda,
1399 Lisboa Codex, Portugal

Hydrogen peroxide is a constituent of oxidative plant metabolism. It is the product of peroxisomal and chloroplastic oxidative reactions and, due to its extremely positive redox potential, is an unstable molecule that reacts with many reduced compounds and is easily degraded by catalase, an enzyme ubiquitous in plant material. H_2O_2 is probably a substrate for peroxidases in the formation of cell wall polymers such as lignin, suberin and insoluble glycoproteins.

One of several assay procedures for the determination of H_2O_2 is based on the oxidation of KI to I_2 by the H_2O_2 visualised by the formation of the blue-black I_2 -starch complex. This reaction is the basis of a histochemical **assay of H_2O_2** in freshly cut plant tissue sections. Using this reaction together with the technique of "tissue printing" it is possible to detect and localise H_2O_2 in higher plant organs in a rapid and simple manner. The basic principle of the "tissue printing" technique consists in the fact that much of the content of the cells **at the surface** of a freshly cut tissue section **can be transferred** to an adhesive or absorptive **surface** with little or no lateral mixing or diffusion.

During the process that leads to the formation of adventitious roots, a certain group of induced cells is required to dedifferentiate and subsequently divide and enlarge forming a meristem. It is clear that such a major shift in the developmental fate of cells involves complex interacting changes at the biochemical level, including the H_2O_2 level present in those cells and surrounding tissues. The present communication describes the application of the **H_2O_2 printing assay** during the adventitious rooting process in cuttings of *Vitis vinifera* L. cultured *in vitro*.

In general, high levels of H_2O_2 can be detected in no longer growing tissues and much lower levels can be observed in actively growing or meristematic tissues of stems and roots. The histological cuts and tissue printings obtained with grapevine stems showed that H_2O_2 was preferentially associated with the epidermis, pith parenchyma and vascular cambium. The ring of tissue between cortex and pith containing the xylem and phloem does not show a detectable print, appearing to be devoid of H_2O_2 .

The histological data obtained during the root induction and acclimatization stages showed that 4 days after the beginning of auxin treatment the cells from the vascular cambium and medullar rays began to divide actively. The tissue printings obtained in the same days also showed some sort of desorganization in those particular tissues. In histological cuts from the 6th day we can identify the meristemoids, that by day 8 become individualised, giving rise to the typical pointed shape of the root primordium. The tissue printings of

the 6-7th day after the beginning of "root induction" permit us to identify the meristemoids, which appear uncoloured and so, devoid of H_2O_2 . The technique allowed us also to distinguish, in later stages, the root vascular system, which appeared coloured. During the rhizogenesis process we also registered a thickening of the cortical parenchyma and loss of radial symmetry.

In grapevine plants, as in some other species like soybean, there are marked differences between the pattern of H_2O_2 displayed by the stem and the roots. In grapevine adventitious roots we could observe high H_2O_2 levels in the newly formed vascular system and low levels of H_2O_2 in the cortex, contrasting with the stem patterns.

This research was supported by a grant from the Sub-Programa Ciência e Tecnologia of the 2^o Quadro Comunitário de Apoio (PRAXIS XXI/BD/5104/95) to C.N.

El gen *FRUTO1* controla el desarrollo del ovario en *Arabidopsis thaliana*

M. Aguilar, P. Aranda y M. Pineda

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, e Instituto Andaluz de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba.
Avda. San Alberto Magno, s/n, 14071-Córdoba

El desarrollo de la flor en la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* es un proceso muy bien caracterizado a nivel morfológico. El pistilo bicarpelar de *Arabidopsis* es un órgano complejo que aparentemente presenta un proceso de desarrollo y diferenciación único en la organogénesis de la flor. En nuestra aproximación genética y molecular a este proceso hemos aislado diversas estirpes mutantes, obtenidas mediante mutagénesis química con EMS, que están afectadas en el desarrollo normal del pistilo.

La mutación *fruto1*, objeto de este estudio, afecta fundamentalmente a la diferenciación de tejidos de la pared del ovario. Los estudios genéticos realizados muestran que se trata de una mutación simple, nuclear y recesiva. Se han aislado cuatro estirpes mutantes con un fenotipo similar, denominadas tentativamente *frt1-1*, *frt1-2*, *frt1-3* y *frt1-4*. Un análisis de complementación ha revelado que se trata de alelos del mismo locus *FRT1*. Este locus se ha mapeado en el cromosoma 5, ligado al marcador visual *yi* (inflorescencia amarilla).

Un seguimiento completo del ciclo de vida de la planta ha permitido realizar una detallada caracterización fenotípica de los distintos alelos mutantes *frt1* en condiciones de cultivo estándar. La mutación no muestra ningún fenotipo aparente durante la etapa vegetativa, y la transición a la fase reproductiva no difiere respecto de la estirpe silvestre: tampoco se ve afectada la longitud del internodo, el número, la morfología y la disposición de pétalos, sépalos y estambres son normales.

Un análisis detallado del fruto a nivel anatómico e histológico reveló la existencia de grandes aberraciones en los mutantes *frt1*. Si bien las flores son fértiles, el fruto sólo alcanza un tercio de la longitud del silvestre, y el número de semillas por fruto es aproximadamente un 50% del normal. En definitiva, esta mutación impide una correcta diferenciación de los distintos tejidos de la pared del ovario y del septum, que aparentemente presentan una especie de interconversión. Como consecuencia de esta malformación del ovario, las semillas se desarrollan en un espacio limitado, y presentan deformaciones; si bien son totalmente viables. Las plantas *frt1* también presentan un grado de ramificación mayor, y un tiempo de floración más extendido; por éste motivo, el número de frutos y semillas por planta es sensiblemente mayor que en la estirpe silvestre. La mutación también parece afectar al desarrollo de la hoja caulinar, que muestra un contorno más redondeado que en la estirpe silvestre.

El análisis fenotípico de dobles mutantes consruídos con *frt1* y otros mutantes que afectan al desarrollo floral (*clavata*, *pistillata*, y *flo1*) corrobora la idea de que *FRT1* parece intervenir fundamentalmente en la diferenciación de tejidos de la pared del ovario. Sin

embargo, nuestros experimentos de cultivo de los mutantes *frit1* en condiciones de inhibición de la transición floral (días cortos, o baja temperatura) muestran que *FRT1* interviene de alguna manera promoviendo la transición del meristemo de inflorescencia a meristemo floral, ya que las flores de plantas *frit1* presentan en estas condiciones algunas características típicas de inflorescencias, tal como hojas caulinares en el peciolo.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que el locus *FRT1* es esencial para la diferenciación de la pared del ovario en *Arabidopsis thaliana* e interviene indirectamente, o jugando un papel secundario, en la promoción de la transición hacia el meristemo floral. Nuestro trabajo en la actualidad se centra en la caracterización de la mutación a nivel celular y subcelular, así como en la clonación del gen *FRT1*, con objeto de profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuales se ejecuta(n) la(s) función(es) reguladora(s) de este gen.

Implicación del etileno en la regulación de las respuestas a la deficiencia de hierro en plantas no gramíneas

F.J. Romera, E. Alcántara y M. Díaz de la Guardia

Departamento de Agronomía, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba,

Apdo 3048, 14080 Córdoba

El hierro (Fe) es un elemento muy abundante en la mayoría de los suelos pero suele estar poco disponible para las plantas, sobre todo en los suelos calcáreos, debido a su baja solubilidad. Las plantas gramíneas absorben el Fe en forma de Fe(III)-fitosideróforos, siendo los fitosideróforos sustancias quelantes del Fe liberadas por las propias raíces. Las no gramíneas absorben el Fe preferentemente como Fe(II), para lo cual deben reducir el Fe(III), el más abundante en los suelos, por medio de un sistema redox localizado en las células epidérmicas de la raíz. Para favorecer la absorción del Fe, estas plantas ponen en marcha una serie de mecanismos de respuesta, tales como incrementar la capacidad para reducir Fe(III) a Fe(II), acidificar el medio y desarrollar engrosamientos con abundantes pelos radicales en las zonas subapicales de las raíces. Estos mecanismos de respuesta no están siempre en marcha, sino que se activan o inactivan dependiendo de las necesidades de Fe de la planta.

Para explicar la regulación de los mecanismos de respuesta se han sugerido básicamente dos tipos de hipótesis. Unas, consideran que es el propio Fe, mediante su unión con proteínas reguladoras u otras sustancias (nicotianamina), el que regula los genes responsables de los diferentes mecanismos de respuesta. Otras hipótesis sostienen que la deficiencia de Fe altera los niveles de algunas hormonas y que son éstas las que inducen los mecanismos de respuesta.

Nuestro grupo de investigación ha obtenido en los últimos años numerosas evidencias que sugieren que la hormona etileno está implicada en la regulación de los citados mecanismos de respuesta. A continuación se citan resumidamente algunos de los experimentos realizados y los resultados más importantes obtenidos en los mismos.

Si se cultivan plantas (pepino, guisante, tomate, etc) en soluciones nutritivas sin Fe, éstas, transcurridos varios días, inducen los mecanismos de respuesta. Esto no ocurre si en la solución nutritiva se añade algún inhibidor de la síntesis de etileno (cobalto, AVG, AOA) o de su acción (tiosulfato de plata). En el mismo sentido, conviene señalar que existe un mutante de guisante ("E107") que siempre tiene en marcha los mecanismos de respuesta, independientemente de que se cultive en solución nutritiva con o sin Fe. Cuando se cultiva con Fe abundante, este mutante absorbe grandes cantidades de Fe, lo cual le ocasiona problemas de toxicidad e, incluso, la muerte. Pues bien, dicho mutante se comporta como una planta normal si, al cultivarlo con Fe, se añade algún inhibidor de la síntesis de etileno.

Cuando se cultivan las plantas en soluciones nutritivas con Fe abundante, éstas no inducen los mecanismos de respuesta. Sin embargo, si se aplica en la solución nutritiva etefón (sustancia liberadora de etileno) o ACC (precursor de la síntesis de etileno), se inducen dichos mecanismos.

Las raíces de las plantas cultivadas en soluciones nutritivas deficientes en Fe producen más etileno que las raíces de plantas cultivadas en soluciones con Fe abundante. Esta mayor producción de etileno ocurre a los pocos días de cultivar las plantas con bajo nivel de Fe, antes de que aparezcan síntomas de clorosis en las hojas jóvenes.

En conjunto, los resultados anteriores sugieren que la deficiencia de Fe estimula la producción de etileno en las raíces y que esta mayor concentración de etileno es la que induce la puesta en marcha de los mecanismos de respuesta.

Abreviaturas: ACC: ácido aminociclopropano carboxílico; AOA: ácido aminooxiacético;
AVG: aminoetoxivinilglicina.

Análisis del contenido en capsicinoides en el pimiento de Padrón durante el desarrollo

B. Estrada, F. Pomar, J. Díaz, F. Merino y M. A. Bernal
Departamento de Biología Animal, Biología *Vexetal* y Ecología,
Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071, A Coruña

El pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, es un cultivar altamente apreciado en Galicia desde el punto de vista gastronómico. Se consume en estado inmaduro cuando su tamaño dista bastante del que alcanzará en la madurez y cuando el nivel de capsicinoides es muy bajo. La comercialización se realiza en fresco para su consumo como hortaliza, a diferencia de otros considerados picantes que se cosechan en estado de sobremaduración, se comercializan como especia y se consumen generalmente molidos.

Los frutos se recogieron en el invernadero con una periodicidad semanal desde el día 14 hasta el día 42 contados a partir de la antesis. A lo largo del proceso de maduración se ha observado un incremento notable en el peso y en el tamaño, así como en el contenido de carotenoides, mientras que las clorofilas presentan un máximo en el día 28, para luego disminuir.

La extracción de los capsicinoides se realizó según la técnica de Collins *et al.* (1995) analizándose posteriormente las muestras por HPLC, utilizando para ello una columna C₁₈ Spherisorb ODS2.

Los resultados obtenidos muestran que la capsicina y la dihidrocapsicina comienzan a acumularse entre los 14-21 días después de la floración, alcanzando su máximo valor a los 42 días, siendo la capsicina el componente mayoritario en todos los estadios analizados. Este patrón de acumulación estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores en otras variedades (Suzuki *et al.*, 1980; Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990). Sin embargo hay que destacar que los niveles de capsicinoides en el pimiento de Padrón son muy bajos incluso en el último estadio estudiado, por lo que se podría considerar como un pimiento moderadamente picante.

Collins, M.D., Wasmund, L.M. & Bosland, P.W. (1995). HortSci. 30 (1): 137-139.

Suzuki, T., Fujiwake, H. & Iwai, K. (1980). Plant Cell Physiol. 21 (5): 839-853.

Salgado-Garciglia, R. & Ochoa-Alejo, N. (1990). Plant Cell Rep. 8: 617-620.

(Trabajo financiado por la Xunta de Galicia. XUGA 10301/A/95)

Biosíntesis y modulación de la flavona Diosmina en plantas de *Hyssopus officinalis*

F. R. Marín, A. Ortuño, O. Benavente-García, M.D. Fuster y J.A. Del Río
Departamento de Biología Vegetal (Unidad de Fisiología Vegetal), Facultad de Biología,
Universidad de Murcia, Espinardo, 30100, Murcia, España

Los flavonoides, son compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de las plantas, de gran interés industrial. Dentro de este grupo, la diosmina, una flavona glucósido, presenta importantes aplicaciones farmacológicas por su efecto sobre la mejora de la resistencia vascular¹, como antioxidante², con efecto anti-peroxidación de lípidos³, como protector frente a radicales libres⁴, e inhibidor de la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas⁵.

En este trabajo ponemos de manifiesto la presencia de diosmina como flavona mayoritaria en la labiada *Hyssopus officinalis*, planta aromática que hasta el momento sólo era considerada de interés industrial para la obtención de aceites esenciales.

Los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución y resonancia magnética nuclear revelan que los máximos niveles de diosmina, en dicho material vegetal, se detectan en los sépalos y en las hojas (51 y 40.5 %, respectivamente, del contenido total de diosmina detectado en la planta), siendo menores los niveles de diosmina detectados en los pétalos, tallos y raíces (en conjunto representan el 8.5% restante).

El estudio sobre la evolución de los niveles de diosmina durante el desarrollo de la planta muestra, que los niveles detectados en los tallos y raíces no presentan cambios con la edad (entorno a 0,3 y 0,1 g/100 g de peso seco, respectivamente, mientras que en las hojas se aprecia un incremento gradual con la edad que oscila entre 1,5 g/100 g de peso seco para hojas de plantas jóvenes (50 mm de altura), hasta 3 g/100 g peso seco en hojas de plantas adultas (150-300 mm de altura).

La aplicación de 6-Bencilaminopurina (6-BA, 5 ppm) y Ac. 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 50 ppm), pone de manifiesto el posible papel de dichos fitorreguladores sobre el metabolismo secundario en el mencionado material vegetal, al haberse observado, transcurridas tres semanas desde los correspondientes tratamientos, incrementos en los niveles de diosmina en las hojas y tallos en torno al 68 y 147%, respectivamente para las plantas tratadas con 6-BA, y del 23 y 109%, respectivamente, para las plantas tratadas con 2,4-D.

1. Tsouderos, Y (1991) Z. kardiol. 80, 95-101.

2. Villa, P., Cova, D., De-Francesco, L., Guaitani, A. Palladini, G., Perego, R. (1992) Toxicology 73, 179-89.

3. Dumon, MF., Freneix Clerc, M., carbonneau, MA., Thomas, MJ., Perromat, A., Clerc, M. (1994) Ann. Biol. Clin. Paris 52, 265-270.

4. Jean, T., Bodinier, MC. (1994) Angiology 45, 554-559.

5. Labryd, C. (1994) Angiology 45, 524-530.

Influencia del etileno sobre la capacidad biotransformadora del sesquiterpeno valenceno en nootkatona en flavedo de pomelo

D. García Puig, A. Ortuño, I. Porras*, A. García Lidón* y J. A. Del Río

Departamento de Biología Vegetal (Unidad de Fisiología Vegetal),

Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia

**Dpto. Citricultura (CIDA), La Alberca, 30150 Murcia, España*

La síntesis del sesquiterpeno Nootkatona se produce durante los procesos de maduración-senescencia en los frutos de pomelo. Los tratamientos con Etileno incrementan la síntesis y/o acumulación de Nootkatona en dichos frutos, debido al efecto que esta hormona produce sobre la evolución de dicha fase del desarrollo, acelerando los procesos de carotenogénesis en la corteza, así como induciendo cambios morfológicos en el exocarpo y ultraestructurales a nivel de cromoplastos^{1,2}. Por otra parte, hemos establecido tanto a nivel de fruto (1), como por cultivo de células³, que el sesquiterpeno Valenceno puede ser el precursor *in vivo* de la Nootkatona en el mencionado material vegetal.

En el presente trabajo, nos proponemos estudiar el efecto del Etileno y su precursor, el ACC, sobre la actividad enzimática formadora de Nootkatona presente en el flavedo de pomelo, responsable de la hidroxilación y posterior oxidación de Valenceno para dar 2-Hidroxivalenceno y Nootkatona, respectivamente.

Los resultados obtenidos, muestran una significativa estimulación en el proceso de biotransformación de Valenceno en Nootkatona, ejercida tanto en las aplicaciones de Etefón (compuesto liberador de Etileno), como de ACC, presentando unas contracciones óptimas de 200 y 1000 ppm, respectivamente.

A tiempos cortos de análisis (horas), la aplicación de Etefón a 200 ppm provoca un importante aumento, tanto en la producción de Nootkatona, como en su velocidad de biosíntesis, obteniéndose un incremento del 60% respecto al control. A tiempos de análisis mayores (hasta 9 días), persiste el efecto estimulador del Etefón sobre la producción de Nootkatona, obteniéndose un incremento en torno al 80% respecto al control.

Con respecto a la aplicación de ACC a 1000 ppm, a tiempos cortos de análisis, se observa un aumento significativo, tanto en la producción como en la velocidad de síntesis de Nootkatona, obteniéndose un incremento en torno al 20% respecto al control. A tiempos largos de análisis, se sigue manifestando el efecto estimulador del ACC en la actividad formadora de Nootkatona, alcanzándose un incremento en la producción del 90% respecto al control.

Este estudio confirma la influencia positiva del etileno sobre la actividad biotransformadora del Valenceno en Nootkatona en flavedo de pomelo, abriendo un nuevo modo de acción de esta fitohormona en su papel estimulador de la biosíntesis de Nootkatona, ejercido posiblemente a nivel de expresión génica, incrementando la expresión de la actividad/es enzimáticas encargadas de la formación de este sesquiterpeno.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PS 96-CA-11 de la Conserjería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua, de la Región de Murcia, España.

-
1. Del Río, J. A.; Ortuño, A.; García Puig, D.; Porras, I.; García Lidón, A.; Sabater, F. (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40, 1488-1490.
 2. Ortuño, A.; García Puig, D.; Sabater, F.; Porras, I.; García Lidón, A.; Del Río, J. A. (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41, 1566-1569.
 3. Del Río, J. A.; Ortuño, A.; García Puig, D.; Iborra, J. L.; Sabater, F. (1991) *Plant. Cell. Rep.* 10, 410-413.

Inducción por Brasinólidos de β -tubulinas relacionadas con la elongación de los epicotilos de *Cicer arietinum*

F. J. Muñoz, B. Dopico y E. Labrador

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal),

Facultad de Biología, Universidad de Salamanca,

Campus Miguel Unamuno, Avda. Campo Charro s/n. 37007

Salamanca, España

Email: labrador@gugu.usal.es

Un clon de cDNA que codifica para una posible β -tubulina ha sido aislado de una genoteca de cDNA construida a partir de mRNA de epicotilos de 5 días de *Cicer arietinum*. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA, nos indica la presencia de un posible sitio de autorregulación en los 4 primeros aminoácidos, de un lugar de unión de GTP y de una zona específica de unión a calcio y proteínas MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos). Todas estas características son comunes en las β -tubulinas descritas en plantas (Fosket y Morejohn, 1992). El análisis del DNA de garbanzo mediante Southern, nos indica la existencia de una familia multigénica de β -tubulinas.

Este clon está regulado diferencialmente a través del crecimiento. Así, los niveles de expresión están en correlación con la tasa de crecimiento, tanto en las plántulas como en plantas adultas. Así mismo los niveles de transcritos de β -tubulinas son más altos en los tejidos que presentan elongación tales como epicotilos y raíces de plántulas y tallos de plantas adultas.

Los Brasinólidos (BR), hormonas que inducen el crecimiento de secciones de epicotilos de garbanzo, tienen un efecto inductor de la expresión de β -tubulinas. Otras hormonas, como el IAA, aunque inducen el crecimiento no modifican los niveles de transcritos de β -tubulinas. El distinto efecto que tienen las combinaciones de hormonas BR+IAA y GA_3 +IAA sobre los niveles de β -tubulinas, indicaría que BR y GA_3 promueven el crecimiento inducido por IAA a través de diferentes mecanismos. De estos resultados podemos concluir que el crecimiento inducido por BR en epicotilos de *Cicer arietinum* está en relación con los cambios que esta hormona produce en la expresión de β -tubulinas.

Efectos del ácido abscísico y el calcio en la expresión de calmodulina durante la germinación de semillas de garbanzo

D. Rodríguez, J.M. de Prada, O. Lorenzo y C. Nicolás

*Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de Salamanca, Avda Campo Charro s/n, 37007 Salamanca*

El ácido abscísico (ABA) es el inhibidor endógeno más importante de la germinación y numerosas evidencias indican que su modo de acción implica cambios en la síntesis de RNA y proteínas. Así se ha demostrado que, durante la germinación, el ABA induce la síntesis de ciertos RNAs y proteínas probablemente implicados en la inhibición de la germinación (Goday et al., 1988), al mismo tiempo que inhibe la síntesis de proteínas específicas de este proceso (Jacobsen y Beach, 1985; Rodríguez et al., 1987).

Nuestros trabajos previos sobre la germinación de semillas de garbanzo, han demostrado que el ABA induce la síntesis de al menos tres proteínas y sus correspondientes RNAs y que esta inducción depende de la presencia de calcio el cual, bien solo o bien mediante su unión a la calmodulina, puede participar en las respuestas de las semillas al ABA (Colorado et al., 1994).

En el presente trabajo hemos aislado un clon de cDNA, al que hemos denominado CaM-C, a partir de una genoteca de cDNA construida con mRNAs de semillas de garbanzo en germinación, y utilizando como sonda el clon CaM-F1 de haya que codifica para la calmodulina (Nicolás et al., 1997).

El clon CaM-C contiene 858 pb, una fase de lectura abierta de 447 nucleótidos que codifican para una proteína de 149 aminoácidos, en los que aparecen los 4 dominios de unión a calcio y presenta una homología superior al 80% con otras calmodulinas tanto de origen animal como vegetal. El estudio de su expresión mediante Northern blot muestra que los transcritos correspondientes a esta proteína son abundantes durante la embriogénesis y germinación de las semillas en condiciones óptimas, pero disminuyen notablemente en presencia de ABA, que inhibe la germinación, lo que indica la importancia de la calmodulina en los procesos germinativos.

La adición de calcio al medio, aumenta los efectos del ABA en la inhibición de la expresión de estos mensajeros y este efecto es similar, aunque menos acusado, tras la adición de agentes quelantes de calcio, sugiriendo que la síntesis de la CaM, requiere calcio, pero ni un exceso ni un defecto del ión, son beneficiosos para su expresión.

Colorado P, Rodríguez A, Nicolás G, Rodríguez D. 1994. *Physiol Plant* 83: 461-467.

Goday A, Sánchez-Martínez D, Gómez J, Puigdomenech P, Pagés M. 1988. *Plant Physiol* 88: 564-569.

Jacobsen JV, Beach LR. 1985. *Nature* 316: 275-277.

Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D. 1997 *Plant Physiol* 113: 306.

Rodríguez D, Dommes J, Northcote DH. 1987. *Plant Mol Biol* 9: 227-235.

Caracterización de un clon de cDNA que codifica para una protein kinasa regulada por ABA y por calcio en semillas durmientes de *Fagus sylvatica*

O. Lorenzo, C. Nicolás, G. Nicolás y D. Rodríguez

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de Salamanca, Avda Campo Charro s/n, 37007 Salamanca

La dormición de semillas constituye un bloqueo de la germinación debido normalmente a características intrínsecas de la semilla, como la presencia de cubiertas seminales duras o impermeables al agua o a los gases, o un inadecuado balance hormonal (Bewley y Black, 1994). Se han realizado numerosos estudios para establecer las causas de la dormición y los factores o tratamientos que permiten eliminarla, sin embargo los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en este proceso aún no se han esclarecido (Goldmark et al., 1992).

El factor hormonal más estudiado en relación con este fenómeno ha sido el ácido abscísico. Los experimentos realizados con mutantes deficientes o insensibles al ABA o con inhibidores de su síntesis, han demostrado que el ABA es necesario tanto para la inducción como para el mantenimiento de la dormición de semillas (Karssen et al., 1983; Le Page-Degivry y Garello, 1992), y que esta hormona puede regular la expresión de ciertos genes relacionados con este proceso, aunque la función y el papel fisiológico de las correspondientes proteínas no son conocidos.

Nuestros estudios se han centrado en la especie *Fagus sylvatica*, cuyas semillas presentan una dormición endógena que puede ser eliminada por estratificación fría durante un tiempo superior a 6 semanas, mientras que el ABA revierte los efectos de las bajas temperaturas (Nicolás et al., 1996). La construcción de una genoteca de cDNA a partir de mRNAs de semillas tratadas con ABA, y su posterior búsqueda diferencial con sondas obtenidas de semillas durmientes y no durmientes, nos ha permitido aislar una serie de clones regulados por ABA y estudiar su expresión durante la salida de la dormición. Uno de estos clones codifica para una protein kinasa con características tanto de serina-treonina como tirosina protein kinasas. La expresión de este clon, que hemos denominado FsPK1, es muy baja en semillas durmientes y disminuye con la estratificación que permite eliminar la dormición, mientras que aumenta en el tratamiento con ABA, que mantiene a las semillas durmientes. La expresión del mensajero correspondiente a este clon parece ser dependiente del calcio, ya que aumenta en presencia de este ion y disminuye en los tratamientos con agentes quelantes del calcio. Por otra parte, se comprueba como los mayores niveles de expresión de este mRNA se producen cuando se añaden conjuntamente ABA y calcio, lo que podría indicar un papel del calcio como mediador de la acción del ABA. La conclusión final de este trabajo sería que en semillas de *Fagus sylvatica*, el ABA induce la expresión de un gen que codifica para una protein kinasa, probablemente utilizando el calcio como segundo mensajero, y esta protein kinasa parece estar relacionada con los efectos del ABA en el mantenimiento de la dormición.

-
- Bewley DJ, Black M. 1994. En: Seeds: Physiology of Development and Germination (2ª ed). Plenum Press, NY.
Goldmark PL, Curry J, Morris CF, Walker-Simmons MK. 1992. Plant Mol Biol 19: 433-441.
Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan D, Breckland AE, Koorneef M. 1983. Planta 157: 158-165.
Le Page-Degivry MT, Garello G. 1992. Plant Physiol 98: 1386-1390.
Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D. 1996. Physiol Plant 96: 244-250.

Análisis de la conjugación *in vitro* entre poliamina, ADN y ácido evérmico

J.L. Mateos¹, A. Reyes² y M.E. Legaz¹

¹Departamento de Biología Vegetal I (Cátedra de Fisiología Vegetal),
Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

²Departamento de Genética, Facultad de Biología,
Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid

Trabajos preliminares (Mateos y Legaz, 1996, 1997) demuestran que las poliaminas putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) están presentes en el líquen *Evernia prunastri*, tanto en su forma libre como conjugadas a macromoléculas, siendo SPD la poliamina más abundante. El ácido evérmico, uno de los compuestos fenólicos presentes en los talos de *E. prunastri*, aparece conjugado a la fracción de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (Fracción PH). En esta fracción, están presentes, asimismo, macromoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos. Este hecho permite suponer que el ácido evérmico esté conjugado a poliaminas, formando parte de un complejo integrado por ADN o proteínas.

En la comunicación anterior se ha demostrado cómo PUT y SPD están presentes en las muestras de ADN genómico aislado de los talos de *E. prunastri*. El ácido evérmico también ha sido detectado en la fracción PH de poliaminas extraída de las suspensiones del genómico.

A la luz de estos resultados, se planteó el estudio de la posible conjugación *in vitro* entre estos tres grupos de sustancias. El trabajo ha sido dividido en dos etapas: por un lado, el estudio del tipo de unión de SPD (por ser la poliamina más abundante) y ácido evérmico; y por otro, el efecto que tiene lugar sobre la doble hélice, tras la formación del complejo ADN-poliamina o ADN-ácido evérmico.

La identificación de los mecanismos de conjugación entre la poliamina y el fenol ha sido llevada a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo y espectrofluorimetría. El espectro de transmisión de la mezcla de patrones reveló la existencia de una fuerte banda de transmisión debida a la vibración de tensión del enlace C-N de la amida (R-CO-N-R'). Sin duda, la formación de este enlace sólo sería posible de existir conjugación entre SPD y ácido evérmico. Además, el ácido evérmico está ejerciendo un claro efecto *Quenching* de la fluorescencia de la SPD derivatizada con cloruro de dansilo, por ocupar el fenol los sitios cromogénicos de la triamina.

Las poliaminas se conjugan mediante unión electrostática a los ácidos nucleicos de la célula e inducen y estabilizan la compactación de las estructuras de dichos ácidos, al igual que lo hacen *in vitro* (Tabor y Tabor, 1984).

Para la molécula de ADN, en cuya constitución se alternan las secuencias de pares de bases de purina-pirimidina para cada hebra, la conjugación de poliaminas induce un cambio conformacional hacia la forma ADN-Z (Thomas y Messner, 1988). Un incremento en el valor de la razón de absorbancias $A_{295\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$ es uno de los principales criterios para determinar las perturbaciones estructurales que sufre la molécula de ADN-B, en su conversión a la forma ADN-Z (Pohl *et al.*, 1972). Consecuentemente, el análisis *in vitro* de la conjugación entre poliamina, ADN y ácido evérmico se llevó a cabo, siguiendo el comportamiento espectral de las mezclas a 260 y 295 nm. En este sentido, una concentración de ácido evérmico 1,0 mM fue capaz de favorecer la condensación del ADN nativo, alcanzándose el máximo grado de compactación de éste al suplementar la mezcla de ADN-fenol con $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SPD.

Análisis *in vivo* de la fracción de poliaminas conjugadas a ADN genómico en el líquen *Evernia prunastri*

J.L. Mateos¹, A. Reyes² y M.E. Legaz¹

¹Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid. ²Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

Las poliaminas putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM) son un grupo de aminas alifáticas de bajo peso molecular, que se caracterizan por poseer grupos amino que se encuentran protonados a valores de pH fisiológico. Desde el punto de vista funcional, las poliaminas aparecen como reguladores de una serie de procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal, tales como la división y proliferación celular, y la diferenciación organogenética. Asimismo, son reguladores de un numeroso grupo de enzimas fosforilantes, por otra parte implicados en la transducción de la señal.

Derivado de su carácter policatiónico, las poliaminas pueden aparecer en forma libre, así como formando conjugados a los grupos electronegativos de otros compuestos, ya sean de pequeño tamaño molecular (fenoles, azúcares) o macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana). Concretamente, la unión de poliaminas a ADN, las clasifica como un grupo de metabolitos reguladores de los fenómenos de replicación, transcripción y traducción.

Existen numerosos trabajos, en los que se ha estudiado, al menos en condiciones *in vitro*, el efecto que producen la unión de poliaminas sobre la estructura de la doble hélice del ADN. Sin embargo, son muy pocos los estudios de que se dispone con respecto a la unión de ambos ligandos en los sistemas vivos, y menos aún, en células vegetales.

En el presente trabajo, se ha desarrollado un método de aislamiento de ADN del genoma de *E. prunastri*, que ha permitido el posterior análisis de los metabolitos que se encuentran conjugados a dicho ácido. Entre ellos, se han detectado las poliaminas PUT y SPD.

Los talos de *E. prunastri* contienen cuatro especies de fenoles líquénicos: atranorina, clo-roatranorina y los ácidos evérmico y úsnico. De todos ellos, el ácido evérmico (mayoritario en esta especie) es el único fenol que aparece como conjugado a poliaminas y ADN, en aquellas suspensiones correspondientes a la extracción del ácido nucleico. Consecuentemente, se postula la hipótesis de que el ácido evérmico se **conjug**a a poliaminas, pero no lo **hace de** manera exclusiva, sino que forma parte de un complejo **en el** que el ADN aparece como integrante.

El anabolismo de los fenoles líquénicos es susceptible de ser regulado por efectores, tales como urea o arginina. Asimismo, la acumulación de poliaminas es distinta, según sea el valor de pH extracelular. Por ello, los talos han sido incubados en tampón MES 20 mM, a pH 6,8 ó 9,15, en presencia o ausencia de L-arginina 40 mM, o bien urea 10 mM, durante diferentes tiempos, a 26 °C en oscuridad. De todas las condiciones ensayadas, la urea a pH 6,8 resulta óptima para la acumulación de PUT y SPD conjugadas a ADN, así como para los niveles de ácido evérmico que se conjugan a estos ligandos.

Desde el punto de vista fisiológico, la existencia de estos conjugados pudiera estar relacionada con la prevención del daño oxidativo que sufre la molécula de ADN, a consecuencia de la radiación UV, quedando ésta absorbida por el ácido evérmico. Esta reacción de fotooxidación es uno de los principales desencadenantes del envejecimiento celular, en cuya prevención también intervienen las poliaminas.

Aplicación de los reguladores de crecimiento en *Cupressocyparis leylandii* E. L. Greene y en *Cupressus arizonica* E. L. Greene, dos especies de coníferas ornamentales

G. García-Martín, E. Fernández-Galiano y P.V. Mauri

Servicio de Investigación Agraria. Comunidad de Madrid, Apdo 127,
Alcalá de Henares, 28800 Madrid

En dos especies de coníferas ornamentales, *Cupressocyparis leylandii* E.L. Greene y *Cupressus arizonica* E.L. Greene, se realizaron aplicaciones de los siguientes reguladores de crecimiento: ácido giberélico (GA_3), bencilaminopurina (BAP), etileno, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (NAA), con el objetivo de encontrar diferencias en los patrones de crecimiento de las plantas según los diferentes tratamientos. La aplicación de estos reguladores de crecimiento se hizo durante tres años. Las aplicaciones se realizaron durante las estaciones de primavera y de otoño, y la frecuencia de las aplicaciones fue en unos casos cada 4 semanas y en otros cada 6 semanas. Las concentraciones que se aplicaron son las que siguen:

- BAP: 10^{-4} M y 10^{-3} M
- GA_3 : 10^{-3} M
- Etileno: 10^{-3} M
- NAA: 10^{-3} M
- IBA: 10^{-4} M
- Testigo sin ningún regulador de crecimiento.

Las aplicaciones se realizaron bien directamente sobre el sustrato o mediante pulverización foliar. Las plantas se cultivaron en contenedores de 5 L con una mezcla de perlita y turba 40/60. La fertilización de las plantas se realizó mediante fertirrigación utilizando una disolución nutritiva para coníferas en hidroponía.

Se midieron los siguientes parámetros:

- 1º Altura de las plantas
- 2º Diámetro a nivel del cuello de la planta
- 3º Volumen del sistema radicular
- 4º Volumen de la parte aérea.

Dentro de estas mediciones, se han encontrado diferencias significativas dependiendo de los distintos tratamientos.

Grzesik, M. y Marcinkowski, J. Effect of gibberellins and dikégulac on the growth of some species of ornamental plants. (1992) Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach. Seria-B, Rosliny Ozdobne. 17: 57-66

Wang, Q et al. Effect of exogenous gibberellin $A_{4/7}$ on tracheid production, longitudinal growth and the levels of indole-3-acetic acid and gibberellins A_4 , A_7 and A_9 in the terminal shoot of *Pinus sylvestris* seedlings. (1992). Physiologia Plantarum. 86: 202-208

Transformación estable de maíz mediante electroporación y regeneración de plantas fértiles

I. Claparols, M. Santos, J. Rigau y J. M^a Torné

Departament de Genètica Molecular,

Centre d'Investigació i Desenvolupament (C.S.I.C.)

c/ Jordi Girona n^o 18-26, 08034-Barcelona

Los biólogos que trabajan con maíz esperaban desde hace tiempo el desarrollo de un método de transformación eficaz. Pocas especies como ésta tienen tanta importancia para la agronomía y la biología básica. La capacidad de crear maíz transgénico fácil y rápidamente representa una gran ventaja tanto para los que quieren mejorar sus caracteres agronómicos, como para los que pretenden utilizar la transformación como una herramienta para estudiar cuestiones fundamentales acerca de la genética y desarrollo del maíz.

La finalidad del presente trabajo era lograr mediante la técnica de la electroporación la transformación de callos compactos de maíz (Tipo I) y la posterior regeneración de plantas fértiles y transformadas. De esta manera se dispondría de una nueva herramienta para los diferentes estudios que con esta especie se vienen desarrollando en el departamento.

Hemos utilizado callos del híbrido HP y de la línea LW. Los trabajos se han hecho en distintos períodos de tiempo para facilitar la selección del callo y la posterior regeneración de plantas y obtención de semillas. Las electroporaciones con el cultivar HP se realizaron entre febrero-mayo de 1996 y disponemos actualmente de semillas de plantas transformadas. Los trabajos con el cultivar LW se efectuaron entre noviembre-febrero de este año y las plantas regeneradas inician su crecimiento en invernadero.

El plásmido utilizado contiene el gen de la fosfinotricina acetil transferasa (*bar*) y el gen *gus*, dos promotores, el CaMV 35S y el de la *Adh1* y dos intrones.

Los callos embrionarios previamente plasmolizados fueron cocultivados con el plásmido antes de su electroporación (sistema BioRad). Seguidamente pasaron a un medio selectivo con la fosfinotricina y los que resultaron ser resistentes (callos transformantes) se situaron en un medio de regeneración.

Con el híbrido HP, de 50 electroporaciones ensayadas se obtuvieron 29 positivas y con un total de 53 callos transformantes; se regeneraron 266 plantas (progenie F0) y de 135 obtuvimos semillas. Con la línea LW, de 54 electroporaciones ensayadas se han obtenido 19 positivas y 48 callos transformantes; algunos están aún en fase de regeneración.

Con el fin de detectar la integración del plásmido en el genoma de las plantas F0 regeneradas, se han preparado dos primeros de 23 pares de bases y se han analizado por PCR. Los resultados demuestran que un apreciable número de plantas regeneradas presentan el plásmido. Actualmente están en curso los Southern blot de las plantas positivas analizadas por PCR.

Debe analizarse además, la progenie de las semillas F1 obtenidas a partir de las plantas transformadas F0 a fin de conocer la segregación de las transgénicas y el índice de las resistentes al *bar*.

Como conclusión de estos primeros estudios debemos subrayar dos aspectos importantes que son esenciales para el éxito de los trabajos: 1) utilizar un plásmido con un promotor suficientemente potente y adecuado al material a transformar y 2) saber seleccionar bien el material "in vitro" para la transformación a fin de conseguir altas tasas de regeneración.

Este estudio está financiado por un programa DGICYT (PB94-0082).

Un flavocitocromo *b* es aparentemente el responsable de la generación de H_2O_2 en el xilema de *Z. elegans*

A. Ros Barceló

Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Universidad de Murcia, E-30100 Murcia

El proceso de lignificación de la pared celular consiste en la deposición de un polímero heterogéneo, y de naturaleza hidrofóbica, que resulta del acoplo oxidativo de los alcoholes cinamílicos p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, y tiene lugar mayoritariamente en el xilema de las plantas. Dicha reacción está catalizada por las enzimas peroxidasa y lacasa. Aunque hoy día existe cierta controversia sobre la extensión en la cual la síntesis de ligninas está catalizada por cada una de estas enzimas^(1,2), si hay algún mecanismo realmente desconocido relacionado con la lignificación de la pared celular, éste es el mecanismo de la generación del H_2O_2 necesario para la activación del ciclo catalítico de la peroxidasa⁽²⁾. Hipótesis previas⁽³⁾ han supuesto que la misma peroxidasa podría generarse su propio H_2O_2 en la presencia de un reductor adecuado que estuviera presente, o se transportara, a través del xilema. Este podría ser el caso del regulador endógeno del crecimiento, ácido indol-3-acético (3). Recientemente se han propuesto sistemas alternativos para la producción del H_2O_2 que, aparentemente, resultan válidos para explicar la producción de éste durante las situaciones de estrés de la planta. Uno de ellos⁽⁴⁾ implica a un flavocitocromo de membrana plasmática, con actividad NADPH oxidasa, que generaría anión superóxido a partir de O_2 utilizando como reductor NADPH citosólico. El anión superóxido posteriormente dismutaría a H_2O_2 por la acción de una CuZn-superóxido dismutasa.

En esta comunicación se aportan datos que sugieren que la producción de H_2O_2 determinada histoquímicamente a nivel del xilema de *Z. elegans*, y que está relacionada espacialmente con la deposición de ligninas y la distribución de peroxidasa, está mediada por un flavocitocromo análogo a la NADPH oxidasa de membrana plasmática. De hecho, la producción de H_2O_2 en el xilema de *Z. elegans* es totalmente inhibida por inhibidores del componente hemoproteico de este flavocitocromo (piridina e imidazol), así como por inhibidores del componente flavina (quinacrina y cloruro de difenileneiodonium). Estos resultados son discutidos en relación con otros mecanismos propuestos para la producción de H_2O_2 en el xilema⁽⁵⁾, y en relación con sistemas alternativos propuestos a nivel de orgánulos en los cuales la producción de H_2O_2 está sometida a una fuerte homeostasis.

1. Ros Barceló A (1995) *Protoplasma* 186: 41-44.

2. Ros Barceló A (1997) *Int. Rev. Cytol.* En prensa.

3. Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A (1990) *FEBS Lett.* 276: 127-130.

4. Auh CK, Murphy TM (1995) *Plant Physiol.* 107: 1241-1247.

5. Ros Barceló A, Morales M, Pedreño MA (1997) *ACS Symp. Ser.* En prensa.

Fosforilación de proteínas dependiente de calcio y fitocromo en *Cucumis sativus*

D. Vidal, M. Gil y E. Simón

Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Fisiología Vegetal,
Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 645, 08028 Barcelona

La fosforilación de proteínas se ha propuesto como una etapa esencial en la vía de transducción de señales en sistemas animales. La información existente en plantas permite suponer que dicha fosforilación desempeña también un papel fundamental en la transducción de señales hormonales o ambientales (Zentgraf and Hemleben 1996). En este aspecto es esencial la habilidad de las plantas para detectar cambios en la intensidad y calidad luminosas que modifican el desarrollo vegetal. El fitocromo es el fotorreceptor mayoritariamente implicado, de ahí el interés en caracterizar sus vías de transducción.

Por ello, en este trabajo, se ha planteado el estudio de la actividad de proteinquinasas dependiente de luz roja y su modulación por calcio y fosfolípidos, considerando en especial la posible implicación de proteinquinasa C (PKC).

Se ha utilizado como material vegetal cotiledones etiolados de *Cucumis sativus* de 7 días. Los extractos se obtienen por homogeneización en tampón tris-HCl pH=7,5 con PMSF y leupeptina como inhibidores de proteasas y se incuban durante 10 minutos a 37° C con [γ - 32 P] ATP. Para valorar la tasa de fosforilación total se precipitan las proteínas con tricloroacético sobre papel Whatman 3MM, y se cuantifica la incorporación del 32 P por centelleo líquido (Komatsu and Hirano, 1993). Para detectar las distintas proteínas fosforiladas, se procede a la separación electroforética por SDS-PAGE del extracto incubado y se localizan las bandas fosforiladas mediante autorradiografía.

La actividad proteinquinasa se ha determinado en presencia de diferentes niveles de calcio, fosfatidilserina y ésteres de forbol. Como sustrato de referencia se ha utilizado histona III-S.

Los resultados obtenidos indican la presencia en el extracto de proteínas con capacidad fosforiladora, cuya actividad se estimula en presencia de Ca^{2+} . La separación electroforética y posterior autorradiografía pone de manifiesto varias proteínas fosforiladas con pesos moleculares de aproximadamente 63, 54 y 35 KDa, así como la fosforilación de la histona exógena aplicada. La adición de fosfatidilserina y ésteres de forbol, descritos como activadores de la PKC en sistemas animales, no ha modificado significativamente la actividad fosforiladora.

La irradiación con luz roja ($17,5 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durante 15 minutos previamente a la extracción, aumenta sensiblemente la tasa de fosforilación, lo que indicaría la probable participación de proteinquinasas en la vía de transducción de señales del fitocromo.

Komatsu and Hirano (1993). Plant Science, 94:127-137.

Zentgraf and Hemleben (1996). Progress in Botan, 57:218-233.

Inmunodetección de fitocromo en extractos foliares y pulvínulos de *Robinia pseudoacacia* y *Albizia lophantha*

L. Moysset, E. Fernández y E. Simón

Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Fisiología Vegetal,
Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 645, 08028 Barcelona

El crecimiento y desarrollo de las plantas superiores está finamente controlado por la luz. El sistema fitocromo regula numerosas respuestas fotomorfogénicas y está formado por una serie de fotorreceptores cromoproteicos molecularmente próximos codificados por una familia de genes divergentes. El fitocromo A es el más estudiado, abundante en plantas etioladas y lábil a la luz. El fitocromo B es estable a la luz.

El objetivo de este trabajo es identificar y localizar el tipo de fitocromo implicado en el fotocontrol de los movimientos foliares de *Robinia pseudoacacia* y *Albizia lophantha* mediante anticuerpos monoclonales (mAT1, MAC 50, 54, 56 y 200) y policlonales CP 3/289 no específicos contra fitocromo de Leguminosas. La inmunodetección se ha realizado mediante Western-Blott en extractos foliares de plantas irradiadas con luz roja (5 minutos, $17.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 4°C y en cámara oscura con luz de seguridad verde. Como material control se utilizaron extractos de cotiledones dectiolados de *Cucumis sativus*. La dectiolación se realizó durante las 24 horas precedentes a la extracción con irradiaciones de 15 minutos de luz roja cada dos horas. La localización intracelular del fitocromo se efectuó por microscopía electrónica de transmisión en secciones transversales de pulvínulos fijados en 4% paraformaldehído-0,5% glutaraldehído en tampón fosfato 0.1 M (pH 7,4) e incluidos en LR-White o Lowicryl K4M. La inmunolocalización se llevo a cabo según McCurdy y Pratt (1986) mediante mezclas de anticuerpos monoclonales (MAC 200 + 54 y MAC 56 + 50) o con CP 3/289.

Uno de los principales problemas en la inmunodetección por Western-Blott radica en una adecuada extracción del pigmento, ya que se encuentra en muy baja concentración y se hidroliza fácilmente dando productos de un peso molecular inferior al esperado (alrededor de 124 KDa). Para reducir este problema se han empleado diferentes métodos de extracción usando material liofilizado o congelado. Los extractos de fitocromo de *Robinia* y *Albizia* no reaccionan con mAT1, un anticuerpo monoclonal que reconoce fitocromo B de tabaco y pepino. En cambio, reaccionan con MAC 200 aunque se observan varias bandas de peso molecular inferior al esperado, principalmente una de 74 KDa que podría corresponder al extremo amino terminal de la molécula. El fitocromo de pepino reacciona positivamente con MAC 200 y CP 3/289. En el primer caso se detecta una banda de aproximadamente 124 KDa y varias de tamaño inferior. En el segundo se obtienen únicamente dos bandas, una de aproximadamente 74 KDa y otra de 55 KDa que posiblemente corresponden a los dos extremos, el amino terminal y el carboxi terminal, del fitocromo. Bandas de tamaño similar no se han detectado en extractos de *Robinia* ni *Albizia*.

La inmunolocalización indica que el fitocromo se encuentra en muy escasa cantidad en los pulvínulos, tanto en las células corticales como en las del cilindro central. A nivel de

células corticales el pigmento se detecta en el citosol, cloroplastos y, ocasionalmente, en el núcleo. En ningún caso se observa asociado al plasmalema.

Estos resultados indican que existen diferencias importantes entre el fitocromo de Leguminosas y no Leguminosas. La obtención de anticuerpos específicos contra este fotoreceptor de las especies objeto de este trabajo contribuiría a un mejor conocimiento del fitocromo de las Leguminosas.

McCurdy y Pratt (1986) *J.Ceill Biol.* 103(6):2541-2550.

Influência do estágio de desenvolvimento do micrósporo na formação de calos de anteras de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

A.C.R.Brasileiro, L.Willadino, M.Guerra Filho, J.Meunier

Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de

Pernambuco, CEP 52171, Brasil

O cultivo *in vitro* de anteras tem auxiliado o melhoramento genético de plantas, possibilitando a obtenção de linhas puras em um único ciclo de cultivo. Anteras de híbridos de tomate IPA 5 x Rotam 4 foram inoculadas em tres meios de cultura descritos por Gresshoff, P.M. (Planta, v.107, p.161, 1972) Rogozinsza, J.H. (Acta Soc.Bot.Pol., v.43, p.81, 1974) e Dao N.T. (Sov. Plant Physiol., v.25, p.120, 1978) respectivamente, com a finalidade de estudar a influência do estágio de desenvolvimento e comprimento da antera sobre a produção de calos. A análise citológica foi realizada em uma antera de cada botão floral previamente fixada. Apesar de terem sido induzidos calos em todos os estádios de desenvolvimento, anteras contendo micrósporos em estágio de prófase I apresentaram maior frequência de formação de calos. Tanto o comprimento da antera quanto o do botão floral apresentaram interdependência significativa com o estágio de desenvolvimento da antera. Entretanto, o comprimento da antera exibiu uma maior interdependência que o comprimento do botão. A frequência de calos produzidos decresceu com o estágio de desenvolvimento das anteras e se apresentou de forma semelhante nos tres meios testados.

Projeto financiado pelo CNPq e FACEPE

Autólisis de las paredes celulares de callos de judía (*Phaseolus vulgaris* L.)

E. Recio, A. E. Encina, R. M. Moral, J. M. Alvarez, J. L. Acebes

Departamento de Biología Vegetal, Lab. Fisiología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24071 León

El análisis de los procesos autolíticos que se registran en paredes celulares aisladas constituye una estrategia frecuentemente utilizada para estudiar diferentes aspectos relacionados con el metabolismo de la pared celular. La mayoría de los trabajos sobre autólisis se han realizado utilizando diferentes órganos tomados directamente de la planta. Sin embargo, la heterogeneidad celular de los mismos condiciona la interpretación de los resultados obtenidos. El objetivo de este trabajo es caracterizar los productos liberados en la autólisis de callos de judía, material biológico elegido por su mayor homogeneidad.

Los callos de judía se obtuvieron por cultivo *in vitro* a partir de explantes de hojas cultivados sobre medio MS sólido y se subcultivaron periódicamente. Los callos se recolectaron y homogeneizaron tras 30 días de subcultivo, al final de la fase de crecimiento (Recio y col., 1995). Las paredes aisladas estaban constituidas en un 42% por pectinas, concretamente el 32% del total de la pared correspondió a la fracción péctica soluble en CDTA procedente de la lámina media, mayoritariamente compuesta por ácidos urónicos de elevada masa molecular y por azúcares neutros que apenas representaron el 0.2%. Los componentes hemicelulósicos supusieron el 25% de la pared y el 33% restante era celulosa.

Las paredes celulares aisladas fueron incubadas en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.5, a 35°C, durante diferentes tiempos. Como controles se utilizaron paredes celulares incubadas a 0°C (Recio y col., 1995). En la cinética autolítica, valorada como cantidad de azúcares totales liberados en el medio de incubación, encontramos que durante los primeros 15 min ya se había liberado el 60% del total de azúcares, 6 h después era el 95%, y se estabilizó la reacción transcurridas 12 h. La liberación en las paredes celulares activas fue 6 veces superior a la de paredes celulares inactivas. El 85-90% de los azúcares liberados fueron ácidos urónicos. Los productos autolíticos se separaron en una fracción precipitada y otra soluble en etanol al 80%. La fracción precipitada, representó el 90-95% de los azúcares liberados y estuvo mayoritariamente integrada por poliurónidos pécticos de elevada masa molecular (>2000 kDa). El principal azúcar neutro de esta fracción fue galactosa, y en menor proporción arabinosa y glucosa. La fracción soluble en etanol supuso el 5-10% de los productos autolíticos y correspondió a azúcares neutros exclusivamente, de los que el 95% fueron monosacáridos, fundamentalmente glucosa y en menor medida, galactosa. Este resultado se relaciona con el hecho de que las principales actividades glicosidasas asociadas a las paredes celulares de los callos, de las ensayadas, fueran β -D-glucosidasa y en menor medida β -D-galactosidasa.

Los resultados obtenidos, tomados en conjunto, sugieren que los azúcares liberados en la incubación de las paredes celulares de callos podrían provenir de dos procesos diferen-

tes: una solubilización pseudoautolítica, de carácter no enzimático, de polisacáridos pécticos de elevada masa molecular, probablemente procedentes de la lámina media, y la liberación autolítica de restos de azúcares neutros, principalmente glucosa y galactosa mediada por la acción de diferentes glicosidasas.

Gallego, P. P.(1996). Determination of cell wall autolysis. En "Modern methods of plant analysis."(H. F. Liskens y J. F. Jackson, eds.), vol 17, pp 45-61. Springer-Verlag, Berlín.

Recio, E., Encina, A., Alvarez, J. M., Acebes, J. L. (1995). Cell wall autolysis in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) calli: a preliminar characterization. 7th Cell Wall Meeting, p 210. Santiago de Compostela, 1995.

Sección C12:

Senescencia y fisiología post-cosecha

Senescencia foliar y metabolismo del oxígeno activado: Función del ciclo ascorbato-glutation de mitocondrias y peroxisomas de hojas de guisante

A. Jiménez, J.A. Hernández, G.A. Pastori¹, L.A. del Río¹ y F. Sevilla

*Departamento de Nutrición y Fisiología Vegetal, Centro de Edafología y
Biología Aplicada del Segura, CSIC, Murcia; y*

*¹Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas,
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada*

En trabajos recientes llevados a cabo en mitocondrias y peroxisomas purificados de hojas de guisante (*Pisum sativum* L.) se ha demostrado la presencia en estos orgánulos celulares de los antioxidantes ascorbato y glutatión junto con todas las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR), y glutatión reductasa (GR) (1,2). En esta comunicación se estudia el efecto de la senescencia foliar sobre la actividad de los componentes del ciclo ascorbato-glutatión, la peroxidación lipídica, y los niveles de H_2O_2 en fracción soluble, mitocondrias, y peroxisomas purificados de hojas jóvenes (15 días) y de hojas senescentes de guisante, así como sobre la generación de radicales $O_2^{\cdot-}$ por partículas submitocondriales.

La senescencia de las hojas se indujo por incubación de las mismas en oscuridad a 28°C hasta 11 días (3), y los orgánulos celulares se aislaron por centrifugación diferencial y en gradientes de densidad de Percoll (2). En mitocondrias aisladas de hojas senescentes tenía lugar una disminución significativa de todas las actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutatión. Paralelamente a estos cambios, se incrementaba el contenido de H_2O_2 y la tasa de generación de radicales $O_2^{\cdot-}$, mientras que los niveles mitocondriales de ascorbato y de glutatión disminuían significativamente.

En peroxisomas, la senescencia foliar inducía una caída significativa de las actividades APX y MDHAR, mientras que la actividad DHAR aumentaba ligeramente así como la concentración de H_2O_2 . Sin embargo, al contrario que en mitocondrias, el nivel de glutatión experimentaba un fuerte aumento y el de ascorbato se mantenía estable.

En la fracción soluble de hojas senescentes la actividad DHAR aumentaba significativamente y, al igual que en peroxisomas, también se incrementaba la peroxidación lipídica y el contenido de glutatión.

Los resultados obtenidos sugieren que las mitocondrias, al igual que los peroxisomas (3,4), desempeñan una función en los mecanismos oxidativos que acompañan a la senescencia foliar, favoreciendo la liberación de especies de oxígeno activado al citosol. Sin embargo, la diferente respuesta encontrada en el ciclo ascorbato-glutatión de peroxisomas y mitocondrias, asigna un papel predominante a los peroxisomas en el mecanismo oxidativo de la senescencia. En este sentido, el H_2O_2 y el glutatión peroxisomales podrían actuar como mensajeros químicos específicos en los procesos de transducción de señales durante la senescencia foliar.

1. Jiménez A, Hernández JA, Pastori GM, del Río LA and Sevilla F (1996) *Biochem Soc Trans* 24: 1985
2. Jiménez A, Hernández JA, del Río LA and Sevilla F (1997) *Plant Physiol* 114, en prensa
3. Pastori GM and del Río LA (1994) *Planta* 193: 385-391
4. Pastori GM and del Río LA (1997) *Plant Physiol* 113: 411-418

(Financiado por la DGES (proyecto PB95-0004-02), y la UE (contrato CHRX-CT94-0605))

Endoproteasas de peroxisomas de hojas de guisante: Estudio de la autodegradación de proteínas del orgánulo

J.M. Palma, S. Distefano, M. Gómez¹ y L.A. del Río

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas,

¹Departamento de Agroecología y Protección Vegetal,

Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apdo. 419, 18080 Granada

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares que poseen un tipo de metabolismo fundamentalmente oxidativo y que contienen catalasa y flavín oxidasas generadoras de H₂O₂ como constituyentes enzimáticos básicos (1). En los últimos años se han aportado evidencias que sugieren la existencia de distintas funciones para estos orgánulos celulares relacionadas con especies de oxígeno activado (2). Recientemente se ha descrito la presencia de actividad exo y endoproteolítica en peroxisomas de hojas de guisante (3,4). En peroxisomas de hojas senescentes por EGPA-SDS se han detectado siete endoproteasas (EPs) distintas: de ellas tres son serín-proteinasas, las EPs mayoritarias en peroxisomas; dos son cisteín-proteinasas y una metalo-proteínasa (4). En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la acción de las endoproteasas de peroxisomas de hojas senescentes de guisante sobre diferentes proteínas del propio orgánulo, y sobre otras proteínas exógenas de origen vegetal.

Las plantas de guisante (*Pisum sativum* L., var. Lincoln) se cultivaron en invernadero en medios hidropónicos, en condiciones óptimas, durante 20 días (plantas jóvenes) y 50 días (plantas senescentes). Se purificaron los peroxisomas de las hojas mediante centrifugaciones diferenciales y en gradiente de densidad de sacarosa (35-60%, p/p) (5). Los peroxisomas aislados se rompieron por choque osmótico, y las fracciones solubles (matrices peroxisomales) se obtuvieron por centrifugación a 120.000 g durante 30 min (5). Para los ensayos de degradación de proteínas, las matrices peroxisomales se concentraron por ultrafiltración, se incubaron con o sin proteínas exógenas a 37°C durante 16 horas, y posteriormente las muestras se analizaron por EGPA-SDS. Las bandas proteicas resultantes se detectaron en los geles con nitrato de plata, y también se realizaron transferencias de Western empleándose anticuerpos específicos frente a Rubisco y a distintas proteínas peroxisomales (catalasa, glicolato oxidasa, Mn-superóxido dismutasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa).

El análisis por EGPA-SDS de las matrices peroxisomales de hojas senescentes mostró una disminución considerable del número de polipéptidos con relación al patrón obtenido con peroxisomas de hojas jóvenes. En los ensayos de transferencia de proteínas con matrices peroxisomales de hojas senescentes, se pudo comprobar una disminución de las bandas de las proteínas glicolato oxidasa, catalasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, con relación a las matrices control. Este efecto iba acompañado por la aparición de bandas inmunoreactivas de menor masa molecular, probablemente originadas por degradación de las proteínas anteriores. Por el contrario, la enzima Mn-SOD peroxisomal no sufría degradación proteolítica alguna. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en peroxisomas de hojas senescentes de guisante, donde se encontró una disminución notable de la actividad catalasa y un aumento de la actividad Mn-SOD (6).

En ensayos realizados con proteínas no peroxisomales de origen vegetal, también se observó que las endoproteasas peroxisomales degradaban la Rubisco de espinaca y la ureasa de judía. Los resultados obtenidos sugieren una función para las endoproteasas en el mecanismo de recambio de las proteínas peroxisomales durante la senescencia de la hoja.

-
- (1) Huang AHC, Trelease RN & Moore TS, Jr (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press
 - (2) del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P & Corpas FJ (1992) *Free Rad Biol Med* 13: 557-580
 - (3) Corpas FJ, Palma JM & del Río LA (1993) *Eur J Cell Biol* 61: 81-85
 - (4) Distefano S, Palma JM, Gómez M & del Río LA (1996) *Plant Physiol Biochem*, 10th FESPP Congress, p 75, comunicación S06-06
 - (5) López-Huertas E, Sandalio LM & del Río LA (1995) *Plant Physiol Biochem* 33: 295-302
 - (6) Pastori GM & del Río LA (1997) *Plant Physiol* 113: 411-418

(Financiado por la DGES (PB95-0004-01), la UE (CHRX-CT94-0605) y la *Junta de Andalucía*, grupo nº 3315)

Estimación de la calidad de semillas envejecidas de *Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*

M.A. Pérez-Cerezo, M. Torres, M.M. Pavón y *J.L. Esteban

Departamento de Biología Vegetal II, Universidad Complutense,

28040-Madrid *Instituto de Química Orgánica, C.S.I.C.,

Juan de la Cierva, 3, 20006-Madrid

El interés de un gran número de especies vegetales reside en la presencia de los componentes volátiles obtenidos de sus aceites esenciales, que por sus propiedades químicas y farmacológicas son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. La bondad de estas especies, por tanto, viene definida por la composición cualitativa y cuantitativa de sus aceites esenciales, que puede estar condicionada por distintos factores (genotipo, condiciones de cultivo y conservación, madurez fisiológica, procedimientos analíticos, etc.).

Con objeto de conocer si la calidad del aceite esencial constituye un sistema indicador del deterioro de las semillas envejecidas de hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*), se presenta la caracterización de sus componentes volátiles mediante análisis de cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-MS). Las semillas se sometieron a envejecimiento artificial por almacenamiento en cámaras herméticas a 43°C y 75% humedad relativa durante 3 a 15 días.

El análisis cualitativo de la fracción volátil revela la presencia de más de treinta componentes, de los cuales únicamente se han cuantificado aquellos constituyentes que aparecen en cantidades superiores o iguales a 0.1% de *trans*-anetol, ya que este componente está considerado como factor principal de la calidad del aceite esencial de hinojo y que se presenta en todas las muestras analizadas en proporciones iguales o superiores al 70%. La identificación complementaria por los parámetros de retención confirma la presencia de los siguientes componentes: α -pineno, sabineno+ β -pineno, β -mirreno, β -felandreno, p -cimeno, τ -terpineno, α -terpinoleno, alcanfor, carvona y δ -cadineno. En todos los casos analizados, la presencia y cantidad detectada de *trans*-anetol, fenchona y L-limoneno, junto con las cantidades trazas de *cis*-anetol, ponen de manifiesto que la exposición de las semillas de hinojo a las condiciones de envejecimiento utilizadas no afecta la calidad del aceite esencial obtenido.

La ausencia de alteraciones en la composición cuali y cuantitativa de la fracción volátil del aceite esencial procedente de semillas envejecidas de hinojo var. *vulgare* constituye un sistema estimador de la calidad del producto obtenido, pero no puede utilizarse con fines predictivos, ya que no se corresponde con la evolución de los parámetros indicadores de la calidad fisiológica, definida por la viabilidad y vigor de las semillas y el rendimiento en aceite esencial obtenido de las mismas. Estos parámetros disminuyen a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento, por lo que pueden considerarse indicadores del deterioro de las semillas.

Posição na árvore e conservação de maçãs *Golden Delicious* em minicâmara de atmosfera normal

Santos, A. e J. Cavalheiro

Secção de Fitotecnia,

UTAD, Ap. 202, 5001 Vila Real Portugal

Este trabalho decorreu em Vila Real, na campanha de 1994/95, e compreendeu a análise de 5 parâmetros de qualidade em 812 frutos de plantas situadas em duas parcelas de terreno xistoso, pobre em matéria orgânica: uma, com altas percentagens de areia fina e limo e pouca pedregosidade, e outra com bastante pedregosidade e melhor permeabilidade. As árvores estão em eixo vertical, em M9, e foram sujeitas a diferentes alturas de enxertia no viveiro. A plantação foi em 1980, ao compasso de 3*1 m.

A colheita fez-se a 15 de Setembro, com codificação individual dos frutos (posição na árvore, órgão de frutificação e frequência por corimbo) e subsequente pesagem no laboratório e armazenagem em minicâmara de atmosfera normal, à temperatura de 3°C ±1 e 90% HR ±10. O calibre, a dureza, o amido, os sólidos solúveis e a acidez foram analisados em duas amostras representativas: à entrada na câmara e na data de retirada após conservação – 15 de Abril.

Na fase adulta, e naquelas condições de ensaio (podando com base em desramações e sem recorrer a monda química) esta variedade produz cerca de 48% dos frutos em esporões (ER), 12% em posição lateral dos ramos (RL) e 40% no topo de ramos ou verdascas (RT).

As maçãs do terreno menos permeável cresceram menos (135 vs 150 g, P=0,0001), em particular as de árvores enxertadas mais alto, e tiveram maiores perdas de peso (9,9 vs 6,4%, P=0,0001) durante os sete meses de conservação. À entrada na câmara, as maçãs ER e RT pesavam 143 e 141 g, e diferiam (P=0,0001) das RL (133 g), mas estas tiveram menor perda de peso (7,4%) do que aquelas. À saída da câmara as maçãs RL e RT estavam também mais rijas (5,8 kg/cm²) e mais doces – com 12,1 e 12,9% de açúcares solúveis, respectivamente (P<0,001) – contrastando com as ER que apresentavam 11,7%. As RT mantinham ainda os teores de ácidos menos baixos à saída da câmara: 1,6 g/l de ácido málico.

As amostragens realizadas não permitiram observar diferenças sistemáticas de qualquer dos parâmetros analisados, quer ao nível da frequência de frutos por corimbo quer ao dos tratamentos de viveiro, muito embora se tenham observado tendências para menores calibres nos corimbos com mais de dois frutos e nas árvores enxertadas mais alto. Estas tendiam também a ser mais rijas, mais doces e mais aciduladas, e apresentavam teores de amido ligeiramente superiores.

Posição na árvore e conservação de maçãs *Granny Smith* em minicâmara de atmosfera normal

Cavalheiro¹, J., A. Santos¹, I. Recasens² e G. Barreiro³

¹*Secção de Fitotecnia, UTAD, Ap. 202, 5 001 Vila Real, Portugal*

²*Area de Postcollita, Centre UdL-IRTA, 25 198 Lleida, Catalunya*

³*Dep. Fisiologia Vegetal, EAN, 2 780 Oeiras, Portugal*

Este trabalho decorreu na UTAD e compreendeu a análise de 5 parâmetros de qualidade numa amostra da produção da campanha de 1994/95, envolvendo 1900 maçãs, em dois porta-enxertos e três faixas de altura na planta, e tendo em conta a posição dos frutos no ramo suporte (códigos) e frequência no corimbo. As árvores foram plantadas em 1980 e conduzidas em eixo vertical, a 3*1 m.

Em três datas de colheita (semanais, a partir de 8/10) os frutos foram codificados individualmente, pesados e armazenados em minicâmara de atmosfera normal, à temperatura de 3°C ±1 e 90% HR ±10. O calibre, a dureza, o amido, os sólidos solúveis e a acidez foram analisados em três amostras representativas: uma à entrada na câmara, e em duas datas de saída: Abril e Junho.

À entrada na câmara, as maçãs do cavalo M9 pesavam 207g, ou seja, mais 21% do que as do M106, com diferenças altamente significativas de calibre entre as provenientes das três faixas de altura. Também ao nível da posição dos frutos no ramo suporte havia diferenças (P=0,0001) de peso, sendo os mais representativos da produção – os de esporões (ER) e de topo (RT) dos ramos, com 57 e 29%, respectivamente – cerca de 10 e 13% mais pesados que os de posição lateral (RL), de 186 gramas, representando estes 9% da produção, e sendo 3% mais doces. Em termos de frequência nos corimbos, registou-se uma razão inversa com o peso, excepto para os RL, em particular no M9.

Até à primeira saída, as perdas de peso durante a conservação decresceram regularmente da 1ª para a 3ª datas de colheita no cavalo M9, totalizando 2,7, 2,5 e 2,3% nas da 1ª, 2ª e 3ª datas, o que equivale a terem perdido 0,41, 0,38 e 0,35% do peso por mês, respectivamente, mas duplicaram a perda até à 2ª saída; no M106 as perdas não foram relevantes, talvez por não terem sido pesados frutos da 3ª colheita nem analisados os da 2ª saída. Embora sem diferenças significativas, os frutos ER foram os que perderam menos peso (0,35%/mês) e os RL foram os mais heterogêneos.

Tanto à entrada como à 1ª saída da câmara, a dureza das maçãs do M106 foi 5,5% superior (P=0,0001) à do M9 (11,6, vs 7,6 kg/cm²), sendo mais duras as da faixa central das árvores. O amido reduziu-se 61% da 1ª para a 3ª data de colheita, e manteve-se mais baixo na faixa central das árvores, onde os teores de sólidos solúveis e a acidez foram superiores nas primeiras datas de colheita; todavia, os frutos tornaram-se mais doces na faixa cimeira das plantas em finais de Outubro, beneficiando da paragem do crescimento vegetativo.

Efecto diferencial del CO₂ sobre cambios metabólicos asociados a la maduración de chirimoya

M.T. Muñoz, M.I. Escribano y C. Merodio

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales,
Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid

Pretratamientos con elevadas concentraciones de CO₂ son beneficiosos para prolongar el período de conservación y mantener la calidad de frutos. Sin embargo, son escasos los estudios sobre la acción del CO₂ en el retraso del proceso de maduración. En este trabajo determinamos el efecto de altos niveles de CO₂ (20% CO₂-20% O₂) sobre los principales parámetros fisiológicos y bioquímicos de la maduración de chirimoya (*Annona cherimola* Mill. cv. 'Fino de Jete'). Concretamente, analizamos los cambios en color, firmeza, producción de etileno, poliaminas, etanol, niveles de Rubisco y poligalacturonasa y actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH), piruvato descarboxilasa (PDC) y arginina descarboxilasa (ADC).

Después de 3 días de tratamiento con CO₂ (20%), se observa un mantenimiento tanto de la firmeza y del color del fruto como del contenido en Rubisco y poligalacturonasa. La síntesis de etileno se inhibe y los niveles de las poliaminas espermidina y espermina son mayores que los alcanzados en los frutos control (3 días en aire) sin modificación de la síntesis de putrescina. Por el contrario, se activó el metabolismo fermentativo, hallándose mayores niveles de acetaldehído y etanol, a través de una activación de las enzimas PDC y ADH.

Durante el primer día de transferencia al aire, se observa un acusado descenso del metabolismo fermentativo y pérdida de firmeza y de componentes fotosintéticos. Sin embargo, el incremento en la producción de etileno y descenso del valor de la relación de poliaminas (Spd+Spm/Put) no se alcanzaban hasta al menos dos días de la transferencia. Esta secuencia de cambios metabólicos, similar a la de frutos no tratados, podría indicarnos por un lado, que la exposición de chirimoyas a una atmósfera de 20% CO₂-20% O₂ durante 3 días es un tratamiento no estresante que permite retrasar su maduración. Por otro lado, estos resultados parecen confirmar la importancia del metabolismo fermentativo en la fase inicial de su proceso de maduración.

Agradecimientos. El presente trabajo está financiado por la CICYT ALI96-0506-CO3-O2.

Efecto del CO₂ sobre la textura del fresón

I. Llop, X. Palomer y M. Vendrell

Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona (C.S.I.C.),

Jordi Girona Salgado 18-24, Barcelona, 08034

El efecto del CO₂ exógeno sobre la textura del fresón es un fenómeno conocido. No sólo evita el reblandecimiento del fruto, sino que también induce un aumento de la firmeza en los frutos tratados. El mecanismo por el cual el tratamiento con CO₂ provoca un aumento de textura en el fresón es aún desconocido. Dado que las modificaciones en la pared celular son la causa principal de los cambios de textura en frutos, se estudió el efecto del CO₂ sobre la misma.

Se utilizó la variedad de fresón "Selva" porque en anteriores trabajos (Smith, 1992) se había mostrado que esta variedad es una de las que presenta unos cambios de textura más importantes frente a un tratamiento con CO₂.

Mediante un tratamiento continuo de CO₂ (20%) durante 1,2,4 u 8 días a 4 °C, se estudió la evolución de la firmeza del fruto a través de la fuerza de penetración medida en la parte más ancha del fruto. Los resultados confirman que dicho tratamiento provoca un aumento de firmeza con respecto a los frutos recién recolectados.

Posteriormente, se analizó el efecto del CO₂ sobre los diferentes componentes de la pared celular como primera aproximación a los cambios derivados del tratamiento sobre la firmeza del fresón.

Después de cada tratamiento se eliminaron los aquenios y la parte central fibrosa de cada fruto y se obtuvo la pared celular de la pulpa, de la cual se hizo una extracción secuencial de los polisacáridos: solubles (fracción H₂O), pectinas (fracciones CDTA i Na₂CO₃) y hemicelulosas (fracciones KOH). Posteriormente se analizó el contenido en ácidos urónicos mediante técnicas colorimétricas. Finalmente se estudió el efecto del CO₂ sobre el grado de esterificación metílica mediante reducción de ácidos urónicos con NaBH₄, y el contenido en calcio según la técnica de Plasma de Inducción Acoplado (ICP). Para comprobar la relación del calcio con el aumento de la textura de los frutos tratados con CO₂, se analizaron los efectos del EDTA sobre la textura.

El análisis cuantitativo de los polisacáridos muestra una movilización de las sustancias pécticas solubles hacia la fracción iónica. La mayor capacidad de las pectinas para unirse iónicamente no es debido a un incremento en el grado de esterificación metílica, sino que probablemente es el resultado de un cambio en el pH celular. Esto ocasionaría una alteración en el balance iónico entre los distintos compartimentos celulares, estimulando el transporte del calcio hacia la pared celular. Este aumento de calcio en la pared celular permitiría la unión, mediante puentes de calcio, de sustancias pécticas inicialmente solubles en agua, aumentando así la estabilidad de la misma. Tratamientos posteriores con EDTA confirman esta hipótesis.

Respuestas asociadas a la liberación de iones en semillas envejecidas de *Helianthus annuus* L

*M. Torres, ** M. De Paula, ***G. Frutos y **C.J. Martínez-Honduvilla

*Departamentos de Biología Vegetal II,

** Bioquímica y Biología Molecular II y *** Estadística e Inv. Operativa,

Universidad Complutense, 28040 Madrid

La pérdida de la viabilidad y vigor es una de las respuestas más evidentes que se producen en semillas envejecidas. Este efecto se ha asociado en diversas especies con el deterioro de las membranas, lo que permite la liberación de electrolitos al medio que rodea a las semillas. Sin embargo, la relación entre la pérdida de la viabilidad de las semillas de girasol y los cambios en la liberación de iones asociados con las alteraciones de membranas ha producido resultados contradictorios. Con objeto de caracterizar si la liberación de iones constituye un sistema indicador del deterioro de las membranas, se propone un modelo cinético sobre la evolución de la intensidad de corriente eléctrica (ICE, μA) monitorizada durante el período de imbibición (0-24 h) en los exudados procedentes de semillas de girasol cv. Peredovik (43°C , 75% HR durante 11 días) en comparación con la liberación de iones procedentes de aquenios y pericarpios.

En todos los casos existe una rápida salida de iones durante las primeras horas de imbibición, que posteriormente tiende a estabilizarse, observándose un cambio en la cinética de liberación de iones a tiempos prolongados de imbibición, más evidente a medida que aumenta el envejecimiento de los aquenios. Sin embargo, en semillas desprovistas de pericarpio, la liberación de iones es lenta, creciente y continua. Los valores de ICE a las 24 horas muestran además una buena correlación con la presencia de semillas muertas ($r=0,8971^{***}$) y con la aparición de plántulas anormales ($r=0,8680^{***}$) dependiendo del tamaño de los aquenios. Los resultados obtenidos podrían apoyar la hipótesis de que la ICE de los exudados procedentes de aquenios no tratados o envejecidos podría ser la resultante de un proceso de cesión mixto. Esta hipótesis se formaliza en un modelo cinético de liberación de iones que asume que: 1) la velocidad de aparición de iones en el medio de imbibición depende de la cantidad de iones presentes en el pericarpio, que se ceden desde el mismo con una constante de velocidad de primer orden, 2) la velocidad de liberación de iones desde la semilla depende de la cantidad de iones presentes en la misma, que se ceden con una constante de velocidad de primer orden, y 3) la liberación de iones desde el pericarpio depende de la velocidad de cesión de iones desde la semilla y de la velocidad de aparición de iones en el medio de imbibición. La evolución de la ICE en los exudados de los aquenios sugiere que los pericarpios son los responsables de la rápida liberación de iones durante las primeras horas de imbibición de los aquenios. La subsiguiente estabilización de la ICE puede ser debida a la cesión sostenida de iones desde la semilla, que se pone de manifiesto a tiempos más prolongados de imbibición. El modelo cinético propuesto permite explicar esta evolución hasta las 16 horas del comienzo de la imbibición, momento considerado como punto crítico, debido al cambio de tendencia que se observa. Sin embar-

go, este cambio de ICE no se detecta en los exudados procedentes de pericarpios y semillas. El hecho de que este cambio de tendencia se produzca aproximadamente en el mismo tiempo tanto en las semillas no tratadas y en las envejecidas durante 11 días, se puede explicar por un proceso físico que implica la fractura del pericarpio antes de la emergencia visible de la radícula, lo que permite un mayor contacto de la semilla con el medio de imbibición, facilitando la salida de iones. Dado que este efecto se produce en todas las semillas, independientemente de su viabilidad, la mayor ICE detectada, a partir del tiempo crítico, en los exudados de las semillas envejecidas en comparación con las no tratadas, pone de manifiesto que el envejecimiento artificial produce cambios en la integridad de las membranas.



Estudio de la variabilidad intraespecífica y herencia del DNA de cloroplastos en *Arabidopsis thaliana*

P. Martínez, M. Roldán, B. Sabater y M. Martín

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá,
28871-Alcalá de Henares, Madrid

En *Arabidopsis thaliana* existe una gran variación genética entre ecotipos que puede ampliar sus posibilidades como modelo genético en la investigación de plantas¹. En este trabajo hemos estudiado la variabilidad intraespecífica basada en el DNA de cloroplastos (cpDNA)^{2,3} utilizando los ecotipos Col-0, Cvi-0, Le-0, Ler-0 y St-0. El análisis empleado ha sido el de RFLPs y se han podido identificar dos variaciones en el ecotipo Cabo Verde (Cvi-0) en dos puntos de corte, uno de *Bam*HI que desaparece y otro nuevo para *Hind*III. Las dos diferencias se localizan en la región de copia sencilla corta del cpDNA, donde se encuentran la mayor parte de los genes *ndh* que parecen tener una función en el envejecimiento vegetal^{4,5}. El punto de corte que desaparece para *Bam*HI, se ha localizado dentro del gen *ndhG*. Tras amplificar un fragmento que incluye este punto de corte, se estudió su presencia o ausencia en otros ecotipos adaptados a distintas condiciones ambientales (Col-0, St-0, Wei-0, Can-0, Mt-0, Ita-0, Sah-0, Nd-0). Los resultados no han permitido relacionar similitud genética y localización geográficas en lo que respecta al análisis de la diferencia encontrada a nivel del *ndhG*, sino que confirman la singularidad del ecotipo Cvi-0 en algunas características de su cpDNA.

Por otra parte se han secuenciado el gen *ndhG* completo y parte de los genes *ndhI* y *ndhE* en los ecotipos Ler-0 y Cvi-0 y se ha deducido la secuencia de aminoácidos para el polipéptido NDH-G. Todas estas secuencias han mostrado una elevada conservación en los dos ecotipos y en otras plantas con las que se han comparado, indicando que estos genes son probablemente funcionales en *Arabidopsis*. La secuencia de aminoácidos del NDH-G indica que se trata de un polipéptido fuertemente hidrofóbico, con cinco hélices transmembrana, localizado probablemente en la parte integral de la membrana tilacoidal.

Finalmente, utilizando el marcador del cpDNA de Cvi-0 caracterizado en el estudio de variabilidad, se ha investigado la herencia del genoma de cloroplastos en *Arabidopsis thaliana*⁶. Esto se ha llevado a cabo mediante análisis genético molecular, tras efectuar cruza-mientos en los dos sentidos entre los ecotipos Ler-0 y Cvi-0, amplificación (PCR) y digestión del DNA organular heredado, poniéndose de manifiesto la herencia predominantemente materna de cloroplastos en esta especie.

1. King, G., Nienhuis, J. & Hussey, C. (1993). *Theor. Appl. Genet.* 86, 1028-1032.

2. Harris, S.A. & Ingram, R. (1991). *Taxon.* 40, 393-412.

3. Olmstead, R.G. & Palmer, J.D. (1994). *Amer. J. Bot.* 81, 1205-1224.

4. Martínez, P., López, C., Roldán, M., Sabater, B. & Martín, M. (1997). *Plant Sci.* (en prensa)

5. Vera, A., Tomás, R., Martín, M. & Sabater, B. (1990). *Plant Sci.* 72, 63-67.

6. Reboud, X. & Zeyl, C. (1994). *Heredity.* 72, 132-140.

Efectos de condiciones ambientales y ontogénicas de plántulas de cebada sobre niveles de actividad NAD(P)H-ferricianuro oxidoreductasa cloroplástica

J. Cuello

Departamento de Biología Vegetal.

Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Espinardó, Murcia

Aunque recientemente ha sido aislado y parcialmente caracterizado el complejo NADH deshidrogenasa cloroplástico de plantas superiores no se conoce aún su función en las plantas. Se discute actualmente la posible participación de este complejo en el proceso clororrespiratorio y/o en el transporte electrónico cíclico, y en qué condiciones actúa. Con el propósito de encontrar condiciones fisiológicas de las plantas que afecten particularmente a la actividad NADH deshidrogenasa de cloroplastos, en el trabajo presente se partió de hojas primarias ligadas de plántulas de cebada de grado de desarrollo variable y sometidas a diversos tratamientos de estrés. La actividad NAD(P)H deshidrogenasa, expresada por unidad de clorofila o de proteína, fue medida en los cloroplastos aislados usando ferricianuro como aceptor electrónico.

Durante el desarrollo normal de la planta desde los 6 hasta los 14 días de edad, la actividad NADH-ferricianuro oxidoreductasa disminuye con la edad. Sin embargo, la actividad NADPH-ferricianuro oxidoreductasa cambia relativamente poco durante esta etapa del desarrollo. Además, el jasmonato de metilo tiene poco o ningún efecto sobre los niveles de ambas actividades. Por otra parte, partiendo de plantas de 14 días, la actividad NADH-ferricianuro oxidoreductasa aumenta durante 4 días, al menos, de envejecimiento en la oscuridad. En estas condiciones el jasmonato de metilo estimula algo este aumento, mientras que los estreses oxidativos que suponen los tratamientos con agua oxigenada y paraquat disminuyen la actividad NADH-ferricianuro oxidoreductasa. La deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo de la cebada no afecta a la actividad NAD(P)H-ferricianuro oxidoreductasa (expresada al menos por unidad de clorofila), lo cual contrasta con lo descrito por otros autores partiendo de *Chlamydomonas*. Sin embargo, durante el ciclo diario al que se someten las plantas la actividad NADH-ferricianuro oxidoreductasa es mayor al final del fotoperiodo que al final del nictoperiodo. Por otra parte, partiendo de plantas de 14 días de edad esta actividad también es mayor en secciones foliares apicales que en basales.

Los resultados sugieren una menor o nula implicación del complejo NADH deshidrogenasa cloroplástico en procesos de estrés oxidativos y de déficit de nitrógeno, y algún papel en procesos de desarrollo normales de la planta, tanto en fases de crecimiento como de envejecimiento. La mayor actividad enzimática durante el fotoperiodo está de acuerdo con una posible participación, al menos durante alguna etapa del desarrollo, a través del transporte electrónico fotosintético.

Estudio de la maduración de las variedades *Talma* y *Manta* de melón Cantaloup durante su desarrollo en la planta.

M. T. Pretel*, G. Martínez-Reina**, M. C. Martínez-Madrid*, M. Serrano*
y F. Romojaro**

* Escuela Politécnica Superior de Orihuela (UPV),
Ctra. Beniel Km 3,2, Alicante

** Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC),
Avda. de La Fama nº 1, Murcia

A pesar del incremento que ha experimentado en nuestro país la producción del melón Cantaloup durante estos últimos años, como consecuencia de la demanda de determinados mercados de la Unión Europea, la información que se tiene sobre las condiciones de cultivo y la maduración del fruto es muy limitada.

Esta situación se ve agravada por la sensibilidad de algunas variedades a un desorden fisiológico denominado vitescencia que confiere a la pulpa un aspecto vítreo y modifica su textura, y a la dificultad de establecer el momento óptimo de recolección.

En el presente trabajo se ha estudiado la evolución de diferentes parámetros físico-químicos responsables de la calidad y fisiológicos durante la maduración de las variedades *Manta* y *Talma* (sensible a la vitescencia) cultivadas en invernaderos y en condiciones de fertirrigación.

Los frutos se recolectaron cuando habían alcanzado su desarrollo máximo y se clasificaron en cuatro estados de maduración de acuerdo con la tasa de emisión de etileno. En cada uno de ellos se determinaron los sólidos solubles, acidez valorable, color por reflexión (en pulpa y piel) y análisis sensorial.

Asimismo, se ha investigado la ruta metabólica del etileno determinando los metabolitos y enzimas implicados en la misma: ACC libre, ACC conjugado, ACC-sintetasa, ACC-oxidasa y malonil ACC transferasa. También se ha estudiado la evolución del ABA en los diferentes estados de maduración.

Los resultados encontrados ponen de manifiesto que en ambas variedades el estado 3 presenta la calidad sensorial óptima y la producción máxima de etileno. Se ha encontrado que la variedad *Manta* presenta valores más elevados en este estado a nivel de sólidos solubles, acidez, emisión de etileno, parámetro de color "a" en pulpa, ACC-sintetasa y ACC-Oxidasa.

Factores que inducen la pigmentación rosa en espárrago (*Asparagus officinalis*, L.) y su control

F. Flores*, F. Romojaro* y J. Oosterhaven**

*Centro de Edafología y Biología Aplicada de Segura (CEBAS-CSIC), Murcia

**Agrotechnological Research Institute (ATO-DLO), Wageningen, Holanda

La coloración rosa que aparece en los espárragos blancos durante la post-recolección y que afecta considerablemente a la calidad se ha asociado a la acumulación de antocianos en la epidermis debido a la incidencia de la radiación luminosa sobre los mismos. Asimismo se ha observado empíricamente que su inmersión en agua impide atenuar la aparición de esta coloración.

En el presente trabajo se ha estudiado en tejido epidérmico de espárrago blanco la influencia del tiempo de exposición luminosa, y de un periodo de oscuridad tras dicho tratamiento en muestras testigo y tratadas con S-carvone (monoterpeno que bloquea la brotación en patata por inhibición del enzima PAL) sobre la acumulación de antocianos, actividad PAL y contenido de L-fenilalanina, sustrato de PAL.

Para estudiar la incidencia de la inmersión en agua se han determinado los parámetros seleccionados sobre muestras sumergidas en agua y tras un periodo de almacenamiento en la oscuridad.

Los resultados muestran que en los espárragos expuestos a la luz se produce un aumento acusado de la actividad PAL entre las 3 y 5 horas de exposición luminosa, para disminuir a continuación y hacerse apenas detectable a las 18 horas, mientras que la acumulación de antocianos es gradual durante todo el periodo de iluminación (0-18 horas), haciéndose más sostenida a partir de las 5 horas. No se ha detectado L-phe en los espárragos tras 4 horas de iluminación.

Los espárragos expuestos a la luz y tratados con S-carvone muestran que tanto los niveles de antocianos como la actividad PAL aumentan lenta y gradualmente de principio a fin del tratamiento luminoso (0-18 horas), si bien los contenidos son inferiores a los detectados en los espárragos control.

En cuanto al periodo de almacenamiento en oscuridad de 5 días posterior a la exposición luminosa se observa que tanto el contenido en antocianos como la actividad PAL se mantienen en ciertos valores independientemente del tiempo de exposición a la luz previo al almacenamiento en oscuridad. Los niveles de antocianos son superiores en los espárragos control que en los tratados con S-carvone, pero no así los niveles de actividad PAL.

En cuanto a la muestra sumergida en agua durante 20 horas se observa que la actividad PAL y la concentración de antocianos son mínimos, aunque en este caso sí se detecta L-phe, al cabo de 5 horas de tratamiento; pero mientras que tras el periodo de oscuridad de 5 días el contenido en antocianos duplica su valor, la actividad PAL experimenta un aumento de unas 50 veces su actividad inicial.

Purificación y caracterización de la peroxidasa ácida en frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.)

F. Pomar, M.A. Bernal, J. Díaz y F. Merino

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología,
Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña

Las peroxidases (EC 1.11.1.7) constituyen un grupo numeroso de isoenzimas que difieren en su especificidad de sustrato, composición aminoacídica y localización en el tejido de la planta. Cada grupo de isoenzimas desarrolla una función fisiológica diferente en el metabolismo de la célula vegetal. Así, las ácidas estarían relacionadas preferentemente con la biosíntesis de lignina (Gaspar *et al*, 1991), mientras que las básicas lo estarían con el proceso de degradación del ácido indolacético (Zheng *et al*, 1992) y con la oxidación de la capsicina y de sus precursores, como hemos podido demostrar recientemente (Bernal *et al*, 1995).

En el primer estadio del desarrollo del fruto del pimiento se observa una mayor presencia de la peroxidasa ácida. Por medio de técnicas de fraccionamiento subcelular, se ha podido comprobar que la peroxidasa ácida se encuentra de forma mayoritaria en la fracción soluble del pericarpio, por lo cual se ha elegido este material para su purificación.

La purificación de la enzima fue llevada a cabo por medio de una precipitación con sulfato amónico seguida por distintos pasos cromatográficos en columnas de Sephadex G-100, Q-Sepharose y Superosa 12 PC 3.2/30. Tras estos pasos se obtuvo un factor de purificación próximo a 300. La enzima purificada tiene un punto isoeléctrico de 3,8 y un peso molecular de 50 kDa que se determinó por medio de una columna de filtración en gel. En extractos parcialmente purificados se pudo determinar que la enzima era estable en un rango de pH de 6 a 9. Asimismo, presentó una gran estabilidad frente a la temperatura. A diferencia de como sucede con las peroxidases básicas, los iones calcio no provocan un aumento en su actividad.

Se ha comprobado también la capacidad de esta enzima para oxidar la capsicina, lo que abre un camino en la participación de las peroxidases ácidas en el metabolismo capsicinoide, todavía desconocido.

Gaspar, Th., Penel, C., Hagege, D. & Greppin, H. (1991). *In* Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, pp. 249-280.

Zheng, X. & Van Huystee, R.B. (1992). *Phytochem.* 31, 1895.

Bernal, M.A., Calderón, A.A., Ferrer, M.A., Merino de Cáceres, F. & Ros Barceló, A. (1995). *J. Agric. Food Chem.* 43: 352-355.

(Trabajo financiado por la Xunta de Galicia, XUGA 10301/A/95)

Aplicación de diferentes ácidos carboxílicos, aminas y azúcares parcialmente protegidos en plantas de algodón. Efecto de los azúcares en el crecimiento de *Botrytis cinerea* pers.:Fr.

V. Flors¹, M.C. Miralles¹, S. Muñoz², L. Lapeña¹ y P. García-Agustín¹

¹Unidad de Biotecnología Vegetal,

Departamento de Ciencias Experimentales,

Universitat Jaume I, Apartado 224, 12080 Castellón, Spain

²CODIAGRO S.L. Polígono Serrallo 38, 12100 Grao Castellón, Spain

El principal objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que ejercen diferentes ácidos carboxílicos, aminas y azúcares parcialmente protegidos sobre las enzimas implicadas en procesos de senescencia y sobre azúcares celulósicos y no celulósicos de la pared celular vegetal. Estos compuestos podrían inducir en la planta cambios fisiológicos, favoreciéndose la síntesis de fitoalexinas y azúcares de la pared y la inhibición del crecimiento de determinados agentes patógenos.

Para ello, se cultivaron plantas de algodón (*Gossypium sp.*) durante tres meses y se pretrataron con ácidos carboxílicos, aminas y azúcares parcialmente protegidos en los diferentes estadios del crecimiento del cultivo. Tras el tratamiento se analizaron en las hojas las enzimas clorofilasas, peroxidasas y proteasas, así como proteínas totales y azúcares de la pared (celulósicos y no celulósicos).

Resultados iniciales han mostrado que las plantas pretratadas presentan un mayor vigor y crecimiento respecto de las plantas control. La actividad clorofilasa en plantas inducidas disminuye en general en todos los tratamientos aplicados, así como la actividad proteasa, ambas enzimas son las responsables del control del proceso de senescencia de la planta.

La actividad peroxidasa muestra una mayor disminución en plantas tratadas que en las control, ello podría favorecer la ruta de síntesis de fitoalexinas e inhibir el proceso de lignificación de la pared celular. Por último se ha observado que el contenido en azúcares celulósicos y no celulósicos (azúcares urónicos y azúcares neutros) se incrementa en la pared celular tras el pretratamiento, lo que supone una mayor protección de la planta frente al ataque de agentes patógenos.

Otro de los objetivos del trabajo ha sido determinar el efecto de la glucosa parcialmente protegida sobre el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* pers.:Fr.v.

Se ha comprobado que cuando se incuba el hongo en un medio que contiene glucosa parcialmente protegida en los grupos hidroxilos hay una mayor disminución del crecimiento del hongo a los 3 y 4 días respecto de los controles.

INDICE DE AUTORES

Abadía, M.A.	122	Aparicio, P.J.	195
Abrisqueta, J.	374	Aparicio, P.M.	79
Acebes, J. L.	162, 424	Aparicio-Tejo, P.M.	214, 286, 288, 289
Acero, N.	261, 380	Apesteguía, B.	305
Acosta, M.	395, 396	Arán, M.	52
Aguado, C.	47	Aranda, I.	85
Agüera, E.	268, 272	Aranda, P.	403
Agüila, N.M.	335	Aranda, X.	122
Aguilar, M.	294, 295, 403	Arcas, M.C.	155
Aguirreolea, J.	151, 305	Areal, E.L.V.	121
Alarcón, A.L.	372	Arellano, J.B.	186
Albuérne, M.	310, 350, 361	Arigita, L.	322
Albuérne, M.A.	346	Arnao, M.B.	395, 396
Alcántara, E.	82, 405	Arrabaça, J.D.	224, 225
Alcaraz, C.F.	369	Arrabaça, M.C.	167, 208, 223
Alegre, J.	78	Arregui, L.	303
Alegre, L.	128, 129	Arrese-Igor, C.	145, 214, 286
Aleixandre, E.	191	Arrillaga, I.	345
Alía, R.	135	Artetxe, U.	105, 246
Almeida, J.M.	290	Aschan, G.	108
Almeida, S.	182	Asenjo, M.C.G.	64
Alvarez, C.	348, 350	Avila, C.	292
Alvarez, J.M.	162, 424	Ayerbe, L.	78, 132, 137
Alvarez, R.	197	139
Alvarez-Tinaut, M.C.	160	Azcón, M.	367
Amâncio, S.	81	Azinheira, H.	113
Amâncio, S.Q.	401	Aznar, R.	65
Amo-Marco, J.B.	331	Balaguer, B.	65
Andrade, S.	181	Ballesteros, E.	168
Angosto, T.	394		

Índice de autores

Bañuelos, M.A.	40	Breia, E.	196
Barceló, J.	188, 378	Brewin, N.J.	21, 254
Barea, J.M.	49, 244	Bueno, M.	385
Barnestein, P.	292	Bueno, P.	241
Barón, M.	152, 186	Burló, F.	376, 377
Barrachina, C.	388	Caba, J.M.	247, 248
Barragán, E.	297	Caballero, F.J.	284
Barreiro, G.	221, 435	Cabral, M.L.	175
Barreiro, M.G.	224	Cabrera, J.	60
Barrero, S.	68	Cabrerizo, P.M.	214
Barrientos, M.L.	261, 380	Caçador, I.	185
Barroso, C.	278	Cacho, M.	307, 308
Barrote, I.	204	Caffaro, S.V.	190
Batista, M.T.	307	Caldeira, G.	181, 182, 360
Batlle, I.	119	Calderón, A.A.	243
Becana, M.	145	Camacho Martínez, M.	296
Becerril, J.M.	105, 246	Camara, T.R.	180
Bellés, J.M.	47	Campos, J.A.	60
Belver, A.	168	Campos, P.S.	114
Ben Abdelkhalek, H.	176	Candela, M.E.	239
Benavente, O.	155	Cano, E.A.	396
Benavente-García, O.	408	Cánovas, F.M.	292
Benítez, E.	366	Canta, N.R.	196
Benloch, M.	67, 99, 192	Cañal, M.J.	312, 314
.....	370	315, 321
Benson, E.E.	315	Carbonell, A.	376, 377
Bergareche, C.	297	Carelli, M.L.C.	199, 200
Bernal, M.A.	258, 407, 444	Carmona, M.A.	175
Bernardes da Silva, A.	208	Caro, E.	339
Bernet, E.	328	Carpena Ruiz, R.O.	236
Berros, B.	316, 319	Carrasco-Rodríguez, J.L.	191
Bertrand, A.	346	Carvajal, M.	369, 374, 375
Bezerra, J.	180	Carvalho, C.	116, 217
Biel, C.	119	Carvalho, L.F.	81
Blanco, M.C.	67	Carvalho, L.M.	185
Blanco, R.	282	Carvalho, M.L.	184
Biasco, R.	282, 285	Carvalho, P.	96
Bonfill, M.	351, 353, 355	Cases, M ^a .A.	335
Botía, J.M.	359	Casimiro, A.	184
Boza, M.	267	Castillo, F.	282, 283
Brasileiro, A.C.R.	423	284, 285

Castillo, J.E.	66	De Cires, A.	267
Catalá, R.	210	De Felipe, M.R.	250, 252, 254
Catarino, F.	209	De Herralde, F.	119
Cavaco, A.M.	223	De la Haba, P.	268, 272
Cavalheiro, J.	434, 435	De la Torre, A.	267
Cazorla, J.M.	339	De la Torre, F.	397
Cejudo, F.J.	197, 278	De Paula, M.	438
Cenoz, S.	151	De Prada, J.M.	412
Centeno, M.L.	248, 318, 319	De Ron, A.M.	69
Cerdá, A.	374	Del Campo, E.M.	212
Cerezo, M.	174	Del Castillo Agudo, L.	70
Chamber Pérez, M.A.	263, 296	Del Castillo, L.	309, 345
Chaves, M.M.	34, 124, 127	Del Monte, J.G.	190
.....	158, 196, 205	Del Río, J.A.	155, 359
Chueca, A.	206	408, 409
Chueca, M.C.	72	Del Río, L.A.	429, 431
Claparols, I.	328, 417	Del Valle-Tascón, S.	191
Clavijo, A.	331	Delgado, I.C.	365
Cohen, M.	119	Díaz Barradas, M.C.	118
Corchete, P.	344	Díaz de la Guardia, M.	82, 405
Cornejo, M.J.	301	Díaz, J.	82, 258,
Corrales, I.	188	407, 444
Corredoira, E.	336	Distefano, S.	431
Correia, A.	360	Domínguez, J.R.	277
Correia, C.M.	121	Donaire, J.P.	37, 168.
Correia, M.J.	204	169, 241
Correia, O.	117, 118	Dondini, L.	328
Correira, M.A.	281	Dopico, B.	189, 411
Costa, M.	70	Droppa, M.	186
Coupland, G.	390	Drumond, M.	93
Crespillo, R.	292	Duñabeitia, M.K.	105, 142, 149
Cruz, C.	117, 185	Duque, P.	224
.....	281, 298	Echevarría, C.	197
Cuello, J.	215, 441	Egea, C.	239, 372
Cueva, R.M.	334	El Mansouri, I.	183
Culiáñez Macià, F.A.	47	Elvira, C.	366
Cusidó, R.M.	351, 353, 357	Encina, A.E.	162
Cutanda, M.C.	47	Encina, C.L.	339, 424
Dahiya, P.	21	Eraso, E.	79
David, M.M.	204	Escalona, J.M.	101
De Andrés, E.F.	78, 137, 139	Escribano, M.L.	436

Índice de autores

Escudero, A.	68	Frutos, G.	438
Escuredo, P.R.	145	Fuster, M.D.	408
Espejo, J.A.	66	Galhano, V.M.F.	230
Espinosa, A.	47	Gallardo, M.	387
Espinosa, F.	160	Gallardo-Lara, F.	367
Esquivel, M.G.	123	Gallego, P.P.	75, 77
Esteban, E.	236	Gallo, P.B.	199
Esteban, J.L.	433	Gámiz, R.	66
Esteve, A.	355	Gárate, A.	236
Estévez López, P.	238	García del Moral, L.F.	94
Estrada, B.	407	García Lidón, A.	409
Fahl, J.I.	199, 200	García Pérez, M.D.	239
Fal, M.A.	312	García Puig, D.	409
Faria, T.	196	García, A.L.	201
Feito, I.	314	García, G.	325
Fernandes, F.M.	167	García, J.L.	80
Fernández Pascual, M.	250, 254	García, L.	73, 74
Fernández, B.	248, 314,	García, P.	282
.....	318, 321	García, S.	385
Fernández, E.	327, 421	García-Agustín, P.	174, 445
Fernández, G.A.	134	García-Baudín, J.M.	72
Fernández, H.	346	García-Luque, I.	152
Fernández, J.A.	42	García-Martín, G.	326, 416
Fernández, M.	135	García-Martínez, J.L.	389, 394
Fernández-Galiano, E.	325, 326, 416	García-Mina, J.M.	151
Fernández-López, P.	321	García-Plazaola, J.I.	105, 246
Fernández-Tárrago, J.	307, 308, 344	García-Sánchez, M.I.	277
Ferreira, R.B.	123	García-Sánchez, M.J.	42
Ferrer, F.	52	Garrido, A.M.	385
Ferrer, S.S.	73	Garrido, D.	391
Fidalgo, F.	156	Garrido, G.	395, 396
Fleck, I.	122	Garrido, I.	160
Flexas, J.	101	Gavidía, I.	70
Flores, F.	443	Gavira, M.	283
Flores, P.	375	Gazarini, L.C.	89, 90
Flors, V.	445	Gea, M.A.	315
Fonseca, F.	204	Gil, J.	389
Fournier, J.M.	99, 370	Gil, L.	85, 135
Fraga, M.F.	316, 318	Gil M.	420
Franco, A.R.	269	Giráldez, N.	195
Frechilla, S.	288, 289	Girio, F.M.	279, 280

Goicoechea, M.	398	Hipólito, M.	175
Goicoechea, N.	151	Hogan, K.P.	122
Gómez, M.	366, 431	Hormilla, S.	149
Gómez, P.	394	Horváth, G.	186
Gómez, R.	228	Huguet, G.	159
Gómez-Jiménez, M.C.	387, 391	Humara, J.M.	259, 292
Gómez-Laranjo, J.C.E.	230	Ibarra, M.	73, 74
Gomis, M.	378	Igeño, M.I.	390
González, A.	132, 286, 322	Irigoien, I.	274
González, J.L.	64, 66	Iturbe-Ormaetxe, I.	145
González, M.C.	197	Jevremovic, S.	361
González, M.V.	343	Jiménez, A.	171, 429
González-Fontes, A.	268	Jiménez, I.	244
González-Moro, B.	144, 149	Jiménez, M.S.	107, 108
González-Murua, C.	142, 149, 286	109, 110
González-Rodríguez, A.M. ...	107, 108	J nez-Bermúdez, S.	183
.....	109, 110	Jones, J.D.G.	235
Gonzalo, J.	351, 355	Jorriñ, J.	192
Gotor, C.	277, 278	Juan-Delhom, M.	191
Groeneveld, H.W.	111	Karpinski, S.	171
Guasch, L.M.	250, 254	Kerkeb, B.	168
Guéra, A.	210	Kerkeb, L.	169
Guerra Filho, M.	423	Khadri, M.	178
Gulías, J.	134	Labrador, E.	189, 411
Gutiérrez Mañero, F.J.	261, 380	Lacuesta, M.	142, 144
Gutiérrez, J.C.	130	L amsfus, C.	79, 274
Guzmán, M.	192	288, 289
Hammond-Kosack, K.	235	Lángara, L.	246
Harrison, K.	235	Lapeña, L.	445
Henriques, F.	217, 221	Lara, C.	267
Heredia, M.A.	42	Lasa, B.	288, 289
Hernández, A.	246	Lauriano, J.	93, 116
Hernández, J.A.	171, 429	Legaz, M.E.	414, 415
Hernández, L.E.	21	Leidi, E.O.	130
Hernández, M.J.	252	Lidon, F.	116
Hernández-Allika, J.	142, 144	217, 219, 221
Hernández-Nistal, J.	69	Lidon, F.C.	111
Hernando, S.	79	Ligero, F.	247, 248
Herrera-Cervera, J.A.	241	Lips, S.H.	298
Herrera, M.T.	336	Llompert, B.	159
Hidalgo Fernández, P.	100	Llop, I.	437

Índice de autores

Llorens, L.	122	Martínez, V.	374, 375
López, E.	376, 377	Martínez-Abarca, F.	241
López Gorgé, J.	206	Martínez-Honduvilla, C.J.	438
López, M.	130, 259, 343	Martínez-Madrid, M.C.	442
López-Carbonell, M.	153	Martínez-Parra, J.	275
López-Díaz, I.	389	Martínez-Reina, G.	442
López-Garrido, J.	60	Martín-Remesal, C.	392
López-Moreno, J.L.	369	Martins, L.L.	279, 280
López-Siles, F.J.	269	Martins, V.	117
Lorences, E.P.	65, 388	Martins-Louçao, M.A.	117, 185, 281
Lorenzo, O.	412, 413	298, 304
Losada, M.	15, 202, 226,	Mata, S.	190
.....	228	Mataix, J.	376, 377
Lösch, R.	108	Mateos, J.L.	414, 415
Lozano, R.	394	Matilla, A.	385, 391
Lucas García, J.A.	261, 380	Matilla, A.J.	387, 392
Lucas, M.M.	252, 254	Matos, A.A.	333
Lucena, J.L.	62	Matos, M.C.	93, 114, 116
Lluch, C.	176, 178, 256	Mauri, P.V.	325, 326, 416
MacRae, S.	360	Medeira, M.C.	147
Madeira, M.A.	90	Medrano, H.	101, 134
Madrid, R.	372	Mena, A.	142, 144
Magalhaes, N.	141	Mercado, J.A.	183
Maldonado, J.M.	64, 100	Mérida, A.	226
.....	268, 271, 272	Merino, F.	258, 407, 444
Mallol, A.	353, 357	Merodio, C.	436
Manzanares, M.	78, 137, 139	Meunier, J.	423
Manzanera, J.A.	335	Millard, P.	96
Marín, F.R.	408	Mingo-Castel, A.M.	303
Marín, M.	73, 74	Miralles, M.C.	445
Marques da Silva, J.	208, 209	Molinas, M.	159, 338
Marques, N.	93, 114	Moncaleán, P.	314
Marques, N.M.	333	Montenegro, M.	271
Martín, C.	340	Moral, R.M.	162, 424
Martín, I.	132	Morales, C.	324, 351, 355
Martín, M.	212, 440	Morales, D.	107, 108
Martín, S.	371	109, 110
Martín-Closas, Ll.	334	Morán, M.	307, 308
Martínez Luque-Romero, M.	282, 285	Moreno-Vivián, C.	283, 284
Martínez, D.	347	Moret, A.	153
Martínez, P.	440	Moukadiri, O.	301

Mourato, M.F.B.	279, 280	Osuna, L.	197
Moutinho-Pereira, J.M.	141	Pacheco, J.	318
Moya, J.L.	173	Padilla, I.G.	339
Moyano, E.	324, 351	Pádua, M.	184
Moyssset, L.	327, 421	Palazón, J.	324, 355, 357
Mullineaux, P.M.	171	Palha, M.G.S.	86
Munné-Bosch, S.	128, 129	Palma, J.M.	92, 431
Munoz, A.	294	Palomer, X.	437
Muñoz, F.J.	411	Paranhos, A.	344
Muñoz, M.T.	436	Pardo, F.	85
Muñoz, R.	275	Pardo, I.	73
Muñoz, S.	445	Pardos, J.A.	83, 85, 135
Muñoz-Guerra, L.M.	62	Pardos, M.	74, 83
Muñoz-Rueda, A.	142, 144, 149	Paredes, M.A.	160
Muro, J.	274	Pastor, J.J.	369
Nadal, A.	159	Pastori, G.A.	429
Nadal, M.	153	Pavón, M.M.	433
Navarro, J.M.	375	Payán, C.	394
Navia-Osorio, A.	353, 355	Paz Rodríguez, J.L.	97
Nebauer, S.G.	309, 345	Pelacho, A.M.	334
Neves, C.C.	401	Peña, M.J.	400
Nicolás, C.	412, 413	Perea, F.	82
Nicolás, G.	413	Peregrín Alvarez, J.M.	263
Nicolás, N.	201	Pereira, P.M.	281
Nogales, R.	366	Pereira, I.P.	89
Nogués, S.	128, 129	Pereira, J.S.	96, 127, 158
Noronha, C.	304	196, 205
Nunes, M.A.	111, 113	Pereira, M.J.	182
Ocaña, A.	176, 178, 256	Pérez de los Reyes, C.	59
Olivares, J.	241	Pérez García, F.	68
Oliveira, A.A.	141	Pérez Vicente, R.	100, 271
Oncina, R.	359	Pérez, C.	340
Oosterhaven, J.	443	Pérez-Alegre, M.	269
Ordás, R.J.	259, 292, 343	Pérez-Bermúdez, P.	70
Ortega, J.M.	202	Pérez-Castiñeira, J.R.	226
Ortuño, A.	155, 359	Pérez-Cerezo, M.A.	433
.....	408, 409	Peters, J.	110
Osorio, J.	127, 158	Picorel, R.	29
Osorio, M.L.	81, 124	Piedras, P.	235, 294
.....	127, 158	Pierre, J.N.	197
Osuna, D.	295	Pineda, M.	294, 295, 403

Índice de autores

Pinto, G.	360	Recio, E.	424
Pinto, T.M.S.	91	Revilla, G.	397, 398, 400
Piñol, M.T.	324, 353, 357	Revilla, M.A.	347
Pita, J.M.	68	Rey, M.	292
Pita, P.	135	Reyes, A.	414, 415
Pla, M.	159	Reyes, F.	283
Pliego, F.	183	Ribeiro, D.	96
Pliego, L.	178	Rigau, J.	417
Poblete, L.B.	272	Rivilla, R.	236
Polo, A.	367	Robles, C.	244
Pomar, F.	407, 444	Rodrigo, M.J.	389, 394
Porras Piedra, A.	59	Rodríguez, A.	314, 319
Porras, I.	409	Rodríguez, M.L.	124
Portela, P.	75	Rodríguez Cámara, M.C.	238
Poschenrieder, Ch.	188, 378	Rodríguez-Fernández, M.T. ...	238
Prego, M.C.	258	Rodríguez-Rosales, M.P.	169
Pretel, M.T.	442	Rodríguez, D.	75, 412, 413
Primo-Millo, E.	173, 174	Rodríguez, N.	340
Probanza, A.	261, 380	Rodríguez, R.	77, 310, 315
Proença da Cunha, A.	307	316, 318, 319
Puigderrajols, P.	159, 338	348, 350, 361
Quartin, V.	113	Rodríguez-Jiménez, M.I.	109, 110
Queiroz-Voltan, R.B.	200	Rodríguez-Navarro, A.	40
Quemada, M.	288, 289	Rodríguez-Paradela, M.A.	397
Quesada, J.L.	367	Rodríguez-Rosales, P.	241
Quesada, M.A.	183	Roig, C.	324, 357
Quiles, M.J.	215	Roldán, M.	440
Quintero, J.M.	67, 99, 370	Roldán, M.D.	284
Radojevic, L.	310, 348	Romano, A.S.	393
.....	350, 361	Romano, R.O.	393
Rahoutei, J.	152	Romeis, T.	235
Ramalho, J.	217, 221	Romera, F.J.	405
Ramalho, J.C.	111, 113	Romero, C.	47
Ramírez Vera, R.	238	Romero, J.M.	226
Ramos, B.	261, 380	Romero, L.C.	278
Ramos, J.	99, 370	Romero-Aranda, R.	103, 173
Ramos, J.M.	94	Romo, S.	189
Rathbun, E.A.	21	Romojaro, F.	442, 443
Rebelo, E.	93	Roncel, M.	202
Recalde, L.	247	Ros Barceló, A.	243, 419
Recasens, I.	435	Royo, A.	83

Royuela, M.	286	Serrano, R.	47
Ruano, M.A.	92	Sevilla, F.	171, 429
Rubio, F.	40	Sevillano, J.M.	162
Ruiz Nogueira, B.	97	Silva, M.J.P.	86
Sá, C.S.	90	Simoes, M.P.	89, 90
Sabater, B.	210, 212, 440	Simón, E.	32, 297, 327
Sabater, F.	155	420, 421
Saco, D.	371	Simon, R.	390
Sáez, L.P.	284	Solís Martel, I.	263, 296
Sahrawy, M.	206	Soriano Martín, M.L.	59
Salajová, T.	348	Soriano, P.	70
Salema, R.	156, 290, 341	Sousa, A.	181
Sales, E.	345	Soussi, M.	176
Sampedro, J.	397	Sudriá, C.	351
Sánchez-Escribano, E.M.	243	Syvertsen, J.P.	103
Sánchez, F.J.	137, 139, 372	Tadeo, F.R.	173
Sánchez, J.	78	Talón, M.	173
Sánchez-Bravo, J.	395, 396	Tamés, R.S.	347
Sánchez-Díaz, M.	80, 305	Teixeira, A.R.	123
Sánchez-Raya, A.J.	365	Teixeira, M.	111
Sánchez-Tamés, R.	312, 322, 346	Tenorio, J.L.	62, 78, 137
Sandalio, L.M.	92	139
San José, P.	371	Tenreiro, A.M.	225
Sanjuan, J.	241, 256	Toribio, M.	338
Santa-María, G.	40	Torné, J.M.	327
Santos, A.	434, 435	Torné, J. M ^a	328, 417
Santos, C.	181, 182, 360	Torres, M.	433, 438
Santos, I.	156, 290, 341	Torres-Pereira, J.M.	141
Santos, J.	341	Torres-Pereira, J.M.G.	91, 121, 230
Santos, M.	175, 328, 417	Torres-Pereira, M.S.B.C.	230
Santos, P.	196, 205	Trivelin, P.C.O.	200
Santos, R.J.C.G.	91	Ubera Jiménez, J.L.	100
Sau, F.	97	Ullán, R.V.	189
Savé R.	119	Uribe, M.	316
Segura, J.	70, 309, 345	Uribe, M.A.	310
Semedo, J.	93, 114, 333	Valdés, E.	343
Serafini-Fracassini, D.	328	Valpuesta, V.	183
Serôdio, J.	209	Varela, M.	69
Serrano, A.	226, 228	Varenes, A.	279, 280
Serrano, I.M.	192	Vaz Pinto, V.	225
Serrano, M.	442	Vega, J.M.	277, 278

Indice de autores

Vendrell, M.	437	Villar, P.	52
Veramendi, J.	303	Villarroya, M.	72
Verdaguer, D.	159	Vincent, J.L.	21
Viana, R.	389	Wangensteen, O.S.	206
Vicente, C.	190	Willadino, L.	423
Vicente, J.	225	Wiszniewski, J.P.	21
Vidal, D.	420	Yáñez, J.A.	94
Vidal, J.	197	Zarra, I.	397, 398, 400
Villar, J.M.	52	Zúñiga, D.	256

