

Biológicas

332

T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE C.C BIOLOGIQUES

**EL SISTEMA REDOX DEL
PLASMALEMA Y EL CRECIMIENTO
POR ELONGACIÓN CELULAR**



Memoria presentada por el
Licenciado D. JOAQUÍN CARRASCO LUNA
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

UMI Number: U607670

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607670

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTHECA CIÈNCIES

o Biológicas

Nº FOLIOS: 6410

DATA: 23.3.94

SIGNATURE:

332.T.D

Nº LIBRES: 121644597

30 ms.



DEPARTAMENT DE BIOLOGIA VEGETAL
(FISIOLOGIA VEGETAL)

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctor Moliner, 50
E-46100 BURJASSOT (València)

Telèfons 386 46 34 - 386 43 80 / Fax 386 43 72

Dr. D. Secundino del Valle Tascón, Catedrático de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València y Dr. D. Julio Salguero Hernández, profesor ayudante L.R.U. E.U. del Dpto. Biología y Producción de Vegetales de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: "El sistema redox del Plasmalema y el crecimiento por elongación celular", que presenta D. Joaquín Carrasco Luna para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido finalizada bajo nuestra dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Burjassot a 21 de Enero de 1994.

Fdo. Secundino del Valle Tascón

Fdo. Julio Salguero Hernández

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Secundino del Valle Tascón, sin cuyas orientaciones, consejos y enseñanzas no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias por todo.

Al Dr. Julio Salguero por su dirección y asesoramiento en la realización de este Estudio. Por su amistad y apoyo en el inicio de la tarea investigadora.

Mención especial para los Dres. Angeles Calatayud y Francisco González, que además de compartir su amistad, también compartieron su tiempo en largas tertulias de trabajo. Gracias por vuestro apoyo en todo momento. Por estar cuando os he necesitado.

A la Dra. Dña. Felisa Puche por su asesoramiento en el tratamiento de las muestras para la Microscopía electrónica y Óptica.

Al Dr. D. Antonio Campos por su amistad, convivencia diaria y por compartir inquietudes comunes.

A Jesús García y Juan Carlos Femenía por su amistad y por compartir tantas cosas

A mis padres y toda mi familia por el apoyo incondicional en todo y en todo momento.

A mis compañeros de trabajo en Medicina, muchísimas gracias por vuestro apoyo incondicional.

A todos mis amigos por aguantarme durante tanto tiempo.

Y sobre todo a Anna, por tu apoyo y comprensión. Por estar siempre a mi lado por tus contínuos animos y servirme de estímulo.

A Anna
A mis padres.

ABREVIATURAS

ABA, ácido abcísico

CH, cicloheximida

DCCD, dicitclohexilcarbodiimida

DCP, 2,4-diclorofenolindofenol

DES, dietilestilbestrol

DNP, 2,4-dinitrofenol

E, coeficiente de extinción

FC, fusicocina

HBI IV, Hexabromoiridato IV

HCF III, Hexacianoferrato III (ferricianuro)

HCF II, Hexacianoferrato II (ferrocianuro)

HCl IV, Hexacloroiridato IV

HEPES, ácido 2-(4-hidroxietil 1-piperacil) etano sulfónico

IAA, ácido indol-3-acético

KCN, cianuro potásico

PCIB, ácido p-clorofenoxiisobutírico

TIBA, ácido 2,3,6-triiodobenzoico

Vel, velocidad

2,4 D, ácido 2,4 diclorofenoxiacético

INDICE

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Elongación celular	2
1.1.1. Crecimiento inducido por auxina	2
1.1.2. Mecanismo de acción de la auxina	4
1.2. Sistema redox de la membrana plasmática en vegetales	5
1.2.1. Actividad redox de la membrana plasmática	6
1.2.2. Reducción de HCF III	7
1.3. Extrusión de protones	8
1.3.1. Potencial de membrana	10
1.4. pH citosólico	12
1.5. Sistema calcio-calmodulina	13
1.6. Sistema redox y elongación celular	14
1.7. Objetivos	18
2. Materiales y métodos	19
2.1. Material vegetal	19
2.1.1. Germinación	19
2.1.2. Tratamiento de los segmentos de coleoptilos e hipocotilos ..	20
2.1.3. Preincubación	21
2.2. Elongación	21
2.3. Extrusión de protones	22
2.3.1. Determinación	22
2.3.2. Capacidad tampón	23
2.3.3. Velocidad aparente de extrusión de protones	24
2.4. Reducción de HCF III	24
2.4.1. Velocidad de reducción de HCF III	26

2.4.2. Recuperación HCF III reducido mediante peróxido de hidrógeno	26
2.5. Microscopía electrónica	26
2.6. Calmidazolium	28
2.7. Estadística	30
3. Resultados	31
3.1. Crecimiento por elongación	31
3.1.1. Elongación inducida por auxina	31
3.1.1.1. Efecto del HCF III y HCF II	31
3.1.1.2. Adición de HCF III en la fase II	37
3.1.1.3. Readición de HCF III al cabo de 30 minutos	40
3.1.2. Elongación basal del coleoptilo	40
3.1.2.1. Efecto de HCF III y HCF II	40
3.1.3. Abrasión	47
3.1.4. Inhibidores	52
3.1.4.1. Atebrina	52
3.1.4.2. DCCD	59
3.1.4.3. Cicloheximida	59
3.1.5. Elongación en coleoptilos de avena e hipocotilos de soja ..	59
3.1.5.1. Efecto HCF III en la elongación de los coleoptilos de avena	61
3.1.5.2. Crecimiento por elongación en hipocotilos de soja	61
3.1.5.3. Abrasión	61
3.1.6. Efecto del ión Ca ²⁺ en el crecimiento inducido por IAA y HCF III.	68
3.2. Reducción de HCF III	72
3.2.1. Cinética de reducción	72

3.2.2. Estimulación de la reducción del HCF III por calcio.	72
3.2.3. Reducción en ausencia de auxina	76
3.2.4. Efecto de los antibióticos en la reducción de HCF III	76
3.3. HCF III estimula la extrusión de protones	80
3.3.1. Dosis respuesta de HCF III en presencia de IAA	80
3.3.2. Efecto del calcio en la extrusión de protones inducida por HCF III	83
3.3.3. Extrusión de protones en ausencia de IAA	83
3.3.4. Efecto de los antibióticos en la extrusión de protones	83
3.4. La extrusión de protones inducida por HCF III se realiza a través de la atpasa del plasmalema	88
3.4.1. Estequiometría H ⁺ /e ⁻	88
3.4.2. Efecto del catión Ca ²⁺ en la estequiometría H ⁺ /e ⁻	92
3.4.3. Estequiometría como cociente de velocidades	93
3.4.4. Efecto del dccd en la extrusión de protones y reducción de HCF III	93
3.5. El sistema redox acidifica el citoplasma	99
3.5.1. Efecto del NH ₄ Cl en el crecimiento por elongación	99
3.5.2. Efecto de la atebrina en el crecimiento inducido por NH ₄ Cl	102
3.6. Participación del sistema calcio calmodulina en el mecanismo de acción del HCF III	102
3.6.1. Efecto antagonistas de calmodulina.	104
4. Discusión	108
5. Conclusiones	118
6. Bibliografía	119

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

El sistema redox del plasmalema, transfiere electrones desde donadores citosólicos de electrones, NADH o NAD(P)H, posiblemente hasta aceptores de electrones fisiológicos como el oxígeno o semidihidroascorbato. Oxidantes impermeables en la superficie externa de la membrana plasmática actúan como aceptores artificiales de electrones (HCF III, HCI IV, HBI IV, DCIP, etc) (Craig y Crane, 1985b; Crane *et al.*, 1985a; Morré *et al.*, 1987a).

Se han considerado como aceptores fisiológicos determinados iones, los cuales deben ser reducidos antes de ser incorporados en la célula, como por ejemplo el ión férrico, cúprico o nitrato (Bienfait, 1985; Castignetti y Smarrelli, 1986; Jones *et al.*, 1987).

El transporte de electrones del plasmalema interviene en el control de la elongación, incrementa la extrusión de protones, modifica el potencial de membrana y participa en la proliferación celular en células animales (Crane *et al.*, 1991).

Las hormonas de crecimiento regulan el transporte de electrones en el sistema redox del plasmalema (Referencias en Crane *et al.*, 1991). La naturaleza de la interacción entre el sistema redox y las hormonas o factores de crecimiento no es conocido todavía.

En células vegetales las evidencias de la participación del sistema redox en el control de la elongación celular son todavía contradictorias (Taiz, 1984; Silk, 1984). El objetivo de esta Memoria de Tesis Doctoral es el estudio de la participación del sistema redox en células vegetales en la elongación celular. Los resultados experimentales obtenidos demuestran que en células vegetales, el sistema redox del plasmalema participa en el crecimiento por elongación (Carrasco-Luna *et al.*, 1993).



1.1. ELONGACIÓN CELULAR

El crecimiento por elongación celular, es un proceso esencial en las plantas. La elongación celular es la consecuencia de varios procesos interrelacionados:

a) entrada de agua a través de la membrana plasmática impulsada por el gradiente de potencial hídrico (Cosgrove, 1986; Van der Volkenburg y Cleland, 1986; Hoson *et al.*, 1992; Cosgrove, 1993a y 1993b).

b) aumento en la cantidad de solutos (Kutschera y Fröhlich, 1992).

c) extensión de la pared celular y otros procesos de biosíntesis (Cleland, 1971; Cleland, 1981; Nakajima *et al.*, 1981).

d) transporte continuo de solutos hacia las zonas de extensión celular (Boyer, 1985; Stendle, 1985; Cosgrove, 1986; Schmalsting y Cosgrove, 1988).

1.1.1. CRECIMIENTO INDUCIDO POR AUXINA

Masuda en 1990, determinó que uno de los efectos de la auxina sobre el crecimiento era el incremento de la capacidad autolítica de la pared celular, estimulando la actividad de enzimas específicos tales como hidrolasas (Seara *et al.*, 1988; Hoson *et al.*, 1992; Inouhe y Nevins, 1991).

Hohl observó, que la adición exógena de la hormona auxina a tejidos sensibles, produce una extrusión de protones al apoplasto; esta acidificación, activa distintos procesos hidrolíticos que conducen a la expansión de la pared celular mediante el aumento de la presión de turgencia (Hohl *et al.*, 1991). Otros autores (Vesper y Evans, 1978; Carrington y Esnard, 1988; Brevario *et al.*, 1992) observaron que la auxina provoca un rápido crecimiento por elongación.

La adición de la hormona auxina a tejidos vegetales, estimula el crecimiento por elongación (Brummer y Parish, 1983; Altabella *et al.*, 1990). Esta estimulación presenta dos fases:

a) Fase I: se observa una estimulación del crecimiento que presenta un máximo, tras un período de latencia variable, entre 10-30 minutos tras la adición de la auxina.

Estas características varían dependiendo del tipo de tejido y de las condiciones experimentales.

Durante la fase I se observa una activación de la ATPasa que requiere síntesis de ATP (Penny y Penny, 1978; Evans, 1985). Respuestas similares se obtienen en presencia de soluciones ácidas (pH 5.0-3.5)(Hager *et al.*, 1971; Cleland, 1977; Rayle y Cleland, 1977).

b) Fase II: Se alcanza un segundo máximo de crecimiento que corresponde a la fase II de crecimiento o fase estacionaria que puede durar entre 12-48 horas (Cosgrove y Cleland, 1983).

La fase II, se caracteriza por el aporte de sustancias en la pared celular, la activación de la transcripción de genes, síntesis de proteínas, y un incremento en el aporte exógeno de azúcares y sales (Stevenson y Cleland, 1981).

La fase I del crecimiento es el resultado de la extrusión de protones, mientras que la fase II es debida a la síntesis de pared celular. Dos observaciones apoyan esta hipótesis de trabajo; la primera es la similitud entre la cinética de la fase I y el crecimiento inducido por tampones ácidos (Vanderhoef y Stahl, 1975) y la segunda es que se ha encontrado una correlación temporal entre el incremento de la extrusión de protones y el crecimiento (Cleland, 1987).

Este tipo de cinética se ha obtenido en diversos tejidos vegetales (Vanderhoef y Stahl, 1975; Bouchet *et al.*, 1983; Nissen, 1985; Sasse, 1990).

Una teoría sometida a controversias para explicar el mecanismo de acción en la auxina sobre la elongación celular es la hipótesis de crecimiento ácido (crecimiento por acidificación de la pared celular) establece que el crecimiento por elongación inducido por auxina es debido al flujo de protones desde el citoplasma hacia la pared celular (Brummell, 1986). El descenso de pH en la pared celular lleva consigo una modificación de las propiedades de la pared que estimulan el crecimiento por elongación (Hager *et al.*, 1971; Rayle y Cleland, 1992).

1.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA AUXINA

El efecto de la fitohormona auxina, se ha estudiado en diferentes tejidos vegetales y está asociado a numerosos procesos fisiológicos (Aloni, 1980; Trewavas, 1981; Hein *et al.*, 1984). Los dos procesos más estudiados son la extrusión de protones (Cleland, 1975; Marré *et al.*, 1989; Schopfer, 1989) y la elongación celular (Cleland, 1981; Cosgrove, 1986; Masuda, 1990).

El mecanismo de acción de la auxina en el crecimiento por elongación no es conocido todavía. Se han propuestos diferentes modelos:

1- Incremento del calcio citosólico:

Mediante diversos mecanismos:

a) El aumento de calcio citosólico produce la fusión de vesículas del aparato de Golgi con el plasmalema (Morris y Northcote, 1977); de esta manera, se incorporan nuevos materiales a la pared celular y se estimula el crecimiento (Buckhout *et al.*, 1981; Hertel, 1983).

b) Los iones calcio son intercambiados por protones en la mitocondria y la salida de H^+ al citoplasma disminuye el pH citosólico que a su vez estimula la extrusión de protones mediante la ATPasa (Brummer y Parish 1983; Brummer *et al.*, 1984).

c) La acción primaria de la auxina es la liberación de Ca^{2+} desde los orgánulos citoplasmáticos, aumentando los niveles de calcio citosólicos que activan a la calmodulina (Evans, 1985). El crecimiento y la extrusión de protones son mediados por proteínas quinasas dependientes de calmodulina que activarían la fosforilación de la ATPasa (Ragothama *et al.*, 1985).

d) La acidificación inducida por la hormona auxina en células vegetales parece estar mediada por el sistema calcio-calmodulina. Antagonistas del sistema calcio-calmodulina, inhiben la extrusión de protones y el crecimiento por elongación inducido por auxina (González-Darós *et al.*, 1993).

2- Transcripción de genes específicos:

La auxina estimula la transcripción de genes específicos e induce la síntesis de ARNm; el crecimiento y la extrusión de protones se derivan de la acción de los polipéptidos sintetizados por el ARNm (Theologist, 1986).

El crecimiento es regulado por proteínas que facilitan la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática e incorporan nuevos materiales a la pared celular (Scherer, 1984; Gabathuler y Cleland, 1985).

1.2. SISTEMA REDOX DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN VEGETALES

Böttger *et al.*, han demostrado la existencia de actividad oxidasa en células vegetales con una baja afinidad por el oxígeno que está asociada a una extrusión de protones inducida por auxina; ellos proponen que esta actividad oxidasa pertenece al sistema de transporte electrónico transmembrana que utiliza el NADH citosólico como sustrato (Böttger *et al.*, 1985a y 1985b; Böttger y Lüthen, 1986; Böttger, 1986). Se ha encontrado también actividad NADH oxidasa inducida por IAA en la membrana plasmática relacionada con el crecimiento rápido de hipocotilos de soja (Brightman *et al.*, 1987a).

Los cultivos de células, protoplastos y tejidos intactos reducen el HCF III exógeno y oxidan el NADH citosólico mediante una NADH HCF III óxido-reductasa (Crane *et al.*, 1985a).

Aunque las funciones realizadas por el sistema redox del plasmalema no son todavía bien conocidas, se tienen evidencias de su participación en los siguientes procesos:

a) Oxidación de compuestos con bajo potencial redox, estos compuestos incluyen principalmente, NADH, NADPH, Glutación y Ascorbato (Crane *et al.*, 1985).

b) Control del crecimiento por elongación mediante la estimulación del sistema redox por la luz, (Briggs y Ilno, 1983; Schmidt, 1984; Elzenga y Prins, 1987;



Dharmawardhane *et al.*, 1989).

c) Liberación de segundos mensajeros (Crane, 1989).

d) Acidificación del citoplasma (Rubinstein y Stern, 1986; Marré *et al.*, 1988a; Morré *et al.*, 1988a).

e) Modificación del potencial de membrana (Novak y Ivankina, 1983; Döring *et al.*, 1990).

1.2.1. ACTIVIDAD REDOX DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Los diferentes enzimas redox del plasmalema se pueden agrupar según su actividad redox en:

a) NAD(P)H oxido-reductasa. Reducción de aceptores de electrones externos con un alto potencial redox (Ivankina y Novak, 1981; Crane *et al.*, 1982; Crane *et al.*, 1988; Lüthen y Böttger, 1988; Morré *et al.*, 1988b). Este sistema utiliza el oxígeno como aceptor terminal del electrones (Møller y Bérczi, 1986; Morré *et al.*, 1986; Böttger, 1989). Este sistema actúa como una NADH: oxígeno-oxido-reductasa.

b) NADH-oxidasa Tipo I. Oxida el NADH o NAD(P)H exógenos en presencia de oxígeno (Morré *et al.*, 1988c). La fitohormona auxina es un estimulador de este enzima (Federico y Giartosio, 1983; Brightman *et al.*, 1988). Insensible a cianuro potásico y catalasa.

c) NADH-oxidasa Tipo II. Esta enzima oxida el NADH produciendo superóxidos y peróxidos (Chai y Doke, 1987; Ullrich-Eberius *et al.*, 1988; Crane y Barr, 1989).

d) NAD(P)H-oxido-reductasa inducida por deficiencia en hierro. (Chaney *et al.*, 1972). También llamado sistema turbo está considerado como uno de los mas importantes complejos enzimáticos relacionados con el transporte de iones hacia el interior de la célula (Bienfait, 1985; Bienfait, 1988).

e) Semidehidroascorbato óxido-reductasa. Este sistema está considerado como un posible aceptor natural de las NADH deshidrogenasas. El ascorbato formado por la acción reductasa puede ser reoxidado para formar de nuevo semidehidroascorbato a

través de una ascorbato oxidasa (Morré *et al.*, 1986; Navas, 1991).

f) Variación de absorción inducida por luz. Fotorreducción de un citocromo tipo b a través de los cambios inducidos en la absorción de la luz. Esta reacción alcanza su óptimo en la luz azul a 450 nm (Briggs y Ilmo, 1983; Schimdt, 1984). Esta luz induce cambios que han sido relacionados con las respuestas fototrópicas (Shinkle *et al.*, 1992; Caubergs *et al.*, 1988).

1.2.2. REDUCCIÓN DE HCF III

La actividad oxido-reductasa en la membrana plasmática ha sido estudiada tanto en células animales como en células vegetales. La reacción redox más estudiada en todo tipo de tejido vegetal ha sido la reducción de HCF III (Ivankina y Novak, 1981; Sandelius *et al.*, 1987) u oxidación de NAD(P)H mediante actividad deshidrogenasa en el citosol u oxidasa en la superficie de las células (Chalmers *et al.*, 1984; Rubinstein *et al.*, 1984; Lüthen y Böttger, 1988; Morré *et al.*, 1988b) en preparaciones aisladas del plasmalema (Møller y Bérczi, 1986; Brightman *et al.*, 1987b; Askerlund *et al.*, 1988). El sistema de transporte de electrones transmembrana lleva a cabo la reducción del HCF III externo mediante la oxidación de NADH o NAD(P)H citosólicos. Esta actividad HCF III NAD(P)H-reductasa se encuentra localizada en la membrana plasmática, con actividad deshidrogenasa en la parte interna y actividad reductasa en la cara externa, actuando siempre en presencia de donadores y aceptores impermeables.

Otras evidencias de la relación entre la actividad NADH oxidasa y la reducción del HCF III se determina por el efecto del HCF III sobre el consumo de oxígeno (Polevoy y Salamatova, 1977), que demostraron que el consumo de oxígeno es inhibido en presencia de HCF III en coleoptilos de maíz.

Tanto el NADH como el NADPH pueden actuar como sustratos de las enzimas del transporte electrónico. (Sijmons *et al.*, 1984; Qiu *et al.*, 1985).

La hormona sintética 2,4 D, estimula la oxidación del NADH, en cambio, la auxina no tiene ningún efecto sobre la NADH-HCF III-reductasa (Brightman *et al.*, 1987b).

En tejidos con capacidad de fotosíntesis, en presencia de la luz, estimulan la reducción de HCF III, estimulación atribuida al incremento en el suministro de NAD(P)H en el cloroplasto, así mismo, la reducción de HCF III se ve inhibida en presencia de DCMU que es un inhibidor de la formación de NAD(P)H fotosintético (Dharmawardhane *et al.*, 1987; Neufeld y Bown, 1987).

Antimicina A, inhibidor del complejo I, inhibe la reducción de HCF III por el sistema redox del plasmalema (Barr *et al.*, 1985a; Dharmawardhane *et al.*, 1987).

También se han encontrado otros donadores de electrones citosólicos tales como el Ascorbato, Glutación, Tioredoxina y Xantina (Crane *et al.*, 1979).

La reducción del HCF III en células vegetales es estimulada por los iones (Crane, 1989). El efecto de los cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} es mucho mayor que el de los cationes monovalentes (Federico y Giartosio, 1983; Rubistein *et al.*, 1984). Este efecto es debido a la neutralización de las cargas negativas de la superficie celular. El efecto del calcio externo, además, puede ser explicado mediante la regulación de los niveles de calcio citosólico (Crane, 1989; Dharmawardhane *et al.*, 1988).

1.3. EXTRUSIÓN DE PROTONES

La extrusión de protones es un proceso muy importante en la regulación del metabolismo celular, es realizado por la ATPasa localizada en la membrana plasmática (Poole, 1978; Serrano, 1989; Palmgren, 1991).

El sistema ATPasa del plasmalema acopla la hidrólisis de ATP a un bombeo de protones a través de la membrana (Palmgren, 1990), que genera un potencial eléctrico y un gradiente de pH a través de la membrana plasmática debido a la extrusión de protones desde el citoplasma a la pared celular (Sze, 1985; Cooper *et al.*, 1991).

La energía producida por el gradiente electroquímico es la fuerza conductora para la entrada de solutos, absorción de nutrientes, mantenimiento de la turgencia celular etc, (Nelson, 1988; Sanders y Slayman, 1990; Lin y Randall, 1991; Briskin y

Hanson, 1992). Durante el período de extrusión de protones el pH del medio de incubación disminuye hasta alcanzar un pH estacionario de 4.8-4.4 (Cleland, 1976). En el tejido vegetal se dan simultáneamente dos flujos de protones. El flujo de salida o extrusión de protones es un proceso activo y dependiente de auxina. El flujo de entrada es un proceso pasivo. Los flujos de entrada y salida están regulados por el pH de la solución externa; la entrada de protones aumenta al disminuir el pH de la solución externa (Cleland, 1975). La extrusión de protones es inhibida por un gran número de compuestos, CH, un inhibidor de la síntesis proteica, inhibe la extrusión de protones (Bates y Cleland, 1971; Cleland, 1976; Lado *et al.*, 1977; Pope, 1983). Otros inhibidores metabólicos como son el KCN, dinitrofenol, antiauxinas (PCIB y TIBA) y la fitohormona ácido abscísico (ABA) inhiben también la extrusión de protones (Cleland, 1973; Rayle, 1973).

El transporte de electrones del plasmalema está relacionado con la extrusión de protones, pero todavía no están claras las bases para el movimiento de protones asociado al sistema redox ni la vía por la que los protones son liberados. El HCF III como oxidante externo, estimula la liberación de protones, esta extrusión de protones es inmediata tras la adición (Craig y Crane, 1985b; Böttger, 1986), o con una fase de latencia de pocos minutos (Chalmers *et al.*, 1984; Rubinstein y Stern, 1986).

Por otra parte se ha propuesto que la cadena de transporte electrónico podría activar una ATPasa transmembrana mediante la acidificación de un sitio alostérico de la ATPasa (Morré *et al.*, 1986).

Se han planteado numerosas hipótesis para explicar la relación entre la actividad del sistema redox y la modificación del pH externo. Marré (Referencias en Crane *et al.*, 1991), distingue 3 modelos conceptuales: (Figura 1) (Marré *et al.*, 1987; Marré *et al.*, 1988a; Marré *et al.*, 1988b; Trockner y Marré, 1988)

Modelo A. Donador de electrones citosólico y aceptor de electrones extracelular. El transporte de protones a través de la membrana se realiza por el sistema redox.

Modelo B. Donador y aceptor de electrones citosólicos. El transporte de protones lo realiza el sistema redox.

Modelo C. Donador de electrones citosólico, aceptor de electrones extracelular. El transporte de protones se produce mediante un sistema diferente al sistema redox del plasmalema.

1.3.1. POTENCIAL DE MEMBRANA

La auxina produce un aumento de la hiperpolarización de la membrana plasmática, pero la auxina estimula el crecimiento en ausencia de una hiperpolarización (Senn y Goldsmith, 1984); este hecho sugiere que la hiperpolarización de la membrana no participa en la respuesta de la auxina en el crecimiento por elongación.

La adición de aceptores de electrones externos a tejidos vegetales inducen un descenso en el potencial de membrana. Este cambio es consistente con un descenso de los iones de carga negativa y un incremento de los cationes en el citoplasma (Novak y Ivankina, 1983; Ivankina *et al.*, 1984). La reducción de HCF III está acompañada por una extrusión de protones con una relación estequiométrica, el transporte de electrones, por tanto, debería ser no electrogénico. Se ha propuesto que el descenso del potencial de membrana inducido por HCF III está basado en un bombeo de protones por la NADH oxidasa en la membrana plasmática, el cual transfiere electrones al oxígeno interno mientras libera protones al exterior, este bombeo de protones participaría en el mantenimiento del potencial de membrana (Novak y Miklasevich, 1984; Böttger *et al.*, 1985a y 1985b; Böttger y Lüthen, 1986).

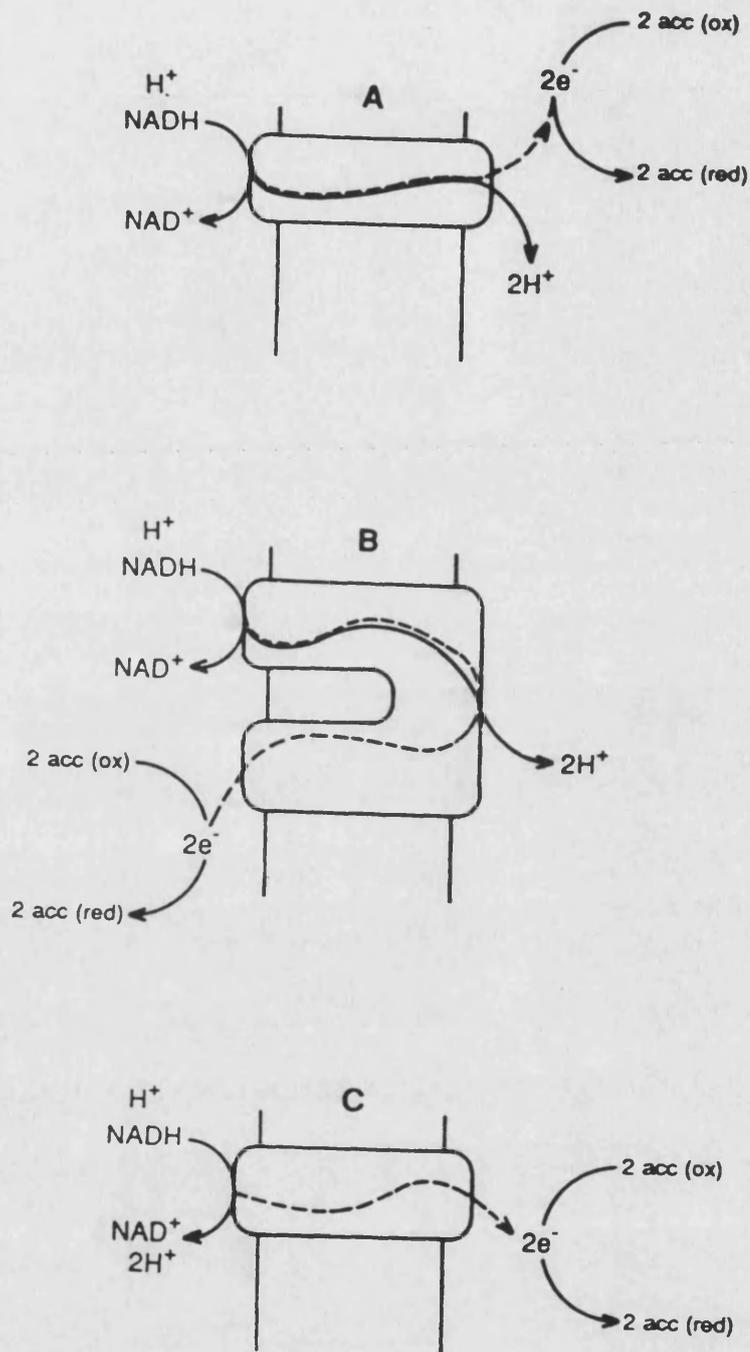


Figura 1. Modelos para el acoplamiento entre la actividad oxido-reductasa y la modificación del pH.

Modelos conceptuales (Marré *et al.*, 1988a y 1988b).

1.4. pH CITOSÓLICO

El pH celular regula la actividad de muchos enzimas y proteínas y controla diversos procesos metabólicos que se efectúan en las células (Gillies y Deamer, 1979; Gillies *et al.*, 1981; Gross *et al.*, 1983). Así mismo, la actividad metabólica (Raven, 1986), el transporte de solutos (Leonard, 1984; Marschner, 1986) o la variación de los factores ambientales (Roos y Boron, 1981; Felle y Bertl, 1986a y 1986b) inciden y modifican el pH citoplasmático.

Estas variaciones en el pH citoplasmático pueden efectuarse a través de la producción o consumo de equivalentes de protones intracelulares o mediante el intercambio de equivalentes de protones a través de las membranas (Smith y Raven, 1979; Raven, 1986).

Los protones podrían actuar como mensajeros intracelulares mediante: la variación del pH citoplasmático, la acidificación de la pared celular, variaciones intramoleculares de protones dentro de las membranas y por último variaciones muy localizadas de pH en ciertas regiones del citoplasma (Poole, 1978; Felle, 1981; Spanswick, 1982).

La acidificación de la pared debida a la extrusión de protones es un requisito imprescindible para promover el crecimiento por elongación (Rayle y Cleland, 1977).

La adición de IAA a coleótilos de maíz produce una variación del pH citosólico que oscila con el mismo período encontrado en las variaciones del potencial de membrana (Referencias en Felle, 1989).

Todas estas características coinciden en determinar el pH citosólico como segundo mensajero en las plantas; capaz de regular numerosas actividades metabólicas entre ellas su participación en la regulación del crecimiento por el sistema redox del plasmalema (Felle 1988a y 1988b).

1.5. SISTEMA CALCIO-CALMODULINA

El aumento del calcio intracelular incrementa el transporte de electrones a través de la membrana plasmática hacia los aceptores de electrones tales como el HCF III:

a) El ionóforo A-23187 y el compuesto 202-791 estimulan la reducción de HCF III en células de mesófilo de avena (Barr *et al.*, 1990).

b) El compuesto TMB-8 (Quelante de calcio impermeable) inhibe la reducción de HCF III (Crane *et al.*, 1984; Barr *et al.*, 1990).

c) Antagonistas de calcio-calmodulina tales como clorpromafina, trifluoperacina, calmidazolium y pimocida, inhiben la reducción del HCF III a bajas concentraciones (Barr y Crane, 1985b).

La función del calcio citoplasmático está regulada por su unión a la calmodulina. El complejo calcio-calmodulina regula la actividad de varias enzimas.

Este efecto depende de la edad de las células y del tiempo de incubación (Barr y Crane, 1985a). Los antagonistas de calmodulina también inhiben el crecimiento inducido por auxina del mismo modo que inhiben la actividad oxido-reductasa del plasmalema (Barr y Crane, 1985a y 1985b), así como la extrusión de protones inducida por auxina (González-Darós *et al.*, 1993).

Los antagonistas de calmodulina presentan varios efectos laterales y por consiguiente el empleo de los antagonistas debe ser realizado de forma cuidadosa.

Estos resultados sugieren que el efecto de la auxina es transmitido a través de una oxido-reductasa sensible a calmodulina (Elliott *et al.*, 1983; Raghothama *et al.*, 1985; Crane *et al.*, 1986).

En esta Memoria de Tesis Doctoral se han contrastado los resultados del antagonista del sistema calcio-calmodulina calmidazolium, tanto en la extrusión de protones como en la reducción de HCF III.

1.6. SISTEMA REDOX Y ELONGACIÓN CELULAR

El transporte de electrones del plasmalema está relacionado con la función de segundo mensajero mediante dos tipos de acciones (Referencias en Crane *et al.*, 1991):

a) Una acción directa sobre los componentes citosólicos mediante modificación en la composición del citoplasma que pueden incluir cambios en el pH y en la relación redox (NAD-NADH, GSH-GSSH, ascorbato-deshidroascorbato), variaciones en el potencial de membrana por flujo electrogénico de electrones o producción de superóxidos o peróxido de hidrógeno.

b) Una acción indirecta por modificación de la actividad de otros enzimas de membrana que están directamente involucrados en la formación de segundos mensajeros.

Evidencias posteriores han demostrado un papel muy importante de la actividad oxidasa en el control del crecimiento. Mediante la inhibición de la NADH oxidasa se observa un descenso del crecimiento inducido por auxina en hipocotilos de soja. Estos inhibidores de NADH-oxidasa incluyen, actinomicina D, nitrofenil-acetato, adriamicina y cis-diaminodicloroplatinum-II, que inhiben la elongación de los hipocotilos de soja (Morré *et al.*, 1987). El compuesto acetato de nitrofenilo, en una concentración de 200 μM , inhibe al 100 % la actividad NADH-HCF III reductasa en membranas aisladas por el procedimiento de flujo libre.

La liberación de protones en células en crecimiento inducido por auxina parece estimular la elongación celular (Cleland, 1971). Esta extrusión de protones depende de la acción de una ATPasa de membrana (Marré y Balarin-Dentí, 1985; Sze, 1985). Se ha propuesto que la acidificación de un sitio interno de la membrana podría activar la extrusión de protones mediante ATPasa (Brummer y Parish, 1983). Este tipo de activación no requeriría la acidificación del citoplasma. La activación puede también llevarse a cabo por la transferencia directa de un protón mensajero desde el sitio redox en la superficie de membrana (Williams, 1983; Dilley *et al.*, 1987).

Otra hipótesis alternativa es la acidificación del citoplasma que se desarrollaría

más lentamente tras el tratamiento con auxina y dependería de la activación de la ATPasa, generando liberación de protones internos por la oxidación de NADH, transporte de protones a través de membrana y variación de la actividad de los enzimas glicolíticos (Felle, 1989).

El transporte de electrones a través de la membrana puede variar el estado redox de la mayoría de los transportadores del citoplasma, por la oxidación NAD(P)H (Navas *et al.*, 1986). El flujo de electrones es máximo durante el proceso de mayor crecimiento en células de zanahoria (Barr y Crane, 1985; Crane *et al.*, 1988), o en porciones de raíces de máximo crecimiento (Qiu *et al.*, 1985), lo cual coincide justo cuando el efecto de la auxina es máximo.

El estado redox de los enzimas de la membrana plasmática controlan la fosforilación de enzimas de membrana mediante la activación de proteína quinasa (Malviya y Anglund, 1986).

La liberación de protones en un sitio localizado de la membrana puede activar la fosfolipasa c, este proceso incrementa la hidrólisis de fosfatidilinositol con la consecuente activación de una proteína quinasa c y la liberación de calcio (Pfaffmann *et al.*, 1987).

El sistema redox del plasmalema controla también los canales de calcio. La apertura de un canal de calcio incrementa la concentración de calcio citosólico, lo cual activa la proteínas quinasas y otras enzimas dependiente de la actividad calcio calmodulina (Houslay, 1987).

En células animales, la proliferación celular y la actividad del sistema redox de la membrana plasmática están correlacionados (Crane *et al.*, 1985). Sin embargo, en células vegetales las evidencias de esta correlación son todavía escasas. En vesículas aisladas de membrana plasmática los compuestos auxínicos naturales (IAA) así como sus análogos (2,4-D, 1-NAA) estimulan la actividad NADH oxidasa con una rápida estimulación (fase de latencia inferior a un minuto) y este efecto se observa durante 30 minutos (Brightman *et al.*, 1987b).

Las concentraciones de auxina que estimulan la actividad oxidasa se encuentran

en el mismo intervalo que las que promueven las respuestas fisiológicas (Morré *et al.*, 1988b y 1988c). La estimulación de la oxidación del NADH por la auxina sugiere que esta oxidación puede ser un proceso limitante en la respuesta hormonal.

En segmentos de tallo de soja los inhibidores del sistema standard, cis-platinum, adriamicina y acetato de p-nitrofenol inhiben la elongación (Morré *et al.*, 1988c). Por el contrario, la presencia de oxidantes externos poseen poco efecto (Morré *et al.*, 1988a) o incluso inhiben el crecimiento celular (Crane *et al.*, 1984).

En células animales la estimulación del crecimiento en presencia de HCF III ha sido considerada como la única demostración de la regulación del crecimiento por el sistema redox (Ellen y Kay 1983), por tanto las evidencias presentadas anteriormente (estimulación de la NADH oxidasa por auxinas e inhibición del crecimiento por inhibidores del sistema redox) están, por el momento, poco contrastadas. Por otra parte, si la actividad del sistema redox controla la elongación, los aceptores de electrones deben estimular el crecimiento. En cambio en hipocotilos de soja el HCF III (0.001 a 500 mM) tienen muy poco efecto en la elongación celular (endógena y estimulada por 2,4-D)(Crane *et al.* 1984, Morré *et al.*, 1988a).

La extrusión de protones es considerada como un factor muy importante en el control del crecimiento celular vegetal. La hormona auxina estimula el crecimiento por elongación celular mediante un aumento en la extrusión de protones del plasmalema. El HCF III estimula la extrusión de protones dependiente de auxina y en términos de la teoría del crecimiento ácido, se debería esperar un aumento en la elongación; por el contrario Böttger y Lüthen observaron una inhibición en el crecimiento por elongación en raíces de maíz (Böttger y Lüthen, 1986).

Otros aceptores externos de electrones tales como el Hexabromoiridato (HBI IV) y el Hexacloroiridato (HCI IV) incrementan la elongación en raíces de maíz (Hassidim *et al.*, 1987).

La regulación del crecimiento celular por el sistema redox del plasmalema ha sido estudiada bajo el modo de acción de dos herbicidas (Blein *et al.*, 1986). El herbicida phemmediphan inhibe la reducción del HCF III y la acidificación del

citoplasma en células de Sicamoro. El herbicida Sethoxydim despolariza reversiblemente el potencial de membrana sin afectar a la actividad ATPasa.

Existe una buena correlación sobre la inhibición de la NADH oxidasa y el crecimiento por elongación en hipocotilos de soja (Crane *et al.*, 1991).

Por otra parte se ha determinado que el sistema calcio-calmodulina representa un paso regulador en la actividad redox del plasmalema (Barr *et al.*, 1985).

La adición de auxina produce una extrusión de protones y una bajada de pH en la pared celular, como consecuencia aparecen dos procesos coordinados que son el ablandamiento de esta pared y la síntesis de nueva pared celular que constituyen el crecimiento por elongación. La adición de activadores del sistema redox, en presencia de IAA, produce un aumento notable en la extrusión de protones, en cambio sus efectos sobre el crecimiento por elongación no están todavía claros.***

Se ha puesto de manifiesto, una serie de hipótesis sobre la posible relación del sistema redox del plasmalema y el crecimiento por elongación que presenta grandes contradicciones. El objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, es el establecimiento del mecanismo de acción del sistema redox del plasmalema y su posible regulación de la elongación celular con el fin de aportar y clarificar algunas de las controversias aquí detalladas.

1.7. OBJETIVOS

En esta memoria de Tesis Doctoral se propone el estudio de la regulación del crecimiento por elongación celular a través del sistema redox del plasmalema mediante:

1- Estudio del efecto de activadores del sistema redox del plasmalema. Efecto del HCF III sobre la extrusión de protones y la elongación celular.

2- Efecto de inhibidores del sistema redox del plasmalema. Efecto sobre el crecimiento por elongación.

3- Estudio de la actividad de los antagonistas calcio-calmodulina sobre la actividad redox del plasmalema.

4- Regulación del crecimiento mediante el pH citoplasmático. Efecto de las bases permeantes (NH_4Cl).

2. MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

La especies vegetales utilizadas en la realización de este trabajo de investigación han sido *Zea mays* L., *Avena sativa* L. y *Glycine max* M. Los cultivares utilizados han sido: maíz, INRA 5a (semillas tratadas con Reldan-48-E, antifúngico protector), suministrado por LYRA. S. A. (Madrid); avena, VICTORY I (Svalöv Ab, Svalöv, Suecia) y soja, MERR. (semillas suministradas por ASGROW (Barcelona).

El peso medio de las cariopsides de maíz es de 0.023 gr. (n=128). El porcentaje de germinación aproximadamente 95 %. El peso medio de las semillas de avena es de 0.012 gr. (n=400); El porcentaje de germinación es 97.3 %. El peso medio de los semillas de soja es de 0.009 (n=250); El porcentaje de germinación es 96.2 %.

2.1.1. GERMINACIÓN

Previamente a la germinación, las semillas son sometidas a los procesos de lavado, esterilización e imbibición sucesivamente.

a) El lavado con abundante agua destilada elimina los restos vegetales y de fungicida. Después del lavado, se desechan las semillas dañadas y aquellas de tamaño muy inferior a la media.

b) La esterilización permite evitar la posible contaminación por microorganismos. La esterilización de la superficie se realiza mediante la inmersión de las semillas en una solución de 1 mM CaCl_2 -lejía (50 gr. cloro activo/litro) al 9 % v/v durante 15 min, transcurrido este tiempo, las semillas son de nuevo lavadas con una solución 1 mM CaCl_2 .

c) La imbibición se lleva a cabo sumergiendo completamente las semillas en la solución de 1 mM CaCl_2 durante dos horas en completa oscuridad en un armario germinador Selecta modelo S.484 a temperatura constante 30 °C.

Tras este último proceso, se realiza la siembra en cajas de plástico (30 x 13 x 8 cm) sobre tres hojas de papel de filtro. En cada caja se depositan 90 semillas (orden 15 x 6) con 90 ml de solución 1 mM CaCl₂. Las cajas se cierran herméticamente, mantienen una humedad relativa de aproximadamente 95 % y se incuban en completa oscuridad en el armario germinador.

Después de 3 días en estas condiciones, se obtienen coleoptilos de maíz y de avena de tamaño comprendido entre 20 y 40 mm de longitud, e hipocotilos de soja entre los 20 y 60 mm. Los segmentos de tamaños superior o inferior y aquellos coleoptilos en los que se aprecia la hoja primaria no son utilizados.

2.1.2. TRATAMIENTO DE LOS SEGMENTOS DE COLEOPTILOS E HIPOCOTILOS

La preparación de los segmentos se lleva a cabo mediante dos procesos: eliminación del ápice del coleoptilo y el tratamiento de la cutícula por abrasión.

El ápice del coleoptilo es la principal fuente de auxina endógena y su eliminación evita el aporte de la hormona a la zona basal del coleoptilo (Went y Thimann, 1937).

La cutícula que recubre al coleoptilo es impermeable a los protones (Rayle, 1973) y por lo tanto se hace necesario eliminarla parcialmente para poder observar la extrusión de protones en la fase externa (Cleland, 1976a; Rayle y Cleland, 1977).

Los segmentos se obtienen cortando los coleoptilos que reúnen todas las características anteriormente citadas con una cuchilla y sometidos posteriormente a abrasión, mediante el giro de los coleoptilos entre los dedos impregnados con una pasta de alúmina (Aluminium oxid 150 basish Type T de Merck) y agua destilada en proporción 1:1 (p/v). Los segmentos se lavan con abundante agua destilada para eliminar completamente los restos de alúmina.

Posteriormente se secciona el ápice, 2-3 mm del extremo apical, se elimina la hoja primaria localizada en el interior del coleoptilo y se obtienen segmentos de 10 mm de longitud.

Los hipocotilos de soja se obtienen en idénticas condiciones, y se elimina el ápice de unos 20 mm a partir de los cotiledones y cortando segmentos de 10 mm que son sometidos al mismo proceso de abrasión y lavado que los coleoptilos de maíz y avena.

2.1.3. PREINCUBACIÓN

Los segmentos apicales se incuban en una solución 1 mM HEPES 4 mM ó 1 mM CaCl_2 (pH = 6.0). Las condiciones de la incubación son:

- a) Temperatura 30 °C.
- b) Agitación mediante una barra y agitador magnético.
- c) Aireación por gaseo con una bomba de acuario acoplada a una pipeta Pasteur.
- d) El volumen del medio de incubación es aproximadamente 10 ml por segmento.
- e) La duración de la preincubación es de 1 hora.

Este proceso se realiza con el fin de eliminar la auxina endógena y los restos de células muertas y componentes celulares producidos por el tratamiento de los segmentos.

2.2. ELONGACIÓN

El crecimiento por elongación se determina mediante la variación de la longitud de los segmentos de 1 cm, en un transductor de proximidad Phillips (modelo PR 9373). El transductor mide la distancia entre dos superficies metálicas en forma de diferencia de potencial que se mide en un voltímetro Hung Chang (modelo HC-5010 C). Este método permite una medida continua.

Estas medidas se realizan en una cubeta especialmente diseñada que posee un filamento metálico en el centro que permite la introducción de 4 segmentos de coleoptilos o bien un tubo de plástico cuyo diámetro interno permite la introducción de 4 hipocotilos de soja. Se localiza una caperuza metálica de 200 mg sobre el último

segmento, que se dispone de forma paralela al transductor. El voltaje obtenido y la distancia son linealmente dependientes en un intervalo (2-8 voltios). La relación matemática entre voltios y distancia se realizó entre 1.0 y 2.0 mm en incrementos de 0.1 mm. La mezcla de reacción está formada por 43 ml Hepes 10 mM CaCl₂ 1 mM (pH 6.0).

Las medidas de crecimiento se realizan cada 0.5 min ó 2 min a lo largo de toda la cinética de crecimiento.

La velocidad de elongación se obtiene mediante diferenciación numérica. Se emplea una fórmula de cinco puntos centrada (Persaud y Virden, 1984)

$$V(I) = (-2N(t-2) - N(t-1) + N(t+1) + 2N(t+2))/t \cdot 10^3 \cdot n^{\circ} \text{ segmentos}$$

$$V(I) = \mu\text{m}/\text{minuto} \cdot \text{segmento},$$

t= intervalo de tiempo constante

N(t)= elongación en μm para cada intervalo de tiempo.

Los cálculos se realizan en el programa Lotus Qpro.

2.3. EXTRUSIÓN DE PROTONES

2.3.1. DETERMINACIÓN

La medida de la extrusión de protones se efectúa mediante la determinación del pH y la titulación del medio, que se detallará en la sección 2.3.2.

La mezcla de reacción se incuba en una cubeta de vidrio marca Vidrafoc (Modelo E-11830), termostaticada a 30 °C. La oxigenación del medio se lleva a cabo por gaseo, mediante una bomba de acuario. La homogenización del medio se consigue mediante un agitador magnético Selecta (Modelo 242) y una barra magnética Sigma de 8 x 1.5 mm.

La variación de pH del medio de reacción se mide con un pH-metro Crison (Modelo 2002), que permite detectar variaciones de 0.001 pH y los electrodos combinados INGOLD (n 0-9314 y n V-9331). Las variaciones de pH son seguidas de forma continua en un registrador HITACHI (Modelo 561). La conexión entre el pH-metro y el registrador se lleva a cabo mediante un potenciómetro, que permite regular la escala del registrador al intervalo de pH medido.

La mezcla de reacción está formada por 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM. La adición de CaCl_2 en esta mezcla de reacción es debida a la mejora de la permeabilidad celular, mantiene la capacidad tampón (Van der Volkenburg y Cleland, 1980) y aumenta la relación señal a ruido durante la medida (González-Darós *et al.*, 1993). El empleo de sustancias reguladoras o inhibidoras del crecimiento (en ausencia de material vegetal), no modifican la titulación del medio.

2.3.2. CAPACIDAD TAMPÓN

La medida de extrusión de protones, se realiza en una mezcla de reacción debilmente tamponada.

El cálculo de la extrusión de protones se suele realizar mediante la determinación de la capacidad tampón al final del período de medida y se admite que esta capacidad tampón es constante en el intervalo de pH (Vesper y Evans, 1979).

La capacidad tampón de la mezcla de reacción (Figura 2 A), no es constante en el intervalo de pH empleado. Por lo tanto, se hace necesario calcular la relación entre los nmoles de protones en el medio y el valor de pH. La titulación del medio de reacción se obtiene mediante las adiciones de cantidades conocidas de HCl ó NaOH mediante el siguiente protocolo:

- a) Medida del pH inicial
- b) Adición de HCl o NaOH
- c) Medida del pH final
- d) Cálculo de la relación entre los nmoles H^+ añadidos y el pH externo.

Esta relación se calcula mediante el ajuste polinomial (grado 1 a 5), considerándose en cada caso el mejor ajuste, mediante el programa Poly del paquete estadístico BIOM Sokal-Rohlf (1981).

El polinomio obtenido:

$$\text{nmoles H}^+ = a_0 + a_1(\text{pH}) + a_2(\text{pH})^2 + a_3(\text{pH})^3 + a_4(\text{pH})^4 + a_5(\text{pH})^5.$$

permite calcular la extrusión de H^+ para cada valor de pH, tomando como cero el pH inicial y la capacidad tampón (Figura 2 A). La diferenciación de este polinomio permite calcular la capacidad tampón (Figura 2 B).

La presencia de material vegetal (60 coleoptilos ó la adición de diferentes compuestos) puede modificar la titulación del medio de reacción, por tanto se calcula la capacidad tampón para cada experimento mezcla de reacción.

2.3.3. VELOCIDAD APARENTE DE EXTRUSIÓN DE PROTONES

La velocidad de extrusión de protones se expresa como $\text{neq H}^+/\text{unidad de tiempo}$ * segmento. Se calcula mediante diferenciación numérica empleando el algoritmo de la sección 2.2. (Persaud y Virden, 1984).

2.4. REDUCCIÓN DE HCF III

La reducción de HCF III se realiza simultáneamente en la misma mezcla de reacción empleada en la extrusión de protones (apartado 2.3.1). La $A_{420-500}$ nm se realiza en un Espectrofotómetro Spectronic modelo 2000 Beckmann.

Cada cinco minutos se extrae 3 ml de la mezcla de reacción, se mide su absorción y se reemplazan en la cubeta de medida inmediatamente.

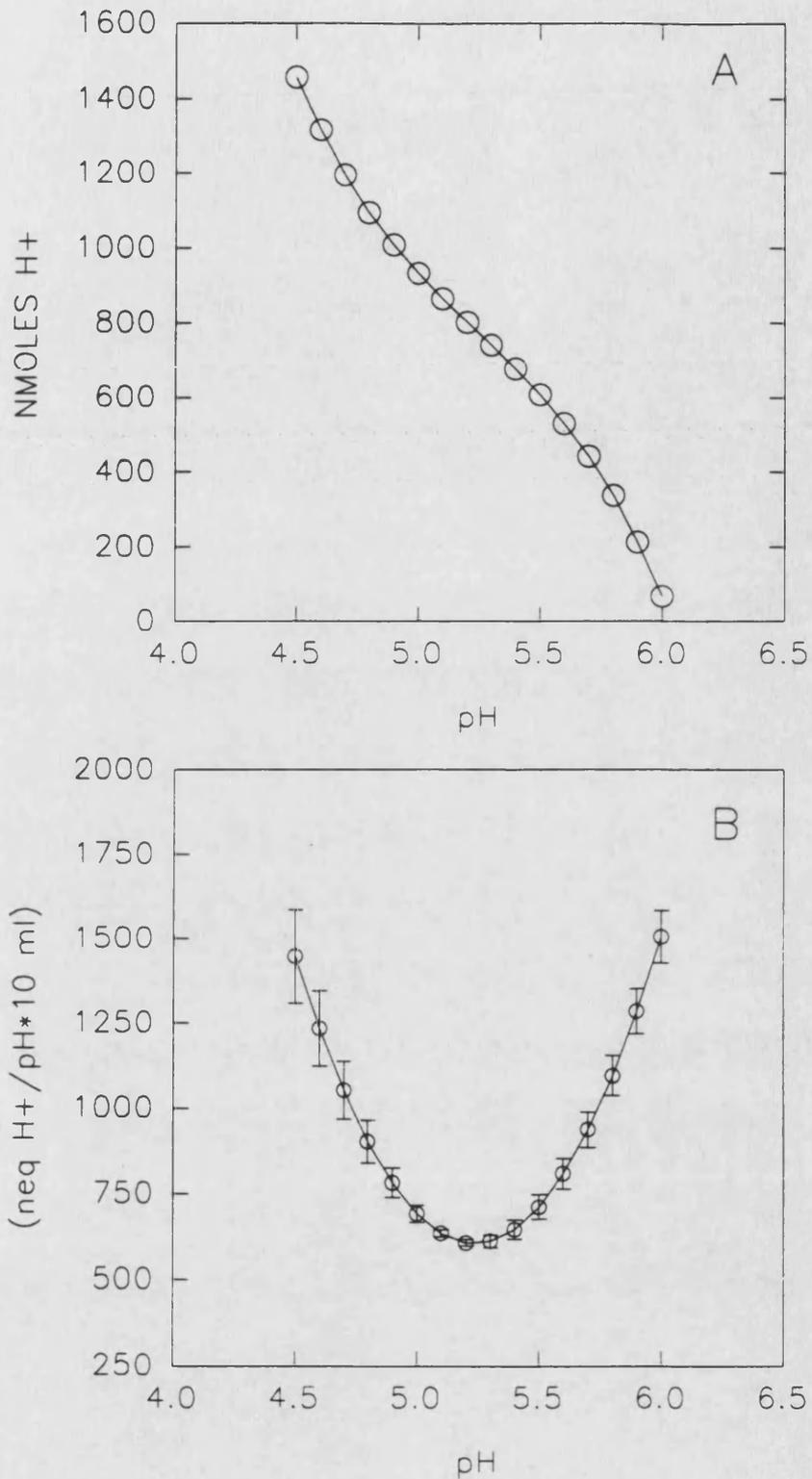


Figura 2. A): Curva de titulación de una mezcla de reacción compuesta por 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos. B): Capacidad tampón de la mezcla de reacción en función del pH.

2.4.1. VELOCIDAD DE REDUCCIÓN DE HCF III

La velocidad de reducción de HCF III se calcula mediante el siguiente algoritmo:

$$V(R) = \frac{\Delta A_{420-500} * 10000}{60 * \Delta t}$$

$V(R)$ = nmoles HCF III reducidos / segmento * minuto.

Δt = incremento de tiempo (minutos).

Cálculos realizados en el programa Lotus Qpro.

2.4.2. RECUPERACIÓN HCF III REDUCIDO MEDIANTE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Las muestras tratadas con HCF III, han sido posteriormente reoxidadas mediante la adición de alícuotas de peróxido de hidrógeno (1.63 M) en ausencia de coleoptilos.

La tabla I presenta la recuperación del HCF III reducido. Se observa que la recuperación es próxima al 100 % y por tanto se demuestra que el HCF III no es transportado al interior celular.

2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La preparación de las muestras, se ha realizado mediante el siguiente protocolo:

a) La muestra hidratada se sumerge en solución tamponada de glutaraldehído (25 %).

b) Al cabo de 2 horas la muestra se lava abundantemente con el tampón y se deshidrata con etanol en concentraciones crecientes: 30-50-70-96 y 100 % a intervalos de 30 minutos; posteriormente, se incuba en una solución de acetato de iso-amilo, y se sustituye en el punto crítico por CO₂ (Critical Point Dryer modelo autosamdri-814).

Tabla I. Recuperación HCF III reducido. Reoxidación mediante alicuotas de peróxido de hidrógeno 1.63 M

H ₂ O ₂ [mM]	0.5 mM HCF III		0.75 mM HCF III		1.0 mM HCF III		1.25 mM HCF III	
	A ₄₂₀₋₅₀₀	% Recuperado						
0	0.297	0	0.483	0	0.771	0	0.798	0
1.08	0.372	79.65	0.560	82.96	0.809	92.35	0.858	81.79
2.71	0.430	92.07	0.600	88.88	0.843	96.23	0.950	90.56
5.43	0.459	98.28	0.667	98.81	0.864	98.63	1.044	99.52
8.15	0.459	98.28	0.670	99.26	0.863	98.63	1.060	101.04
10.86	0.459	98.28	0.670	99.26	0.864	98.63	1.065	101.52
nmoles iniciales	4670		6750		8760		10490	
nmoles recuperados	4590		6700		8640		10650	

2.6. CALMIDAZOLIUM

El compuesto calmidazolium también llamado R-24571 es un derivado del antimicótico miconazol (Gietzen *et al.*, 1983). ES un antagonista del sistema calcio-calmodulina mediante la unión específica a la Calmodulina (Tuana & McLennan, 1984).

La adición del compuesto calmidazolium en etanol a la mezcla de reacción HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 µM IAA y 1 mM HCF III, produce un aumento de la turbidez. El calmidazolium aumenta la absorción del HCF III debido al aumento de la dispersión de la luz (Figura 3). Se han utilizado filtros opalescentes para evitar este problema en la determinación de la reducción de HCF III.

La Tabla II muestra el efecto de los filtros opalescentes en la medida de absorción a 420 y a 500 nm del medio en presencia de diferentes concentraciones de HCF III. El ajuste lineal entre la absorción obtenida en presencia de filtros frente a la absorción obtenida en su ausencia, presenta una pendiente de 1.0006 (c.c.= 0.9999), demostrando que las absorciones obtenidas son iguales.

TABLA II. Efecto de la utilización de filtros opalescentes en la absorción del HCF III a 420 y 500 nm. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 µM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

HCF III [mM]	+ FILTROS OPALESCENTES				- FILTROS OPALESCENTES			
	A ₄₂₀	STD	A ₅₀₀	STD	A ₄₂₀	STD	A ₅₀₀	STD
0.50	0.562	0.001	0.039	0.0005	0.549	0.0005	0.033	0.0005
0.75	0.802	0.0015	0.034	0.0005	0.810	0.0009	0.040	0.0004
1.00	1.070	0.0012	0.040	0.0004	1.075	0.0008	0.041	0.0005

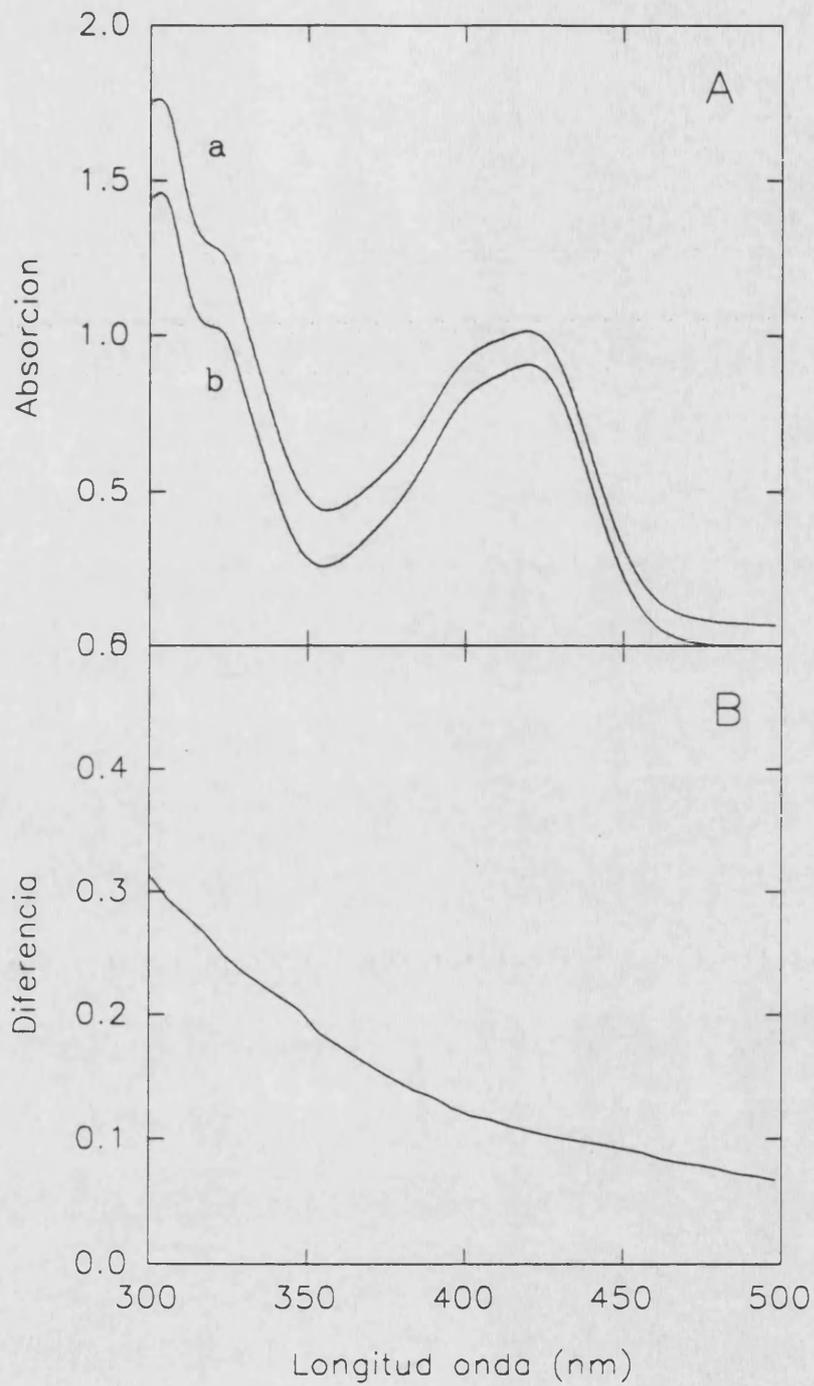


Figura 3. A): Espectro de absorción del compuesto 1 mM HCF III en presencia de 30 μ M calmidazolium (a) y 1 mM HCF III (b). B): Espectro de la diferencia. Mezcla de reacción: 10 ml 1 mM HEPES, 4 mM CaCl_2 , 10 μ M IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

2.7. ESTADÍSTICA

Las diferencias entre distintos tipos de tratamiento, se ha realizado mediante el análisis de la varianza. Las diferencias significativas se han calculado mediante la menor diferencia significativa (Factor LSD).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. CRECIMIENTO POR ELONGACIÓN

3.1.1. ELONGACIÓN INDUCIDA POR AUXINA

La velocidad de crecimiento inducido por auxina presenta la típica cinética bifásica (Figura 4). La fase I alcanza el máximo aproximadamente a los 18-20 minutos. La segunda fase de elongación se observa a partir del minuto 35, aumentando su velocidad hasta el minuto 120 donde la velocidad de crecimiento alcanza un valor aparentemente estacionario. La elongación total y la velocidad de crecimiento son similares a otros datos ya publicados.

3.1.1.1. EFECTO DEL HCF III Y HCF II

En esta sección, se presenta el efecto del HCF III (aceptor exógeno del sistema redox del plasmalema), frente al HCF II (forma reducida del HCF III) en el crecimiento por elongación inducido por auxina.

La adición exógena de 1 mM HCF III, en presencia de IAA, produce una estimulación de la elongación. Esta estimulación es estadísticamente significativa y además no modifica la respuesta bifásica del crecimiento por elongación. El HCF III aumenta la velocidad de crecimiento de la fase I, en cambio el máximo de la fase II no presenta diferencias significativas. Por el contrario, la adición de 1 mM HCF II a la mezcla de reacción, no produce ningún efecto estadísticamente significativo en la velocidad de crecimiento en ninguna de las dos fases (Figura 4).

Estos datos indican que el efecto del HCF III no es debido a la presencia en la mezcla de reacción de los iones K^+ , ya que la forma reducida de HCF III no tiene ningún efecto.

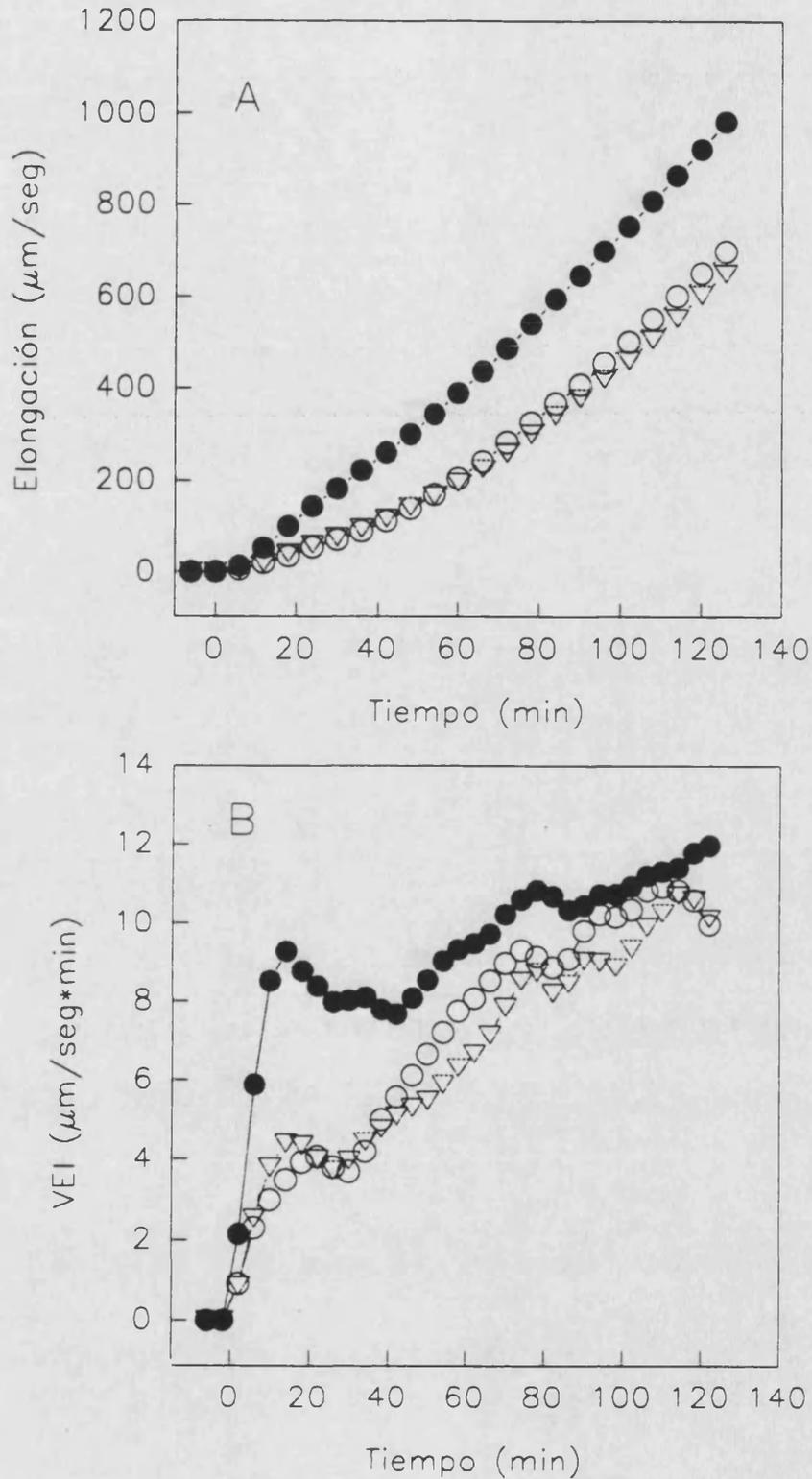


Figura 4. A): Efecto adición de 1 mM HCF III (\bullet , \circ) y 1 mM HCF II (∇ , \circ) sobre el crecimiento inducido por 10 μM IAA (\circ). B): Efecto sobre la velocidad de crecimiento. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos.

El efecto estimulador del HCF III en el crecimiento por elongación es dependiente de la concentración; en efecto, la adición de diferentes concentraciones de HCF III (0.5-10 mM) estimulan el crecimiento (Figuras 5 A y 6 A).

La estimulación del crecimiento por HCF III no modifica la respuesta bifásica de la auxina (Figura 5 B). El HCF III aumenta la velocidad de crecimiento de la fase I y se observa una pequeña inhibición inicial para la concentración de 10 mM, (fase de latencia de aproximadamente 18 minutos). La velocidad de crecimiento presenta el máximo de la fase I en todas las concentraciones. El máximo efecto se obtiene con 5 mM HCF III. La velocidad disminuye para volver a aumentar a partir del minuto 40 (Fase II) (Figura 5 B).

La estimulación relativa del HCF III del crecimiento inducido por IAA presenta un máximo inicial de hasta 5 veces el valor del control entre los 6-12 minutos (Figura 6 A). 10 mM HCF III presenta una inhibición en los primeros minutos, y se recupera a partir del minuto 18 con una clara estimulación. Esta estimulación disminuye progresivamente hasta alcanzar un valor aparentemente estacionario dependiente de la concentración de HCF III (Figura 6 A).

La Figura 6 B presenta la dosis-respuesta del HCF III para diferentes tiempos de incubación. En la fase I, la velocidad de crecimiento presenta un máximo para la concentración de 5 mM HCF III; concentraciones superiores disminuyen su efecto estimulador. La fase II, por el contrario, presenta una estimulación dependiente de la concentración, siendo mayor la estimulación para 10 mM HCF III.

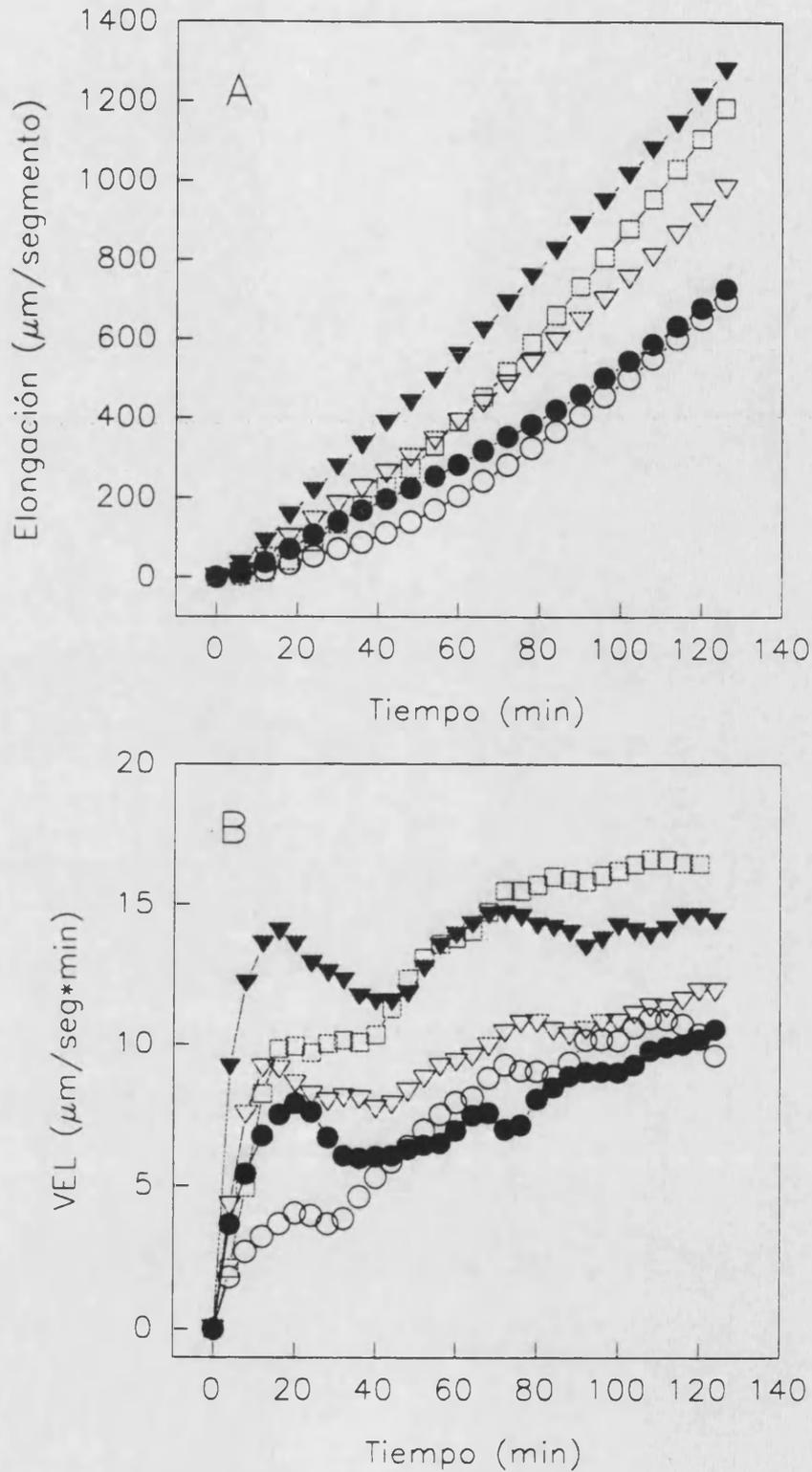


Figura 5. A): Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HCF III sobre el crecimiento por elongación. B): Efecto sobre la velocidad de crecimiento por elongación. La mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 , 1 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▽, ▼, □); 0.5 mM HCF III (●); 1.0 mM HCF III (▽); 5 mM HCF III (▼); 10 mM HCF III (□).

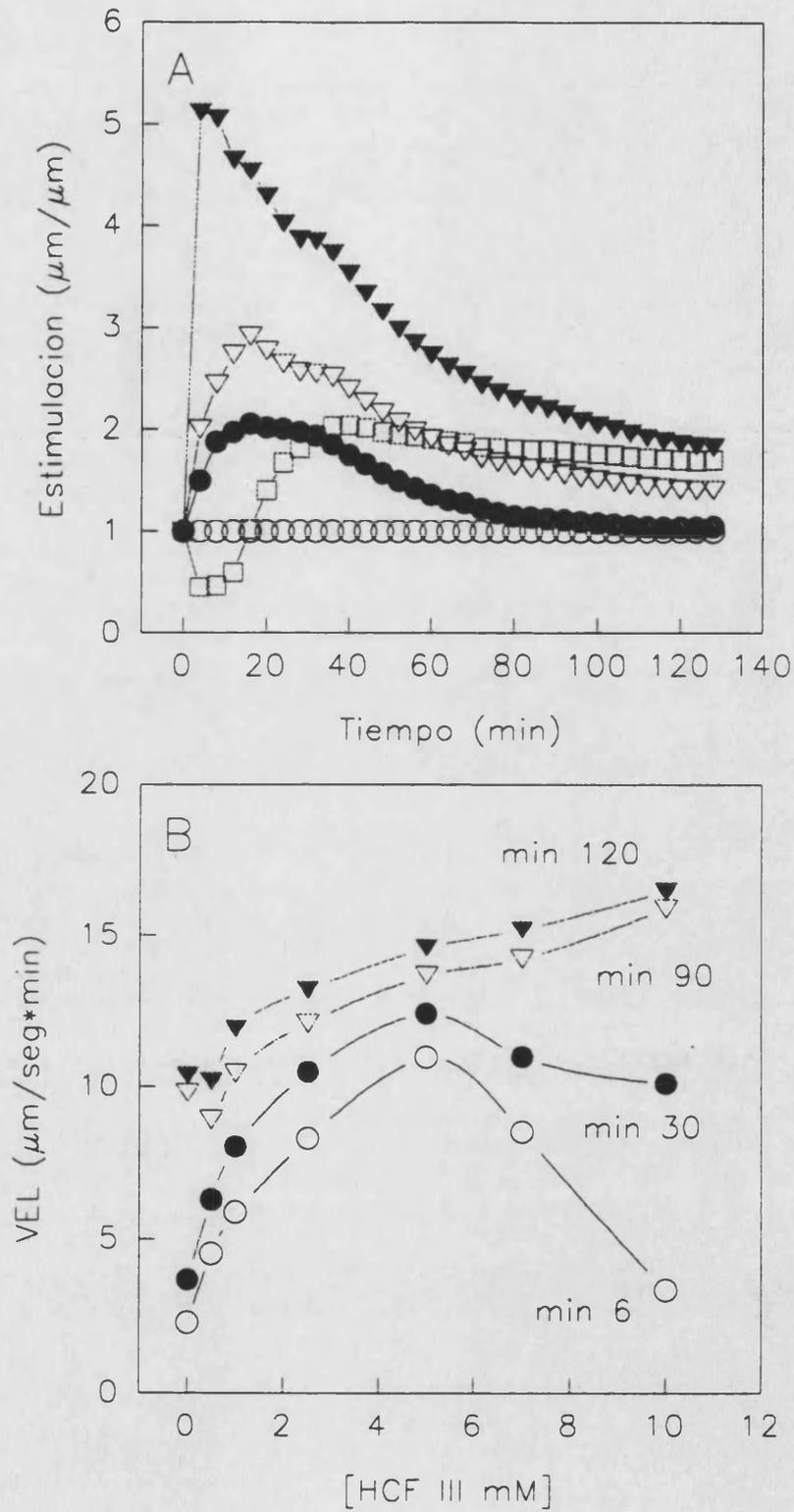


Figura 6. A): Efecto estimulador HCF III. Normalización para el control. B): Efecto dosis respuesta HCF III en la velocidad máxima de crecimiento para distintos tiempos de incubación. Datos de la Figura 5.

La adición de 50 mM HCF III, produce una inhibición casi completa del crecimiento, con un aumento de la fase de latencia (60 minutos) y disminución de la elongación (Tabla III).

Tabla III. Efecto de 50 mM HCF III en el crecimiento y velocidad de elongación. Los coleoptilos son incubados en 43 ml HEPES 10 mM CaCl₂ 1 mM (pH 6.0) y 10 μ M IAA. Adición IAA y HCF III a t=0 minutos. Valores promedio (n=4).

Tiempo (min)	Elongación (μ m/segmento)		Velocidad (μ m/seg*min)		Inhibición (%)
	10 μ M IAA	50 mM HCF III	10 μ M IAA	50 mM HCF III	
10	14	0	2,99	0	100
20	41,2	0	4,05	0	100
30	71,6	0	3,7	0	100
40	104	0	5,32	0	100
50	149	0	6,67	0,05	100
60	205	0,47	7,94	0	99,76
70	267	1,89	8,97	0,27	99,29
80	339	3,78	9,04	0,2	98,88
90	408	5,67	9,8	0,35	98,61
100	486	8,27	10,2	0,34	98,3
110	568	11,3	10,9	0,33	98
120	651	14,4	10,4	0,43	97,8

Los resultados experimentales obtenidos (Figuras 4-6, Tabla III) demuestran que la adición de HCF III produce una estimulación significativa de la elongación. El efecto estimulador es dependiente de la concentración y el tiempo de incubación en HCF III. Las concentraciones de HCF III de 10 mM o superiores aumentan la fase de

latencia y disminuyen el crecimiento; estos efectos están posiblemente asociados a efectos osmóticos y/o concentración de potasio. Por tanto, se concluye que el HCF III, aceptor del sistema redox del plasmalema, estimula la elongación observada en presencia de IAA.

3.1.1.2. ADICIÓN DE HCF III EN LA FASE II

Una vez determinado el efecto de HCF III en la fase I de crecimiento, estudiamos el efecto de HCF III en la fase estacionaria de crecimiento (Fase II).

La adición de 5 mM HCF III al cabo de 120 minutos de incubación en IAA estimula la elongación del coleoptilo (Figuras 7 A y 8 A). La velocidad de elongación presenta un máximo en el minuto 128. La velocidad de elongación disminuye continuamente a partir de ese momento y tiende a un valor estacionario al cabo de 120 minutos de incubación (Figura 7 B).

La velocidad relativa aumenta hasta tres veces y presenta un máximo al cabo de 8 minutos de incubación, a continuación disminuye de forma continua (Figura 8 B).

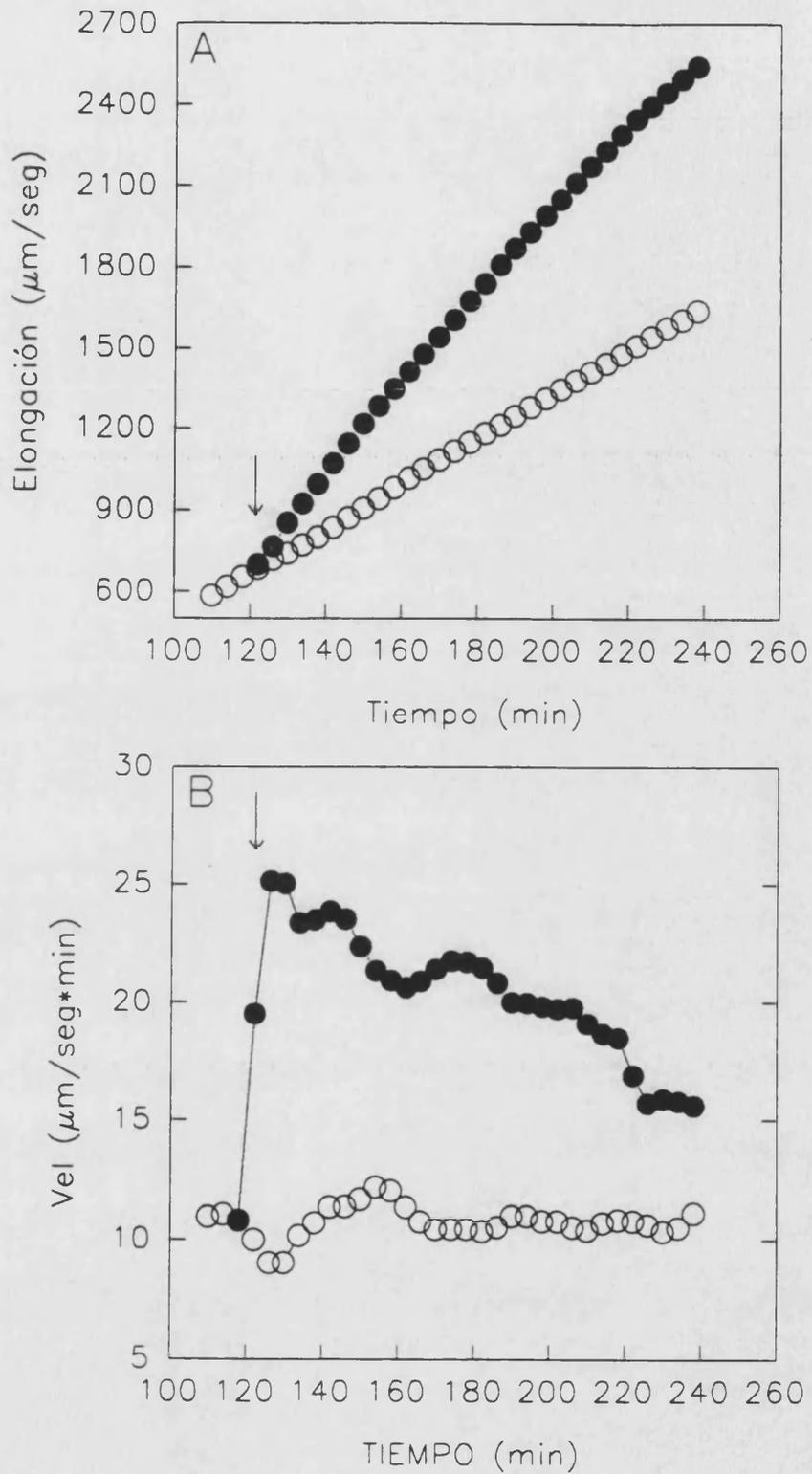


Figura 7. A): Efecto adición de 5 mM HCF III (●.○) en el t=120 sobre el crecimiento inducido por 10 μM IAA (○). B): Efecto en la velocidad de crecimiento por elongación. La flecha indica adición. La mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl₂ 1 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos.

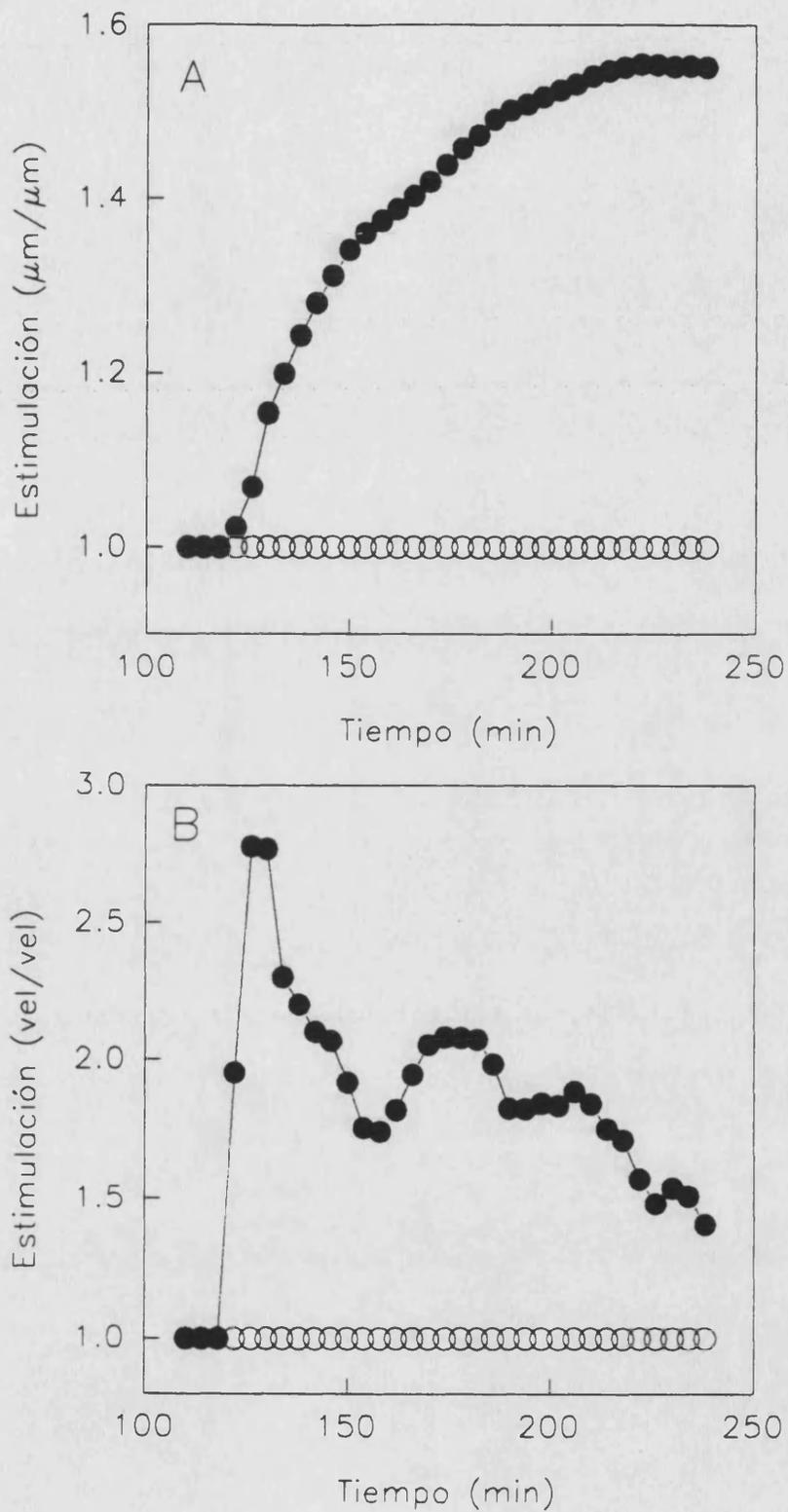


Figura 8. A): Efecto estimulador 5 mM HCF III sobre el crecimiento por elongación. B): Efecto estimulador sobre la velocidad de crecimiento. Datos Figura 7.

3.1.1.3. READICION DE HCF III AL CABO DE 30 MINUTOS

La readición de HCF III al cabo de 30 minutos de incubación con 10 μM IAA y 1 mM HCF III, produce un aumento en la elongación del coleoptilo (Figura 9 A). Esta estimulación se observa a los 2 minutos de la readición, produciendo un nuevo máximo en la velocidad de crecimiento al cabo de 12 minutos, con una cinética similar al primer máximo; la estimulación total es menor para esta segunda adición (Figuras 9 y 10).

La readición de HCF III es capaz de estimular de nuevo el crecimiento, aunque la magnitud de esta estimulación es menor que la obtenida a la adición a tiempo cero.

3.1.2. ELONGACIÓN BASAL DEL COLEOPTILO

3.1.2.1. EFECTO DE HCF III Y HCF II

La elongación basal del coleoptilo (Figura 11 A) representa aproximadamente el 8 % del crecimiento obtenido en presencia de IAA a lo largo de 120 minutos de incubación (Figuras 11 y 4). La adición de HCF III produce un incremento en la elongación del coleoptilo de casi cuatro veces el crecimiento basal (Figuras 12 y 13). La adición de HCF II no produce efecto significativo alguno en la elongación total (Figura 11).

El crecimiento basal del coleoptilo no presenta fases de crecimiento diferenciadas; la velocidad de crecimiento se caracteriza por un aumento casi lineal durante todo el período de medida. La adición de HCF III incrementa la velocidad de crecimiento desde el momento de la adición. La adición de 1 mM HCF II no produce ningún efecto significativo en el crecimiento (Figura 11).

La adición de concentraciones crecientes de HCF III, producen un incremento de la elongación del coleoptilo (Figura 12 A y 13 A). Este incremento es dependiente de la concentración.

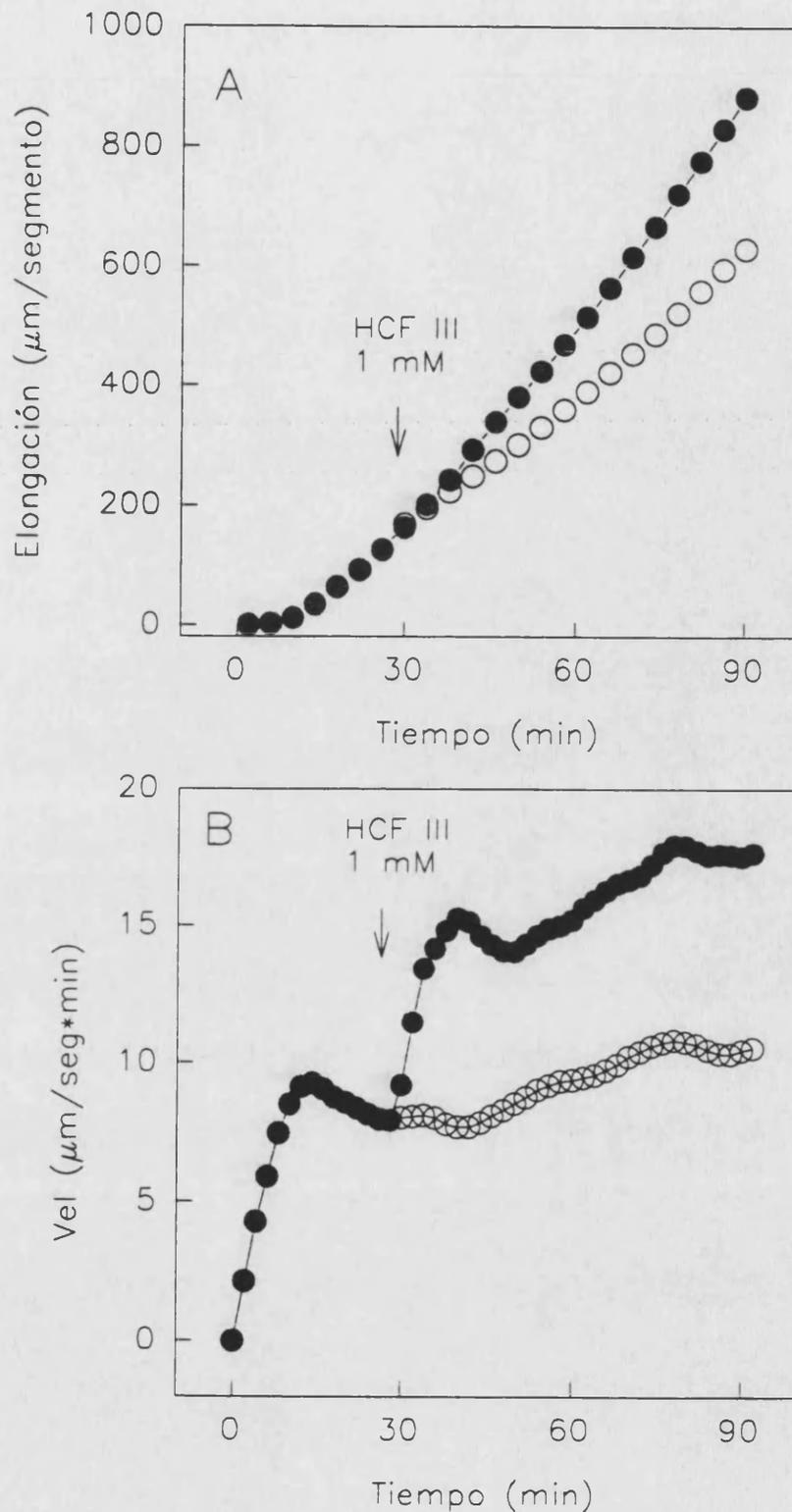


Figura 9. A): Efecto de la readición de 1 mM de HCF III (●) a $t=30$ minutos en la elongación celular inducida por 1 mM HCF III y 10 μM IAA (○) a $t=0$ minutos. B): Efecto de la readición en la velocidad de crecimiento. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleóptilos.

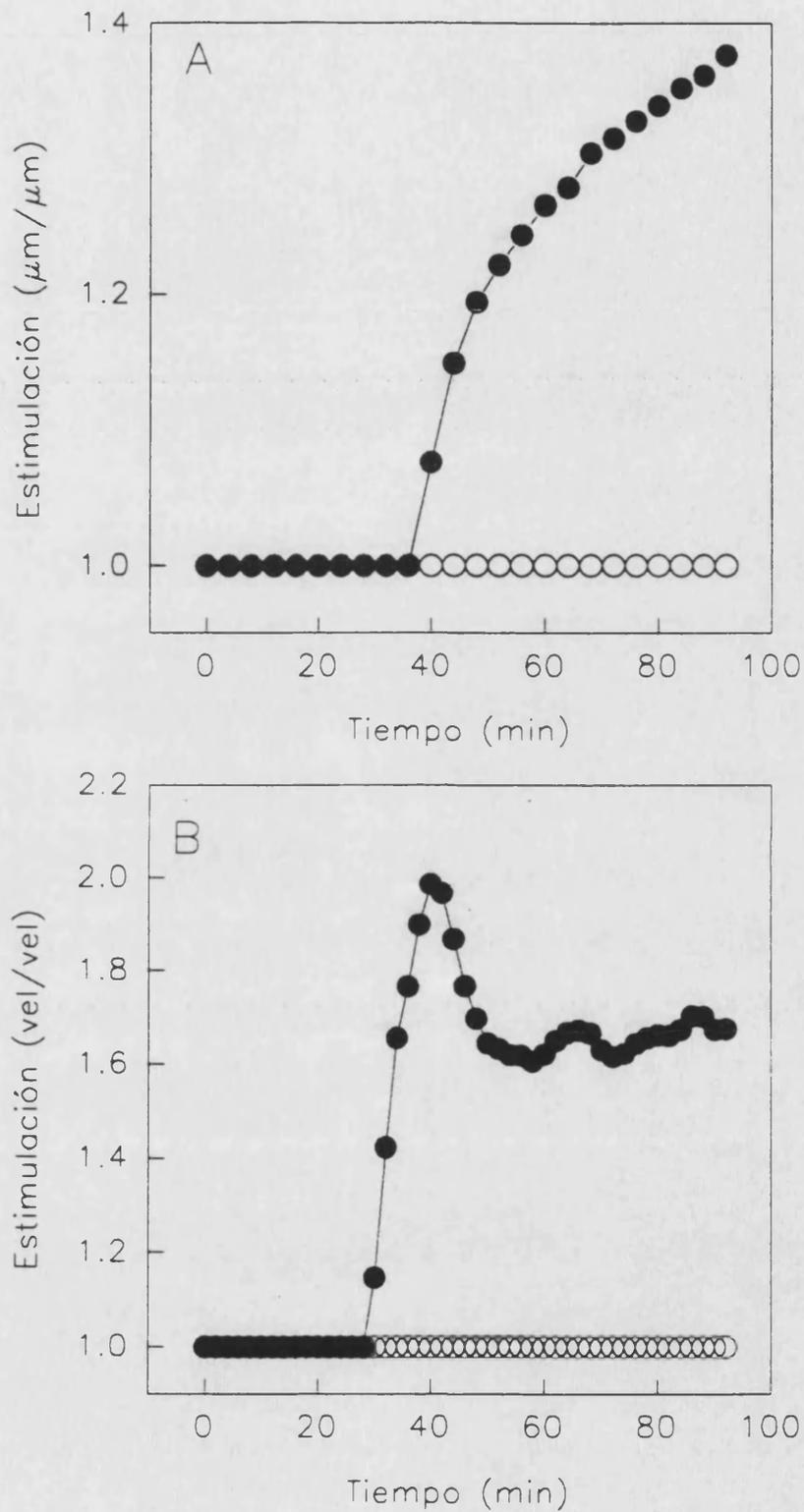


Figura 10. A): Cinética de la estimulación de la elongación por la readición de 1 mM HCF III a $t=30$ minutos. B): Efecto en la velocidad de elongación. Datos figura 9.

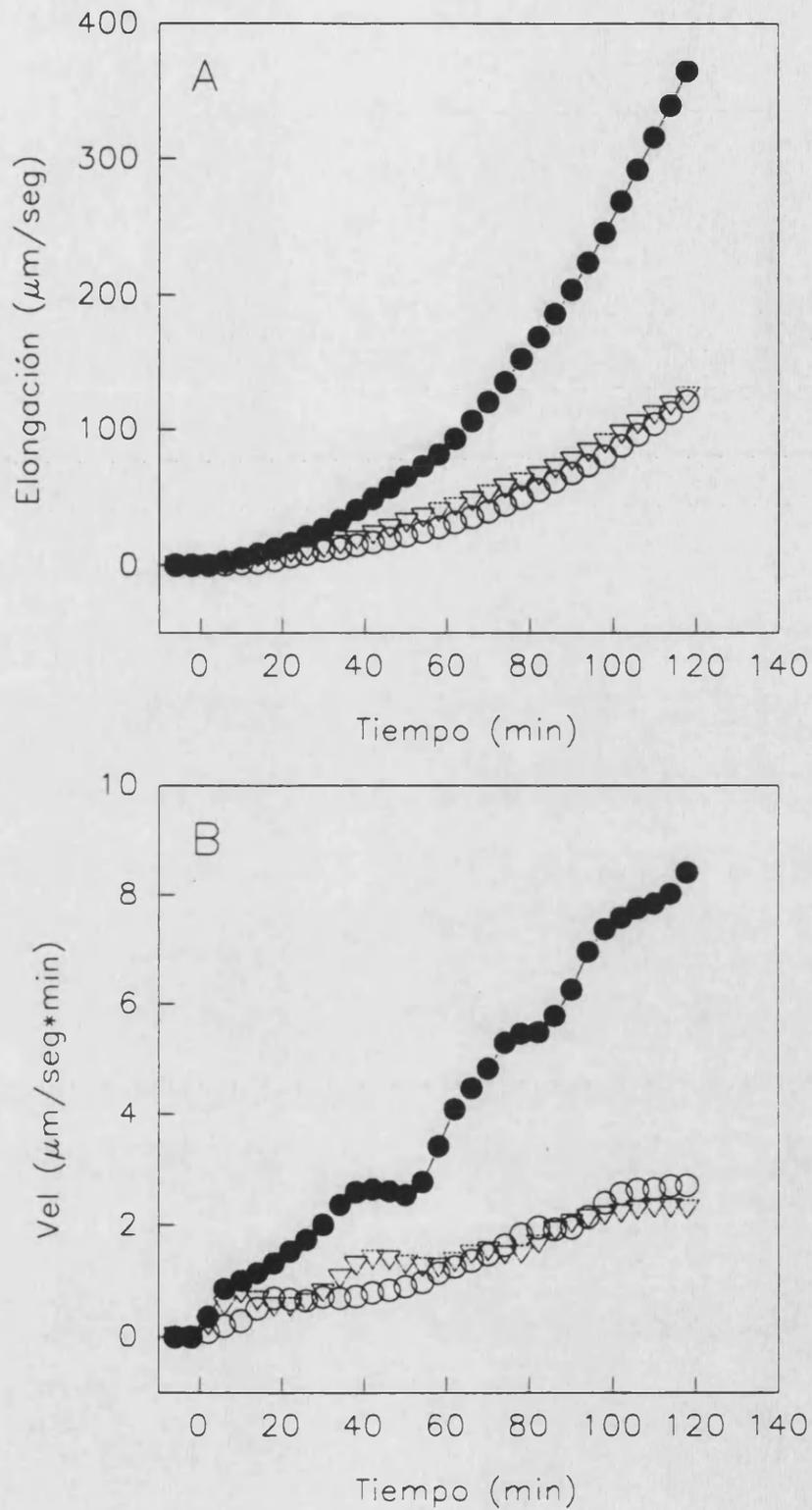


Figura 11. A): Efecto de los compuestos HCF III y HCF II en la elongación basal del coleoptilo. B): Efecto en la velocidad basal de crecimiento. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▽); 1 mM HCF III (●), 1 mM HCF II (▽), Control sin adición (○).

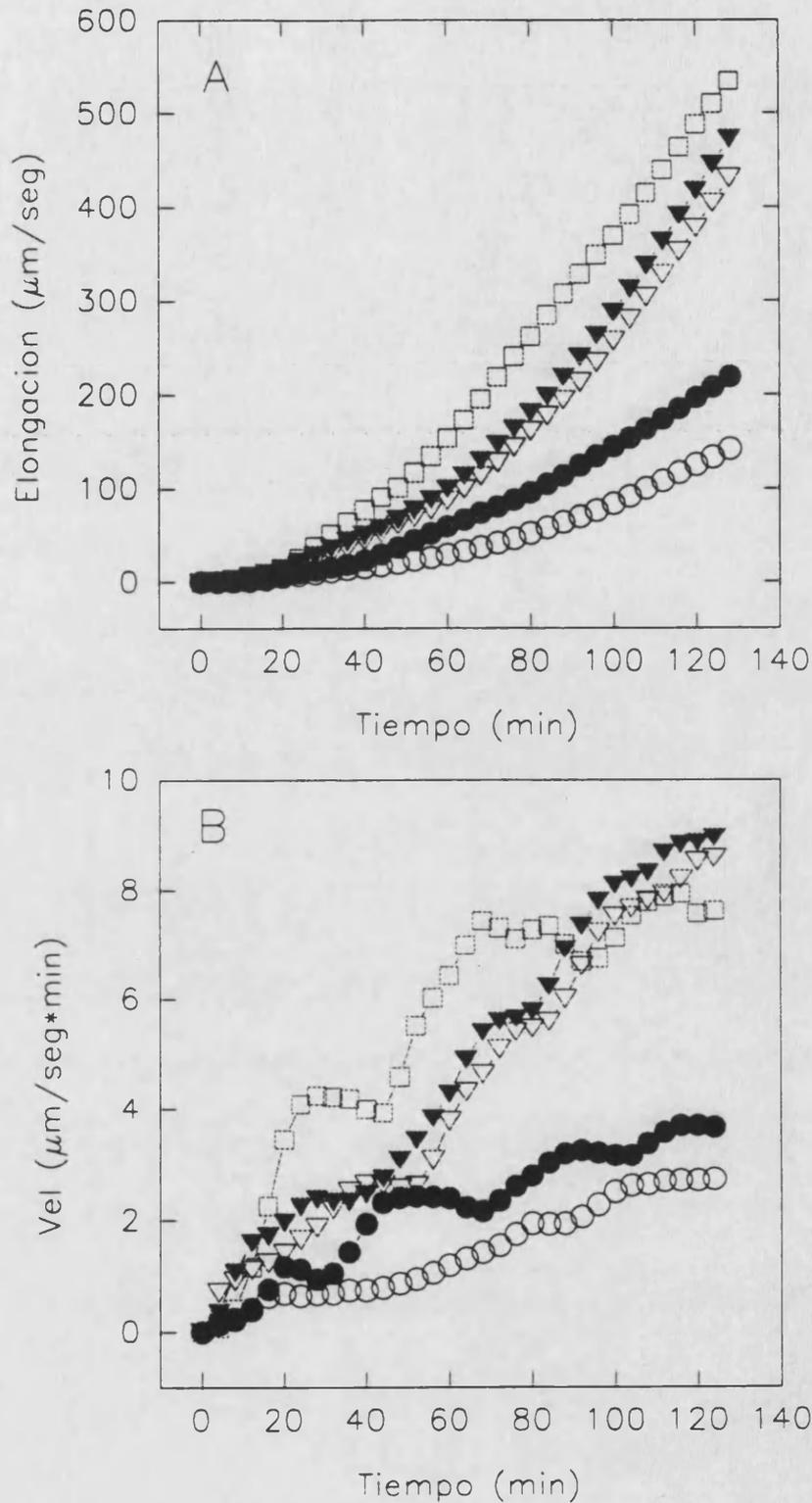


Figura 12. A): Efecto del compuesto HCF III en la elongación basal del coleoptilo. B): Efecto en la velocidad de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos. (○) y 0.5 mM HCF III (●), o 1 mM HCF III (▽), 5 mM HCF III (▼) y 10 mM HCF III (□).

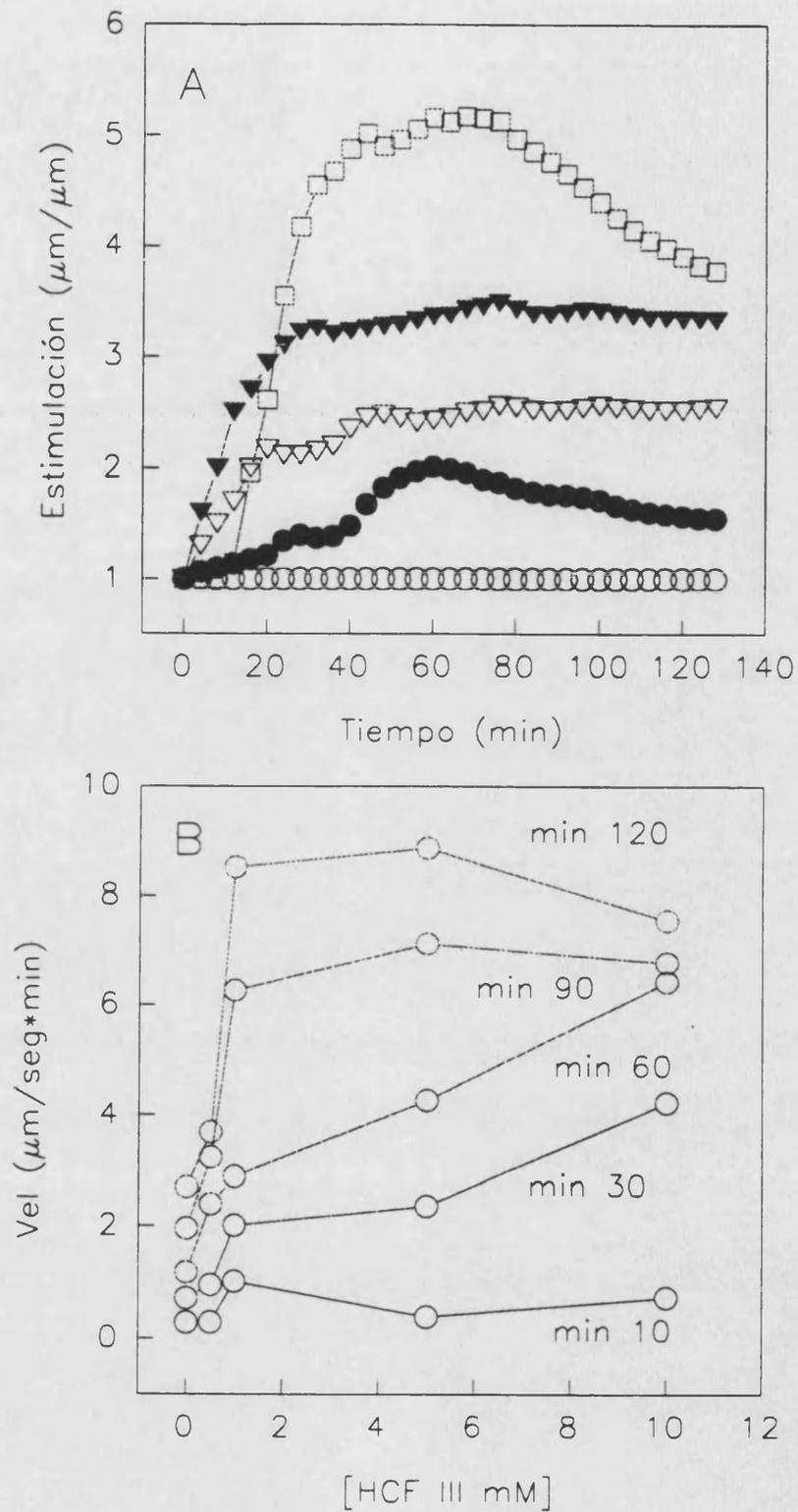


Figura 13. A): Efecto estimulador del compuesto HCF III en la elongación celular. Normalización del control. B): Efecto dosis respuesta HCF III en la velocidad de elongación a diferentes tiempos de incubación. Datos figura 12.

Este efecto estimulador del HCF III se observa en las Figuras 12 B y 13 B, la velocidad de crecimiento, aumenta sin observarse ninguna de las dos fases del crecimiento inducido por auxina (Figuras 12 y 13 B). El tratamiento con 25 mM HCF III produce un aumento de la fase de latencia (40 minutos) y una posterior recuperación de la elongación (Tabla IV).

La adición de 50 mM HCF III produce una inhibición total del crecimiento (Tabla IV).

Tabla IV. Efecto de la adición de HCF III (25 mM y 50 mM) en el crecimiento. Los coleoptilos son incubados en 43 ml HEPES 10 mM CaCl₂ 1 mM (pH 6.0). Adición HCF III a t=0 minutos. Valores promedio (n=4).

Tiempo (min)	Elongación (µm/segmento)			Velocidad (µm/seg*min)			% Inhibición	
	Basal	25 mM HCF III	50 mM HCF III	Basal	25 mM HCF III	50 mM HCF III	25 mM HCF III	50 mM HCF III
10	1,42	0	0	0,29	0	0	100	100
20	5,32	0	0	0,69	0	0	100	100
30	10,5	0	0	0,71	0	0	100	100
40	15,9	0	0	0,75	0	0	100	100
50	22,1	3,78	0	0,91	1,02	0	83,03	100
60	29,7	13,2	0	1,19	1,49	0	55,55	100
70	39,9	26,9	0,236	1,48	1,83	0	32,4	99,4
80	52,7	44,4	0,47	1,94	2,41	0,106	15,7	99,1
90	67,5	59,8	2,13	1,96	2	0,16	11,5	96,85
100	84,1	78,7	2,84	2,5	2,5	0,023	6,4	96,63
110	104	100	2,84	2,65	3,08	0,07	3,6	97,3
120	125	122	4,02	2,7	2,67	0,106	2,2	96,78

Los resultados experimentales obtenidos en la sección anterior (3.1.2.) (Figuras 4-13), demuestran que las concentraciones de HCF III empleadas como aceptor de electrones del sistema redox estimulan significativamente, tanto la elongación basal como la elongación en presencia de IAA e coleoptilos de maíz.

3.1.3. ABRASIÓN

La abrasión puede modificar la elongación celular y por ello es posible que el efecto estimulador del HCF III sea debido a la abrasión. Sin embargo, esta hipótesis de trabajo se rechaza ya que el efecto estimulador del HCF III es observado en coleoptilos intactos (no sometidos a abrasión con alúmina). En efecto, como se observa en las Figuras 14 y 15, la abrasión no afecta significativamente el crecimiento basal. De igual modo, tampoco afecta el crecimiento inducido por 5 mM HCF III en presencia y ausencia de IAA.

Este método de abrasión no produce daños mecánicos importantes en el coleoptilo. El corte transversal del coleoptilo de maíz muestra dos grupos de haces vasculares longitudinales y completamente opuestos.

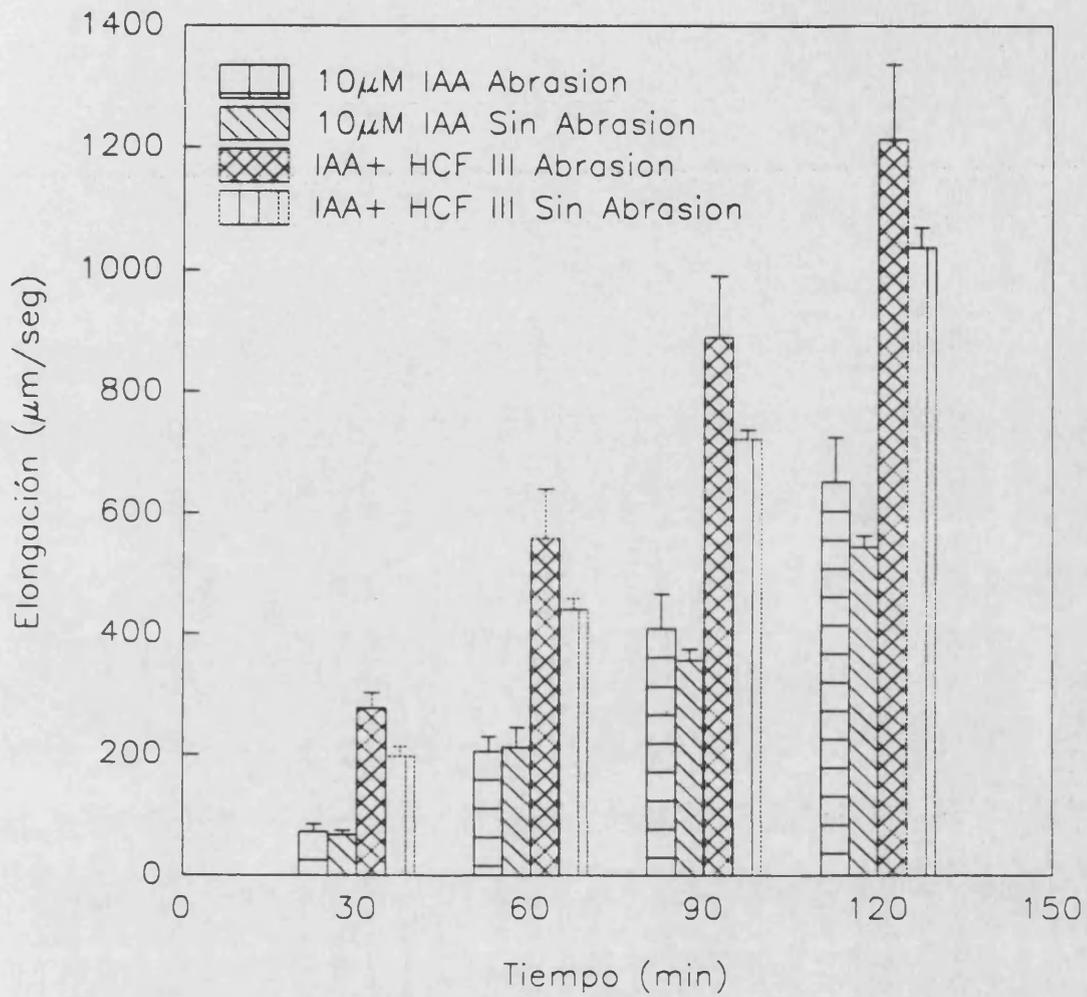


Figura 14. Efecto del proceso de la abrasión en el crecimiento por elongación inducido por 10 μM IAA o 10 μM IAA y 5 mM HCF III.

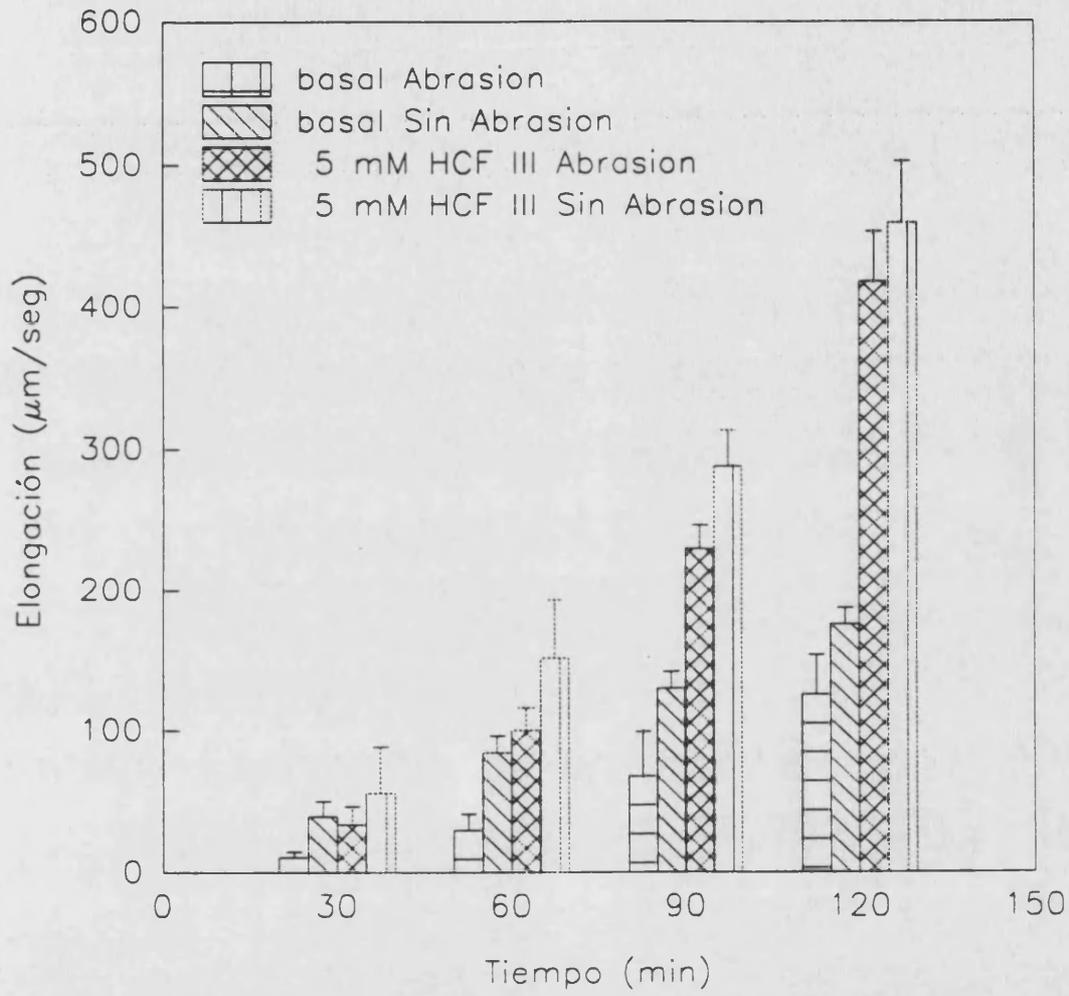


Figura 15. Efecto del proceso de la abrasión en el crecimiento basal por elongación del coleoptilo y por 5 mM HCF III.

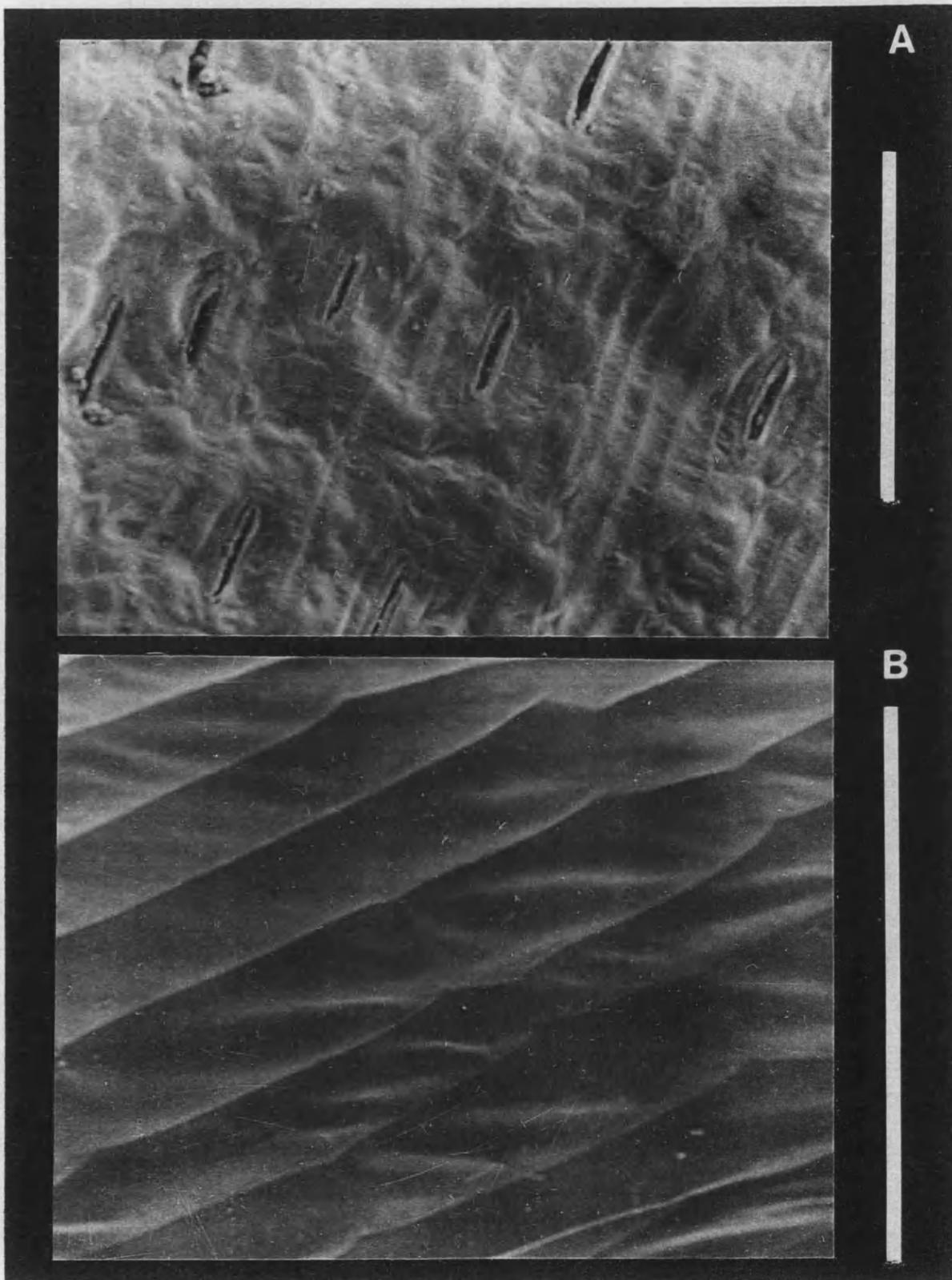


Fotografía 1. Detalle de haz vascular. Coleoptilo de *Zea mays*.

La estructura de los haces vasculares presenta la disposición típica de los vasos de xilema y floema, propia de monocotiledoneas.

Se observa también la presencia de hasta 7 niveles de células parenquimáticas, la epidermis y la cutícula.

Las observaciones microscópicas del coleoptilo presentan la cara externa con una alta densidad de estomas (Fotografía 2 A). Su cara interna de estructura diferente, presenta muy pocos estomas o casi ninguno debido sobre todo a que no está en contacto con el medio externo y no puede realizar sus funciones; transpiración e intercambio gaseoso (Fotografía 2 B).



Fotografía 2. Observación microscopía electrónica del coleoptilo de *Zea mays*. A): Cara externa; detalle de los estomas. B): Cara interna. La barra representa 10 μm .

La abrasión manual sólo muestra daños en las células epidérmicas de una forma ocasional permaneciendo intactas la mayor parte de las células.

En las fotos 3 A y B, se observa como el coleoptilo permanece íntegro, no se observa daños, excepto en el aspecto externo de la cutícula (Fotos 4 A y B).

Estos resultados experimentales demuestran que la abrasión manual con óxido de aluminio, es un método que disminuye el espesor de la cutícula sin destruir las células.

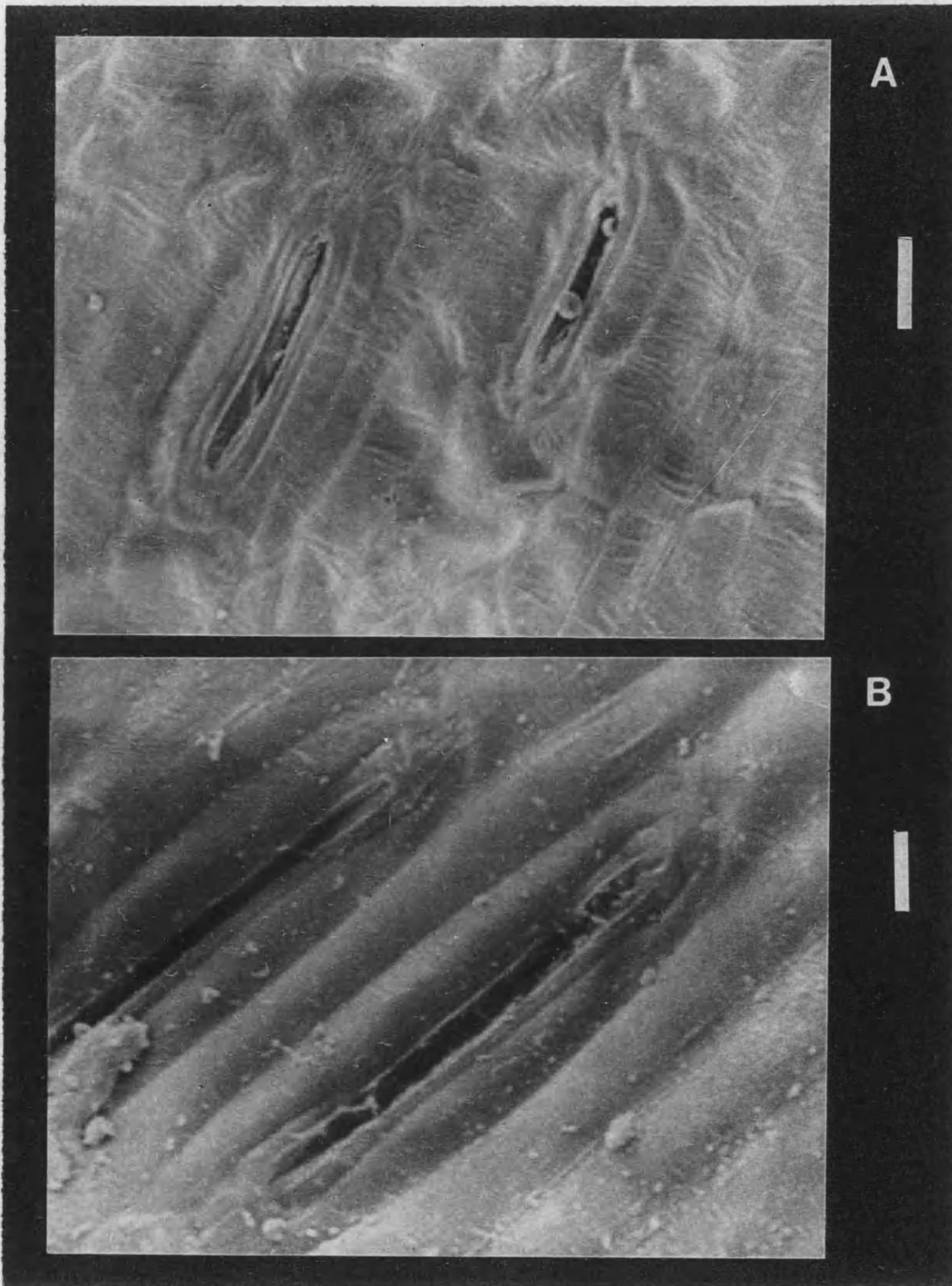
El efecto estimulador del HCF III no está asociado por el efecto de la abrasión, obteniéndose resultados similares tanto en coleoptilos con abrasión como en segmentos intactos (Figuras 14 y 15).

3.1.4. INHIBIDORES

Se ha estudiado el efecto de diferentes inhibidores específicos tanto en presencia como en ausencia de auxina, en el crecimiento por elongación estimulado por HCF III. La utilización de inhibidores específicos, permite caracterizar el crecimiento observado en presencia de HCF III. Los inhibidores utilizados han sido: atebrina, DCCD y CH.

3.1.4.1. ATEBRINA

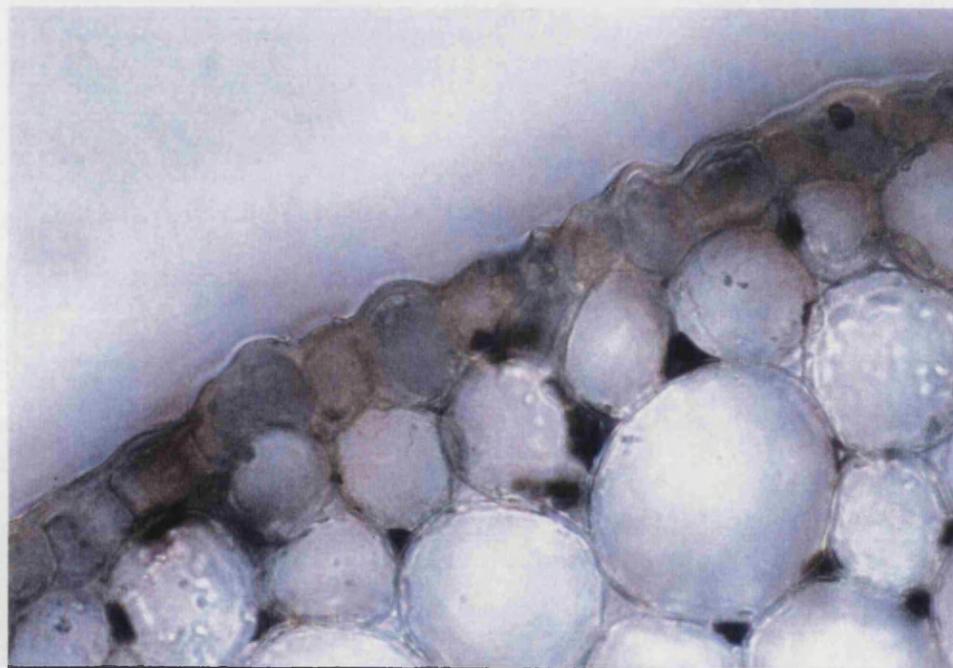
La atebrina es un inhibidor específico de la NADH-oxidasa tipo I del plasmalema (Crane y Löw, 1976; Blein *et al.*, 1986; Brightman *et al.*, 1987b). La adición de diferentes concentraciones de atebrina produce una inhibición de la elongación del coleoptilo y de la velocidad de crecimiento dependiente de la concentración de atebrina y del tiempo de incubación tanto en presencia como en ausencia de IAA. El mayor efecto se observa para 100 μ M atebrina (Figuras 16-19).



Fotografía 3. Observación al microscopio electrónico del coleoptilo de *Zea mays*. A): Superficie externa sometida a abrasión. B): Superficie externa intacta. La barra representa 100 μm .



A



B

Fotografía 4. Observación por microscopía óptica. Corte transversal del coleoptilo de *Zea mays*. A): Superficie sometida a abrasión. B): Superficie intacta.

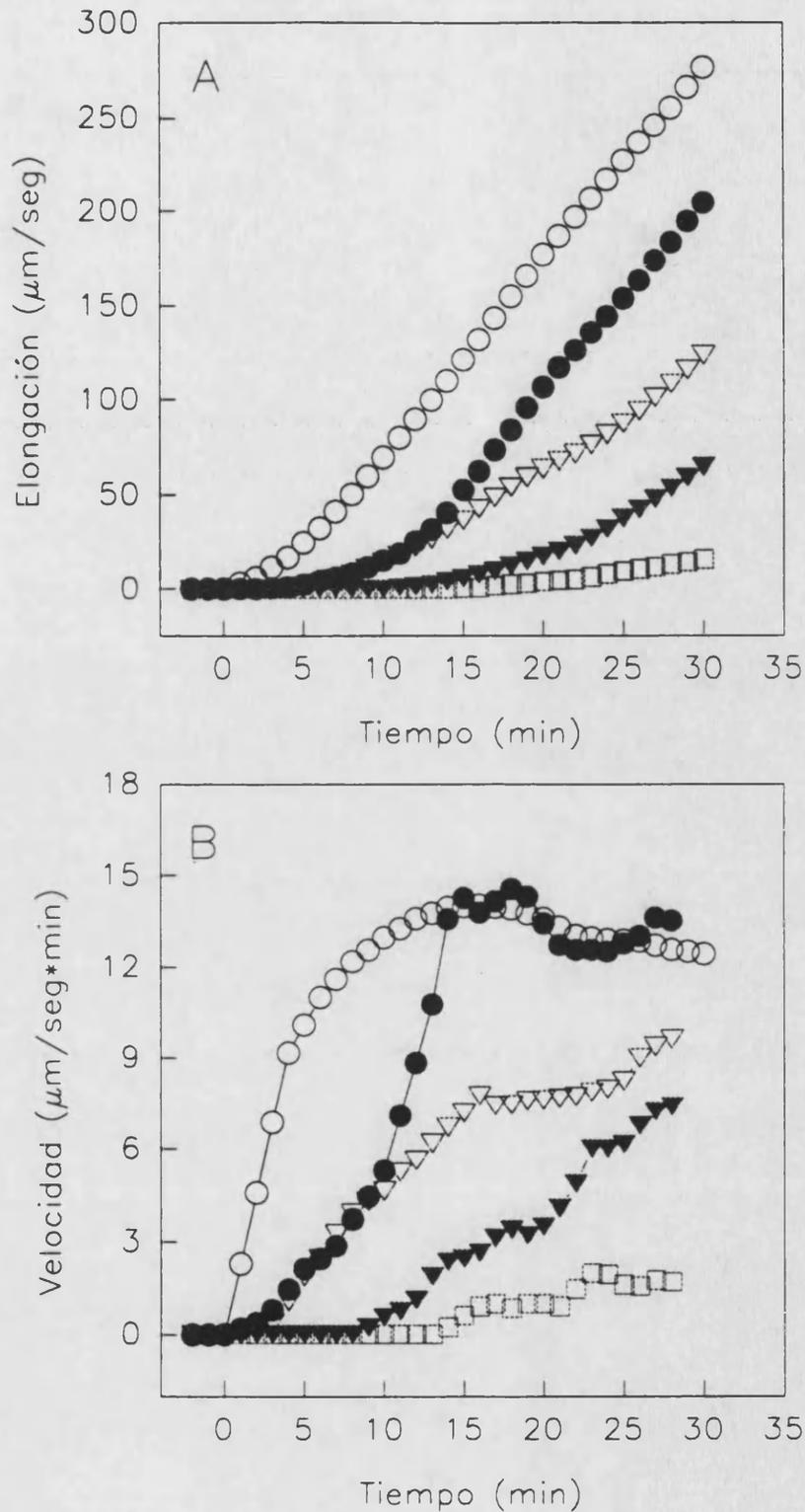


Figura 16. A): Efecto de la adición de diferentes concentraciones de atebriane sobre el crecimiento por elongación. B): Efecto sobre la velocidad de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 Mm CaCl₂ 1 Mm 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▽, ▼, ◻); 10 μM atebriane (●), 50 μM atebriane (▽), 75 μM atebriane (▼) y 100 μM atebriane (◻).

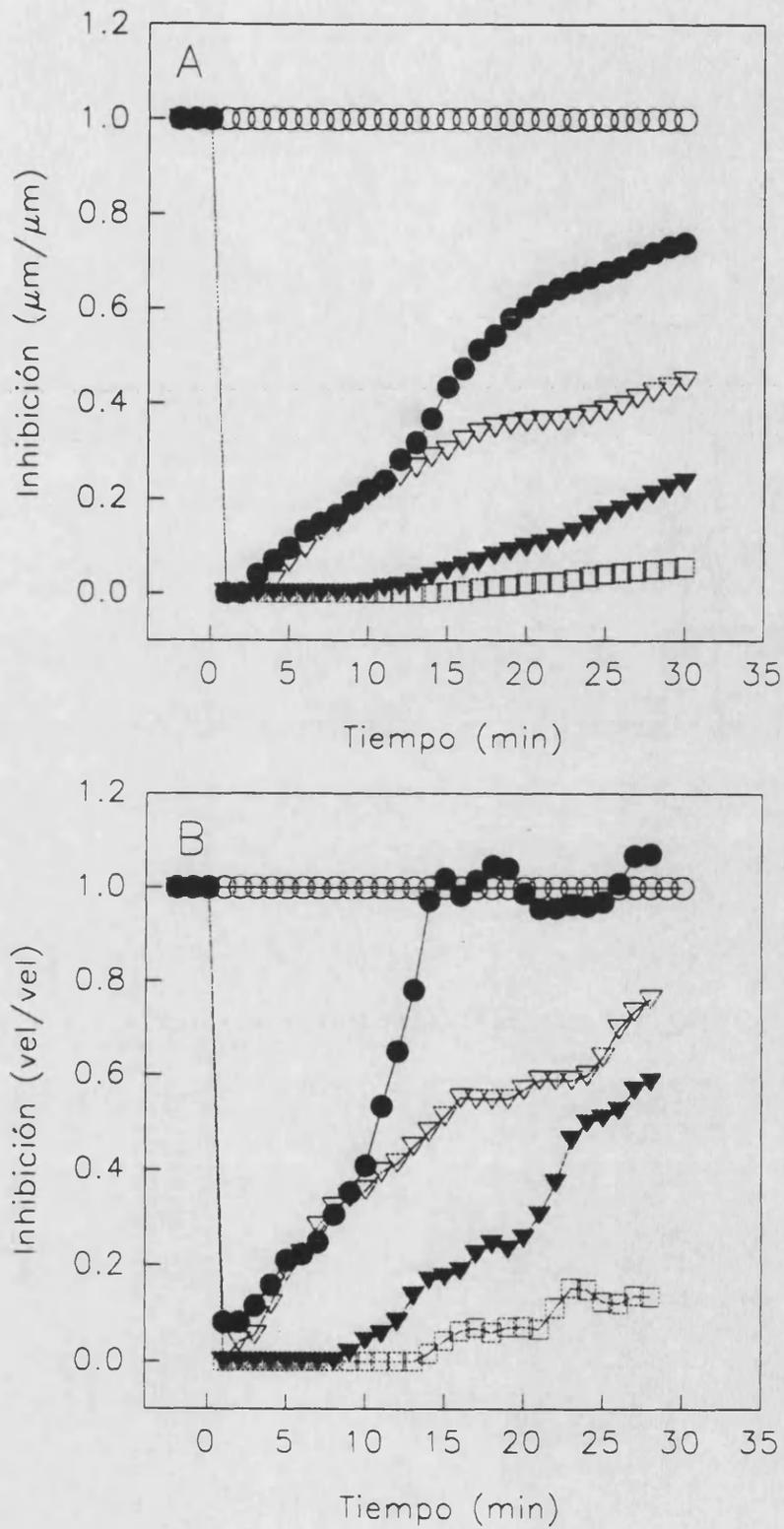


Figura 17. A): Efecto inhibitor de la elongación del compuesto atcbrina. B): Inhibición relativa de la velocidad de crecimiento. Datos de la figura 16.

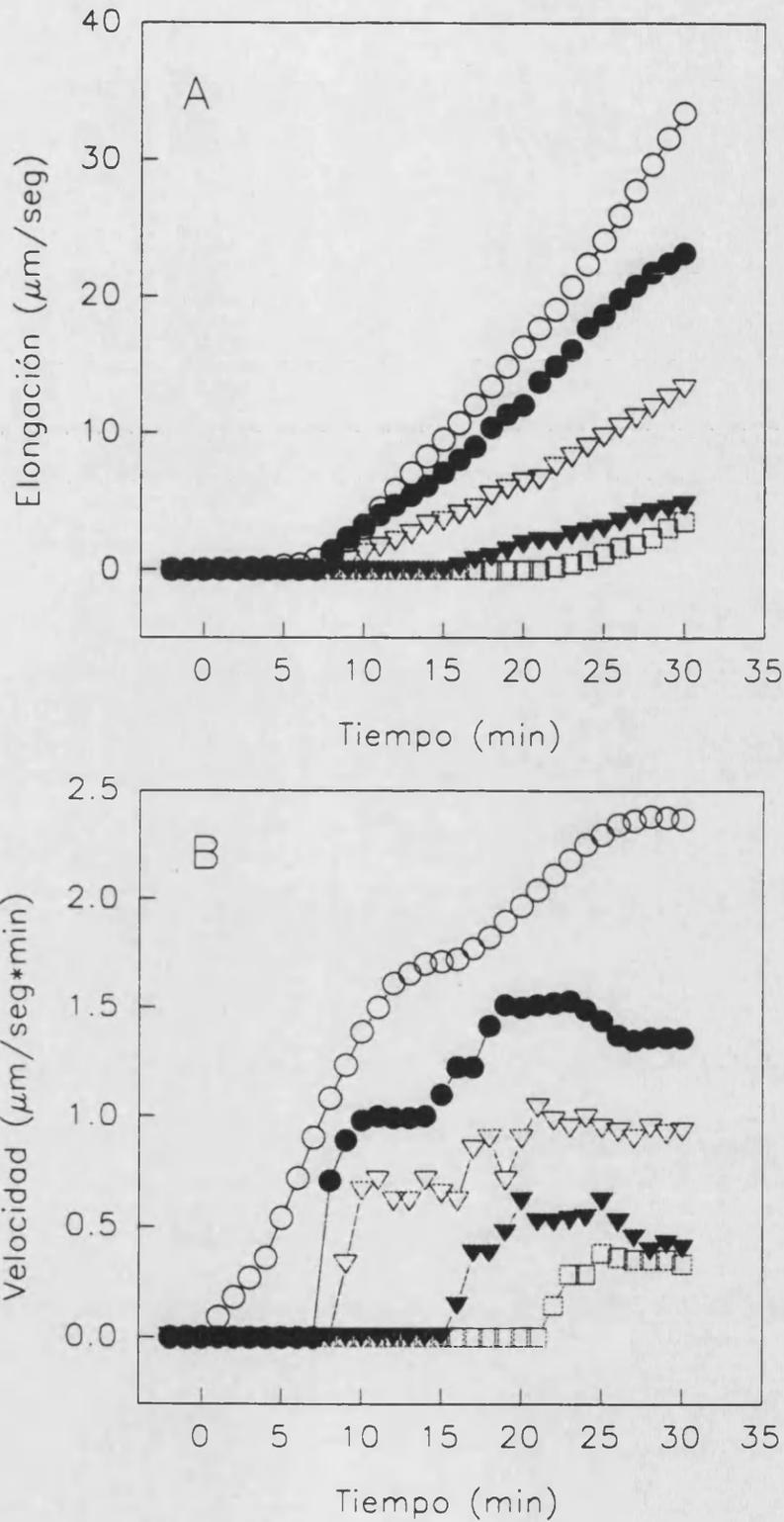


Figura 18. A): Efecto de la adición de diferentes concentraciones de atabrina sobre el crecimiento basal por elongación. B): Efecto sobre la velocidad basal de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 Mm CaCl_2 1 Mm (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (○); 10 μM atabrina (●), 50 μM atabrina (▽), 75 μM atabrina (▼) y 100 μM atabrina (□).

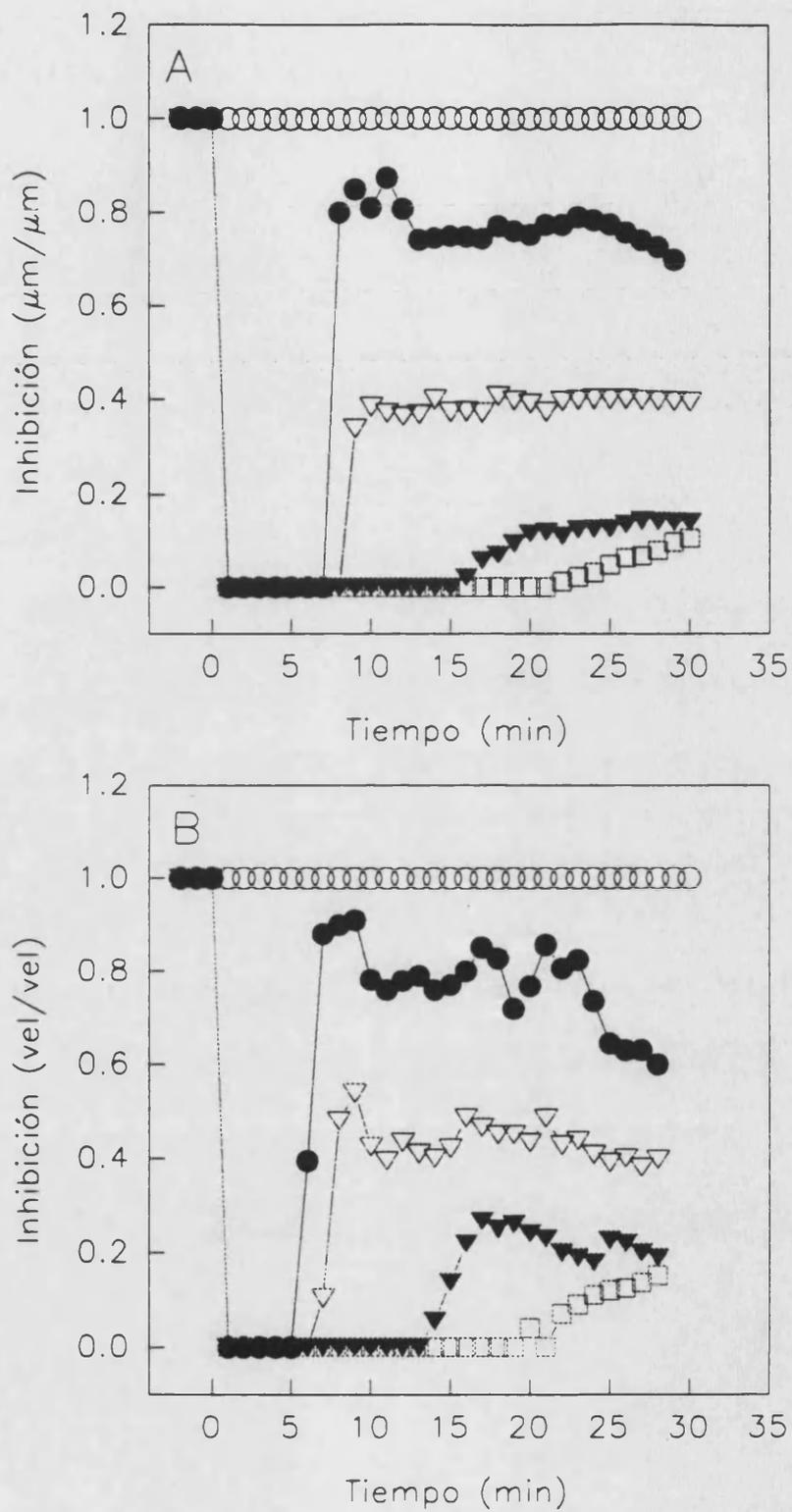


Figura 19. A): Efecto inhibitor de la elongación basal por el compuesto atebriina. B): Inhibición relativa de la velocidad basal de crecimiento. Datos de la figura 18.

3.1.4.2. DCCD

El DCCD es un inhibidor específico del sistema ATPasa de la membrana plasmática (Cleland, 1973; Rayle, 1973; Solioz, 1984). La adición de DCCD 100 μM en presencia de HCF III, produce una disminución tanto del crecimiento basal como del inducido por IAA (Tabla V). Este efecto inhibitor es prácticamente constante durante todo el período de incubación (Tabla V).

3.1.4.3. CICLOHEXIMIDA

La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas en el citosol (Marré et al., 1973; Dostrom et al., 1980). La adición de 35 μM cicloheximida tanto en presencia como ausencia de IAA inhibe totalmente el crecimiento por elongación en coleoptilos de maíz inducido por HCF III, (Tabla V).

Se concluye por tanto, que el crecimiento estimulado por HCF III al igual que el observado tanto en presencia de auxina como el crecimiento endógeno, es dependiente de la actividad de el sistema redox del plasmalema y está asociado a la actividad ATPasa y biosíntesis de proteínas.

3.1.5. ELONGACIÓN EN COLEOPTILOS DE AVENA E HIPOCOTILOS DE SOJA

El efecto estimulador del HCF III sobre el crecimiento por elongación se estudia también en otras especies y en otro tipo de tejido (coleoptilos de avena e hipocotilos de soja), con el fin de poder caracterizar si el efecto del HCF III en el crecimiento es compartido por otras especies vegetales y no es una característica propia de los coleoptilos de maíz.

Tabla V. Efecto de los compuestos CH (35 μ M) y DCCD (100 μ M) en el crecimiento por elongación, inducido por 5 Mm HCF III, tanto en presencia como en ausencia de 10 μ M IAA. Los coleoptilos son incubados en 43 ml HEPES 10 Mm CaCl₂ 1 Mm 5 Mm HCF III (pH 6.0). Adición inhibidor a tiempo cero. Valores promedio (n=6).

	Tiempo (min)					
	5	10	15	20	25	30
Elongación (μm/seg)						
en 10 μM IAA						
+ 5 Mm HCF	24,62	69,64	121	176,7	226,9	276,5
" + 100 μ M DCCD	0	1,02	3,38	7,01	11,42	15,76
" + 35 μ M CH	0	1,18	2,6	5,04	7,8	9,29
% Inhibición						
100 μ M DCCD	100	99,5	97,2	96,1	95	95
35 μ M CH	100	98,4	97,9	97,3	96,6	96,7
Elongación (μm/seg)						
Basal						
+ 5 Mm HCF	0,27	3,07	9,49	16,3	24,14	33,48
" + 100 μ M DCCD	0	0,7	1,4	1,4	1,8	2,36
" + 35 μ M CH	0	0,23	2,36	4,25	4,96	5,67
% Inhibición						
100 μ M DCCD	100	99,5	98	99	94	92,95
35 μ M CH	100	99,8	93,4	87,5	87,5	86,2

3.1.5.1. EFECTO HCF III EN LA ELONGACIÓN DE LOS COLEOPTILOS DE AVENA

El crecimiento inducido por auxina en los coleoptilos de avena se presenta en la Figura 20. La adición de HCF III produce una estimulación significativa de la elongación.

La velocidad de crecimiento inducida por IAA en coleoptilos de avena se presenta en la Figura 20 B. La velocidad de crecimiento se incrementa por la adición de 1 mM HCF III. El HCF III produce una estimulación del crecimiento sin modificar la cinética de la IAA.

La adición de 5 mM produce un aumento de la fase de latencia sin modificar de manera importante el resto de la cinética. (Figura 21).

3.1.5.2. CRECIMIENTO POR ELONGACIÓN EN HIPOCOTILOS DE SOJA

La cinética de crecimiento por elongación inducida por auxina en segmentos de hipocotilos se muestra en la Figura 22. La adición de HCF III produce un claro aumento de la elongación total de los segmentos para una concentración de 5 mM y 1 mM HCF III.

Los hipocotilos de soja (Figura 22) presentan una velocidad basal constante, la adición de IAA produce un descenso de la velocidad que rápidamente se recupera alcanzando un máximo en el minuto 16 (Fase I de crecimiento).

Las diferentes adiciones de HCF III, estimulan el crecimiento, aumentan el máximo de velocidad sin modificar la cinética de crecimiento (Figuras 22 y 23).

3.1.5.3. ABRASIÓN

La abrasión de los coleoptilos de avena e hipocotilos de soja, no modifican la estimulación del crecimiento inducido tanto por IAA como por HCF III (Figuras 24 y 25).

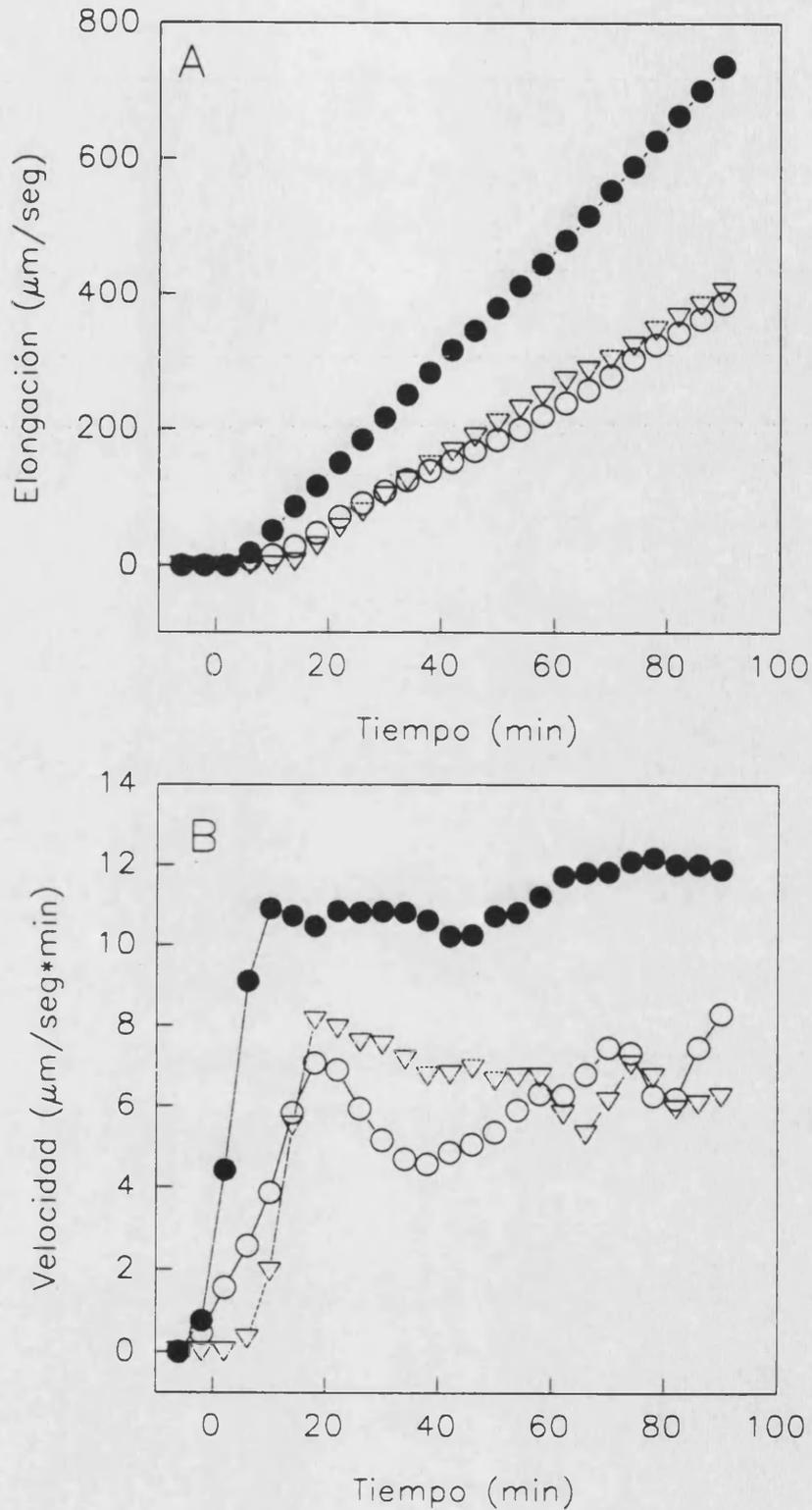


Figura 20. A): Efecto de la adición del compuesto HCF III sobre el crecimiento inducido por $10 \mu\text{M}$ IAA en los coleoptilos de *Avena sativa*. B): Efecto sobre la velocidad de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM $10 \mu\text{M}$ IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (\circ , \bullet , ∇); 1 mM HCF III (\bullet) y 5 mM HCF III (∇).

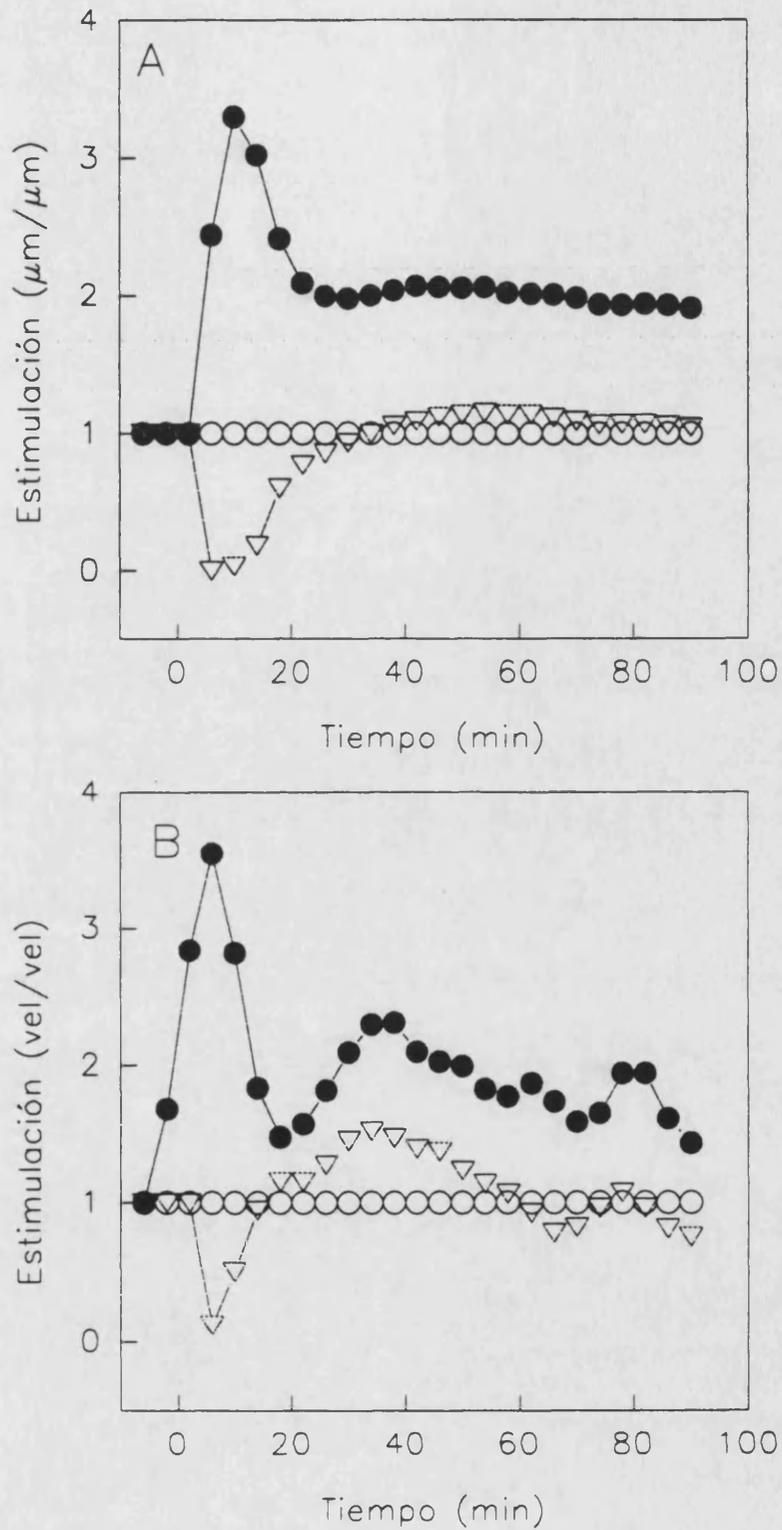


Figura 21. A): Estimulación relativa del crecimiento por elongación en coleoptilos de avena por HCF III. B): Estimulación relativa de la velocidad de crecimiento. Datos figura 20.

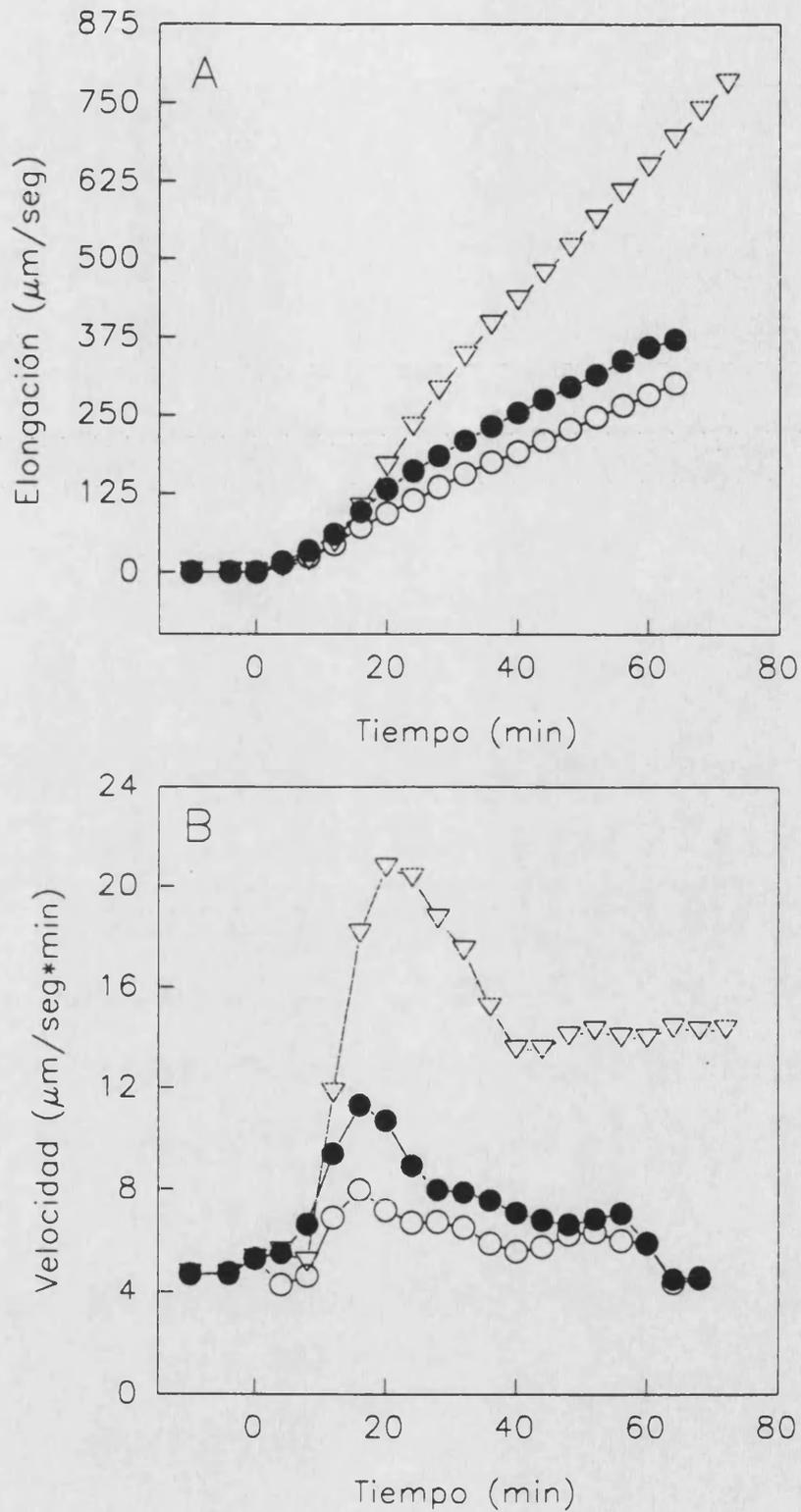


Figura 22. A): Efecto de la adición del compuesto HCF III sobre el crecimiento inducido por $10 \mu\text{M}$ IAA en los hipocotilos de *Glycine max*. B): Efecto sobre la velocidad de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 1 mM $10 \mu\text{M}$ IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleoptilos (\circ , \bullet , ∇); 1 mM HCF III (\bullet) y 5 mM HCF III (∇).

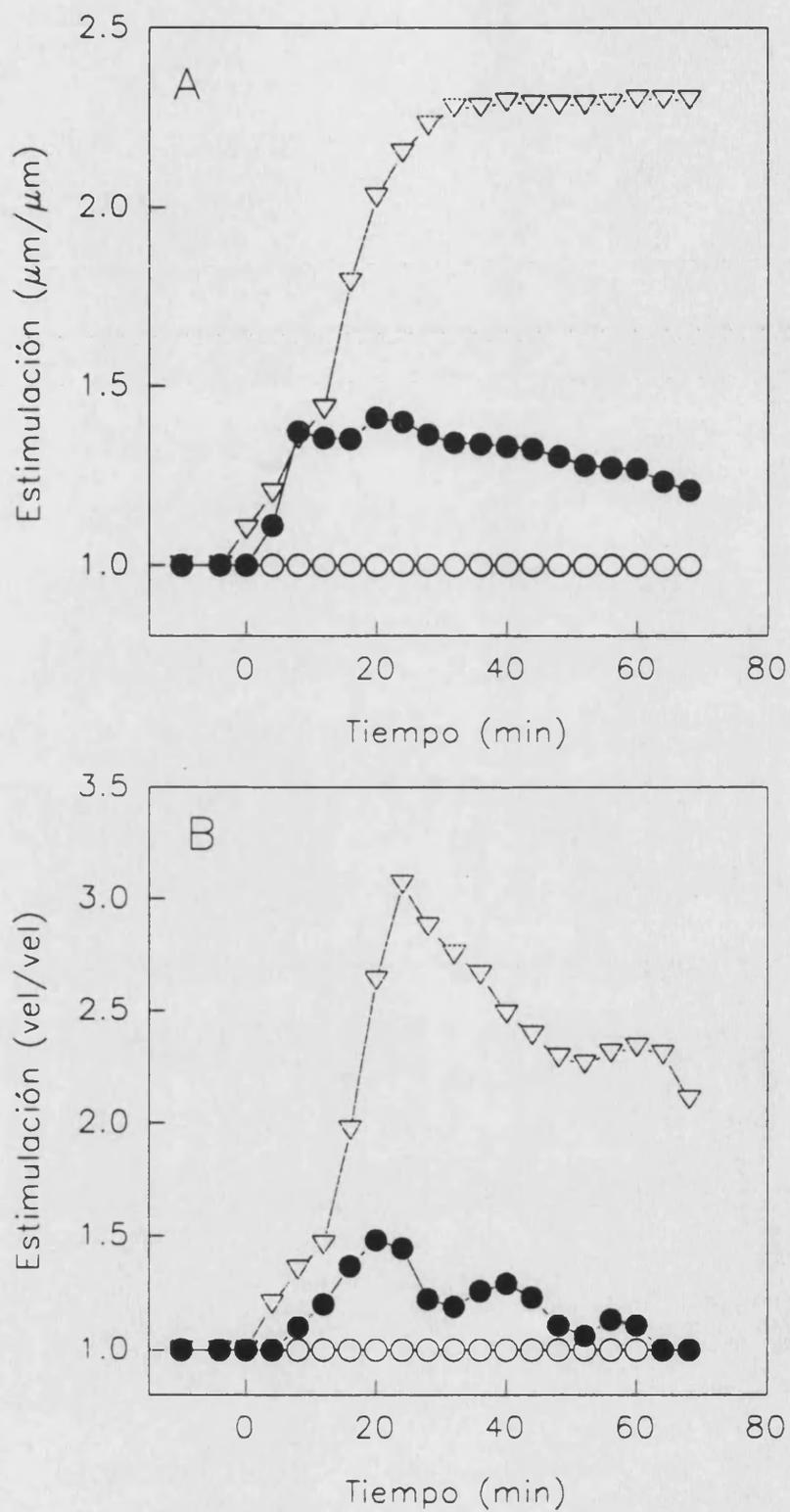


Figura 23. A): Estimulación relativa del crecimiento por elongación en hipocotilos de soja por HCF III.

B): Estimulación relativa de la velocidad de crecimiento. Datos figura 23.

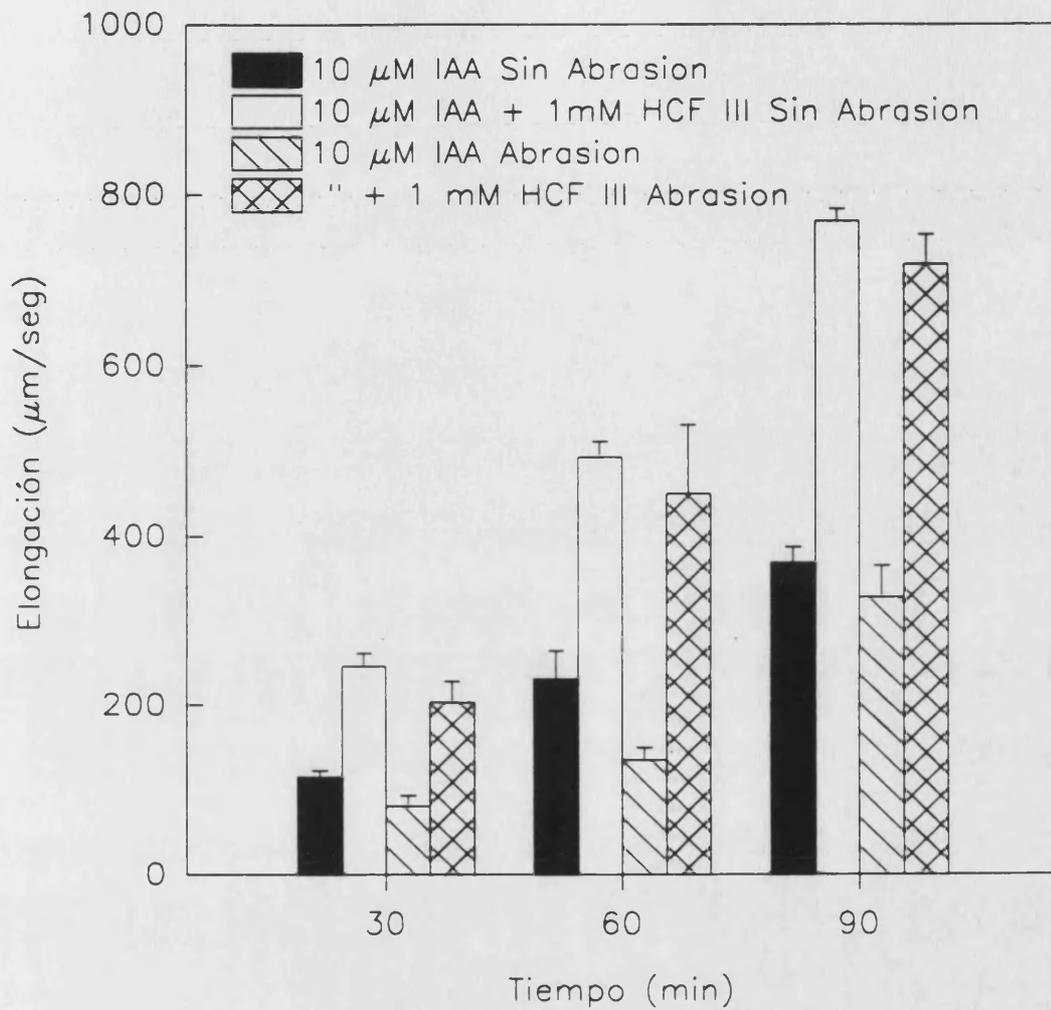


Figura 24. Efecto del proceso de la abrasión en el crecimiento por elongación inducido por 10 μM IAA o 10 μM IAA y 5 mM HCF III en coleoptilos de avena.

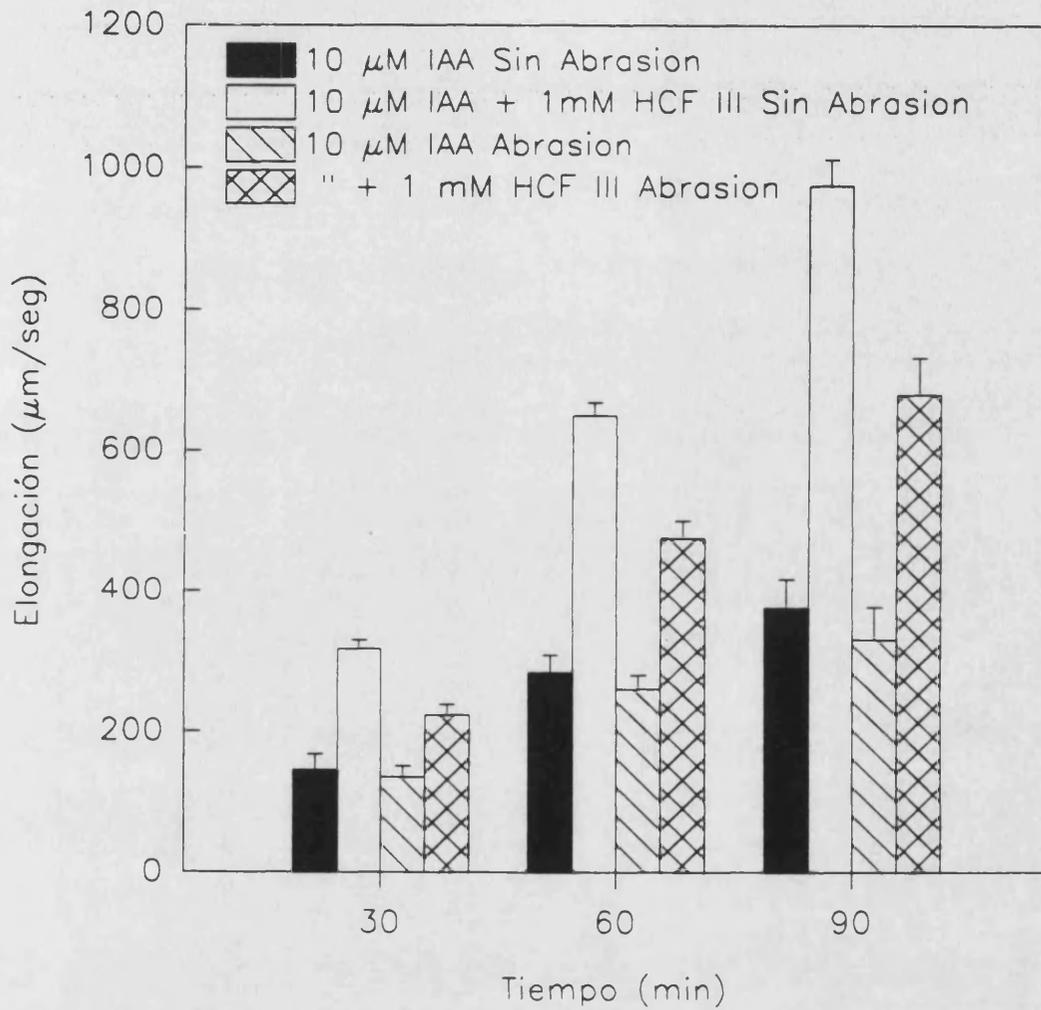


Figura 25. Efecto del proceso de la abrasión en el crecimiento por elongación inducido por 10 μM IAA o 10 μM IAA y 5 mM HCF III en hipocótilos de soja.

3.1.6. EFECTO DEL ION Ca^{2+} EN EL CRECIMIENTO INDUCIDO POR IAA Y HCF III.

La reducción de HCF III aumenta en presencia de cationes bivalentes (Sección 3.2.2.).

Si el efecto estimulador del HCF III es debido a su reducción por el sistema redox, en presencia de cationes bivalentes (Ca^{2+}), se esperaría una mayor estimulación. La Figura 26 demuestra que en presencia de 4 mM Ca^{2+} el crecimiento estimulado por IAA se inhibe, sin manifestarse la cinética bifásica.

Este efecto inhibitor probadamente está asociado al aumento de la rigidez o la modificación de la estructura de la pared en presencia de calcio (Prat *et al.*, 1984). El mecanismo de esta inhibición está todavía sujeto a controversia.

La adición de diferentes concentraciones de HCF III a la mezcla de reacción con 4 mM CaCl_2 produce una estimulación de la elongación total del coleoptilo (Figuras 26 y 27). La estimulación máxima se observa en presencia de 5 mM HCF III. Se recupera, aparentemente, la cinética bifásica, con un aumento progresivo de la fase de latencia (Figura 28).

En la dosis respuesta del HCF III se observa que la máxima velocidad de crecimiento se obtiene para 1 mM HCF III en los primeros 30 minutos. La concentración 5 mM HCF III presenta el máximo de velocidad a partir del minuto 40 de incubación, (Figura 28).

La estimulación máxima del HCF III es dependiente del período de incubación y de su concentración (Figura 28).

Estos resultados indican que el HCF III estimula la elongación incluso en presencia de concentraciones relativamente altas de Ca^{2+} , y por tanto el sistema redox puede revertir la inhibición del calcio.

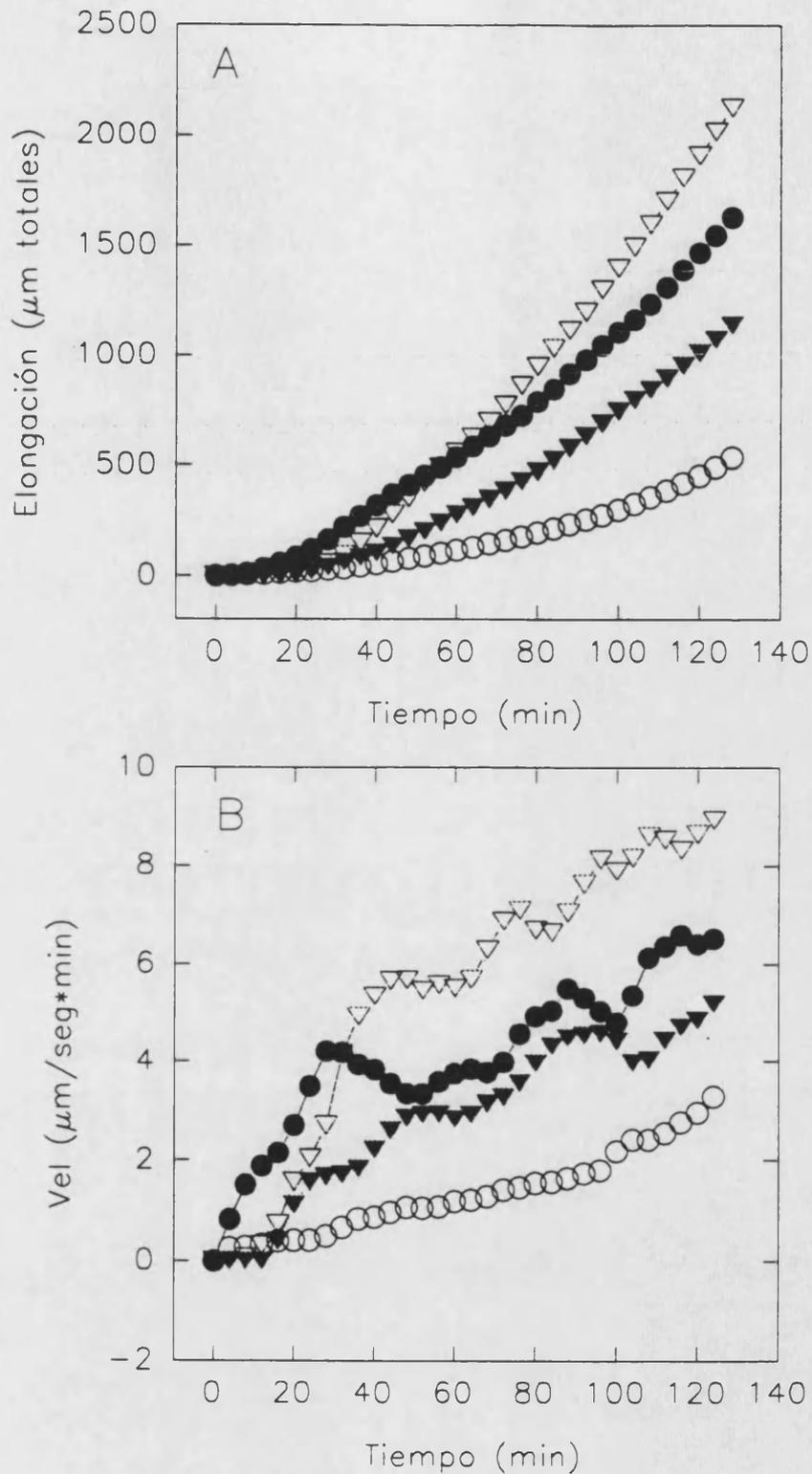


Figura 26. A): Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HCF III sobre el crecimiento inducido por 10 μM IAA en presencia de 4 mM CaCl_2 . B): Efecto sobre la velocidad de crecimiento. Mezcla de reacción: 43 ml de HEPES 10 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA (pH 6.0) y 4 segmentos de coleóptilos (○, ●, ▽, ▼); 1 mM HCF III (●); 5 mM HCF III (▽); 10 mM HCF III (▼).

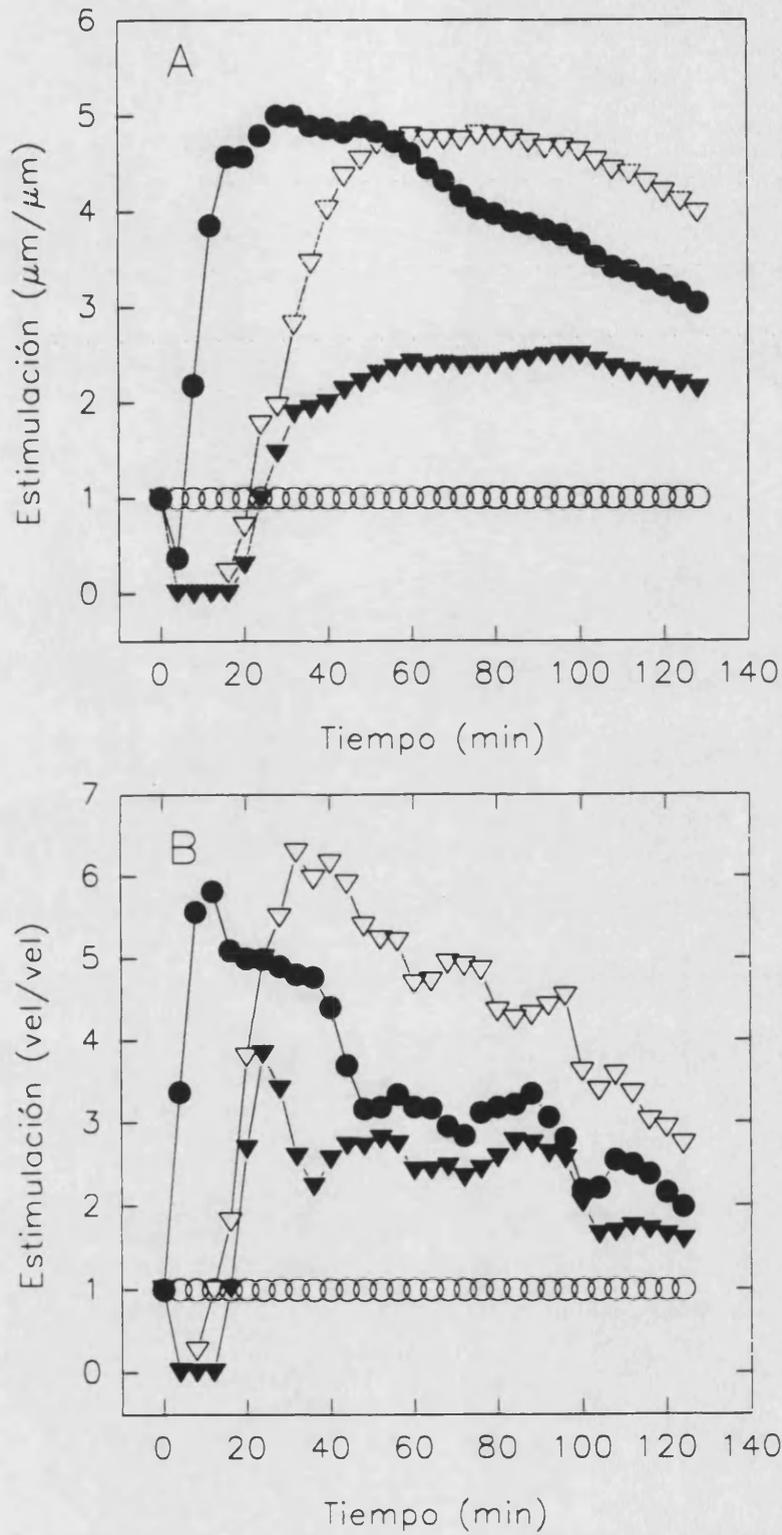


Figura 27. A): Estimulación relativa del crecimiento por elongación por HCF III en presencia de 4 mM CaCl₂. B): Efecto estimulador de la velocidad de crecimiento. Datos de la Figura 26.

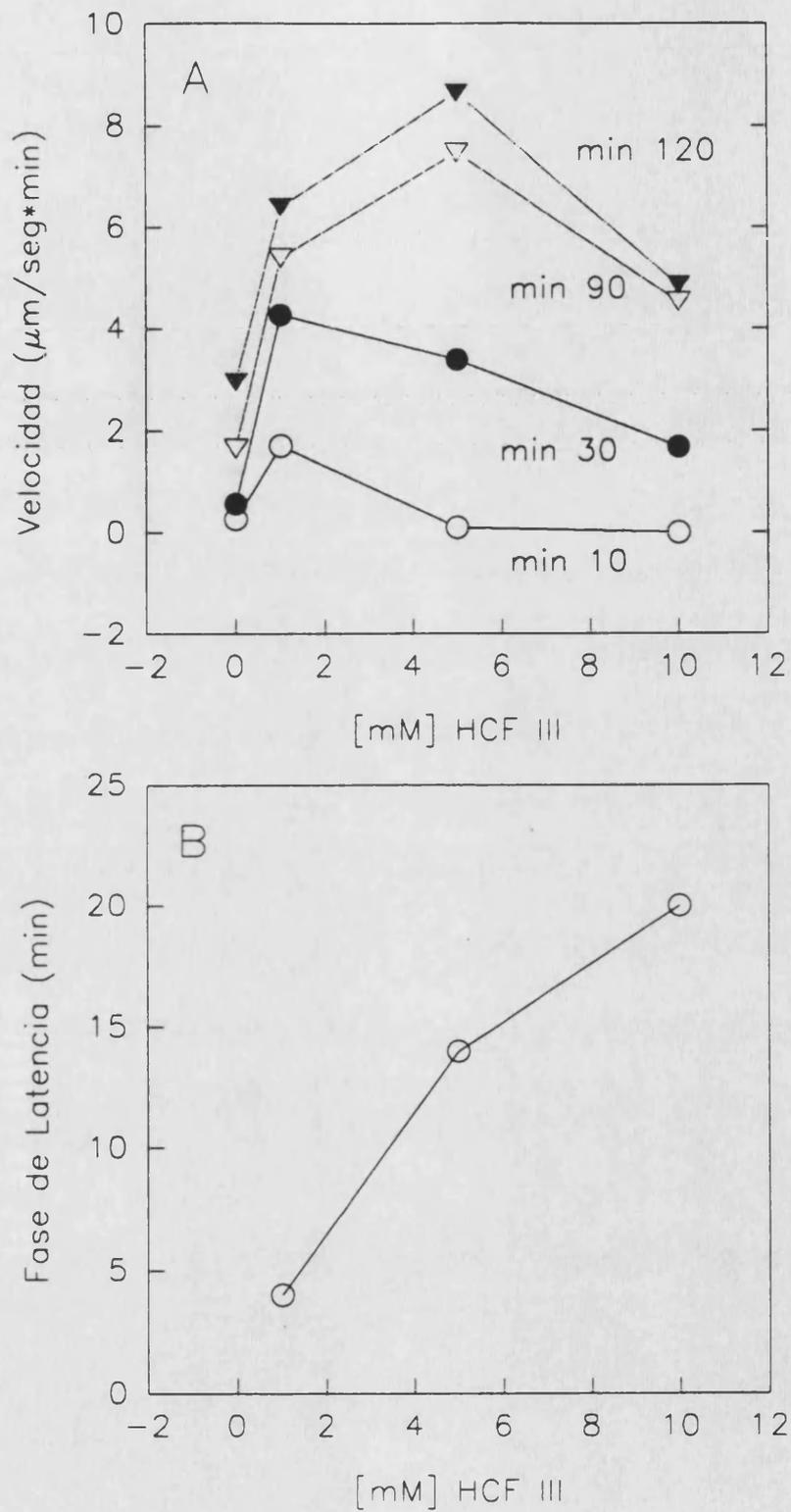


Figura 28. A): Efecto dosis respuesta de HCF III en la velocidad de elongación celular en presencia de 4 mM CaCl_2 a distintos tiempos de incubación. B): Efecto de HCF III en la fase de latencia del crecimiento por elongación.

3.2. REDUCCIÓN DE HCF III

En esta sección, se estudia la reducción del HCF III como consecuencia de la estimulación de la actividad NADH-HCF III-oxido-reductasa de la membrana plasmática.

3.2.1. CINÉTICA DE REDUCCIÓN

La $A_{420-500}$ presenta dos fases, una fase muy rápida (2 primeros minutos) y una fase lenta (hasta el final de la incubación) (Figura 29 A). El HCF III no se reduce en ausencia de coleoptilos en la mezcla de reacción, y la $A_{420-500}$ permanece constante (Datos no presentados).

En la figura 29 B se observa la liberación de nmoles de HCF II en la mezcla de reacción como consecuencia de la reducción de HCF III por los coleoptilos durante la fase II. La velocidad de reducción de HCF III es aparentemente constante. Esta reducción es dependiente de la concentración (Figura 30).

3.2.2. ESTIMULACIÓN DE LA REDUCCIÓN DEL HCF III POR CALCIO.

En esta sección, se estudia el efecto de los cationes bivalentes sobre la reducción de HCF III en presencia de 10 μM IAA.

El calcio estimula la reducción de HCF III en presencia de 10 μM IAA, (Figura 31), el máximo efecto se obtiene para 4 mM Ca^{2+} .

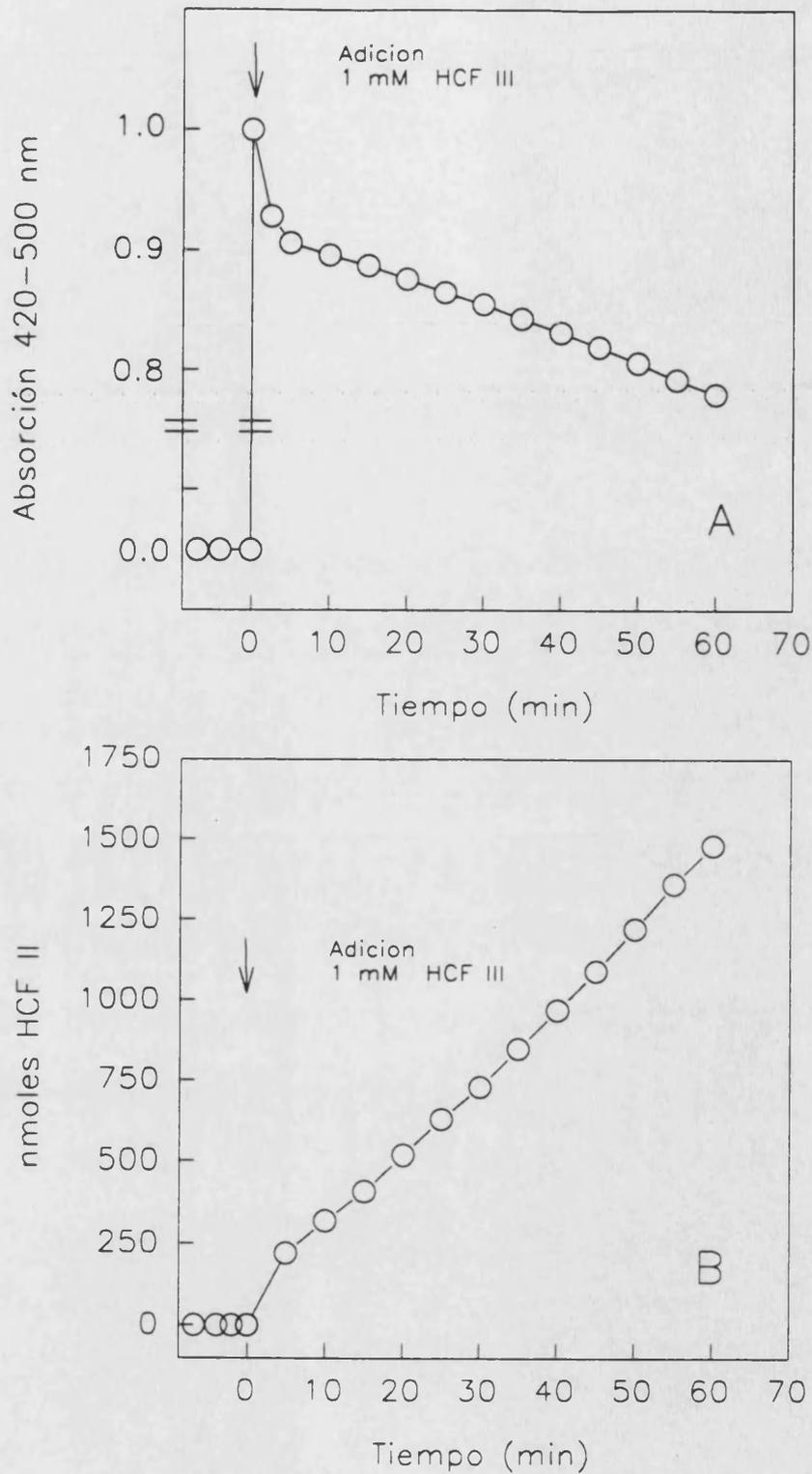


Figura 29. A): Variación en la absorción a 420-500 nm del compuesto HCF III en presencia de 60 segmentos de coleoptilos de maíz. B): Cinética de reducción del HCF III (nmoles HCF II liberados al medio de reacción). Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

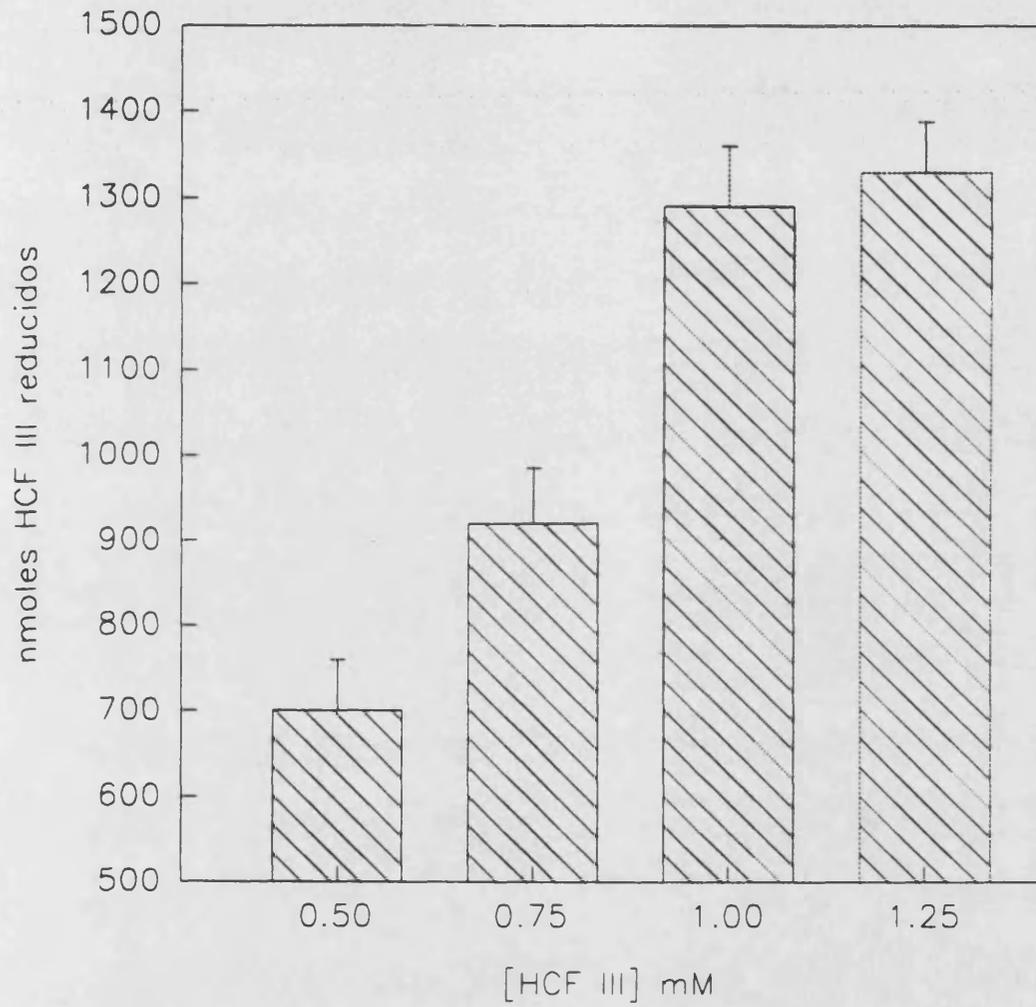


Figura 30. Dosis respuesta en la reducción del compuesto HCF III. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

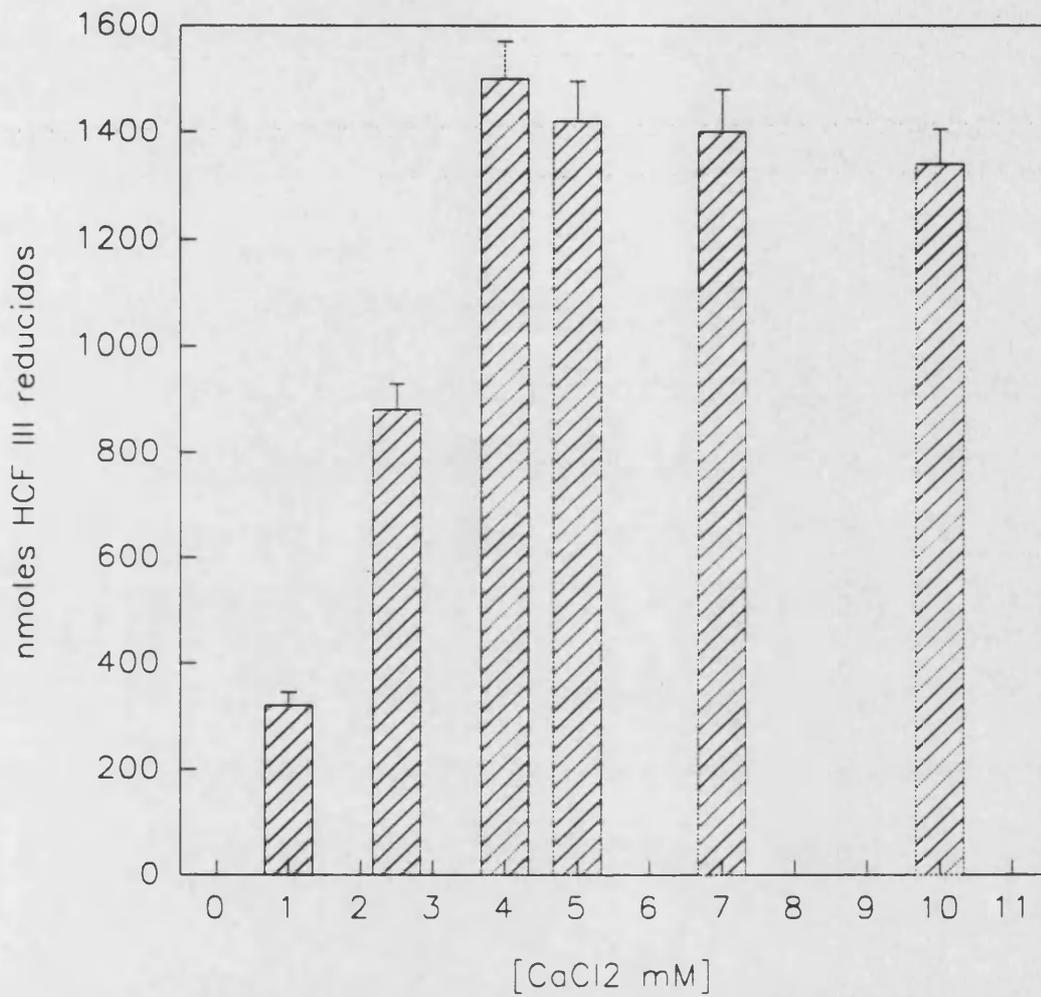


Figura 31. Efecto del catión Ca^{2+} en la reducción de 1 mM HCF III. Cinéticas de 1 hora de duración.

Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM 1 mM HCF III, 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

3.2.3. REDUCCIÓN EN AUSENCIA DE AUXINA

En ausencia de auxina, la reducción de HCF III presenta cinéticas de reducción con fase I (proceso rápido) y fase II (proceso lento)(Figura 32). La reducción es dependiente de la concentración y presenta valores muy parecidos a los obtenidos en presencia de 10 μM auxina (Figura 32); por ello se obtienen valores similares en la K_m y la V_{max} (Figura 33).

La fase II de reducción presenta una cinética micaliana (representación Lineweaver-Burk Figura 33)

3.2.4. EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA REDUCCIÓN DE HCF III

La reducción de HCF III puede ser realizada por los microorganismos presentes en la mezcla de reacción.

En presencia de 150 μM cloranfenicol y 5 mM penicilina, la $A_{420-500 \text{ nm}}$ no presenta diferencias significativas en la velocidad de reducción de HCF III, ni en la magnitud total (Figura 34).

Estos resultados experimentales demuestran que la reducción de HCF III se realiza exclusivamente por los coleoptilos en el medio de incubación.

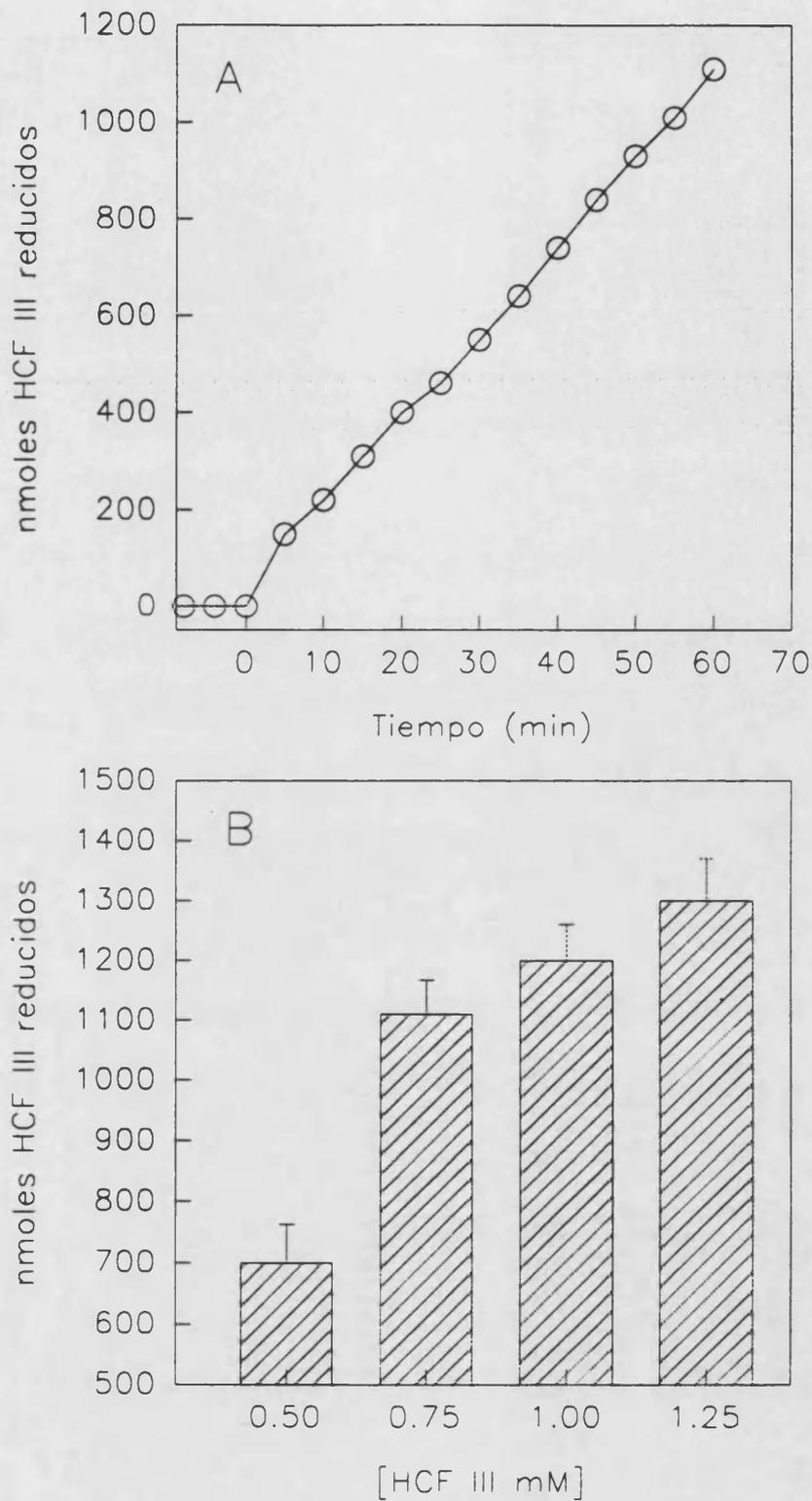


Figura 32. A): Cinética de reducción de 1 mM HCF III en ausencia de IAA. B): Dosis respuesta de la reducción del compuesto HCF III en ausencia de IAA. Cinéticas de 1 hora de duración. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

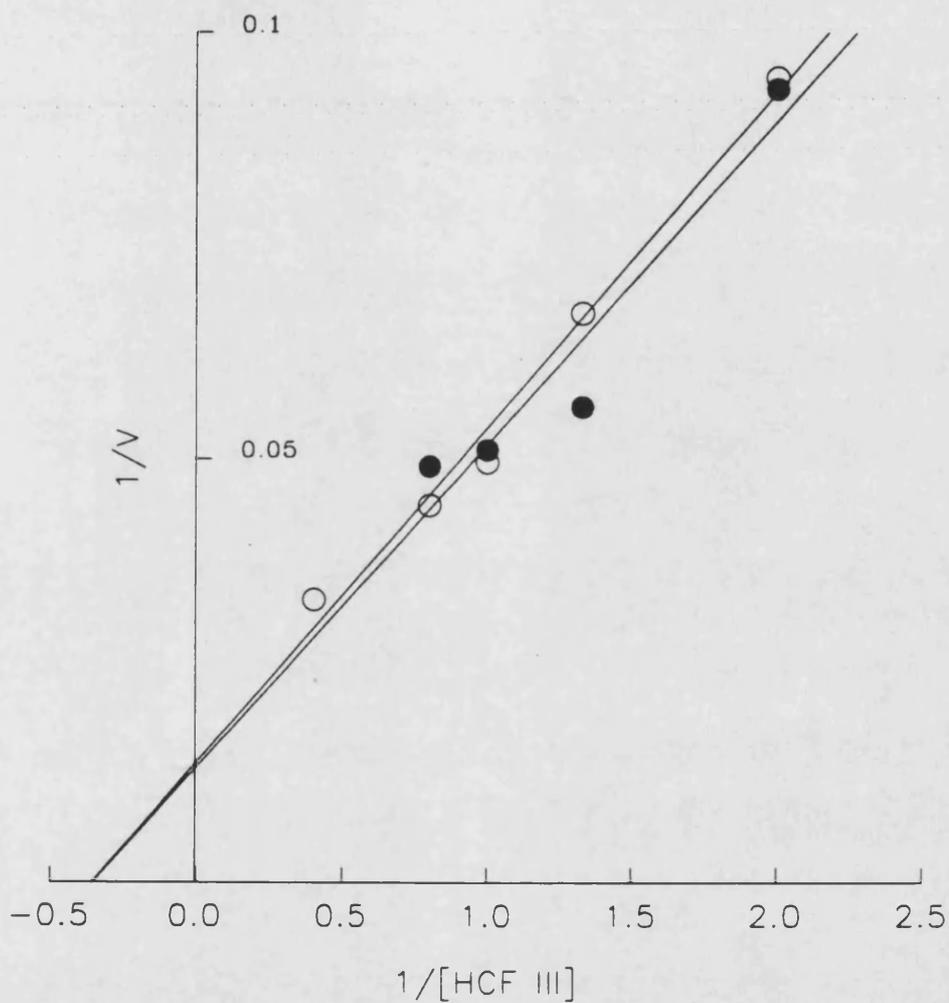


Figura 33. Representación del Lineweaver-Burk para la reducción de HCF III tanto en presencia como en ausencia de IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 4 mM y 60 segmentos de coleoptilos. 10 μ M IAA ($K_m = 2.79$ mM y $V_{max} = 70.69$ nmoles/min); sin IAA ($K_m = 2.59$ mM y $V_{max} = 69.35$ nmoles/min).

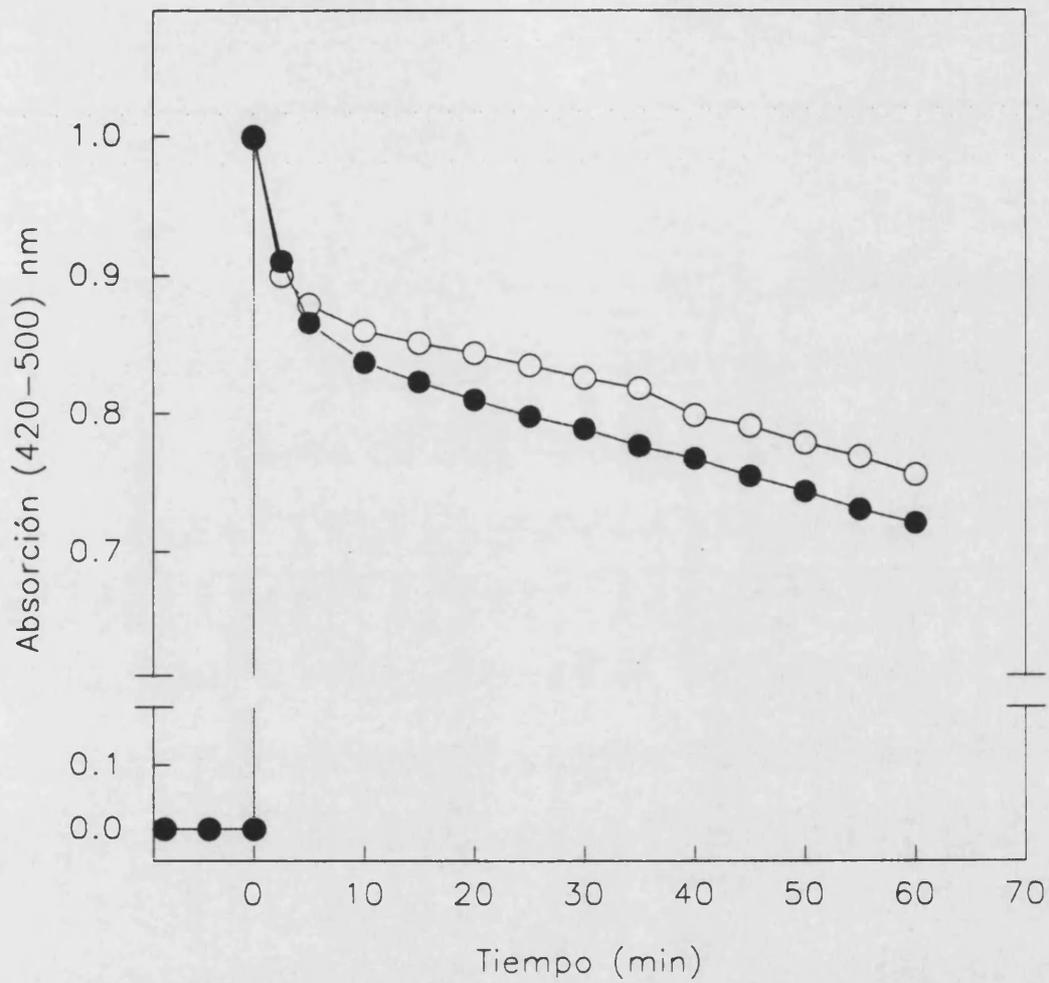


Figura 34. Efecto de los antibióticos Cloranfenicol y Penicilina en la reducción de HCF III. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleóptilos (○●); 1 mM HCF III (○) o 150 μM Cloranfenicol + 5 mM Penicilina y 1 mM HCF III (●).

3.3. HCF III ESTIMULA LA EXTRUSION DE PROTONES

El HCF III estimula la extrusión de protones en un gran número de tejidos vegetales (Referencias en Crane *et al.*, 1991).

La adición de auxina a la mezcla de reacción en presencia de coleoptilos produce una rápida extrusión de protones con una fase de latencia de 8 minutos externa. Este flujo de protones no aparece en ausencia de coleoptilos (Datos no presentados).

En ausencia de auxina el pH de la mezcla de reacción con coleoptilos, permanece prácticamente constante ($\text{pH} = 6.0$) durante 60 minutos (Figura 35). La adición de 1mM HCF II no produce variaciones en el pH del medio significativamente diferentes a la obtenida para las muestras incubadas con IAA (Figura 35). Por el contrario la adición de 1mM HCF III produce una rápida acidificación (fase de latencia inferior a 1 minuto) y se estimula la extrusión de protones.

Al igual que ocurre en otros tejidos vegetales, el tratamiento con HCF III estimula la extrusión de protones en coleoptilos de maíz.

3.3.1. DOSIS RESPUESTA DE HCF III EN PRESENCIA DE IAA

La extrusión de protones inducida por HCF III es dependiente de la concentración, (Figura 36). La estimulación del flujo de protones inducida por IAA es máxima para la concentración de 1 mM HCF III, concentraciones superiores no aumentan la acidificación del medio (Figura 36).

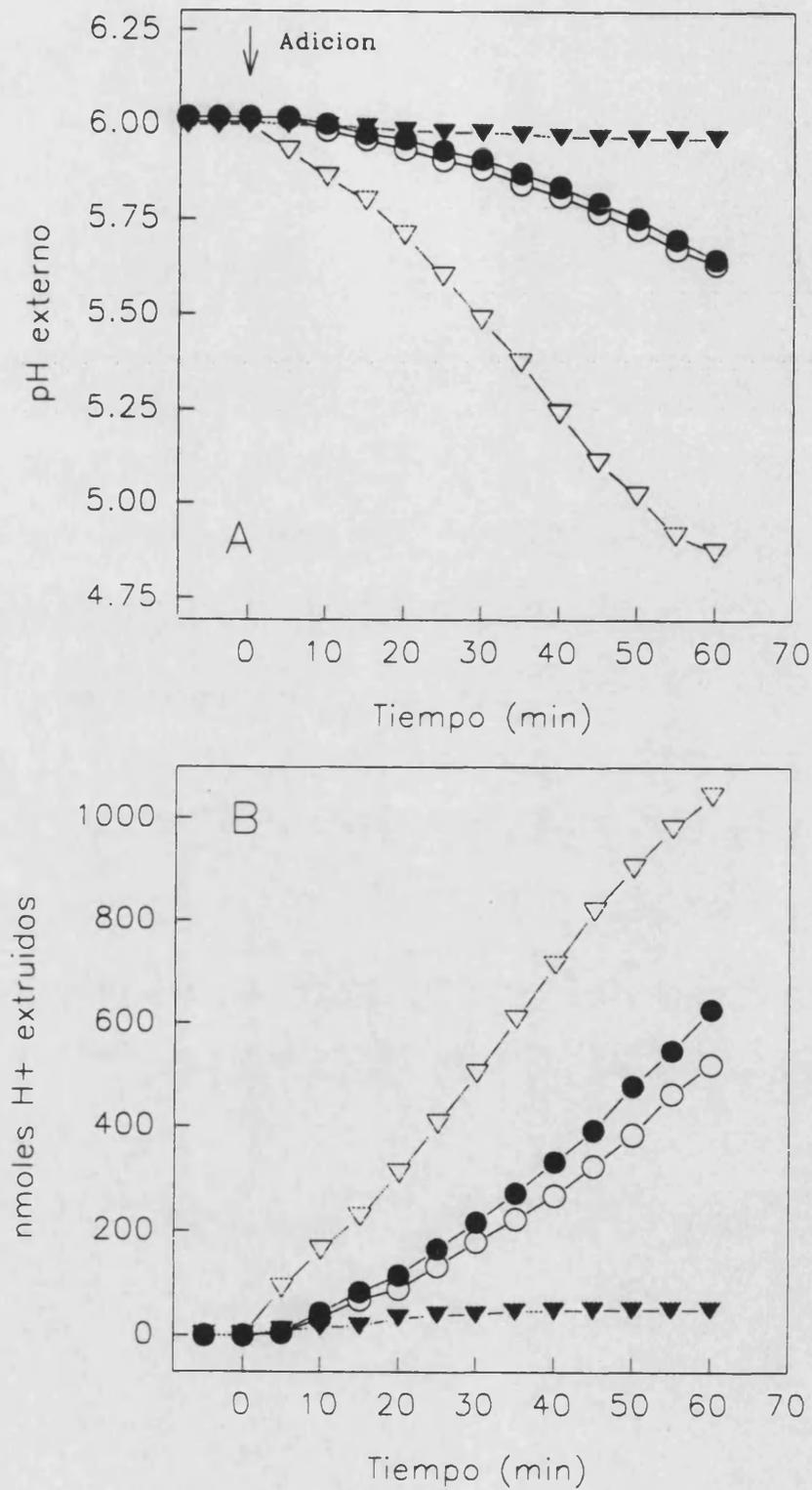


Figura 35. A): Acidificación del medio externo dependiente de HCF III. B): Cinética de extrusión de protones dependiente de HCF III. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM y 60 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▼, ▼); 10 μM IAA (○, ●, ▼); HCF II (●); HCF III (▼).

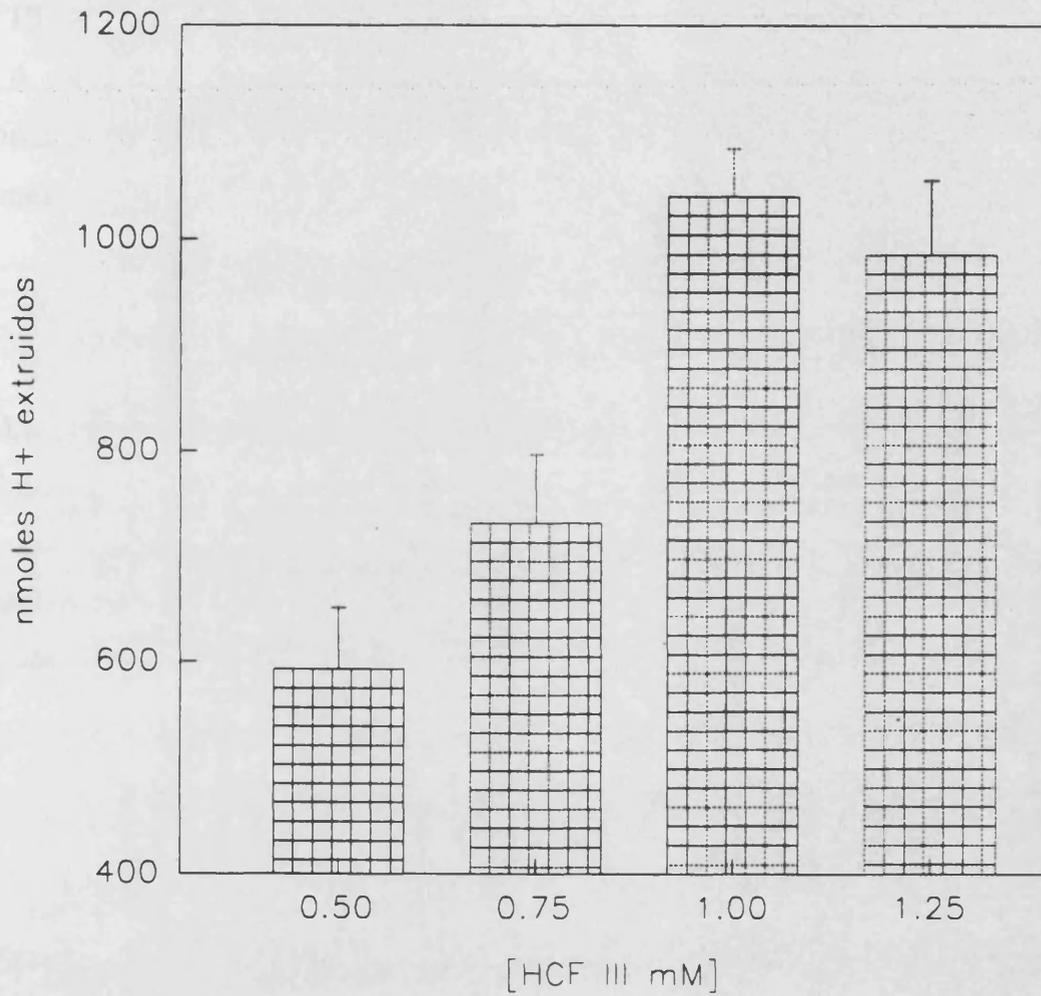


Figura 36. Efecto dosis respuesta del HCF III en la extrusión de protones inducida por IAA. Cinéticas de 1 hora. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

3.3.2. EFECTO DEL CALCIO EN LA EXTRUSIÓN DE PROTONES INDUCIDA POR HCF III

El catión Ca^{2+} es un inhibidor de la extrusión de protones inducida por IAA (Cohen y Nadler, 1976; Cleland y Rayle, 1977; Rubinstein et al., 1977; Matsumoto 1988). La adición de diferentes concentraciones de Ca^{2+} a la mezcla de reacción con HCF III, produce una estimulación del flujo de protones. El máximo efecto se observa para 4 mM calcio, (Figura 37). Concentraciones superiores disminuyen su efecto estimulador, Por consiguiente el catión Ca^{2+} es un estimulador de la extrusión de protones en presencia de HCF III.

3.3.3. EXTRUSIÓN DE PROTONES EN AUSENCIA DE IAA

La adición de HCF III en ausencia de IAA estimula el flujo de protones (Figura 38). La estimulación es dependiente de la concentración de HCF III y del tiempo de incubación (Figura 38). La extrusión de protones es menor en ausencia de IAA que para las mismas concentraciones de HCF III en presencia de IAA. Estos datos experimentales indican que el IAA es un estimulador de la extrusión de protones inducida por HCF III.

3.3.4. EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA EXTRUSIÓN DE PROTONES INDUCIDA POR HCF III

La figura 39, muestra la extrusión de protones inducida por HCF III en presencia de 150 μM cloranfenicol y 5 mM penicilina. No se observan variaciones significativas con respecto al control, por consiguiente la extrusión de protones es debida únicamente a los coleoptilos.

La extrusión de protones al igual que la reducción de HCF III es debida únicamente a los coleoptilos sin que la presencia de microorganismos tenga ningún efecto (Figuras 34 y 39).

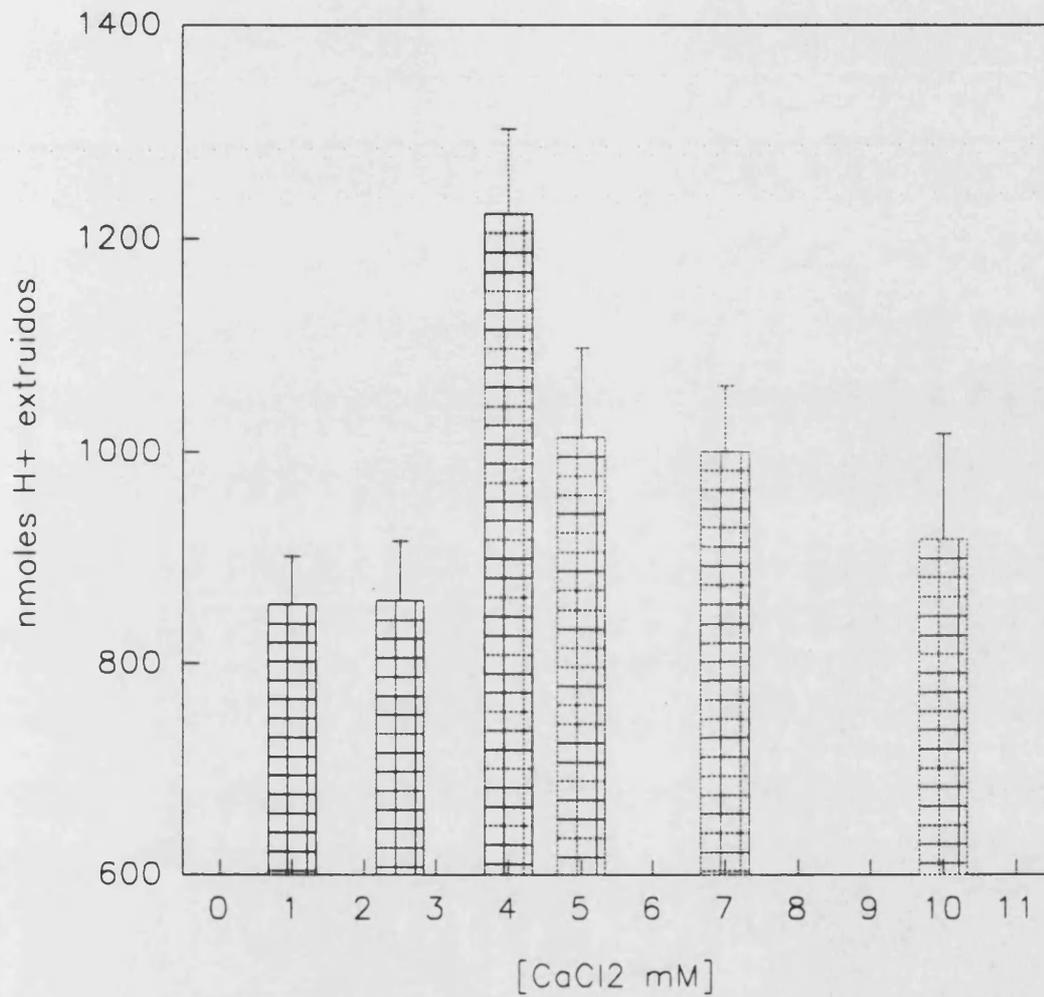


Figura 37. Efecto dosis respuesta de CaCl₂ en la extrusión de H⁺ inducida por 1 mM HCF III en presencia de 10 μM IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

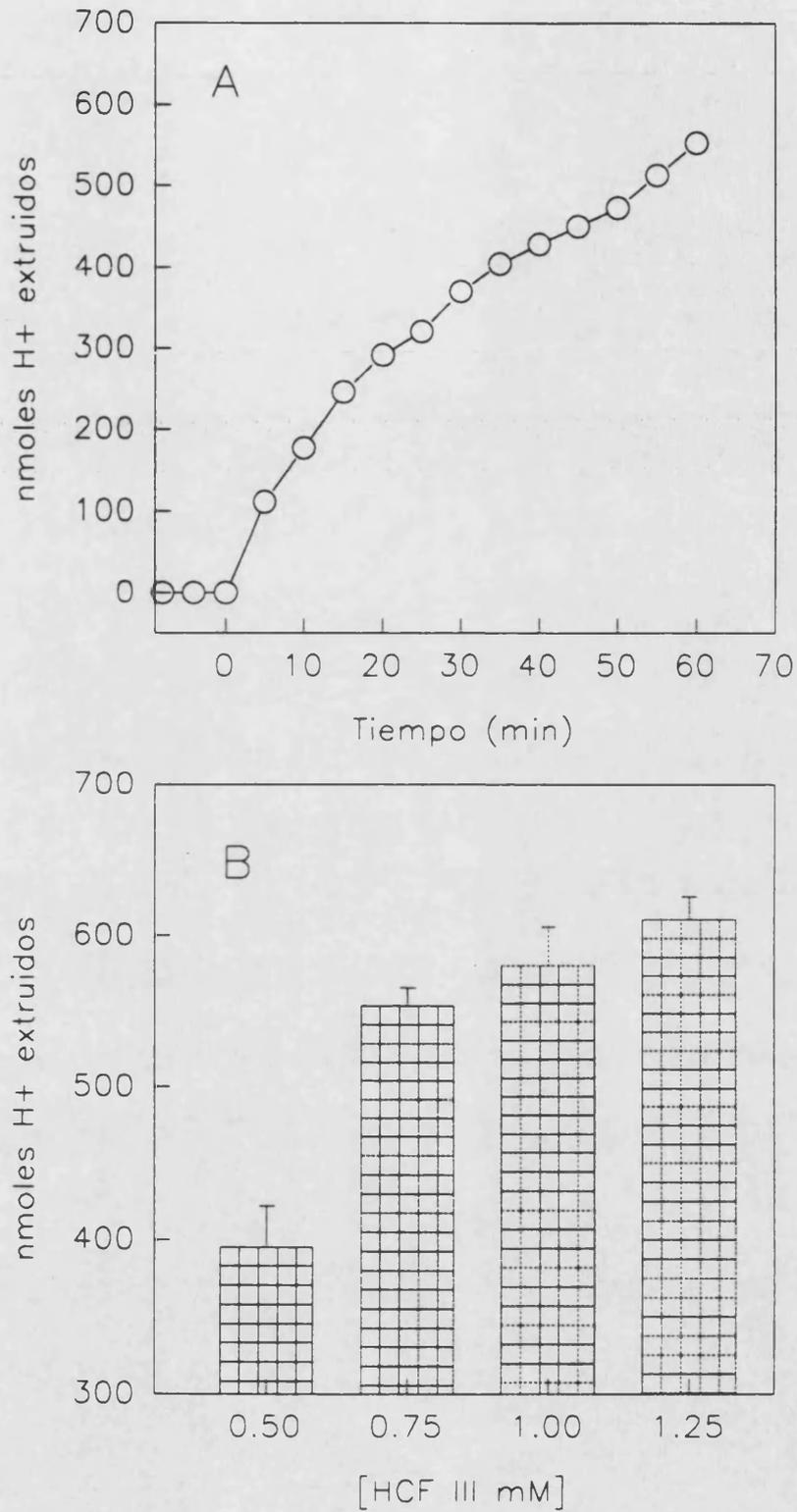


Figura 38. A): Cinética de extrusión de protones inducida por 1 mM HCF III en ausencia de IAA. B): Dosis respuesta de HCF III en la extrusión de protones en ausencia de IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM y 60 segmentos de coleoptilos.

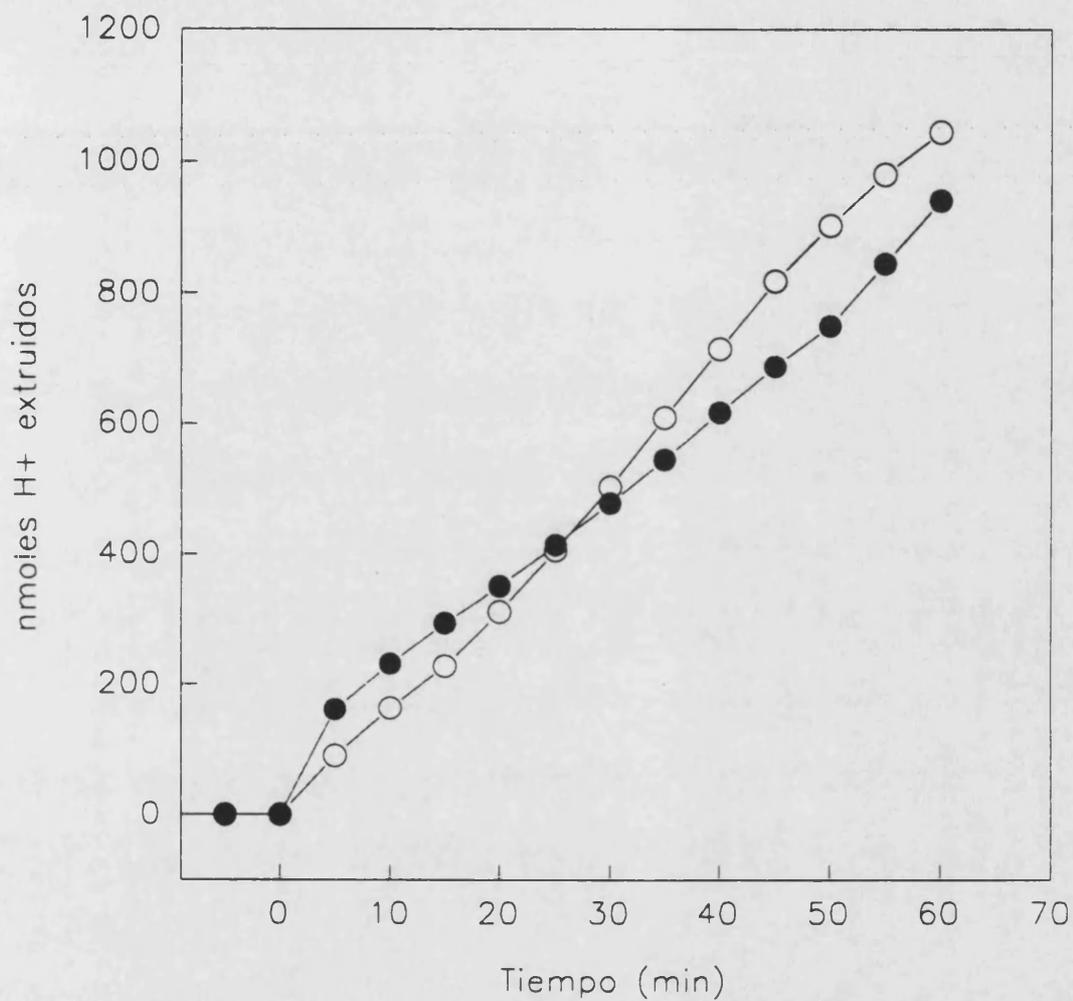


Figura 39. Efecto de los antibióticos Cloranfenicol y Penicilina en la extrusión de protones inducida por 1 mM HCF III en presencia de 10 μ M IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μ M IAA y 60 segmentos de coleoptilos 1 mM HCF III (○, ●) ó 150 μ M Cloranfenicol y 5 mM Penicilina (●).

Los resultados experimentales obtenidos muestran, (Figuras 30-39) que el HCF III es reducido por los coleoptilos y estimula la extrusión de H^+ (Tabla VI) y la elongación tanto en presencia como en ausencia de auxina. Estos resultados sugieren que ambos procesos podrían ser independientes y estar regulados por el sistema redox del plasmalema.

Tabla VI. Efecto de 10 μM IAA en la extrusión de H^+ y reducción de HCF III. La mezcla de reacción está formada por 10 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 4 mM y 60 segmentos de coleoptilos. La velocidad de reducción se expresa en nmoles HCF III reducidos/seg*min. (n= 4).

	[HCF III]					
	0.5 mM		0.75 mM		1.25 mM	
	+ IAA	- IAA	+ IAA	- IAA	+ IAA	- IAA
nmoles H^+ extruidos	592.84	395.27	730.50	553.54	985.50	610.55
nmoles HCF III reducidos	700	700	1110	920	1300	1330
pH inicial	6.013	6.005	6.001	6.009	6.008	6.002
pH final	5.554	5.706	5.377	5.563	5.259	5.610
Velocidad reducción	10.72	10.54	17.80	14.90	20.36	22.50
std	2.24	1.57	2.27	3.01	4.27	1.77

3.4. LA EXTRUSIÓN DE PROTONES INDUCIDA POR HCF III SE REALIZA A TRAVÉS DE LA ATPasa DEL PLASMALEMA

3.4.1. ESTEQUIOMETRIA H^+/e^-

La relación entre la actividad del sistema redox y la acidificación del pH externo no es conocida todavía. La medida de la estequiometría H^+/e^- y el efecto del DCCD ha permitido contrastar las diferentes hipótesis (Sección 1.3)(Marré *et al.*, 1988)

La relación H^+/e^- ha sido estudiada en diferentes tejidos vegetales (Tabla VII). Excepto Rubinstein y Stern 1986 que han medido los valores H^+/e^- frente al tiempo; el resto de valores H^+/e^- se han medido durante diferentes tiempos y representan valores promedio. La relación H^+/e^- es muy variable (0.3-1.21) según los diferentes autores.

Tabla VII. Estequiometría H⁺/e⁻ (nmoles H⁺ extruidos/nmoles HCF III reducidos), calculada en diferentes tejidos. Valores promedio H⁺/e⁻ durante el tiempo de incubación.

Célula o Tejido	H ⁺ /e ⁻	Referencia
Maíz (Raíz)	1.00	Federico & Giartosio 1983
Maíz	1.21	Neufeld & Bown, 1987
Maíz	0.58	Lass <i>et al.</i> , 1986
Maíz	1.00	Crane <i>et al.</i> , 1985a
Maíz (Raíz)	0.40	Federico & Giartosio, 1983
Maíz	0.73-0.47	Rubinstein & Stern 1986
<i>Asparagus</i> (Oscuridad)	1.00	Neufeld & Bown 1987
<i>Asparagus</i> (Luz)	1.10	Neufeld & Bown 1987
<i>Acer</i> sp.	0.93	Blein et al 1986
Maíz	0.39	Rubinstein & Stern 1986
<i>Phaseolus</i> (Raíz)	0.50	Sijmons et al 1984
<i>Elodea</i> (Hojas)	1.10	Ivankina et al 1984
Maíz (Aerobio - FC)	0.40	Federico & Giartosio 1983
Maíz (Anaerobio - FC)	0.03	Federico & Giartosio 1983
Maíz (Aerobio + FC)	0.48	Federico & Giartosio 1983
Maíz (Anaerobio + FC)	0.25	Federico & Giartosio 1983
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.75	Crane et al 1985
Zanahoria	1.10	Craig & Crane 1985

La estequiometría H^+/e^- varía a lo largo del tiempo de incubación y no es constante en presencia de diferentes concentraciones de HCF III, como en presencia o ausencia de auxina (Tabla VIII).

Tabla VIII. Estequiometría H^+/e^- para diferentes concentraciones de HCF III tanto en presencia como en ausencia de 10 μ M IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 4 mM (pH 6.0) y 60 segmentos de coleoptilos. Valores promedio (n=4).

Tiempo (min)	[HCF III]					
	0.5 mM		0.75 mM		1.25 mM	
	+ IAA	- IAA	+ IAA	- IAA	+ IAA	- IAA
5	0.44	0.69	0.58	0.85	0.65	0.65
10	0.52	0.78	0.60	0.80	0.66	0.65
15	0.56	0.80	0.67	0.79	0.73	0.73
20	0.63	0.82	0.66	0.72	0.74	0.66
25	0.68	0.83	0.76	0.67	0.76	0.64
30	0.63	0.80	0.73	0.64	0.75	0.59
35	0.68	0.74	0.75	0.63	0.75	0.56
40	0.75	0.68	0.79	0.57	0.75	0.55
45	0.78	0.68	0.78	0.53	0.75	0.53
50	0.80	0.63	0.79	0.50	0.75	0.50
55	0.84	0.61	0.80	0.50	0.74	0.49
60	0.84	0.56	0.79	0.49	0.74	0.46

La estequiometría H^+/e^- no es constante cuando se tienen en cuenta los protones liberados al medio en ausencia de HCF III (Figura 40).

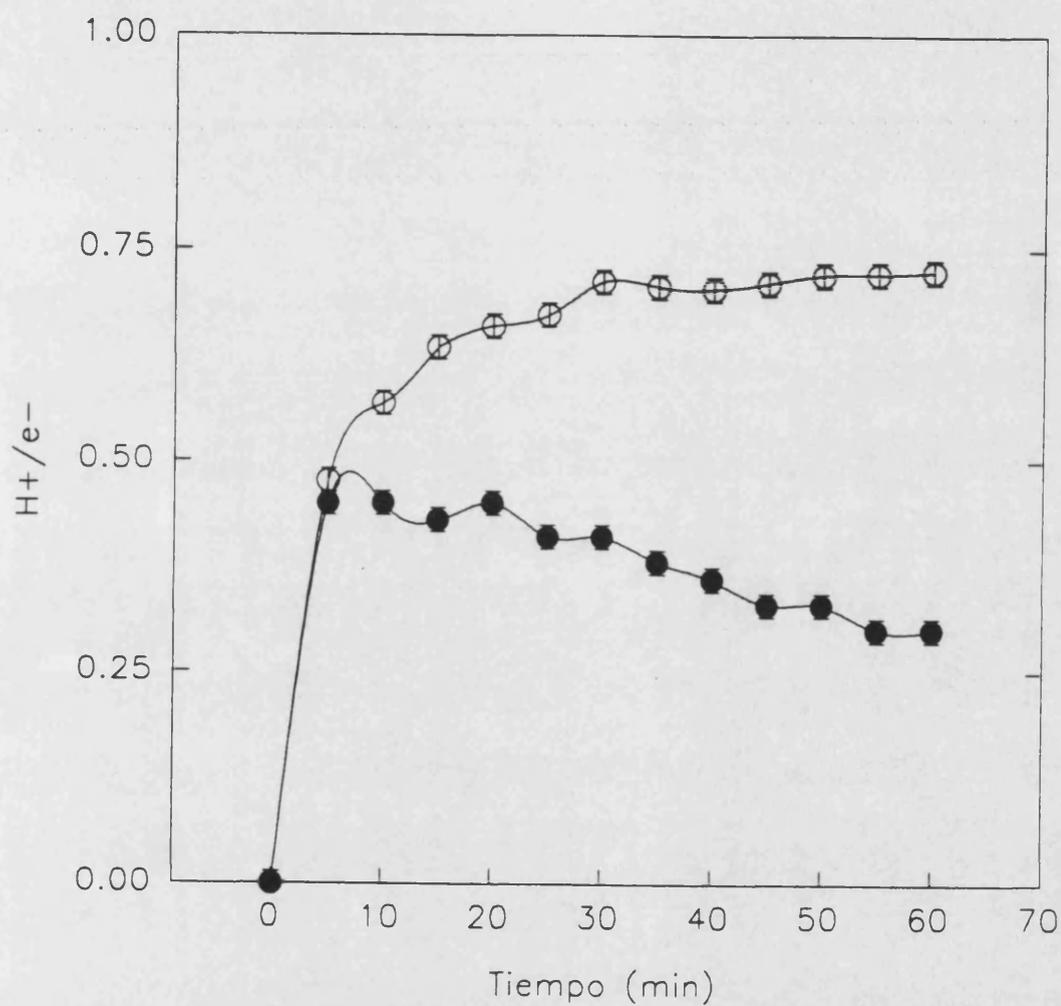


Figura 40. Relación H^+/e^- como cociente entre los nmoles de H^+ extruidos y los nmoles de HCF III reducidos. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 4 mM 10 μ M IAA y 60 segmentos de coleoptilos (○,●); 1 mM HCF III (○) o 1 mM HCF III (●) descontando los protones extruidos en presencia de 10 μ M IAA.

3.4.2. EFECTO DEL CATION Ca^{2+} EN LA ESTEQUIOMETRIA H^+/e^-

La variación de la estequiometría H^+/e^- dependiendo de la variación de la fuerza iónica del medio se ha estudiado en la Tabla IX. El calcio favorece la reducción de HCF III así como la extrusión de protones inducida por 1 mM HCF II. Este efecto es máximo para la concentración de 4 mM Ca^{2+} . Las estequiometrías dependientes de la fuerza iónica no son constantes a lo largo del tiempo de incubación y son independientes de la concentración del ión Ca^{2+} (Tabla IX).

Tabla IX. Efecto de diferentes concentraciones de CaCl_2 en la relación H^+/e^- (nmoles de H^+/nmoles HCF III reducidos). Mezcla de reacción 10 ml HEPES 1 mM 10 μM IAA 1 mM HCF III y 60 segmentos de coleoptilos. Adiciones a tiempo cero minutos. Valores promedio (n=4).

Tiempo (min)	[CaCl_2]				
	1 mM	2.5 mM	4 mM	5 mM	10 mM
5	1.38	0.49	0.41	0.51	0.50
10	1.64	0.58	0.54	0.65	0.62
15	1.44	0.77	0.60	0.65	0.63
20	2.07	0.75	0.74	0.74	0.66
25	1.75	0.86	0.77	0.75	0.62
30	1.73	0.89	0.88	0.84	0.65
35	1.97	0.90	0.86	0.76	0.69
40	2.23	0.95	0.91	0.81	0.72
45	2.28	0.99	0.92	0.74	0.71
50	2.37	0.96	0.89	0.76	0.71
55	2.36	1.00	0.87	0.72	0.70
60	2.67	0.97	0.81	0.71	0.68

3.4.3. ESTEQUIOMETRÍA COMO COCIENTE DE VELOCIDADES

La velocidad aparente de protones representa el flujo neto de protones, como resultado de dos procesos opuestos; extrusión de protones al medio externo y entrada de protones en la célula.

La velocidad de liberación de protones y reducción de HCF III varía con el tiempo de incubación de la muestra (Figura 41 A). La velocidad de reducción de HCF III a HCF II presenta dos fases (Fase I, rápida) y Fase II.

El cociente entre estas dos velocidades nos determina la estequiometría H^+/e^- instantánea (Figura 41 B) esta relación no es constante en todo el período de incubación.

3.4.4. EFECTO DEL DCCD EN LA EXTRUSIÓN DE PROTONES Y REDUCCIÓN DE HCF III

El DCCD es un inhibidor específico de la ATPasa del plasmalema (Cleland, 1973; Rayle, 1973). El crecimiento inducido por HCF III se inhibe por 100 μM DCCD (Tabla V). En la Figura 42 se observa el efecto inhibitorio de la extrusión de protones a diferentes concentraciones de DCCD.

La adición de DCCD presenta una fase de latencia en la extrusión de protones de 25 minutos. Añadido a tiempo cero 25 μM DCCD no inhibe totalmente la extrusión de protones, se observa un flujo neto positivo (salida de protones al medio externo); 30, 40 y 50 μM DCCD inhiben totalmente la extrusión de protones (Figura 42).

La concentración de 30 μM DCCD se utiliza para determinar la acidificación del medio externo en presencia de HCF III.

La acidificación del medio se inhibe tanto en presencia de IAA como en HCF III y IAA. La adición de DCCD se ha realizado a pH 5.7 (con una extrusión de protones importante) (Figura 43).

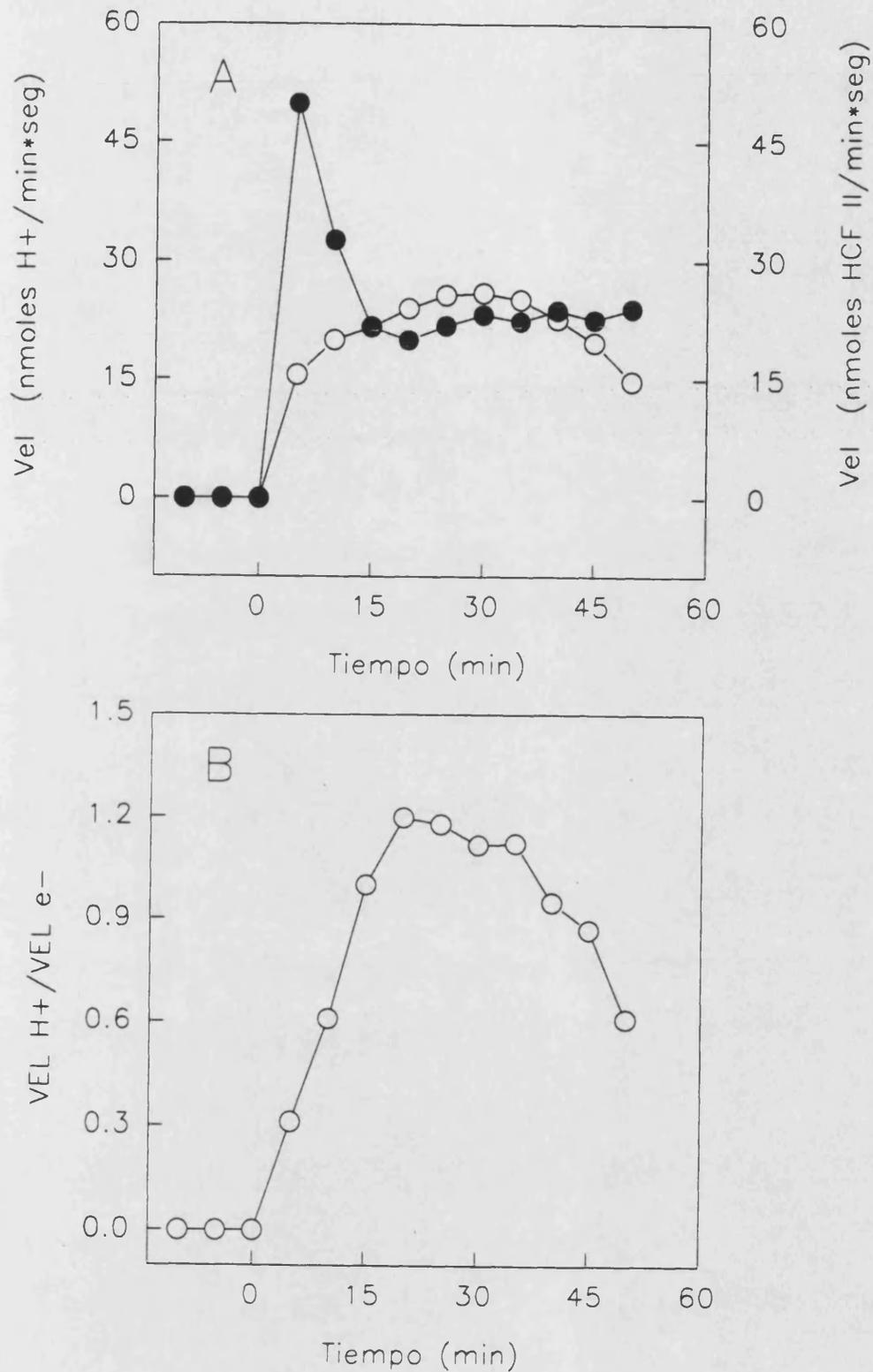


Figura 41. A): Cinética de la velocidad de extrusión de protones inducida por 1 mM HCF III (○), cinética de la velocidad de reducción de 1 mM HCF III (●). B): Relación H⁺/e⁻ como cociente de velocidades. Estequiometría instantánea. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleóptilos.

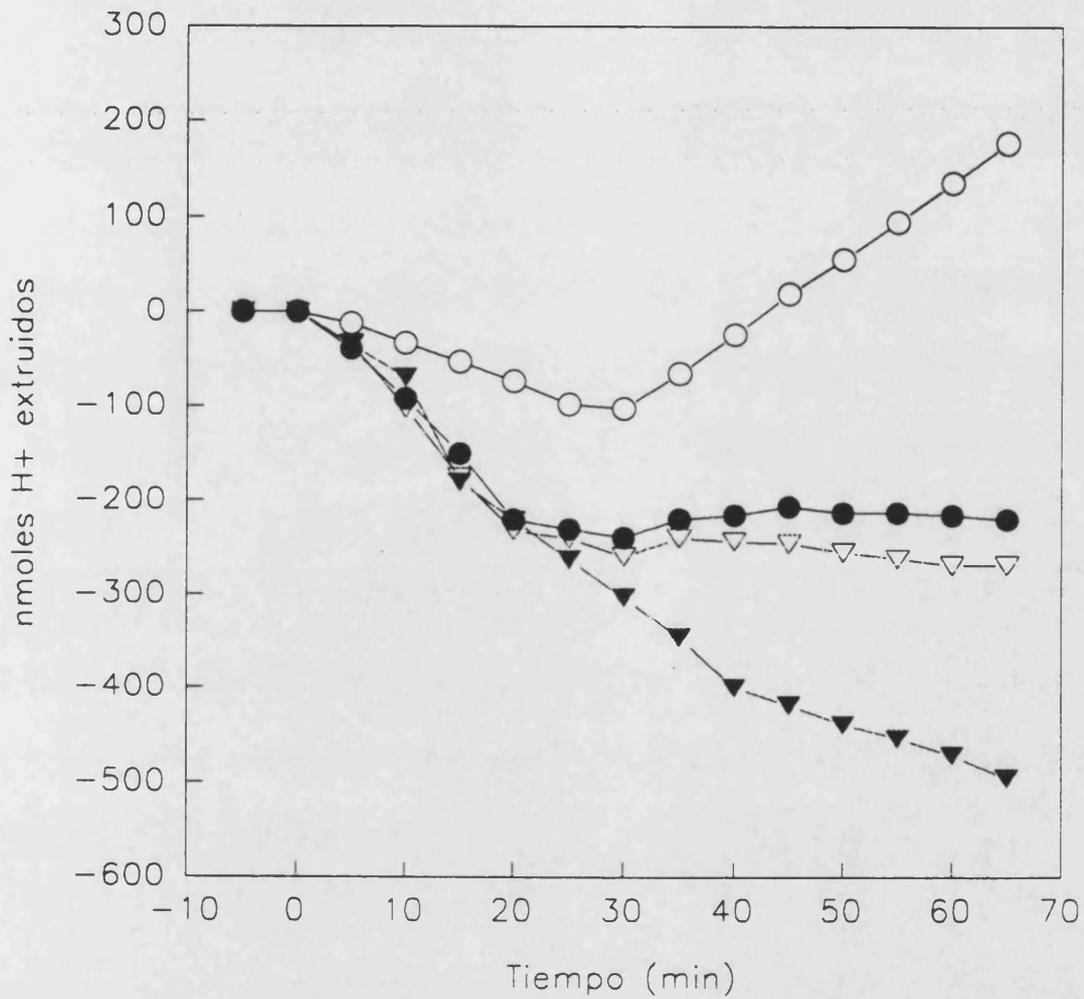


Figura 42. Efecto del compuesto DCCD a $t=0$ en la extrusión de H^+ inducida por $10 \mu M$ IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 4 mM $10 \mu M$ IAA y 60 segmentos de coleoptilos (○,●, ▽,▼); 25 μM DCCD (○); 30 μM DCCD (●); 40 μM DCCD (▽) y 50 μM DCCD (▼).

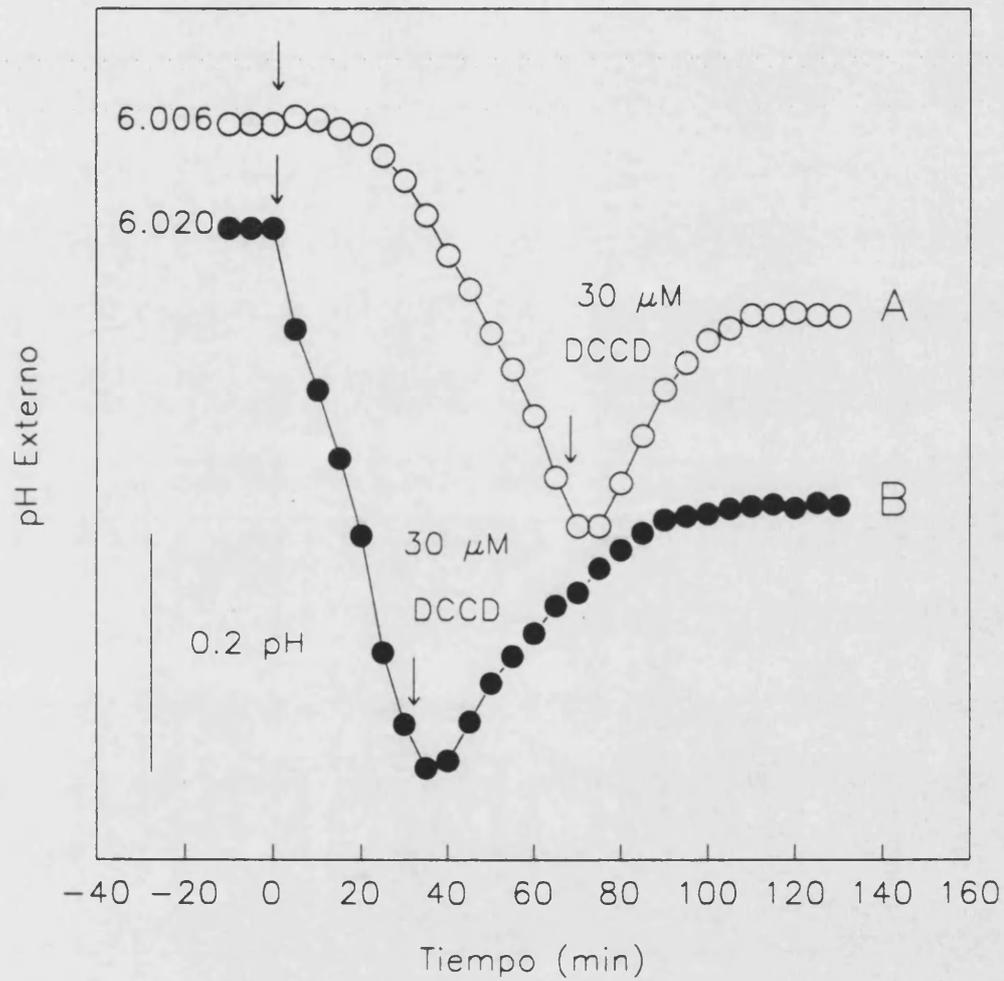


Figura 43. Efecto adición 30 μM DCCD a pH 5.7 en: A): Acidificación inducida por 10 μM IAA. B): Acidificación inducida por 1 mM HCF III en presencia de 10 μM IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

La adición de DCCD 20 minutos antes del tratamiento con IAA o IAA y HCF III inhibe la acidificación del medio. (Datos no presentados).

Por el contrario, la reducción de HCF III no se afecta por la adición de DCCD cuando es añadido 20 minutos antes del tratamiento o 30 minutos después del tratamiento con HCF III (Figura 44).

Estos resultados experimentales (Figuras 42-44) demuestran que el HCF III induce la extrusión de protones mediante el sistema ATPasa.

La estequiometría H^+/e^- es variable (Tablas VIII y IX) y la acidificación del medio se inhibe por DCCD (Figura 43) sin que se afecte la reducción de HCF III, por consiguientes estas evidencias experimentales permiten rechazar las hipótesis A y B (Marré *et al.*, 1988b) y aceptar la hipótesis C. (Sección 1.3).

El sistema redox del plasmalema durante la reducción de HCF III no está acoplado directamente a la liberación de protones sino que ésta se realiza por una vía independiente como es la ATPasa del plasmalema.

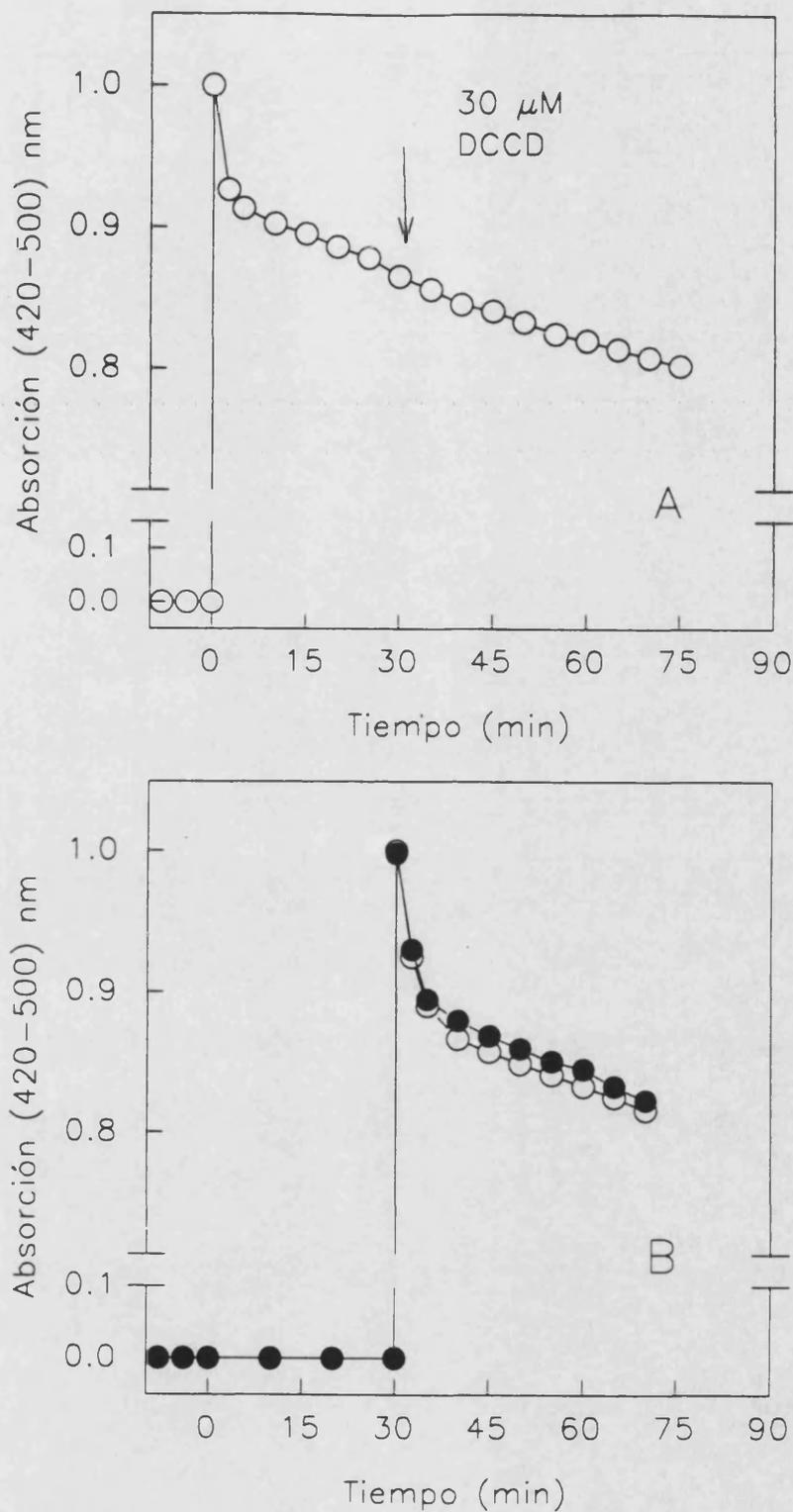


Figura 44. A): Efecto de la adición de 30 μM DCCD $t=30$ minutos en la reducción inducida por 1 mM HCF III a $t=0$ minutos. B): Efecto de la adición de 30 μM DCCD a $t=0$ (\odot) en la reducción de 1 mM HCF III a $t=30$ minutos (\bullet). Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de colcoptilos.

3.5. EL SISTEMA REDOX ACIDIFICA EL CITOPLASMA

El sistema redox y la ATPasa del plasmalema participan en el crecimiento por elongación.

La interacción entre el sistema redox y la ATPasa del plasmalema no es conocida.

La ATPasa del plasmalema puede estar regulada por el valor del pH citosólico. La oxidación de NADH citosólico por la actividad redox libera protones que acidifican el citosol. El pH citosólico podría ser uno de los sistemas de regulación, por lo tanto es interesante estudiar si la interacción del sistema redox y la ATPasa se produce mediante variaciones del pH citosólico.

El método utilizado en esta Memoria de Tesis Doctoral es el tratamiento con ClNH_4 . El NH_4Cl es una base fuerte que a pH 6.0 se encuentra disociada casi en su totalidad en la forma ionizada NH_4^+ . El transporte del ión NH_4^+ al citosol y su posterior disociación libera protones que acidifican el citosol.

3.5.1. EFECTO DEL NH_4Cl EN EL CRECIMIENTO POR ELONGACIÓN

La adición de diferentes concentraciones de NH_4Cl produce un aumento de la elongación total del coleoptilo, (Figura 45). El máximo efecto se obtiene para una concentración de 2.5 mM NH_4Cl . El NH_4Cl aumenta la velocidad de elongación en la fase I del crecimiento inducido por 10 μM IAA; y se obtiene una velocidad máxima para 2.5 mM NH_4Cl en el minuto 15 (Figura 45). En la Figura 46 se observa la estimulación relativa del NH_4Cl .

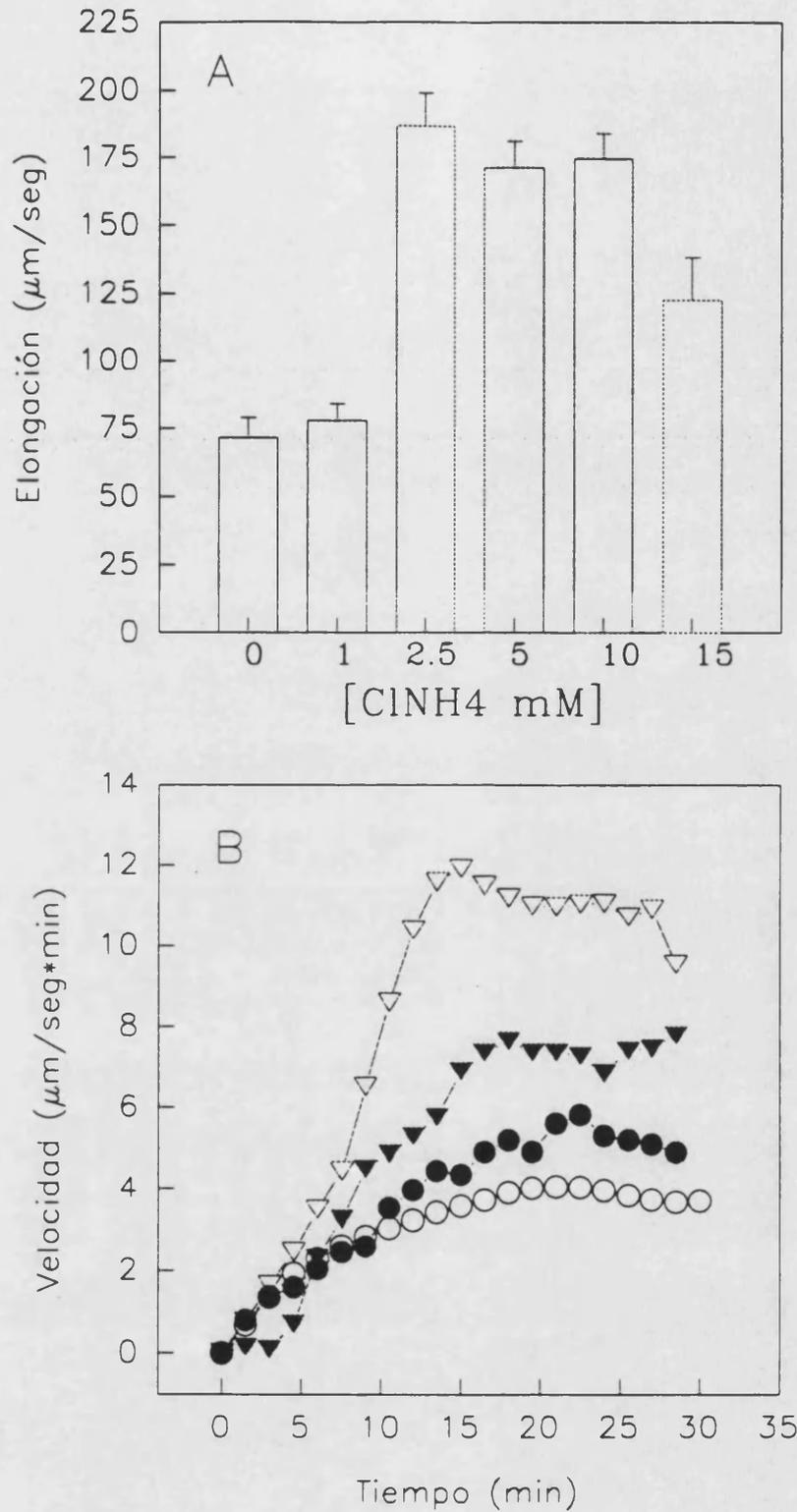


Figura 45. A): Dosis Respuesta del compuesto NH₄Cl el crecimiento por elongación inducido por 10 μM IAA. B): Efecto en la velocidad de elongación celular. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de colcoptilos (○,●,▽,▼); 1 mM NH₄Cl (●), 2.5 mM NH₄Cl (▽) ó 15 mM NH₄Cl (▼).

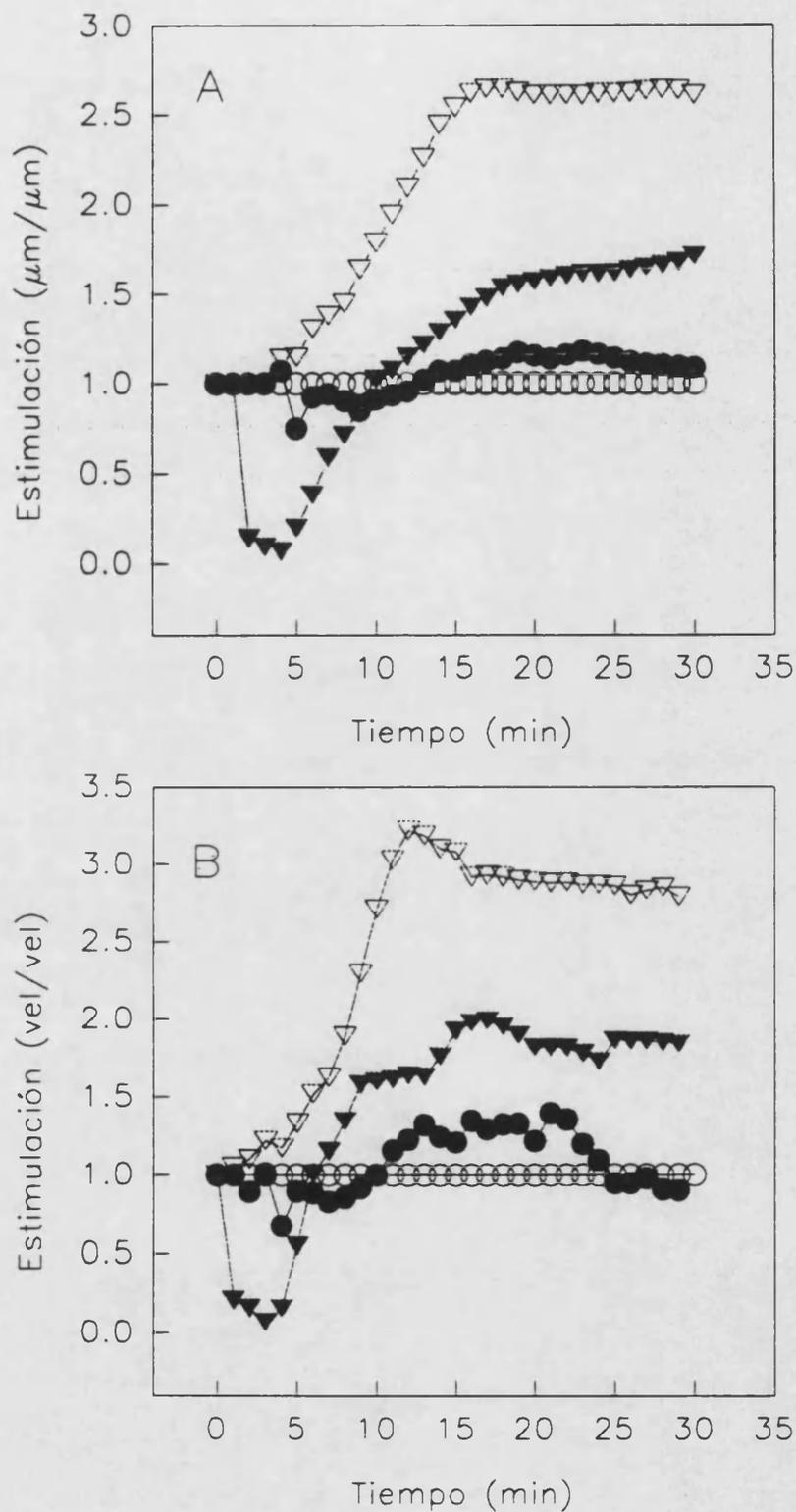


Figura 46. A): Estimulación relativa del crecimiento por elongación por el compuesto NH_4Cl . B): Efecto estimulador de la velocidad de crecimiento. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▽, ▼); 1 mM NH_4Cl (●); 2.5 mM NH_4Cl (▽) y 15 mM NH_4Cl (▼).

3.5.2. EFECTO DE LA ATEBRINA EN EL CRECIMIENTO INDUCIDO POR NH_4Cl

La adición de 100 μM atebrina inhibe el crecimiento por elongación (Figura 47).

Por contra, la adición de 5 mM NH_4Cl revierte el efecto inhibitor de la atebrina y produce incluso una estimulación del crecimiento inducido por 10 μM IAA.

La acidificación del citoplasma con NH_4Cl estimula el crecimiento. En presencia de atebrina que inhibe la NADH oxidasa y el crecimiento, el NH_4Cl revierte este efecto inhibitor por lo tanto la interacción del sistema redox y la ATPasa está mediada aparentemente por el pH del citosol. Aunque no se pueden excluir otros tipos de interacciones.

3.6. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA CALCIO CALMODULINA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL HCF III

El sistema calcio-calmodulina regula una gran variedad de actividades enzimáticas tanto en células animales como vegetales entre ellas se encuentran enzimas tales como ATPasas, NAD quinasas etc (Dieter y Marmé, 1980; Dieter y Marmé, 1984; Sane *et al.*, 1984). En esta sección vamos a tratar de relacionar el sistema calcio-calmodulina con la actividad del sistema redox y el flujo de protones a través de ATPasas (Gietzen *et al.*, 1983).

La extrusión de protones es regulada por el sistema calcio-calmodulina. La reducción de HCF III es dependiente de calmodulina. (Gietzen, 1983; Referencias en Crane *et al.*, 1991)

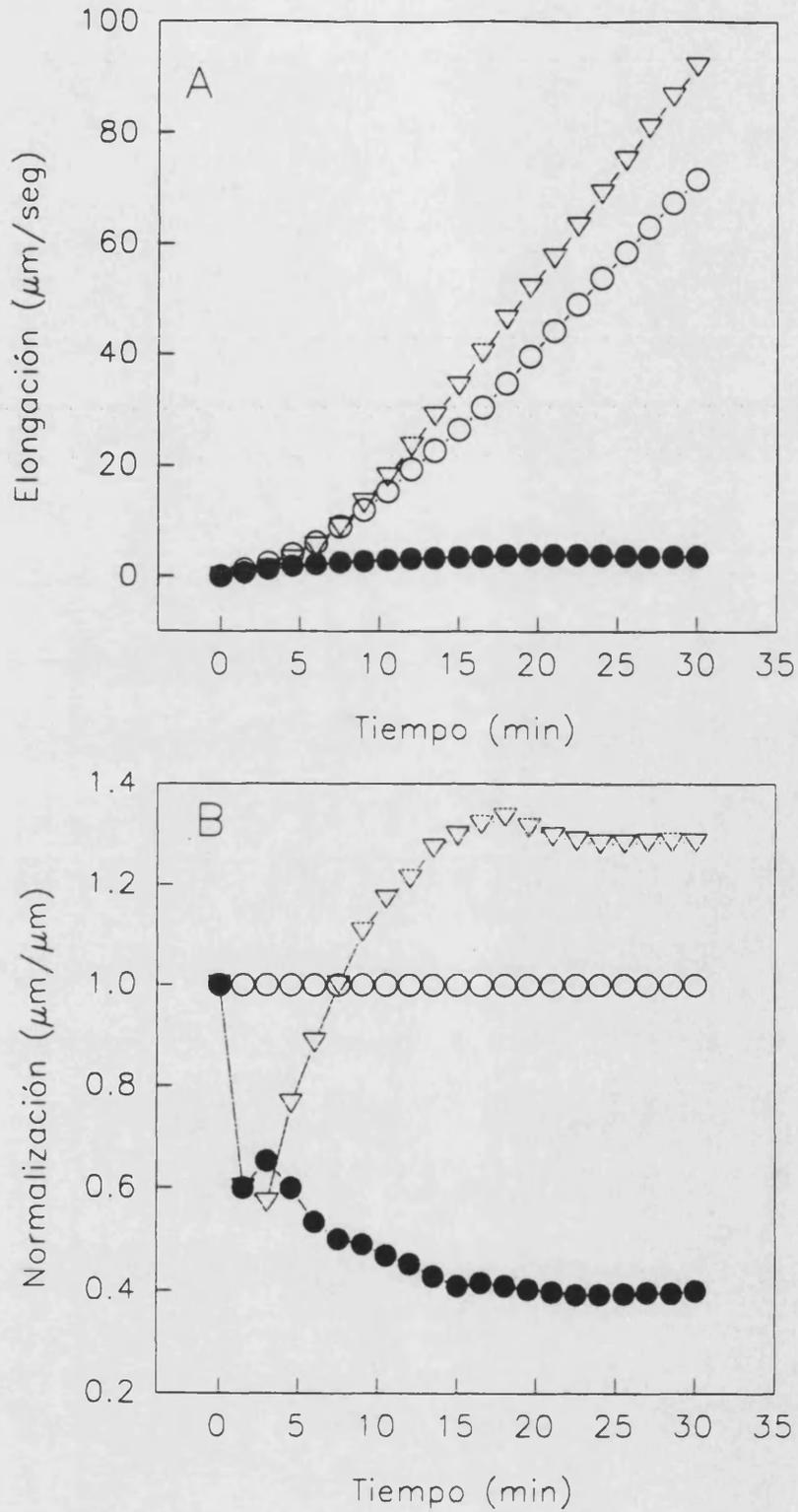


Figura 47. A): Efecto del compuesto NH₄Cl en el crecimiento por elongación inhibido por atebriina. B): Estimulación relativa de la velocidad de elongación. Mezcla de reacción: 43 ml HEPES 10 mM CaCl₂ 1 mM 10 μM IAA y 4 segmentos de coleoptilos (○, ●, ▽); 100 μM Atebrina (●) y 5 mM NH₄Cl (▽).

3.6.1. EFECTO ANTAGONISTAS DE CALMODULINA.

Los antagonistas de calmodulina presentan efectos laterales y por tanto es interesante completar el estudio de la participación del sistema calcio-calmodulina en la reducción de HCF III y extrusión de protones mediante un antagonista con pocos efectos laterales. El antagonista que reúne estas condiciones es el calmidazolium (González-Darós *et al.*, 1993)

El calmidazolium, también llamado compuesto R-24571, es un inhibidor de la calmodulina por unión específica que a concentraciones bajas no afecta a la permeabilidad de la membrana (Björkman y Leopold, 1987). El calmidazolium inhibe el crecimiento por elongación en coleoptilos de maíz.

La adición de 30 μM calmidazolium produce una inhibición de la extrusión de protones en presencia de HCF III (Figura 48); esta inhibición aumenta con el tiempo de incubación y concentración de calmidazolium (Datos no presentados).

La inhibición de la extrusión de protones medida en presencia de HCF III es similar a la observada en coleoptilos de avena en presencia de IAA (González-Darós *et al.*, 1993).

La inhibición máxima alcanza valores de 98.2 % al cabo de 60 minutos de incubación (Figura 48).

El compuesto calmidazolium también afecta a la reducción de 1 mM HCF III. La cinética de reducción se presenta en la Figura 49.

La dosis respuesta del Calmidazolium en la inhibición de la reducción del HCF III se representa en la Figura 50.

La inhibición aumenta con la concentración de inhibidor alcanzando un IC_{50} de aproximadamente 10 μM .

Estos resultados parecen indicar que el sistema redox del plasmalema podría estar regulado por el sistema calcio-calmodulina.

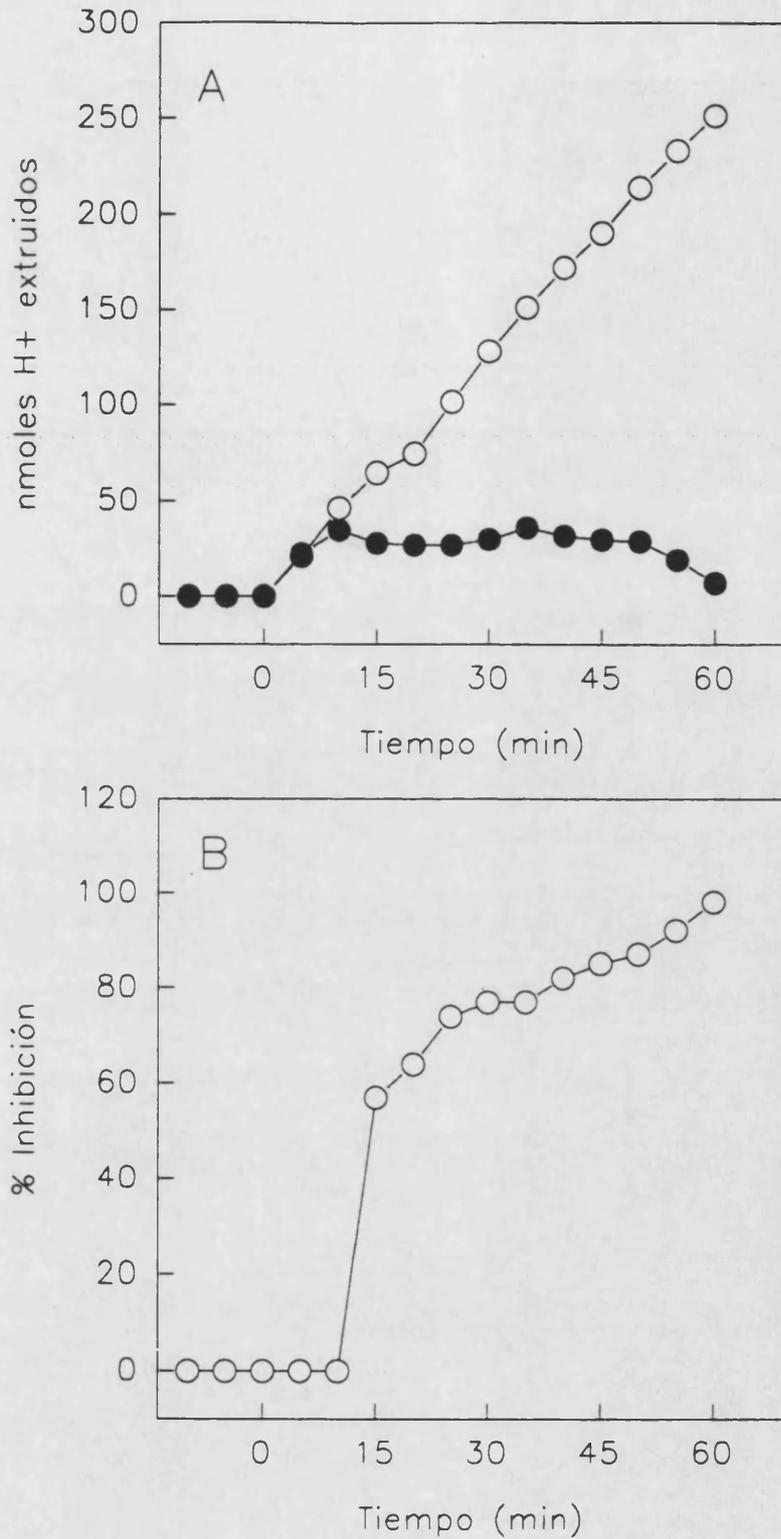


Figura 48. A): Efecto del compuesto Calmidazolium en la extrusión de protones inducida por 1 mM HCF III en presencia de 10 μ M IAA. B): Cinética de Inhibición del compuesto calmidazolium. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl₂ CaCl₂ 4 mM 10 μ M IAA y 60 segmentos de coleoptilos (○,●); 1 mM HCF III (○) y 30 μ M Calmidazolium (●).

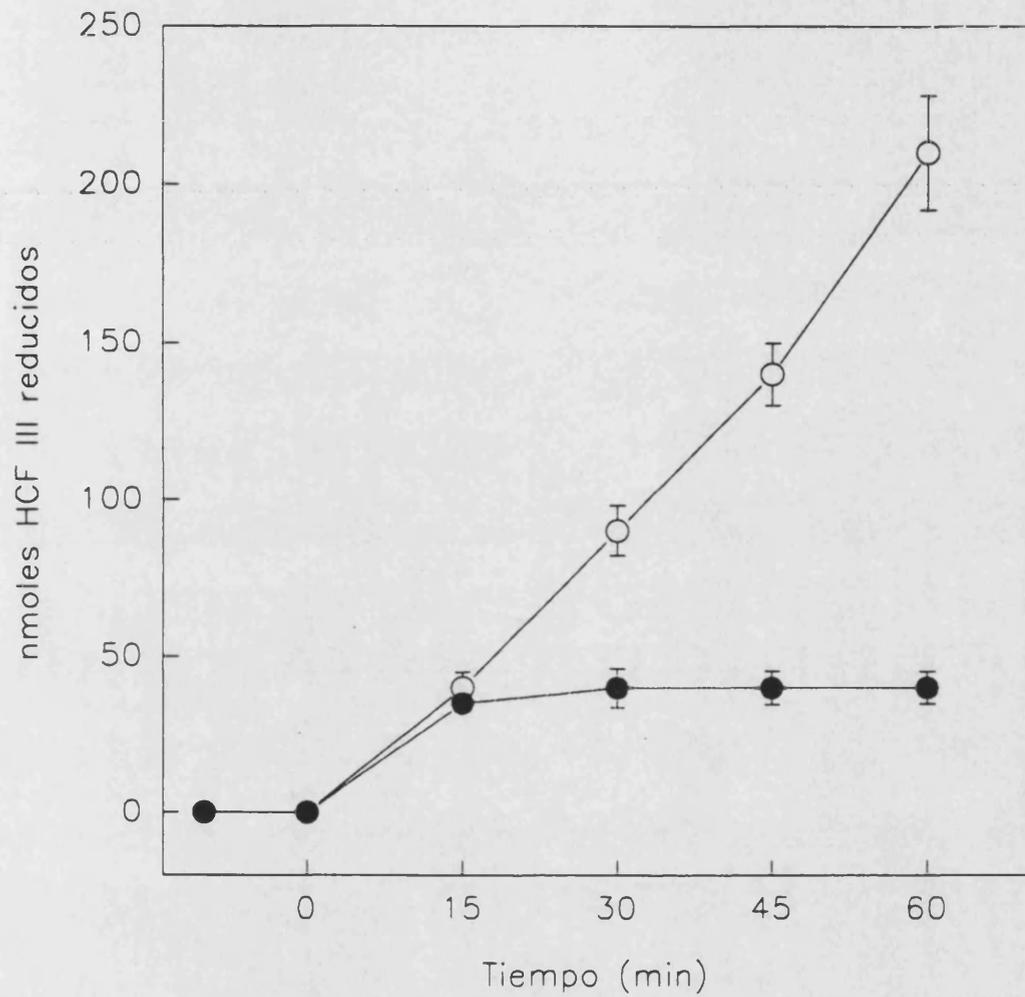


Figura 49. Efecto del compuesto Calmidazolium en la reducción de 1 mM HCF III en presencia de 10 μ M IAA. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μ M IAA y 60 segmentos de coleoptilos (○,●); 1 mM HCF III (○) y 30 μ M Calmidazolium (●).

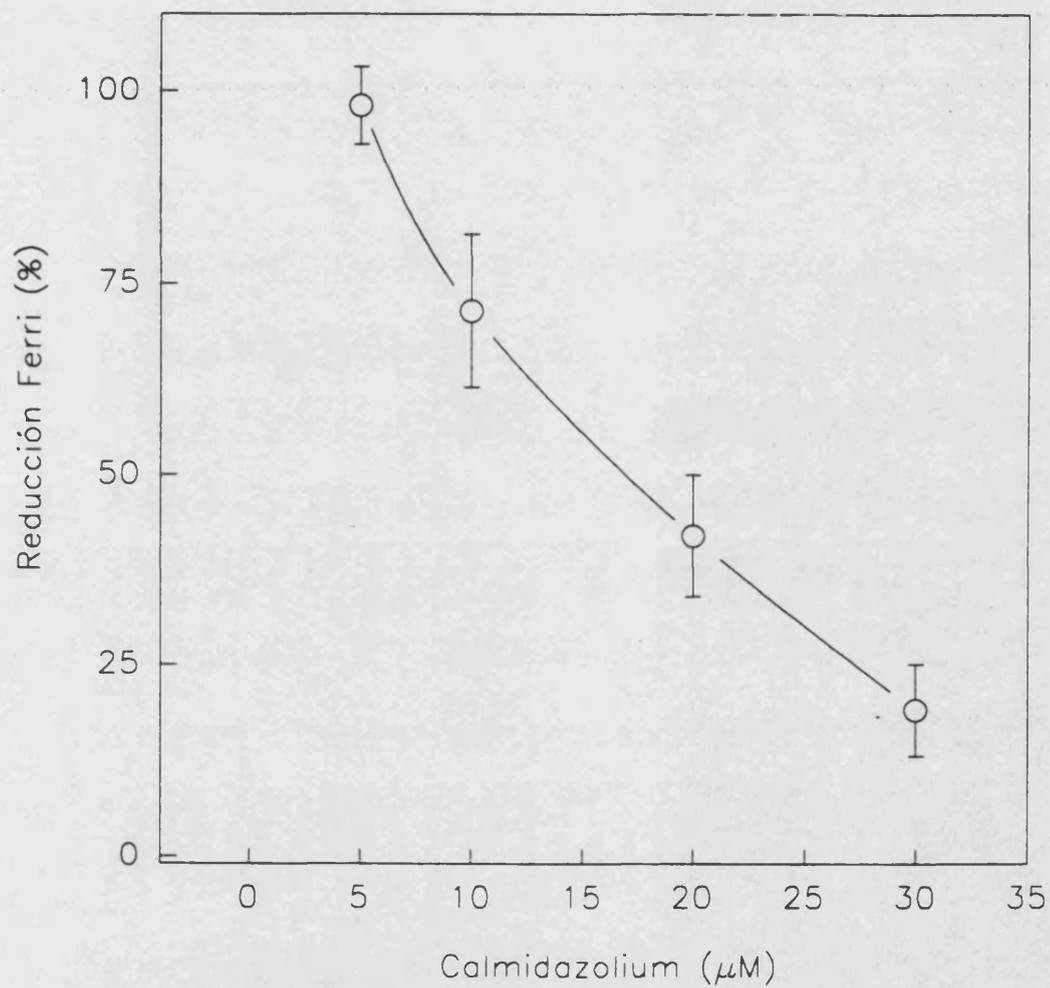


Figura 50. Dosis respuesta del compuesto Calmidazolium en la reducción de 1 mM HCF III. Mezcla de reacción: 10 ml HEPES 1 mM CaCl_2 4 mM 10 μM IAA y 60 segmentos de coleoptilos.

4. DISCUSSION

4. DISCUSIÓN

En el estudio de la actividad del sistema redox del plasmalema se han empleado diferentes aceptores exógenos de electrones (Crane *et al.*, 1985). En esta Memoria de Tesis Doctoral se ha utilizado el compuesto HCF III, ya que, no es transportado al citosol (Tabla I) y por ello no afecta la actividad NAD(P)H-HCF III oxido reductasa de la cara interior del plasmalema (Crane *et al.*, 1991). Su reducción es determinada por el incremento de $A_{420-500}$ (Figura 29), la forma reducida (HCF II) es incolora y por tanto no interfiere en las determinaciones espectrofotométricas y finalmente su reducción no implica la liberación de protones.

Los efectos del HCF III en la elongación celular y la extrusión de protones se ha realizado en coleoptilos de maíz y avena e hipocotilos de soja.

Se han elegido estos tejidos, porque son unos sistemas en los que el efecto del IAA ha sido relativamente bien estudiado (p.e. Kutschera y Schopfer, 1985a; Lüthen *et al.*, 1990; Cleland, 1987; Brightmann *et al.*, 1987a y 1987b).

El enfoque utilizado en esta Memoria de Tesis Doctoral difiere de los estudios realizados anteriormente en dos aspectos fundamentales:

1.- Se ha estudiado la cinética a tiempos cortos (0.5-4 horas) frente a valores de medida de 15-48 horas (Rubinstein y Stern, 1986; Craig y Crane, 1985b; Federico y Giartosio, 1983).

2.- Se ha utilizado un medidor de desplazamiento que permite determinaciones inferiores a 1 μm /segmento, por el contrario las determinaciones realizadas hasta ahora emplean la medida directa de la longitud del tejido y su sensibilidad es inferior a 500 μm .

Este enfoque experimental ha permitido observar, por primera vez, que el tratamiento con HCF III estimula significativamente el crecimiento por elongación celular en presencia y ausencia de IAA (Figuras 5, 6, 12 y 13). Esta estimulación se observa en la fase I y en la fase II (Figuras 4, 5 y 7).

La estimulación óptima se ha observado a concentraciones entre 5 mM y 10 mM. Concentraciones superiores tienen un efecto inhibitorio ya que aumentan la fase de latencia y además disminuyen el crecimiento total (Tablas III y IV).

Aparentemente el efecto inhibitorio observado a concentraciones superiores 10 mM de HCF III puede estar relacionado con un efecto osmótico o bien un aumento de la concentración de iones potasio en la mezcla de reacción. No obstante, no pueden excluirse otros efectos laterales. Es necesario destacar que las concentraciones de HCF III que estimulan la elongación son las que se utilizan como aceptor de electrones del sistema redox en células, protoplastos y vesículas de plasmalema (Crane *et al.*, 1984; Böttger y Lüthen, 1986; Buckhout y Luster 1990).

La estimulación del crecimiento no tiene lugar cuando los coleóptilos se tratan con HCF II (Figuras 4 A y B). Por lo tanto, la presencia de HCF II ó iones potasio no son necesarios para la estimulación del crecimiento por elongación.

La estimulación del crecimiento se observa tanto en la fase I (adición $t=0$ min) (Figuras 4 y 5) como en la fase II (adición $t=120$ min) del crecimiento dependiente de IAA (Figura 7).

La readición de 1 mM HCF III al cabo de 30 minutos, produce una estimulación transitoria y rápida del crecimiento (Figura 9). Esta concentración se ha elegido porque es una concentración subóptima, de forma que la readición no aumente la concentración de HCF III ya existente ($t=0$) hasta concentraciones con efecto inhibitorio.

Posteriores adiciones al cabo de 60 minutos producen una menor estimulación del crecimiento (datos no presentados).

Estos datos experimentales sugieren que el efecto estimulador puede ser producido por readiciones sucesivas del aceptor de electrones, HCF III.

La abrasión del coleóptilo puede producir modificaciones importantes en la cinética de crecimiento y magnitud de la elongación (Kutschera y Schopfer, 1985b).

El efecto de la abrasión ha sido estudiado mediante: la observación microscópica con el fin de identificar posibles daños en la cutícula por fricción mecánica y el estudio

comparativo de la elongación en coleoptilos intactos y sometidos a abrasión con alúmina.

La abrasión con óxido de alúmina produce únicamente una disminución del espesor de la cutícula externa sin que se aprecien daños en las células epidérmicas (Fotos 3 y 4). De modo similar, la abrasión con CSi produce escasos daños en los coleoptilos de maíz (Lüthen *et al.*, 1990). Este resultado contrasta con los obtenidos en otros métodos de abrasión que producen daños importantes en las células de los coleoptilos.

En coleoptilos intactos de maíz (sin abrasión) la adición de HCF III estimula el crecimiento (Figuras 14, 15, 24 y 25). Aunque se aprecian diferencias en la fase de latencia y elongación, se concluye que la estimulación de la elongación en presencia de HCF III no es debida a la abrasión.

Este efecto estimulador del crecimiento ha sido estudiado también en coleoptilos de avena e hipocotilos de soja (Figuras 20, 21, 22 y 23). La cinética de la elongación es dependiente del tejido y de la especie vegetal (Vesper y Evans, 1987; Brummer *et al.*, 1984). En ambos tejidos estudiados (coleoptilos de avena e hipocotilos de soja), el HCF III estimula significativamente el crecimiento. Por consiguiente se concluye que el efecto estimulador del HCF III se observa en los tejidos estudiados que presentan un tipo de crecimiento rápido. Es de destacar que el efecto estimulador en estos tejidos se observa también en ausencia de IAA (datos no presentados).

Por otro lado, otros aceptores de electrones del sistema redox del plasmalema como el 2,4 DCP, también han sido estudiados observándose una estimulación del crecimiento, indicando que los efectos estimuladores no son exclusivos del HCF III.

El efecto estimulador del HCF III en células vegetales no ha sido observado hasta ahora. El tratamiento con HCF III por el contrario inhibe el crecimiento en *Lemna gibba* (Thanaka y Cleland, 1980), en células aisladas de raíz de zanahoria y ápices de raíz de maíz (Crane *et al.*, 1989). Las razones de la discrepancia con los resultados de esta Memoria de Tesis Doctoral no se conoce todavía, pero probablemente son debidos a que el crecimiento es medido al cabo de un período de

tiempo que va desde horas a días o a la falta de precisión en la medida de la longitud así como a la concentración de HCF III empleada.

Por otra parte Polevoy y Salamatova (1977) han observado que el tratamiento de coleoptilos de maíz con HCF III (50 mM) durante 5 horas inhibe el crecimiento endógeno y el estimulado por IAA. Estos resultados están de acuerdo con los datos de la Tablas III y IV, en el que se aprecia que el crecimiento se inhibe por esta concentración de HCF III. Este efecto inhibitor solamente se observa a altas concentraciones y posiblemente es debido a un efecto de la concentración o a otros efectos laterales del HCF III, como ya se ha discutido anteriormente.

Morré *et al.* (1988c), han observado que el HCF III (0.01 a 500 mM) durante 16 horas de incubación no afecta al crecimiento en hipocotilos de soja. Estos resultados contrastan con los datos de las figuras 23 y 24 en los que se aprecia una estimulación significativa del crecimiento en presencia de 5 mM HCF III, en este mismo tipo de tejido.

Las motivos de esta discrepancia posiblemente es debida al método empleado para medir el efecto estimulador del HCF III. En presencia de IAA el efecto estimulador del HCF III disminuye con el tiempo de incubación (Figura 6 A) y por tanto es posible que la estimulación de crecimiento al cabo de 15 horas no pueda ser detectada por la medida de la longitud total del segmento de hipocotilo.

Recientemente Lüthen y Böttger (1993) han observado que en ausencia de IAA y medio de reacción sin tamponar, el HCI IV y el HBI IV aceptores de electrones del sistema redox estimulan el crecimiento en coleoptilos de maíz al cabo de una fase de latencia de 40 minutos. En presencia de IAA ó medio débilmente tamponado no se observa este efecto estimulador. Dado que el HCI IV y HBI IV solamente estimulan el crecimiento al cabo de 40 minutos de incubación y en ausencia de IAA, es difícil concluir que el sistema redox de la membrana esté implicado en la regulación del crecimiento.

De todos estos resultados se puede concluir que en esta Memoria de Tesis Doctoral se presenta la primera demostración de la estimulación del crecimiento por

elongación celular por parte de un aceptor de electrones externo e impermeable del sistema redox de la membrana plasmática.

La estimulación del crecimiento inducido por la adición de HCF III exógeno puede estar mediada por un mecanismo diferente e independiente del crecimiento observado en presencia o ausencia de IAA. Si esta hipótesis de trabajo es correcta, el crecimiento observado en presencia de HCF III debe ser insensible a CH y DCCD, inhibidores del crecimiento por elongación. No obstante, esta posibilidad se ha rechazado, dado que en presencia de HCF III el crecimiento es completamente inhibido por DCCD y CH tanto en presencia como en ausencia de IAA (Tabla V). Estos resultados, y el hecho que el HCF III no afecta a la cinética de elongación (Figuras 4, 5, 11 y 12) sugieren que el HCF III estimula la magnitud de un crecimiento que ya tiene lugar en su ausencia.

La estimulación del crecimiento está acompañada por la reducción de HCF III (Figuras 5 y 29). La reducción de HCF III se realiza por el sistema redox del plasmalema (HCF III óxido-reductasa) que utiliza NADH (Lin, 1984; Morré *et al.*, 1988b) o NAD(P)H (Krüger y Böttger, 1988) como donador citosólico de electrones. La reducción de HCF III indica que este proceso es limitante y su actividad regula el crecimiento. Esta interpretación está de acuerdo con los resultados del grupo de Böttger en los que la extrusión de protones está mediada a por una NADH-oxidasa que posee una baja afinidad por el oxígeno (Böttger y Lüthen, 1986).

La hipótesis de la regulación del crecimiento por la actividad NAD(P)H-HCF III oxido-reductasa, se puede contrastar mediante el empleo de inhibidores específicos de este proceso.

La atebrina inhibe la reducción de HCF III (Blein *et al.*, 1986) y la NADH-oxidasa de tipo I (Brightman *et al.*, 1988). El tratamiento con atebrina inhibe la elongación tanto en presencia como en ausencia de IAA (Figuras 16 y 18). La inhibición causada por el tratamiento de atebrina, disminuye con el tiempo de incubación (Blein *et al.*, 1986), que es el resultado de la inactivación progresiva del compuesto cuando es transportado al interior de la célula.

De igual modo el inhibidor de la actividad NAD(P)H-HCF III oxido-reductasa, acetato de p-nitrofenilo, disminuye el crecimiento inducido por IAA (Morré *et al.*, 1989).

En coleoptilos de maíz la reducción de HCF III produce una estimulación de la acidificación de la mezcla de reacción (Figuras 35 y 36). Este efecto ya ha sido observado en diferentes tejidos vegetales (Rubinstein y Stern, 1986; Craig y Crane, 1985). Esta acidificación comienza inmediatamente tal como se ha observado en células cultivadas de zanahoria y coleoptilos de avena (Rubinstein y Stern, 1986). El mecanismo de la acidificación de la fase externa en presencia de HCF III está sujeto a controversias. Dos hipótesis de trabajo han sido propuestas para explicar el origen de esta acidificación:

a) El flujo de electrones en la membrana plasmática durante la reducción de HCF III, está asociado a una bomba o canal de H^+ que es independiente de la ATPasa del plasmalema (Böttger y Lüthen, 1986).

b) La reducción del HCF III está asociada a la acidificación del citosol y posterior activación de la ATPasa del plasmalema (Rubinstein y Stern, 1986; Morré *et al.*, 1986).

La contrastación de esta hipótesis de trabajo se ha realizado en esta Memoria de Tesis Doctoral mediante el estudio de la estequiometría H^+/e^- (Figura 40) (Tabla VIII) y el efecto del inhibidor de la ATPasa del plasmalema DCCD en la reducción del HCF III (Figura 44).

Si el sistema redox del plasmalema acidifica la mezcla de reacción durante la reducción de HCF III por un mecanismo independiente de la ATPasa del plasmalema, la estequiometría H^+/e^- , debe ser constante, y nulo el efecto del DCCD.

Por el contrario, si la acidificación es realizada por la ATPasa del plasmalema, la estequiometría H^+/e^- debe ser variable y el tratamiento con DCCD debe inhibir la acidificación.

Los resultados obtenidos (Figuras 43 y 44) demuestran que el tratamiento con DCCD inhibe la acidificación y la estequiometría H^+/e^- , no es constante (Figuras 40

y 41). Estas evidencias experimentales permiten concluir que la acidificación producida durante la reducción de HCF III está realizada por la ATPasa del plasmalema, y por tanto, se confirma la hipótesis de trabajo (Rubinstein y Stern, 1986; Morré *et al.*, 1986). La estequiometría H^+/e^- , es calculada como el cociente entre los protones extruidos y el HCF II formado (Tabla VIII) y por ello difíciles de comparar con los datos presentados en esta memoria (Tablas VII y VIII, Figuras 40 y 41). Sin embargo resultados similares han sido obtenidos en raíces de maíz por Rubinstein y Stern (1986). Por otro lado, la discrepancia en la estequiometría H^+/e^- puede resolverse mediante el estudio de la relación H^+/e^- durante la incubación con HCF III.

El mecanismo de interacción entre el sistema redox y la ATPasa del plasmalema no es conocido. Se ha propuesto la participación del pH citoplasmático en esta interacción (Rubinstein y Stern, 1986; Morré *et al.*, 1986).

La modificación del pH citosólico, mediante el NH_4Cl , ha permitido comprobar la participación del pH citosólico en la regulación del crecimiento por elongación.

Se admite actualmente que el crecimiento por elongación inducido por auxina es debido al flujo de protones desde el citoplasma hasta la pared celular (Hager y Moser, 1985). El descenso del pH en la pared celular lleva consigo una modificación de las propiedades que conduce a una aceleración del crecimiento (hipótesis de crecimiento ácido).

Las células vegetales poseen un transportador de NH_4^+ (Raven y Farquhar, 1981), mientras que la forma neutra NH_3 , difunde libremente a través de la membrana plasmática. A pH 6.0, el ión NH_4^+ se encuentra disociado en NH_4^+ (99.94 %) y NH_3 (0.0562 %). Estos datos indican que en las condiciones experimentales empleadas (pH 6.0, 5 mM NH_4Cl) la forma neutra NH_3 no es transportada debido a su baja concentración.

Por el contrario el transporte de NH_4^+ y su disociación en el citosol (pH aproximado 7.5), da lugar a una acidificación del citoplasma.

La estimulación del crecimiento en presencia de NH_4Cl (Figura 45) sugiere la que la acidificación del citosol es un proceso esencial en el crecimiento. Posiblemente

la estimulación de la elongación en presencia de ácidos permeantes puede ser debida a la acidificación del citosol (Hager y Moser, 1985). Aunque también puede ser debida a un crecimiento ácido (Hager *et al.*, 1971).

En presencia 100 μM de atebrina, que inhibe la oxidación de NADH y por tanto la actividad del sistema redox, se inhibe el crecimiento por elongación celular. La adición de NH_4Cl a una muestra incubada en presencia de atebrina, revierte la inhibición de la elongación (Figura 47). Se concluye que la interacción entre el sistema redox de la membrana plasmática y la ATPasa aparentemente es debido a la acidificación del citosol.

Por otra parte, se ha determinado la existencia de una óxido-reductasa sensible a calmodulina (Elliott *et al.*, 1983; Crane *et al.*, 1986). Los antagonistas de calcio-calmodulina inhiben la extrusión de protones (González-Darós *et al.*, 1993) y la elongación (en presencia de IAA, datos no presentados) (Ragothama *et al.*, 1985) sin embargo, presentan otros efectos laterales como son el aumento de la permeabilidad de membrana, aumento de la capacidad tampón (González-Darós *et al.*, 1993).

El compuesto calmidazolium a concentraciones inferiores a 20 μM presenta estos efectos negligibles, por este motivo, ha sido empleado para estudiar si la reducción de HCF III es un proceso dependiente de calmodulina.

La reducción de HCF III se inhibe por tratamiento con calmidazolium ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) (Figura 50). Estos resultados indican que la reducción de HCF III es dependiente del sistema calcio-calmodulina. La inhibición de la actividad NAD(P)H-HCF III oxido-reductasa por calmodulina permite explicar que los efectos sobre la extrusión de protones y la elongación celular aparentemente están asociados a la inhibición del sistema redox del plasmalema.

Los resultados obtenidos en esta Memoria de Tesis Doctoral, demuestran que el sistema redox de la membrana plasmática regula el crecimiento por elongación y se propone la hipótesis de trabajo que se resume en el esquema de la Figura 51.

En este esquema se representa el medio externo, la pared celular, la membrana plasmática y el citosol.

En la membrana plasmática se incluye el sistema redox y el sistema ATPasa. El HCF III acepta los electrones del sistema redox mediante la oxidación del NAD(P)H citosólico. Este proceso, da lugar a una liberación de protones al citoplasma que produce un descenso en el pH citoplasmático que activa el sistema ATPasa de la membrana plasmática y como consecuencia el crecimiento por elongación (hipótesis crecimiento ácido).

La adición de HCF III estimula el sistema de crecimiento ya existente debido a un incremento de la acidificación del citosol.

El compuesto atebrina inhibe la elongación celular y su efecto se revierte por la adición del compuesto NH_4Cl . El NH_4^+ es transportado al interior de la célula, y su disociación produce una acidificación del citosol que estimula el crecimiento por elongación.

Este modelo actualmente está en fase de contrastación. Sin embargo, son también posibles otras interacciones entre el sistema redox y el sistema ATPasa de la membrana plasmática.

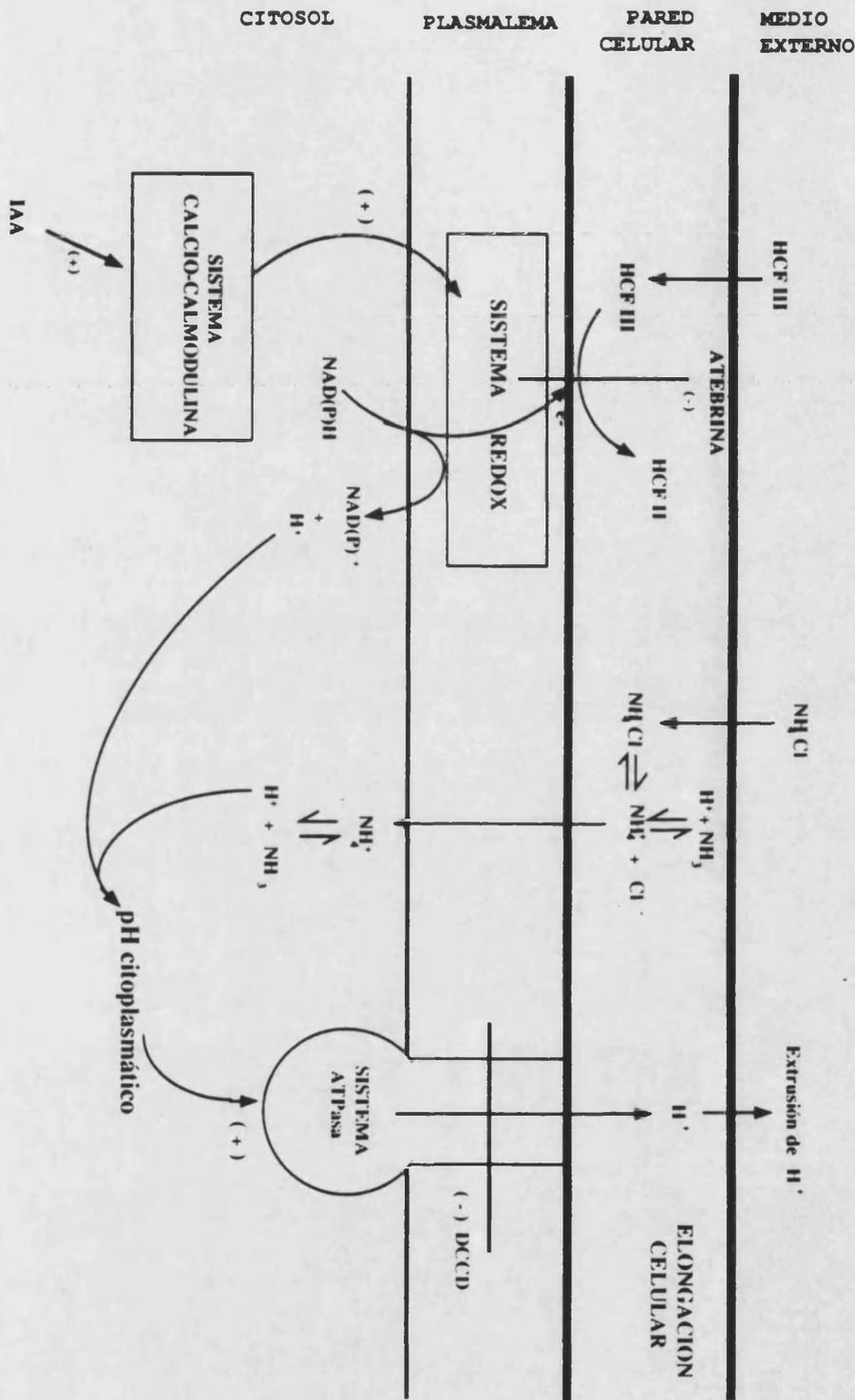


Figura 51. Esquema de la hipótesis propuesta: El sistema redox del plasmalema regula el crecimiento por elongación en células vegetales.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La adición de HCF III exógeno estimula significativamente el crecimiento por elongación celular en coleoptilos de maíz y avena y en hipocotilos de soja.

2. La atebrina, inhibidor de actividad NADH-oxidasa tipo I, bloquea la elongación celular, tanto en presencia como en ausencia de HCF III.

3. La estimulación de la elongación celular está asociada a la estimulación del sistema ATPasa de la membrana plasmática.

4. La acidificación del citoplasma mediante el tratamiento con NH_4Cl produce la recuperación de la inhibición observada en presencia de atebrina y un aumento del crecimiento por elongación.

5. La actividad del sistema redox, modulada por el sistema calcio-calmodulina, regula la elongación celular.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

ALONI, R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* 150: 255-263.

ALTABELLA, T.; PALAZON, J.; IBANS, E.; PIÑOL, M.T. y R. SERRANO. 1990. Effect of auxin concentration and growth phase on the plasma membrane H⁺-ATPase of tobacco calli. *Plant Sci.* 70: 209-214.

ALLNUTT, F.C.T. y W.D. BONNER Jr. 1987a. Characterization of iron uptake from ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 85: 746-750.

ALLNUTT, F.C.T. y W.D. BONNER Jr. 1987b. Evaluation of reductive release as a mechanism for iron uptake from ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 85: 751-756.

ANGELINI, R. y R. FEDERICO. 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.* 135: 212-217.

ASKERLUND, P.; LARSSON, C. y S. WIDELL. 1988. Location of donor and acceptor sites of NADH dehydrogenase activities using inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles from plants. *FEBS Lett.* 239: 23-28.

BARR, R.; F.L. CRANE y T.A. CRAIG. 1984. Transmembrane ferricyanide reduction by tobacco callus cells. *J. Plant Growth Regul.* Vol. II: 243-249.

BARR R.; B. STONE; D.A. CRAIG y F. L. CRANE. 1985a. Evidence for calcium calmodulin control of transplasmalemma electron transport in carrot cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126:262.

BARR, R. y F.L. CRANE. 1985b. Ca^{2+} -Calmodulin antagonists affect plant growth regulator controlled plasma membrane redox in carrot cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 262-268.

BARR R.; M. BÖTTGER y F.L. CRANE. 1990. The effect of selected inhibitors on plasma membrane redox reactions and associated protons excretion by carrot cells. *Plant Sci.* 69: 33.

BATES, G.W. y R.E. CLELAND. 1979. Protein synthesis and auxin-induced growth: Inhibition studies. *Planta* 145: 437-442.

BIENFAIT, H.F. 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant cells and their function in iron uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* 17: 73-83.

BIENFAIT, H.F. 1988. The turbo reductase in plant plasma membrane. In: *Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth*. Crane, F.L.; Morré, D.J: y H. Löw (eds.), pp. 89-93. Plenum Press. New York.

BJÖRKMAN, T. y A.C. LEOPOLD, 1987. Effect of inhibitors of auxin transport and calmodulin on a gravisensing-dependent current in maize roots. *Plan Physiol.* 84: 847-850.

BLEIN J.P.; M.C. CANIVENC; X De CHERADE; M. BERGON; J.P. CALMON y R. SCALLA. 1986 Transplasma membrane ferricyanide reduction in sycamore cells. Characterization of the system and inhibition by some phenyl biscarbamates. *Plant Sci.* 46,77.

BÖTTGER, M.; M. BIGDON y H-J. SOLL. 1985a. Proton translocation in corn coleoptiles: ATPase o redox chain? *Planta.* 163: 373-308.

BÖTTGER, M.; H-J. SOLL. y M. BIGDON 1985b. Influence of inhibitors or alternative respiration pathway and oxygen on growth and proton secretion. *Biol. Plant. (Praha).* 27: 125-130.

BÖTTGER, M. 1986. Proton translocation systems at the plasmalemma and its possible regulation by auxin. *Acta Horticult.* 179: 83-93.

BÖTTGER, M. y H. LÜTHEN. 1986. Possible linkage between NADH-oxidation and proton secretion in *Zea mays* L. roots. *J. Exp. Bot.* 37: 666-675.

BÖTTGER, M. 1989. Transmembrane electron transfer of NADH loaded right-side-out vesicles. In: *Plant Membrane Transport: The Current Position.* Dainty, J.; De Michelis, M.I.; Marré, E. y F. Rasi-Caldogno (eds.), pp. 55-60. Elsevier. Amsterdam.

BOUCHET, M.H.; PRAT, R. y R. GOLDBERG. 1983. Kinetics of indole acetic acid-induced growth in hypocotyl sections of *Vigna radiata*. *Physiol. Plant.* 57: 95-100.

BOYDE, A., 1980. Pros and Cons of Critical Point Drying and freeze Drying for SEM. In: *Scanning Electron Microscopy.* A.M.F. O'Hare. Chicago. IL 60666 pp. 303-314.

BOYER, J.S. 1985. Water transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 473-516.

- BREMER, J.M.; A.J. PESCE y R.B. ASHWORTH. 1974. *Experimental Techniques in Biochemistry*, cap. 7. Prentice-Hall.
- BREVIARIO, D.; GIANI, S.; DI VIETRI, P. y I. COROGGIO. 1992. Auxin and growth regulation of rice coleoptiles segments. *Plant Physiol.* 98: 488-495.
- BRIGGS, W.R. y M. ILMO. 1983. Blue light absorbing photoreceptors in plants. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 303: 347-351.
- BRIGHTMAN A.O.; R. BARR; F. L. CRANE y D.J. MORRÉ. 1987a. Auxin stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean. *J. Cell Biochem. (Supl.)* 11b: 93.
- BRIGHTMAN A.O.; R. BARR; F. L. CRANE y D.J. MORRÉ. 1987b. Auxin stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean. *Plant Physiol.* 86: 1264-1269.
- BRIGHTMAN A.O.; R. BARR; F. L. CRANE y D.J. MORRÉ. 1988. Auxin stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean. *Plant Physiol.* 86: 1264.
- BRISKIN, D.P. y J.B. HANSON. 1992. How does the plant plasma membrane H⁺-ATPase pump protons ?. *J. Exp. Bot.* 43: 269-289.
- BRUMMELL, D.A. 1986. Cell wall acidification and its role in auxin-stimulated growth. *J. Exp. Bot.* 37: 270-276.
- BRUMMER, B.; POTRYKUS, I. y R.W. PARISH. 1984. The role of cell wall acidification and proton-pump stimulation in auxin-induced growth: studies using monensin. *Planta* 162: 345-352.

BRUMMER, R. y R.W. PARISH. 1983. Mechanisms of auxin induced plant cell elongation. FEBS Lett. 161: 9-13.

BUCKHOUT, T.J.; YOUNG, K.A.; LÖW, P.S. y D.J. MORRÉ. 1981. *In vivo* promotion by auxins of divalent ion release from soybean membranes. Plant Physiol. 68: 512-515.

BUCKHOUT, T.J. Y H. LUSTER. 1988. Purification of NADH-HCF III and NADH-duroquinone reductases from maize (*Zea mays* L.) root plasma membrane in Plasma Membrane Oxidoreductase in control of animal and Plant Growth, Crane F.L.; Morré, D.J. y Löw H. (Eds). Plenum Press, New York.

CARRASCO-LUNA, J.; A. CALATAYUD; F. GONZÁLEZ-DARÓS y S. DEL VALLE-TASCÓN, 1993. Potassium Ferricyanide stimulates corn coleoptiles growth. Plant Physiol, 102 (Supp), p. 169.

CARRINGTON, C.M.S. y J. ESNARD. 1988. The elongation response of watermelon hypocotyls to indole-3-acetic acid: A comparative study of excised segments and intact plants. J. Exp. Bot. 39: 441-450.

CASTIGNETTI, D. y J. SMARRELLI Jr. 1986. Siderophores, the iron nutrition of plants and nitrate reductase. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. Vol. 209. 147-151.

CAUBERGS, R.J.; ASARD, H.H. y J.A. DE GREEF. 1988. b-type cytochromes, light and NADH dependent oxidoreductase activities in plant membranes. In: Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth. Crane, F.L.; Morré, D.J. y H. Löw (eds.), pp. 273-285. Plenum Press. New York.

CLELAND, R.E. 1971. Cell wall extension. Annu. Rev. Plant Physiol. 22: 197-222.

CLELAND, R.E. 1973. Auxin-induced hydrogen ion-secretion in *Avena* coleoptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3092-3093.

CLELAND, R.E. 1975. Auxin-induced hydrogen ion secretion: correlation with growth and control by external pH and water stress. *Planta* 127: 233-242.

CLELAND, R.E. 1977. The control of cell enlargement. In: *Integration of Activity in the Higher Plant*. Jennings, D.H. (ed.), pp. 101-115. Cambridge Press. Cambridge.

CLELAND, R.E. 1981. Wall extensibility: hormones and wall extension. In: *Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates. Extracellular Carbohydrates*. Taner, W. y F.A. Loewus (eds.), Vol. II pp. 255-273. Springer-Verlag. Heidelberg.

CLELAND, R.E. 1987. Auxin and cell elongation. In: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Davies, P.J. (ed.), pp. 132-148. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.

COHEN, A.L. y F.D. NADLER. 1976. Calcium requirement for IAA-induced acidification by *avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* 57: 347-350.

COHEN, A.L., 1980. Critical Point Drying. Principles and Procedures. In: *Scanning Electron Microscopy*. A.M.F. O'Hare. Chicago. IL 60666 pp. 315-323.

COOPER, S.; LERNER, H.R. y L. REINHOLD. 1991. Evidence for a highly specific K^+/H^+ antiporter in membrane vesicles from oil-seed rape hypocotyls. *Plant Physiol.* 97: 1212-1220.

COSGROVE, D.J. y R.E. CLELAND. 1983. Osmotic properties of pea internodes in relation to growth and auxin action. *Plant Physiol.* 72: 332-338.

COSGROVE, D. 1986. Biophysical control of plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 377-405.

COSGROVE, D. 1993a. How do plant cell wall extension?. *Plant Physiol.* 102: 1-6.

COSGROVE, D. 1993b. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* 124: 1-23.

CRAIG, T.A. y F.L. CRANE. 1985a. Redox Potential of the donor and proton release of the transplamalemma redox system of carrot cells. *Plant Physiol.* 77: Suppl. 145.

CRAIG, T.A. y F.L. CRANE. 1985b. The trans-plasma membrane redox system in carrot cells: Inhibited by membrane-impermeable DABS and involved in H⁺ release from cells. In Randall D.D., D.G. Blevins, R.L. Larson (Eds.): "Current Topics in Plant Biochemisyt y and Physiology", Vol. 4 Columbia. University of Missouri Press, Pg. 247.

CRANE T.L. Y H. LÖW. 1976. NADH oxidation in liver and fat cell plasmamembrane. *FEBS Lett.* 68: 153-156.

CRANE F.L.; H. GOLDENBERG; D.J. MORRÉ y H. LÖW. 1979. Dehydrogenases of the plasma membrane. In Roodyn D.B. (Ed.): "Subcellular Biochemistry", Vol 6. New York: Plenum, pp 345-399.

CRANE, F.L.; ROBERTS, H.; LINNANE, A.W. y H. LÖW. 1982. Transmembrane ferricyanide reduction by cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 14: 191-205.



CRANE, F.L.; BARR, R.; CRAIG, T.A. y P.C. MISRA. 1984. Growth control by proton pumping plasma membrane redox. *Proc. Plant Growth Reg. Soc. Am.* 11: 87-95.

CRANE, F.L.; SUN, I.L.; CLARK, M.G.; GREBING, C. y H. LÖW. 1985. Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *Biochim. Biophys. Acta* 811: 233-264.

CRANE F.L.; R. BARR y T.A. CRAIG. 1986. Growth control by transplasmalemma redox: Evidence for a calcium role, in *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*. Trewavas A.J. (Ed). Plenum Press New York. 435.

CRANE, F.L.; BARR, R.; CRAIG, T.A. y D.J. MORRÉ. 1988. Transplasma membrane electron transport in relation to cell growth and ion uptake. *J. Plant Nutr.* 11: 1117-1126.

CRANE, F.L. 1989. Plasma membrane redox reactions involved in signal transduction. In: *Second Messenger in Plant Growth and Development*. Boss, W. y P.J. Morré (Eds.), pp. 115-143. A.R. Liss. New York.

CRANE, F.L. y R. BARR. 1989. Plasma membrane oxidoreductases. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 8: 273-307.

CRANE, F.L.; D.J. MORRÉ; H.E. LÖW y M. BÖTTGER. 1991. The Oxidoreductase Enzymes in Plant Plasma Membranes. In Crane, F.L.; D.J. Morré y H.E. Löw (Eds.): "Oxido Reduction at the Plasma Membrane: Relation to Growth and Transport". Vol. II. Boston. CRC Press. 21-35.

- CHAI, H.B. y N. DOKE. 1987. Superoxide generation: a response of potato leaves to infections with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 77: 645-649.
- CHALMERS, J.C.D.; COLEMAN, J.O.D. y N.J. WALTON. 1984. Use of electrochemical technique to study plasmalemma redox reactions in cultured cells of *Daucus carota*. *Plant Cell Rep.* 3: 243-247.
- CHANEY, R.L.; BROWN, J.D. y L.O. TIFFIN. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 50: 208-214.
- DHARMAWARDHANE, S.; A.I. STERN y B. RUBINSTEIN. 1987. Light-stimulated transplasmalemma electron transport in oat mesophyll cells. *Plant Sci.* 51: 193-197.
- DHARMAWARDHANE, S.; B. RUBINSTEIN y A.I. STERN. 1988. Regulation of transplasmalemma electron transport by calcium and light in oat mesophyll cells, In *Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth*, Crane, F.L.; Morré, D.J. y H. Löw (eds.), p. 287. Plenum Press. New York.
- DHARMAWARDHANE, S.; B. RUBINSTEIN y A.I. STERN. 1989. Regulation of transplasmalemma electron transport in oat mesophyll cells by sphingoid bases and blue light. *Plant Physiol.* 89: 1345.
- DIETER, P. Y D. MARME. 1980. Calmodulin activation of plant microsomal Ca^{2+} uptake. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 7311-7314.
- DIETER, P. Y D. MARME. 1984. Plant cell-walls. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 265-382.

DILLEY, R.A.; S.M. THEG y W.A. BEARD. 1987. Membrane proton interaction in chloroplast bioenergetics. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 347-389.

DÖRING, V.; LÜTHJE, S.; HILGENDORF, F. y M. BÖTTGER. 1990. Membrane depolarization by hexacyanoferrate (III), hexabromoiridate (IV) and hexachloroiridate (IV). *J. Exp. Bot.* 41: 1055-1061.

DOSTROM H.; KULESCNA Z.; VAN VLIET, T.B. y P.K. LIBBENGER. 1980. Characterization of a cytoplasmic auxin receptor from tobacco pith callus. *Planta.* 114: 44-47.

EARNSHAW, B.A. y M.A. JOHNSON. 1987. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. A probable mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.* 85: 273-276.

ELZENGA, J.J. y H.B.A. PRINS. 1987. Light induced polarity of redox reacciones in leaves of *Elodea canadensis*. *Plant Physiol.* 85: 239

ELZENGA, J.J. y H.B.A. PRINS. 1989. Light-induced polar pH changes in leaves of *Elodea canadensis*. Effects of ferricyanide: evidence for modulation by the redox state of cytoplasm. *Plant Physiol.* 91: 68-72.

ELLIOTT D.C.; S.M. BATCHELOR,; R.A. CASSA y N.G. MARINOS. 1983. Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin, auxin, and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 72: 219

EVANS, M.L. y M.J. VESPER. 1980. An improved method for detecting auxin-induced hydrogen ion efflux from coleoptile segments. *Plant Physiol.* 66: 561-565.

- EVANS, M.L. 1985. The action of auxin on plant cell elongation. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 317-365.
- FELLE H. 1981. A study of the current-voltage relationships of electrogenic active and pasive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochem. Biophys. Acta.* 730: 342-350.
- FELLE, H. y A. BERTL. 1986a. The fabrication of proton-selective liquid-membrane microelectrodes for use in plant cells. *J. Exp. Bot.* 37: 1416-1428.
- FELLE, H. y A. BERTL. 1986b. Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochim. Biophys. Acta* 848: 176-182.
- FELLE H. 1988a. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174: 495-499.
- FELLE H. 1988b. Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* and *Zea mays*. Interaction of Ca^{2+} and pH ?. *Planta* 174: 500-504.
- FELLE H., 1989. pH as a Second Messenger in Plants. In: *Second Messenger in Plant Growth and Development*. Boss, W. y P.J. Morré (Eds.), pp. 145-166. A.R. Liss. New York.
- GABATHULER, R. y R.E. CLELAND. 1985. Auxin regulation of a proton translocating ATPase in pea root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 79: 1080-1085.

GIETZEN, K.; P. ADAMCZYK-ENGELMANN; A. WÜTHRICH; A. KONSTANTINOVA y H. BADER. 1983. Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 736: 109-118.

GILLIES, R.J. y D.W. DEAMER. 1979. Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. *J. Cell Physiol.* 100: 23-32.

GILLIES, R.J.; UGURBIL, K.; DEN HOLLANDES, J.A. y R.G. SHULMAN. 1981. ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2125-2129.

GITZEN, K. 1983. Comparison of the calmodulin antagonist compound 48/80 and calmidazolium. *Biochem J.* 216: 611-616.

GONZALEZ-DARÓS, F.; J. CARRASCO-LUNA; A. CALATAYUD; J. SALGUERO y S. DEL VALLE TASCÓN, 1993. Effects of Calmodulin antagonists on Auxin-stimulated proton extrusion in *Avena sativa* coleoptile segments. *Physiol. Plant.* 87: 68-76.

GROSS, J.D.; BRADBURY, J.; KAY, R. y M.J. PEACEY. 1983. Intracellular pH and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 303: 244-245.

HAGER, A.; MENZEL, H. y A. KRAUSS. 1971. Experiments and Hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta* 100: 47-75.

HAGER, H. Y I. MOSER. 1985. Acetic acid esters and permeable weak acids induce active proton extrusion and extension growth of coleoptile segments by lowering the cytoplasmic pH. *Planta* 163: 391-400.

HASSIDIM, M.; B. RUBINSTEIN; H.R. LERNER y L. REINHOLD. 1987. Generation of a membrane potential by electron transport in plasmalemma-enriched vesicles of cotton and radish. *Plant Physiol.* 85:872.

HEIN, M.D.; BRENNER, M.L. y W.A. BRUN. 1984. Concentrations of indole-3-acetic acid and abscisic acid in soybean seeds during development. *Plant Physiol.* 76: 951-954.

HERTEL, R. 1983. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. *Z. Pflanzenphysiol.* 112: 53-67.

HOFF, T.; STUMMANN, B.M. y K.W. HENNINGSEN. 1992. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* 84: 616-624.

HOHL, M.; NAM HONG Y. y P. SCHOPFER. 1991. Acid and enzyme-mediated solubilization of cell wall β -1,3, β -1,4-D-Glucan in Maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 95: 1012-1018.

HOLMGREN, A. 1988. Thioredoxin and glutaredoxin: functions in growth dependent DNA synthesis and cellular regulation via thiol redox control. In: *Plasma Membrane Oxidoreductase in Control of Animal and Plant Growth*. Crane, F.L.; Morré, D.J. y H. Löw (eds.), pp. 295-302. Plenum Press. New York.

HOSON, T.; MASUDA, Y. y D.J. NEVINS. 1992. Comparison of the outer and inner epidermis. Inhibition of auxin-induced elongation of maize coleoptiles by glucan antibodies. *Plant Physiol.* 98: 1298-1303.

HOUSLAY, M.D. 1987. Ion channel controlled by guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 12: 167-168.

INOUE, M. y D.J. NEVINS. 1991. Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases. *Plant Physiol.* 96: 426-431.

IVANKINA, N.G. y V.A. NOVAK. 1981. Localization of redox reactions in the plasmalemma of water thyme cells. *Stud. Biophys.* 83: 197-201.

IVANKINA, N.G.; V.A. NOVAK y A.I. MIKLASHEVICH. 1984. Redox reactions with active proton transport in the plasmalemma of *Elodea* leaf cells. In Cram W.J., K. Janáček, R. Rybova, L. Sigler.(Eds.): "Membrane Transport in Plants". Chichester, Wiley: pp 404-405.

JONES, G.J.; B.P. PALENIK y F.M.M. MOREL. 1987. Trace Metal Reduction by Phytoplankton: The Role of Plasmalemma Redox Enzymes. *J. Phycol.* Vol. 23. 237-244.

KRÜGER, S. y M. BÖTTGER. 1988. NADH or NADPH?. In Plasma Membrane Oxidoreductase in Control of Animal and Plant growth. (F.L. Crane, D.J. Murré y H. Löw, eds). 105-114. Plenum Press, New York.

KUTSCHERA, U. y P. SCHOPFER. 1985a. Evidence against the acid growth theory of auxin action. *Planta* 163: 483-493.

KUTSCHERA, U. y P. SCHOPFER. 1985b. Evidence for the acid-growth theory of fusicoccin action. *Planta* 163: 494-499.

KUTSCHERA U. y M. FRÖHLICH, 1992. Osmotic Relations during elongation Growth in coleoptiles of five cereal species. *J. Plant Physiol.* 139: 519-522.

LADO, P.; RASI-CALDOGNO, F. y R. COLOMBO. 1977. Effect of cycloheximide on IAA- or FC-induced cell enlargements in pea internodes segments. *Plant Sci. Lett.* 9: 93-101.

LARSSON, C.; KJELLBOM, P.; WIDELL, S. y T. LUNDBORG. 1984. Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. *FEBS Lett.* 171: 271-276.

LASS, B.; G. THIEL y C.I. ULLRICH-EBERIUS. 1986. Electron transport across the plasmalemma of *Lemna gibba*. G-1. *Planta*, 169, 251.

LEONARD, R.T. 1984. Membrane associated ATPases and nutrient absorption by roots. In: *Advances in Plant Nutrition*. Tinker, P.B. y A. Läuchli (eds.), Vol 1 pp. 209-240. Praeger Scientific Publishers.

LIN, H. y D. RANDALL. 1991. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout cell epithelium. *J. Exp. Biol.* 161: 119-134.

LÜTHEN, H. y M. BÖTTGER. 1988. Hexachloroiridate IV a an electron acceptor for a plasmalemma redox system in maize roots. *Plant Physiol.* 86: 1044-1047.

LÜTHEN, H.; BIGDON, M. y M. BÖTTGER. 1990. Reexamination of the acid growth theory of auxin action. *Plant Physiol.* 93: 931-939.

LÜTHEN, H. y M. BÖTTGER. 1993. Induction of elongation in maize coleoptiles by hexachloroiridate and its interrelation with auxin and fusicoccin action. *Physiol. Plant.* 89: 77-86.

LÜTHJE, S. y M. BÖTTGER. 1989. Hexabromoiridate IV as an electron acceptor: comparison with Hexachloroiridate IV and Hexacyanoferrate III. *Biochem. Biophys. Acta.* 977,335.

MALVIYA, A.N. y P. ANGLUND. 1986. Modulation of cytosolic protein kinase c activity by ferricyanide: Primary event seems transmembrane redox signaling. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 200: 265-270.

MARRÉ, E.; LADO, F.; RASI-CALDOGNO, F. y R. COLOMBO. 1973. Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in the pH of the medium incubation. I. Effects of fusicoccin, natural and synthetic auxins and mannitol. *Plant Sci. Lett.* 1: 179-180.

MARRÉ, E. y A. BALLARIN-DENTÍ. 1985 Proton pumps of plasmalemma and tonoplast. *J. Bioenerg. Biomemb.* 17: 1-21.

MARRÉ, E.; N. BEFFAGNA y G. ROMANI. 1987. Potassium transport and regulation of intracellular pH in *Elodea densa* leaves. *Bot. Acta.* 101: 17.

MARRÉ, M.T.; MORONI, A.; ALBERGONI, F.G. y E. MARRÉ. 1988a. Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion. I. Activation of the H⁺ pump by ferricyanide-induced potential depolarization and cytoplasmic acidification. *Plant Physiol.* 87: 25-29.

MARRÉ, M.T.; ALBERGONI, F.G.; MORONI, A. y E. MARRÉ. 1988b. Preliminary evidence for a regulation of the plasma membrane redox chain by the activity of the ATP-driven proton pump, In *Proc. NATO Advanced Res. Workshop on plasma membrane oxidoreductase in control of animal and plant growth*, Crane, F. (Ed.). Plenum Press. Córdoba. Spain.

MARRÉ, E.; MARRÉ, M.T.; ALBERGONI, F.G.; TROCKNER, V. y A. MORONI. 1988c. Electron transport at the plasma membrane and ATP driven H⁺ extrusion by *Elodea densa* leaves. In: Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth. Crane, F.L.; Morré, D.J. y H. Löw (eds.), pp. 233-241. Plenum Press. New York.

MARRÉ, E.; ALBERGONI, F.G.; MORONI, A. y M.C. PUGLIARELLO. 1989. Evidence that H⁺ extrusion in *Elodea densa* leaves is mediated by ATP-driven H⁺ pump. *Science* 62: 21-28.

MARSCHNER, H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. London.

MASUDA, Y. 1990. Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. *Bot. Mag.* 103: 345-370.

MØLLER, I.M. y A. BÉRCZI. 1986. Salicylhydroxamic acid stimulated NADH oxidation by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *Physiol. Plant.* 68: 67-74.

MORRÉ, D.J.; B. GRIPSHOVER; A. MONROE y J.T. MORRÉ. 1984. Phosphatidyl inositol turnover in isolated soybean membranes stimulated by the synthetic growth hormone 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Biol. Chem.* 259: 15364-15368.

MORRÉ, D.J.; NAVAS, P.; PENEL, C. y F.J. CASTILLO. 1986. Auxin- stimulated NADH oxidase (semi-dehydroascorbate reductase) of soybean plasma membrane: role in acidification of cytoplasm. *Protoplasma* 133: 195-197.

MORRÉ, D.J.; G. AUDERSET; G. PENEL y H. CANUT, 1987. Cytochemical localization of NADH-ferricyanide oxido-reductase in hypocotyl segments and isolated membrane vesicles of soybean. *Protoplasma*. 140: 133-140.

MORRÉ D.J.; A.O. BRIGHTMAN; L-Y WU; R. BARR; B. LEAK y F. L. CRANE. 1988a. An essential role of plasma membrane redox in elongation growth in plants. *Physiol. Plant*. 73: 187-193.

MORRÉ, D.J.; BRIGHTMAN, A.O.; WU, L-Y.; BARR, R.; LEAK, B. y F.L. CRANE. 1988b. Role of plasma membrane redox activities in elongation growth in plants. *Physiol. Plant*. 73: 187-193.

MORRÉ, D.J.; CRANE, F.L.; BARR, R.; PENEL, C. y L-Y. WU. 1988c. Inhibition of plasma membrane redox activities and elongation growth of soybean. *Physiol. Plant*. 72: 236-240.

MORRIS, M.R. y D.H. NORTHCOTE. 1977. Influence of cations at the plasma membrane in controlling polysaccharide secretion from sycamore suspension cell. *Biochem. J*. 166: 603-618.

NAKIJAMA, N.; HORIKAWA, H.; IGASAH, S. y M. SENDA. 1981. Differential effect of calcium and magnesium on mechanical properties of pea stem cells wall. *Plant Cell Physiol*. 22: 1305-1315.

NAVAS, P.; I.L. SUN; D.J. MORRÉ y F.L. CRANE. 1986. Decrease in NADH in HeLa cells in the presence of transferrin or ferricyanide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 135: 110-115.

- NAVAS, P. 1991. Ascorbate free radical (semidehydro-) reductase of plant plasma membrane. In: Oxidoreduction at the Plasma Membrane: Relation to Growth and Transport. Crane, F.L.; Morré, J. y H.E. Löw (eds.), Vol II pp. 111-120.
- NELSON, N. 1988. Structure, function and evolution of proton ATPases. *Plant Physiol.* 86: 1-3.
- NEUFELD, E. y A.W. BOWN. 1987. A plasma membrane redox system and proton transport in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol.* 83: 895-899.
- NISSEN, P. 1985. Dose responses of auxin. *Physiol. Plant.* 63: 357-374.
- NOVAK, V.A. y N.G. IVANKINA. 1983. Influence of nitroblue tetrazolium on membrane potential and ion transport in *Elodea*. *Sov. Plant Physiol.* 30: 845-853.
- NOVAK, V.A. y A.I. MIKLASHEVICH. 1984. Ferricyanide reducing activity in *Elodea* leaves and its relation to energy metabolism. *Soviet Plant Physiol.* 31:380-386.
- PALMGREN, M.G. 1990. An H⁺-ATPase assay: Proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol.* 94: 882-886.
- PALMGREN, M.G. 1991. Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Physiol. Plant.* 83: 314-323.
- PARISH R.W.; H. FELLE y B. BRUMMER. 1986. Evidence for a mechanism by which auxins and fusicoccin may induce elongation growth. In Trewavas A.J. (Ed): "Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development ". New York: Plenum, pp 301-308.

PATTISON, S.; NELSON, M.; BARR, R. y F.L. CRANE. 1988. The effect of diamide and buthionine sulfoximide on glutathione pools and transmembrane electron transport by cultured carrot cells. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 97: 115-121.

PENNY, D.; MILLER, K.F. y P. PENNY. 1972. Studies on the mechanism of cell elongation of lupus hypocotyl segments. *NZ J. Bot.* 10: 97-111.

PENNY, P. y D. PENNY. 1978. Rapid responses to phytohormone. In: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*. Letham, P.S.; Goodwin, P.B. y T.J.V. Higgins (eds.), Vol II pp. 537-597. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. Amsterdam.

PERSAUD, K.C. y R. VIRDEN. 1984. Date-logging with microcomputers. In: *Micronutrients in Biology*. C.R. y S.P. Long (eds.), pp. 61. IR Press Oxford. Ireland.

PFAFFMAN H.; E. HARTMANN; A.O. BRIGHTMAN y D.J. MORRÉ. 1987. Phosphatidyl inositol specific phospholipase c of plant stems: Membrane associated activity concentrated in plasma membrane. *Plant Physiol.* 85: 1151-1155.

POLEVOY, V.V. y T. SALAMATOVA. 1977. Auxin, Proton pump and cell trophics. In Marré, E. y O. Ciferri (Eds.): "Regulation of cell membrane activities in plants". Amsterdam: Elsevier. pp. 209-216.

POOLE, R.J. 1978. Energy coupling for membrane transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 437-460.

POPE, D.G. 1983. Effect of cycloheximide on IAA-induced proton excretion and IAA-induced growth in abraded *Avena* coleoptiles. *Physiol. Plant.* 58: 269-274.

- PRAT, R.; GUEISSAZ, M.B. Y R. GOLDBERG. 1987. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on elongation and H^+ secretion of *Vigna radiata* hypocotyl sections. *Plant y cell Physiol.* 25: 1459-1467.
- QIU, Z-S.; B. RUBINSTEIN y A.I. STERN. 1985. Evidence for electron transport across the plasma membrane of *Zea mays* root cells. *Planta.* 165: 383-391.
- RAGHOTHAMA, K.G.; MIZRAHI, Y. y B.W. POOVAIAH. 1985. Effect of calmodulin antagonists on auxin induced elongation. *Plant Physiol.* 79: 28-33.
- RAVEN, J.A. 1986. Biochemical disposal of excess H^+ in growing plants?. *New Phytol.* 104: 75-206.
- RAYLE, D.L. 1973. Auxin-induced hydrogen ion-secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta* 114: 63-73.
- RAYLE, D.L. y R.E. CLELAND. 1977. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr. Top. Dev. Biol.* 34: 187-214.
- RAYLE, D.L. y R.E. CLELAND. 1980. Evidence that auxin-induced growth of soybean hypocotyls involves proton secretion. *Plant Physiol.* 66: 433-437.
- RAYLE, D.L. y R.E. CLELAND. 1992. The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99 :1271-1274.
- ROOS, A. y W.F. BORON. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61: 296-434.

RUBINSTEIN, B.; JOHNSON K.D. Y D.L. RAYLE. 1977. Calcium enhanced acidification in oat coleoptiles in : Regulation of Cell Membrane Activities in Plants. Marré E. y O. Ciferri (Eds) p.p. 307-316. Elsevier North Holland. Amsterdam.

RUBINSTEIN, B.; STERN, A.I. y R.J. STONT. 1984. Redox activity at the surface of oat root cells. *Plant Physiol.* 76: 386-391.

RUBINSTEIN, B. y A.I. STERN. 1986. Relationship of transplasmalemma redox activity to proton and solute transport by roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 80: 805-811.

SANDELIUS, A.S.; BARR, R.; CRANE, F.L. y D.J. MORRÉ. 1987. Redox reactions of plasma membranes isolated from soybean hypocotyls by phase partition. *Plant Sci.* 48: 1-9.

SANDERS D. y C.L. SLAYMAN. 1982. Control of intracellular pH: Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eucariotic microorganism *Neurospora*. *J. Gen. Physiol.* 80: 377-402.

SANDERS, D. y C.L. SLAYMAN. 1990. Transport at the plasma membrane of plant cells. A review. In: *Plant Membrane Transport: The Current Position*. Dainty, J.; DeMichelis, M.I.; Marré, E. y F. Rasi-Caldogno (eds.), pp. 373-378. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

SANE, P.V.; KUMAR, N.; BAIJAL, M.; K.K. SINGH Y U.K. KOCHMAR. 1984. Activation of plant aspartato kinase by calcium and calmodulin-like factor from plants. *FEBS Lett.* 175 : 238-242.

- SASSE, J.M. 1990. Brassinolide-induced elongation and auxin. *Physiol. Plant.* 80: 401-408.
- SCHERER, G.F.E. 1984. Stimulation of ATPase activities by auxin is dependent on ATP concentration. *Planta* 161: 394-397.
- SCHMALSTING, J.G. y D.J. COSGROVE. 1988. Growth inhibition, turgor maintenance, and changes in yield threshold after cessation of solute import in pea epicotyls. *Plant Physiol.* 88: 1240-1245
- SCHMIDT, W. 1984. Blue light physiology. *Bioscience* 34: 698-703.
- SCHOPFER, P. 1989. pH-dependence of extension growth in *Avena* coleoptiles and its implications for the mechanism of auxin action *Plant Physiol.* 90: 202-207.
- SEARA, J.; NICOLAS, G. y E. LABRADOR. 1988. Autolysis of the cell wall. Its possible role in endogenous and IAA-induced growth in epicotyls of *Cicer arrietimum*. *Physiol. Plant.* 72: 769-774.
- SENN, A.P. y M.H.M. GOLDSMITH. 1988. Regulation of electrogenic proton pumping by auxin and fusicoccin as related to the growth of *Avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* 88: 131-138.
- SERRANO, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- SHINKLE, J.R.; SWOAP, S.J.; SIMON, P. y R.L. JONES. 1992. Cell wall free space of *Cucumis* hypocotyls contains NAD and a blue light-regulated peroxidase activity. *Plant Physiol.* 98: 1336-1341.

SIJMONS, P.C.; F.C. LANFERMEIJER; A.H. de BOER; H.B.A. PRINS y H.F. BIENFAIT. 1984b. Depolarization of cell membrane potential during transplasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron deficient roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 943-946.

SILK, W.K. 1984. Quantitative descriptions of development. *Annual Review of Plant Physiology.* 35: 479-519.

SMITH, F.A. y J.A. RAVEN. 1979. Intracellular pH and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 289-311.

SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF. 1981. *Biometry.* W.H. Freeman and Company. New York.

SOLIOZ, A. 1984. Dicyclohexylcarbodiimide as probe for proton translocating enzymes. *Trends. Biochem. Sci.* 9: 309-312.

SPANSWICK, R.M. 1981. Electrogenic ion pumps. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 267-289.

SPANSWICK, R.M. 1982. The electrogenic pump in the plasma membrane of *Nitella*. In Kleinzeller A., F. Bronner, C.L. Slayman (Eds): "Current topics in membranes and transport. Electrogenic pumps". New York Academic Press. pp. 35-47.

STENDLE, E. 1985. Water transport as a limiting factor in extension growth. In: *Control of Leaf Growth.* Baken, N.R.; Davies, W.J. y C.K. Ong (eds.), pp. 35-55. Cambridge University Press. Cambridge.

STEVENSON, T.T. y R.E. CLELAND. 1981. Osmoregulation in the *Avena* coleoptile in relation to growth. *Plant Physiol.* 67: 749-753.

SUSSMAN, M.R. y J.F. HARPER. 1989. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Plant Cell* 1: 953-960.

SZE, H. 1985. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 175-208.

TAIZ, L. 1984. Plant cell expansion regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiol.* 35 : 585-657.

THEOLOGIS, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.

TREWAVAS, A. 1981. How do plant growth substances act?. *Plant Cell Environ.* 4: 203-228.

TROCKNER, V. y E. MARRÉ. 1988. Plasmalemma redox chain and proton extrusion. II. Respiratory and metabolic changes associated with fusicoccin induced and ferricyanide induced proton extrusion. *Plant Physiol.* 87, 30.

TUANA, B.S. y D.H. MCLENANN. 1984. Calmidazolium and compound 48/80 inhibit calmodulin-dependent protein phosphorylation and ATP-dependent Ca²⁺ uptake but not Ca²⁺-ATPase activity in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 259: 6979-6983.

ULLRICH-EBERIUS, C.I. y J. GUERN. 1988. Trans-plasmalemma electron transport in *Lemna gibba*: pH changes and ion fluxes, Abstracts, FESPP Workshop on Physiological and metabolic implications of transport in plants. Triest.

ULLRICH-EBERIUS, C.I.; PAVLOVKIN, J.; SCHINDEL, J.; FISCHER, K. y A. NOVACKY. 1988. Changes in plasmalemma functions induced by phytopathogenic bacteria. In: Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth. Crane, F.L.; Morré, D.J. y H. Löw (eds.), pp. 323-332. Plenum Press. New York.

VAN DER VOLKENBURG, E. y R.E. CLELAND. 1980. Proton excretion and cell expansion in bean leaves. *Planta*, 148: 273-278.

VAN DER VOLKENBURG, E. y R.E. CLELAND. 1986. Wall yield threshold and effective turgor in growing bean leaves. *Planta* 167: 37-43.

VANDERHOEF, L.N. y C.A. STAHL. 1975. Separation of two responses to auxin by means of cytokinin inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1822-1825.

VANDERHOEF, L.N.; STAHL, C.A.; WILLIAMS, C.A.; BRINKMANN, K.A. y J.C. GREENFIELD. 1976. Additional evidence for separable responses to auxin in soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* 57: 817-819.

VANDERHOEF, L.N. y R.R. DUTE. 1981. Auxin-regulated wall loosening and sustained growth in elongation. *Plant Physiol.* 67: 146-149.

VESPER, M.J. y M.L. EVANS. 1978. Time-dependent changes in the auxin sensitivity of coleoptile segments. *Plant Physiol.* 61: 204-208.

VESPER, M.J. y M.L. EVANS. 1979. Non hormonal induction of H⁺ efflux from plant tissues and its correlation with growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 :6366-6370.

VESPER, M. J. 1985. Use of a pH-response curve for growth to predict apparent wall pH in elongating segments of maize coleoptiles and sunflowers hypocotyls. Planta 166: 96-104.

WENT, F.W. y K.V. THIMANN. 1937. Phytohormones. McMillan (eds.). New York.

WILLIAMS, R.J.P. 1983. Mitochondrial compartments and chemiosmosis. Trends. Biochem. Sci. 8: 48.

YAMASHOJI, S. y G. KAJIMOTO. 1986. The catalytic action of vitamin K₃ on ferricyanide reduction by yeast cells. Biochim. Biophys. Acta 852: 223-228.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acorde otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Joaquín Carrasco Luna
la calificación de APTO CUM LAUDE por Unanimidad

Valencia, a 14 de Marzo de 1974

El Secretario,

El Presidente

