

Tesis de Posgrado

Citocininas y balance hídrico en hojas de maíz

Schenberg, Michael M.

1968

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Schenberg, Michael M.. (1968). Citocininas y balance hídrico en hojas de maíz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1315_Schenberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Schenberg, Michael M.. "Citocininas y balance hídrico en hojas de maíz". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1968.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1315_Schenberg.pdf

Nº-1315

CITOCININAS Y BALANCE HIDRICO
EN HOJAS DE MAIZ

1315 ;
R
et. 2

Michael M. Schenberg

Universidad Nacional de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

C I T O C I N I N A S Y B A L A N C E H I D R I C O

E N M O J A S D E M A I Z

Tesis presentada para
optar al título de
Doctor en Biología
(Orientación Botánica)

Autor: Michael M. Schenberg
Director: Edgardo R. Montalzi
Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria, Castellar, Prov. de
Buenos Aires, República Argentina.

- 1968 -

RESUMEN

Se estudió el efecto de citocininas, análogos estructurales de las mismas, inhibidores del metabolismo y factores del crecimiento sobre el balance hídrico de hojas aisladas de maíz.

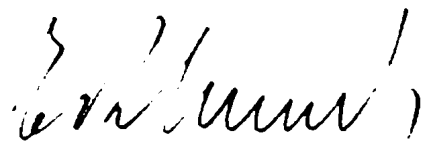
Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a - La cinetina y la zeatina promovieron la apertura estomática, con un efecto máximo por parte de la cinetina a $5 \cdot 10^{-6} M$ y la zeatina a $5 \cdot 10^{-7} M$. Hubo un mayor efecto en la oscuridad, el cual aumentó con el curso del tiempo. La sensibilidad a las drogas disminuyó con el tiempo de incubación.
- b - Ambas citocininas promovieron la capacidad de absorción hídrica y el peso seco por unidad de área foliar.
- c - La cinetina aumentó la transpiración y absorción del agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- d - La cinetina y la luz revirtieron parcialmente la inhibición de la transpiración producida por $Cl. Na$ (10^{-3} - $10^{-5} M$).
- e - Un tratamiento de "temple" contra la sequía al estado de semilla aumentó la transpiración y absorción de agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- f - Los análogos estructurales de la cinetina: adenina, adenosina, 8-azaadenina, puromicina, guanina, 8-azaguanina, 6-bencil-amino-9-(tetrahidropirano-2-yl)-9 H-purina, y las pirimidinas: uracilo y tiouracilo, aumentaron en variado grado y en forma aditiva la capacidad de absorción hídrica.

Se concluye que la cinetina, la zeatina y posiblemente otros análogos estructurales intervienen en el mecanismo regulatorio del balance hídrico en las plántulas de maíz.

La analogía entre las respuestas de las plantas tratadas con cinetina y "templadas" sugiere la intervención de mecanismos de acción similares.

Las citocininas y productos de degradación de los ácidos nucleicos actuarían a través de un efecto revitalizante del metabolismo. Se propone además, que las plantas podrían regular el contenido de cininas de sus diversos órganos y tejidos para poder mantener el equilibrio en condiciones de "stress" hídricos.



EDGARDO R. MONTALDI
ING. AGRÓNOMO



1315 ✓

CITOCININAS Y BALANCE HIDRICO
EN HOJAS DE MAIZ

1315
R

Michael M. Schenberg

Guarina y azaguanina no promovieron al peso seco; adenina, puromicina y tiouracilo no promovieron la capacidad de absorción hídrica.

- g - La actinomicina D y la ribonucleasa pancreática promovieron la capacidad de absorción hídrica y estimularon inicialmente la capacidad transpiratoria, pero luego llegaron a inhibirla. Ambas sustancias en especial la actinomicina, deprimieron el peso seco en experimentos de larga duración. En ambos casos el agregado de cinetina tuvo un ligero efecto aditivo.
- h - D-threo cloramfenicol (10^{-5} - 10^{-4} M) inhibió notablemente la transpiración la cual fué revertida parcialmente por cinetina. Al cabo de varias horas de incubación con el inhibidor hubo una recuperación y posterior estimulación de la transpiración y de la capacidad foliar de absorción hídrica. El peso seco fué muy inhibido, pero la cinetina alivió el efecto. El isómero L no tuvo un efecto apreciable.
- i - El ácido indolacético ($5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} M) estimuló temporariamente la transpiración, inhibió ligeramente la capacidad de absorción hídrica y promovió los pesos secos en experimentos de larga duración. No hubo interacción con cinetina.
- j - El ácido giberélico ($5 \cdot 10^{-6}$ M) tuvo un notable efecto sobre la capacidad de absorción hídrica, pero interactuó con cinetina.

Universidad Nacional de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

C I T O C I N I N A S Y B A L A N C E H I D R I C O

E N H O J A S D E M A I Z

Tesis presentada para

optar al título de

Doctor en Biología

(Orientación Botánica)

Autor: Michael M. Schenberg

Director: Edgardo R. Montaldi

Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria, Castelar, Prov. de

Buenos Aires, República Argentina.

- 1968 -

RESUMEN

Se estudió el efecto de citocininas, análogos estructurales de las mismas, inhibidores del metabolismo y factores del crecimiento sobre el balance hídrico de hojas aisladas de maíz.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a - La cinetina y la zeatina promovieron la apertura estomática, con un efecto máximo por parte de la cinetina a $5 \cdot 10^{-6} M$ y la zeatina a $5 \cdot 10^{-7} M$. Hubo un mayor efecto en la oscuridad, el cual aumentó con el curso del tiempo. La sensibilidad a las drogas disminuyó con el tiempo de incubación.
- b - Ambas citocininas promovieron la capacidad de absorción hídrica y el peso seco por unidad de área foliar.
- c - La cinetina aumentó la transpiración y absorción del agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- d - La cinetina y la luz revirtieron parcialmente la inhibición de la transpiración producida por $Cl. Na$ (10^{-3} - $10^{-5} M$).
- e - Un tratamiento de "temple" contra la sequía al estado de semilla aumentó la transpiración y absorción de agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- f - Los análogos estructurales de la cinetina: adenina, adenosina, 8-azaadenina, puromicina, guanina, 8-azaguanina, 6-bencil-amino-9-(tetrahidropirano-2-yl)-9 H-purina, y las pirimidinas: uracilo y tiouracilo, aumentaron en variado grado y en forma aditiva la capacidad de absorción hídrica.

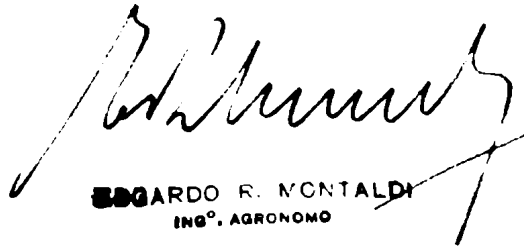
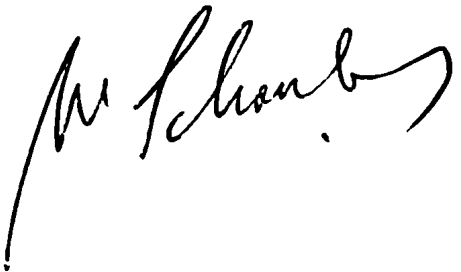
Guanina y azaguanina no promovieron al peso seco; adenina, puromicina y tiouracilo no promovieron la capacidad de absorción hídrica.

- g - La actinomicina D y la ribonucleasa pancreática promovieron la capacidad de absorción hídrica y estimularon inicialmente la capacidad transpiratoria, pero luego llegaron a inhibirla. Ambas sustancias en especial la actinomicina, deprimieron el peso seco en experimentos de larga duración. En ambos casos el agregado de cinetina tuvo un ligero efecto aditivo.
- h - D-threo cloramfenicol (10^{-5} - 10^{-4} M) inhibió notablemente la transpiración la cual fué revertida parcialmente por cinetina. Al cabo de varias horas de incubación con el inhibidor hubo una recuperación y posterior estimulación de la transpiración y de la capacidad foliar de absorción hídrica. El peso seco fué muy inhibido, pero la cinetina alivió el efecto. El isómero L no tuvo un efecto apreciable.
- i - El ácido indolacético ($5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} M) estimuló temporariamente la transpiración, inhibió ligeramente la capacidad de absorción hídrica y promovió los pesos secos en experimentos de larga duración. No hubo interacción con cinetina.
- j - El ácido giberélico ($5 \cdot 10^{-6}$ M) tuvo un notable efecto sobre la capacidad de absorción hídrica, pero interactuó con cinetina.

Se concluye que la cinetina, la zeatina y posiblemente otros análogos estructurales intervienen en el mecanismo regulatorio del balance hídrico en las plántulas de maíz.

La analogía entre las respuestas de las plantas tratadas con cinetina y "templadas" sugiere la intervención de mecanismos de acción similares.

Las citocininas y productos de degradación de los ácidos nucleicos actuarían a través de un efecto revitalizante del metabolismo. Se propone además, que las plantas podrían regular el contenido de cininas de sus diversos órganos y tejidos para poder mantener el equilibrio en condiciones de "stress" hídricos.



EDGARDO R. MONTALDI
ING. AGRÓNOMO

CIEGOSHEFFAS I ABANCE IDRTCO
EN NOJAS DE MAIZ

13

9.7

Michael M. Schenberg

12/5
2021

Universidad Nacional de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

C I T O C I N I N A S Y B A L A N C E H I D R I C O

E N H O J A S D E M A I Z

Tesis presentada para
optar al título de
Doctor en Biología
(Orientación Botánica)

Autor: Michael M. Schenberg
Director: Edgardo R. Montaldi
Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria, Castellar, Prov. de
Buenos Aires, República Argentina.

- 1968 -

Dedicado a quienes más
apoyaron y alentaron esta obra:

a mis padres

a clau li

Illegue ni agradecimiento a todos aquellos que de una u otra forma me han permitido incursionar en el campo de la investigación biológica.

Al Ing. E.R. Montaldi mi sincero reconocimiento por sus enseñanzas, sus críticas y su constante guía en la conclusión de este trabajo.

Al Ing. A. Soriano, mi antiguo maestro, por sus útiles consejos y acertadas críticas.

Al Dr. M. Rosnik por su gentil disposición a fructíferas discusiones.

A los miembros del departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; a los demás miembros del instituto de Botánica del INTA, Castellar; y los miembros del departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires por su colaboración en toda forma y medida.

Al Dr. F.C. Steward (Cornell University, USA); al Sr. M.O. Pagant (Parke Davis de Buenos Aires); al Prof. P. de T. Alvin, (CPC, Itabuna, Bahía, Brasil) y a G.E. Heranic (USDA, Orlando Fla., USA), por sus generosas dádivas de zeatina, D y L-three cloranfenicol, un perómetro y "Rhoplex", respectivamente.

Al INTA que me concediera espacio, materiales, equipo y personal para poder dedicarme de lleno a la realización de este trabajo.

Abreviaturas usadas

ARN y ADN:	Ácidos ribo y desoxiribonucleicos
ARNasa y ADNasa:	Ribo y desoxiribonucleasa
s - ARN:	ARN soluble
MPA, DPA, TPA:	Adenosina fosfatos
BAPP:	6-bencilamino-9-(tetrahidropirano-2-yl)- -9H- purina
CRA:	Contenido relativo de agua
HR:	Humedad Relativa
Pi:	Fosfato inorgánico
I ^o :	Mínima concentración intercelular de CO ₂

INDICE

INTRODUCCION	1
Objetivos	3
Antecedentes	4
MATERIALES Y METODOS	
A. Material biológico	22
B. Incubación de las hojas y determinación de su actividad transpiratoria	23
C. Determinación de la relación de pesos secos a áreas	25
D. Determinación de la conductancia de la hoja al aire	26
E. Determinación de aperturas estomáticas	27
F. Relación entre aperturas estomáticas y la resistencia viscosa al pasaje del aire	29
G. Determinación de la capacidad de absorción hídrica de las hojas	30
H. Determinación de la tensión de succión	32
I. Experimentos con plantas "templadas" contra sequía, sometidas posteriormente a un régimen de sequía.	32
J. Métodos estadísticos	34
K. Drogas y reactivos	35
RESULTADOS	
A. Cininas	36
B. Anfólogos de las aminas purinas.	43
C. Inhibidores del metabolismo de las proteínas y las ácidos nucleicos	45
D. Factores del crecimiento	47
DISCUSION	49
RESUMEN	65
TABLAS	
1. Transpiración de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo	68
2 y 3. Efecto de la cinetina sobre la conductancia al aire en hojas aisladas de maíz	69
4. Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "templado" contra la sequía sobre la absorción de agua en hojas aisladas de maíz.	70
5. Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "templado" contra la sequía sobre la velocidad de deshidratación y la conductancia al pasaje del aire en hojas aisladas	71

6.	Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de templado contra la sequía sobre la relación de pesos secos a áreas foliares y grado de acartuchamiento en hojas aisladas de maíz	72
7A.	Efecto de la zeatina sobre la absorción hídrica y relación de pesos secos a áreas en hojas aisladas de maíz.	73
7B.	Efecto de la zeatina sobre la conductancia al aire en hojas aisladas de maíz	73
8.	Efecto de la cinetina e interacción con diversos análogos sobre la absorción hídrica y relación de pesos secos a áreas foliares en hojas aisladas de maíz	74
9.	Efecto de la cinetina e interacción con D y L-threo cloranfenicol sobre la conductancia al pasaje del aire en hojas aisladas de maíz . . .	75
10.	Efecto de la cinetina e interacción con diversos inhibidores del metabolismo sobre la capacidad de absorción hídrica y la relación de pesos secos a áreas foliares de hojas aisladas de maíz	76
11.	Efecto de la cinetina e interacción con las ácidos indolacético y giberélico sobre la absorción de agua y relación de pesos secos a áreas foliares en hojas aisladas de maíz	77

FIGURAS

1.	Sistema experimental utilizado para la medición de la transpiración	78
2.	Efecto de la cinetina sobre la transpiración de hojas aisladas obtenidas de plantas de distinta edad	78
3 y 4.	Efecto de la cinetina sobre la transpiración e interacción con iluminación solar y artificial	79
5.	Curva de calibración del porómetro de Alvin utilizado	80
6.	Relación entre apertura estomática y conductancia al pasaje de aire a través de hojas de maíz. . .	81
7.	Efecto de la cinetina sobre la velocidad de deshidratación y ulterior rehidratación de hojas aisladas de maíz	82
8.	Efecto de diferentes concentraciones de cinetina sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz	83

9.	Efecto de la cinetina sobre la actividad transpiratoria de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo	84
10.	Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "temple" contra la sequía sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz.	85
11.	Supervivencia: un criterio de vitalidad	86
12.	Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "temple" contra la sequía sobre el acartuchamiento de hojas aisladas de maíz.	87
13.	Efecto de la cinetina e interacción con ClNa sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz	89
14.	Efecto de diferentes concentraciones de zeatina sobre la transpiración relativa de hojas aisladas de maíz	90
15.	Efecto de la zeatina sobre la actividad transpiratoria de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo	91
16.	Efecto de 6-bencilamino-9-(tetrahidropirano-2-yl)-9H-purina: (BAPP) sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz	92
17.	Efecto de la cinetina e interacción con diversos análogos estructurales sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz.	93
18.	Efecto de la cinetina e interacción con diversos inhibidores del metabolismo sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz	94
19.	Efecto de la cinetina e interacción con las ácidos indolacético y giberélico sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz	96
	BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUCCION

Son pocos los avances hechos en el tema de los mecanismos básicos que regulan el movimiento del agua en las plantas. Baste leer a Renner (1911) para observar que, por ejemplo, los conceptos que hoy explican el potencial de succión de un órgano o planta entera, son prácticamente tan superficiales como hace medio siglo atrás. Y no es que escaseen los enfoques adecuados para una experimentación fructífera, sino que es necesario intensificar los estudios sobre los reguladores metabólicos que actúan sobre el balance hídrico. Uno de los aspectos de regulación hídrica que requiere inmediata atención es dilucidar el papel que puedan desempeñar las citocininas en las plantas en condiciones variables del suministro hídrico.

Las citocininas afectan varios procesos del metabolismo foliar y los más documentados son sus efectos sobre la senescencia y el metabolismo de las proteínas. Solo recientemente se ha encarado su posible acción sobre el balance hídrico.

Si pudiéramos conocer los procesos que regulan el pasaje de las moléculas de agua a través de las membranas celulares, probablemente entonces, estaríamos a un paso de su control de una utilización más eficiente de la vida vegetal. Es muy importante tratar de obtener las herramientas para la dilucidación, y seguir examinando, la cuestión del transporte activo o pasivo del agua, a pesar que la mayoría de los investigadores en este campo se inclinan actualmente por el último concepto (Kozlowski, 1964; Fogg, 1965; Slatyer, 1967). Es también importante entender en qué consiste la propiedad de atraer y retener al agua, que se observa en las plantas durante el proceso del crecimiento. Del mismo modo que avances realizados en la regulación del transporte de sales y agua en el mundo animal han aclarado los conceptos sobre los fenómenos de nutrición y translocación vegetal, contribuciones a nivel fisiológico ó bioquímico en las plantas en lo que se refiere a permeabilidad y regulación del agua, puedan quizá coadyuvar a la resolución de problemas fisiopatológicos y a una utilización más económica del agua en los animales. Asimismo es muy posible que la investigación sobre reguladores bioquímicos del balance hídrico suministre información de utilidad para el desarrollo de nuevos métodos de cultivo en condiciones ambientales adversas. El maíz, en particular, es un cultivo de gran importancia económica, que ha sido extensamente

estudiado y que requiere una cantidad relativamente grande de agua para satisfacer su ciclo biológico. Es por lo tanto de sumo interés dilucidar sus mecanismos de regulación hídrica.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- 1) Determinar si las citocininas tienen efecto sobre el balance hídrico en hojas aisladas de maíz y fundamentalmente establecer:
 - a) si las citocininas actúan sobre la apertura estomática y cuales son las variables que pueden modificar su acción (tiempo, concentraciones, iluminación, etc.),
 - b) si las citocininas pueden afectar la absorción de agua en hojas aisladas de maíz,
 - c) si la cinetina puede modificar la transpiración y absorción del agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía,
 - d) si un tratamiento de "templado" contra la sequía al estado de semilla puede modificar los mismos parámetros estudiados con la cinetina en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- 2) Determinar el efecto de los siguientes grupos de sustancias sobre el balance hídrico en hojas aisladas de maíz:

- a) análogos estructurales de la cinetina,
- b) inhibidores del metabolismo de los ácidos nucleicos de las proteínas,
- c) factores del crecimiento.

ANTECEDENTES

Mecanismos de regulación del balance hídrico

Las superficies epidérmicas de la mayoría de las plantas terrestres ofrecen una barrera muy efectiva a la pérdida de vapor de agua y al intercambio de gases con la atmósfera. Los poros estomáticos que se hallan en la epidermis son las principales puertas de entrada y salida al interior de la planta. Ya que estos poros pueden ser abiertos y cerrados por las células guardianas muy especializadas de la epidermis, que rodean a los poros, están en situación de poder regular esencialmente los intercambios de vapor de agua, y de otros gases entre la planta y el medio ambiente. No se sabe aún cuáles son los mecanismos íntimos que regulan la apertura de los estomas. Existe el consenso que el modelo clásico de Sayre (en Ketellaper, 1963) que hace hincapié sobre los cambios osmóticos en las células guardianas, merece modificarse incorporando un mecanismo activo de "bombeo" de agua donde el modelo clásico actuaría como estabilizador. Asimismo el CO_2 parece ser uno de los reguladores

más importantes en la apertura estomática. Algunos suponen que el CO_2 actuaría como represor del metabolismo del ácido glicólico (Zelitch, 1965). En este proceso metabólico se genera trifosfato de adenosina (TPA) el cual activaría el "bombeo" de agua produciéndose así la apertura estomática, pero existe evidencia que niega el papel del metabolismo del ácido glicólico y de la fotofosforilación en este proceso (Meidner, 1965).

En su habitat natural, las plantas se encuentran frecuentemente expuestas a déficits más o menos rigurosos en el suministro de agua. No es de sorprenderse entonces que algunas de ellas se hayan adaptado a esta limitación. Por su modo de adaptación se pueden considerar dos tipos fundamentales: (Levitt, 1965)

(1) adaptación por evasión (avoidance) y (2) adaptación por "tolerancia" (tolerance). En el primer caso se reduce al máximo la pérdida de agua y en el segundo simplemente hay una adaptación a la pérdida. Considerados en este contexto, los estomas al cerrarse contribuyen a preservar el balance hídrico y estarían así participando en uno de los mecanismos posibles de la evasión a la deshidratación. Pero tal como ocurre con el resto de las células, una sequía prolongada puede provocar una mortandad muy elevada de las células estomáticas (Iljin, 1922). La adaptación de estas células, sea del tipo de evasión o tolerancia permitiría concebiblemente un nivel mayor de funcionalidad

estomática y así también protegería la capacidad transpiratoria y fotosintética de las hojas. Tumanov (1927) ha descubierto que se pueden "templar" contra la sequía a semillas de ciertas plantas cultivadas sensibles a la deshidratación, exponiendo a las plántulas a una breve sequía previa. El "temple" aparentemente consiste en inducir una mayor adaptación a la sequía subsiguiente por medio de una mayor "evasión". Existe el consenso que por lo menos en los cereales, uno de los factores asociados con el "temple" contra la sequía es la elevación de la concentración osmótica (Levitt, 1956, p. 164; Schmidt, 1940). Así, por ejemplo, Clements (1937) observó los cambios producidos en hojas de especies "templadas" y halló cambios en el contenido de hemicelulosa a los cuales él atribuyó la mayor resistencia. Contrastando con este tipo de evidencia de "evasión" a nivel citológico Clark y Levitt (1956) presentaron evidencia en el sentido que la resistencia producida por el "temple" pueda ser debida a una mayor acumulación de ceras en la cutícula epidermal. Cabe mencionar que existen muchas analogías en el comportamiento fisiológico y bioquímico de plantas "templadas" contra la deshidratación producida por sequía, helada y calor (Levitt, 1956). Pero no hay evidencia o razón para suponer que existan analogías con otros tipos de "temple", como, por ejemplo, contra las sales, que si bien pueden actuar causando sequía fisiológica

presentan también efectos directamente tóxicos (Adriani, 1958; Biebl, 1958; Stälfelt, 1956; Gale, 1967).

Es sorprendente que el marchitamiento afecte preferentemente a los tejidos de mayor edad en vez de los tejidos jóvenes en expansión. Miller (1938) notó que las hojas más viejas eran las primeras en marchitarse con la sequía. Wilson (1948) observó que en plantas de tomate donde se produjo un déficit hídrico durante el día se notó un encogimiento en el tamaño de las partes más viejas del tallo, mientras que las partes más jóvenes en expansión continuaban su crecimiento. Kerr y Anderson (1944) observaron que los frutos del algodónero continuaban creciendo a pesar que las hojas más adultas fueron inhibidas por un "stress" hídrico. Soriano (1968) estudió plántulas de trigo cuyas raíces fueron expuestas a un déficit hídrico. La porción basal de las raíces se había desecado y, notablemente, los ápices se mantuvieron turgidos. Vaadia (1963) cita trabajos que muestran gradientes de potencial de agua y potencial osmótico entre raíz y tallo y entre ápice y base foliar. Las causas que hacen que las porciones vegetales en crecimiento puedan tener primera preferencia al suministro de agua es algo que no se sabe, pero está claro que el daño producido por la sequía se hace sentir primero en los tejidos y hojas más viejas.

Citocininas y regulación hídrica

Todas estas respuestas de la planta al "stress" hídrico, es decir a la tensión producida por un déficit dado de agua, podrían tener como a un común denominador bioquímico a las citocininas.

Es conocido que las citocininas en conjunción con otros factores del crecimiento pueden revitalizar la actividad de las células vegetales (Mothes, 1960). Las citocininas de por sí podrían ser las sustancias que Went (1938) llamó "caulocalinas" y las "hormonas radicales" de Chibnall (1939)

Kulajeva (1962) en una serie de experimentos exploratorios demostró que citocininas son trasladadas por vía xilemática al tallo desde la raíz y encontró que se insinuaba una pérdida en la formación de estas sustancias si la raíz era expuesta a un "stress" que impedía su desarrollo normal. Más tarde Kende (1965) e Itai y Vaadia (1965) demostraron que, efectivamente, el exudado obtenido al decapitar una planta de girasol en la base de su tallo podía ser separado por cromatografía en fracciones con actividad de citocininas y que estas fracciones tenían menor actividad por unidad de volumen exudado, cuando las plantas se estaban recuperando de un "stress" hídrico provocado por una tensión osmótica o salina. Además se observó repetidamente la acción de las citocininas sobre la expansión celular, es decir

sobre la absorción de agua. Esta promoción era dependiente de la concentración de la droga, de la especie y el órgano utilizado. (Shaw, 1964; Banerji, 1965; van Overbeek, 1967). Además es sugestiva la siguiente evidencia de Mothes (1964). Este autor trató hojas individuales de plantas enteras de tabaco con cinetina. Luego expuso las plantas a marchitamientos repetidos. Las plantas murieron, pero las hojas pretratadas con cinetina se mantuvieron lozanas. Es también notable cuán paralelos son los fenómenos de regulación hídricos con los de la regulación del estado y movimiento de solutos. En este sentido Livne y Vaadia (1965) observaron que la cinetina promueve la apertura estomática en hojas aisladas de cebada. Mientras se llevaba a cabo el presente trabajo de tesis Meidner (1967) presentó también evidencias que cinetina, concomitantemente con una promoción de la apertura estomática en la hoja de cebada, produce una mayor fijación de CO_2 y una ligera depresión respiratoria. En el trabajo de Meidner se observa que paralelamente a la disminución del "contenido intercelular" de CO_2 (Γ) debida a la mayor fijación y menor respiración del mesófilo se va produciendo un gradual aumento en la apertura estomática, y no parece que hubiera un retraso en la expresión del fenómeno. Pero además de este aumento gradual llega un momento, aproximadamente a las dos horas de incubación con cinetina, en que se produce un

salto súbito en la fijación fotosintética de CO_2 y la apertura estomática. Meidner supone que esto último se debe a un efecto directo de la cinetina sobre las células estomáticas ~~y que el retardo se debe a un efecto directo de la cinetina sobre las células estomáticas~~ y que el retardo se debe al tiempo de traslado. Según Meidner, sería el CO_2 la sustancia más directamente vinculada a la regulación estomática producida por cinetina.

Modo de acción de cinetina

No se conoce el modo de acción de la cinetina pero se supone que son varios y que en general como resultado de estudios de incorporación de fósforo inorgánico (Pi) y bases purínicas y pirimidínicas marcadas, se considera que la cinetina activaría el metabolismo de los ácidos nucleicos (Ietham, 1967).

Existe una opinión en el sentido que este factor de crecimiento actuaría primariamente sobre el "locus" productor de proteínas. En algunos tejidos vegetales éste estimula la síntesis de proteínas a pesar de producirse una degradación de acidribonucleico (ARN) (Sacher, 1967). Además hay evidencia de Fox (1966) mostrando que la cinetina se incorpora inalterada a ARN-soluble/paralelamente a un efecto sobre el crecimiento de tejidos vegetales cultivados in vitro. Estos autores postulan que la cinetina podría actuar en lugar de ciertas bases

sustituídas en tejidos que han perdido la capacidad de sintetizarlas.

Otras opiniones se inclinan por implicar al ARN en el mecanismo de acción de la cinetina. Así por ejemplo, Gunning (1963) implica al ARN porque el pretratamiento de hojas aisladas de avena con ribonucleasa (ARN-asa) deprime el aumento de la incorporación de P_i promovido por la cinetina. Carpenter (1966) observó en dicotiledones del maní que benciladenina (otra cito- cinina) induce la síntesis generalizada de ARN en todas sus fracciones. Ciertas concentraciones de la cinina promovían, pero otras más elevadas inhibían la síntesis, pero de cualquier manera no hubo efecto sobre la síntesis del ácido desoxiribo- nucléico (ADN). Siguiendo este enfoque Maciejewska (1959) ob- servó en extractos de hipocótilos de Phaseolus que cinetina pro- mueve la actividad de ARN-asa y ADN-asa. A una cierta concen- tración de la droga se produce una inhibición de las nucleoti- dasas y esta concentración es de dos órdenes de magnitud menor para la ARN-asa que para la ADN-asa. Srivastava (1965), flotando hojas de cebada sobre soluciones de cinetina, sólo pudo observar inhibición en las actividades de estas nucleotidasas. Según Bergmann (1958), la inhibición competitiva de xantinaoxidasa sobre cinetina, in vitro, podría indicar que la citocinina in- fluye seriamente sobre los pozos purínicos. Según Schlee (1966),

quien suministró bases marcadas a hojas de Pelargonium, la cinetina pareció inhibir las deaminasas de adenina, adenosina y monofosfato de adenosina (MPA) para así prevenir la degradación de adenina por esa vía, pero sin embargo promovió la degradación de adenina por vía de serina y no pareció inhibir a la xantina oxidasa in vivo.

Existe una opinión que sostiene el papel de ADN en la acción de las citocininas. Van Overbeek (1967), observando que benciladenina revierte el efecto inhibitor de "dormina" sobre el crecimiento y la síntesis paralela de ADN en Lemna, sugiere una hipótesis para explicar el modo de acción de las citocininas basada sobre el esquema de Monod de activación o inhibición alostérica de enzimas. Según esta hipótesis la citocinina activaría reversiblemente a una enzima (por ejemplo la ADN-polimerasa) en su conformación inactiva. Se tendría así una forma posible de derepresión génica.

Tampoco se puede ignorar otros aspectos del modo de acción de las citocininas, como ser la depresión tanto in vivo como in vitro de la respiración y la glicólisis (Dedolph, 1961; Bergman, 1964; Tuli, 1964) o que la absorción continuada de agua no siempre esté acoplada a una síntesis neta de proteína (Rai, 1965; Banerji, 1966). Es también pertinente agregar que bien podría ser que cinetina actúe como un antioxidante (Porto, 1960)

Análogos estructurales de la cinetina, inhibidores del metabolismo de los ácidos nucleicos y las proteínas, y factores del crecimiento

Fue uno de los propósitos de este trabajo, observar los efectos que puedan tener ciertos análogos estructurales a la cinetina, ciertos inhibidores del metabolismo y factores del crecimiento sobre el balance hídrico.

El uso de análogos permite explorar la estereospecificidad del compuesto investigado, en este caso, cinetina. Observaciones de este tipo a nivel fisiológico permiten luego un refinamiento a nivel bioquímico. En algunos "ensayos" donde se trataba de determinar la presencia de citoquininas, se observó que también adenina, adenosina, guanosina tenían actividad aunque por lo general a mayor concentración (Jetham, 1967). Puede ser que además, por su analogía estructural, la cinetina sea degradada como lo es la adenina (Bergman, 1958; Schlee, 1966).

Los inhibidores metabólicos pueden ser útiles, en la medida en que sean específicos, para poder deducir el mecanismo de acción de la sustancia estudiada. Esto es siempre problemático y es, por lo tanto, imprescindible utilizar varios compuestos diferentes para poder diferenciar entre lo específico y lo no específico en la acción de éstos.

Así por ejemplo, 8-azaadenina puede por sustitución producir ARN defectivo como tal o luego de convertirse en 8-azaguanina (Smith, 1957). Esta última sustancia reemplaza menos del 5% de la guanina del ARN y muy poco es lo que se incorpora en el ADN (Mandel, 1954; Harris, 1965). 8-azaguanina y cinetina se antagonizan competitivamente en diversos organismos (Moewus, 1959; Blaydes, 1966). Por otro lado la especificidad de estos análogos es dudosa pues, como lo menciona Mandel (1958) éstos pueden tener su efecto principal sobre la función y la organización de coenzimas y ácidos nucleicos y no sobre las etapas de biosíntesis de los nucleótidos purínicos. De modo que los efectos de inhibición sobre la síntesis de proteínas observados frecuentemente, podrían ser una consecuencia de esto.

Tiouracilo es incorporado al ARN e interfiere con el crecimiento de cultivos de tejido de endosperma de maíz (Strauss, 1960) y con la diferenciación normal y la capacidad biosintética de plantas superiores (Hess, 1959; Heslop-Harrison, 1960; Thimann, 1962; Woodstock, 1966; Rimon, 1967). Tiouracilo puede causar una pérdida acelerada de clorofila, proteínas y ARN. Este efecto, expresado en la incapacidad de incorporar a macromoléculas metionina y adenina marcadas, no puede ser revertido por cinetina. Sin embargo, cinetina es capaz de restaurar completamente la capacidad de atracción y retención de

metionina y adenina marcadas. De este modo, Mothes (1964) distingue al proceso de atracción y retención del de fomento de la síntesis de proteínas y ARN. Cinetina y tiouracilo pueden interactuar en forma aditiva y sinérgica en inhibir la replicación del virus mosaico del tabaco (TMV) en hojas de tabaco (Király, 1964).

Puromicina, el nucleótido extraído de cultivos de Streptomyces alboniger, inhibe la síntesis de proteínas a nivel de "traducción" por incorporarse a las cadenas peptídicas; y se considera que lo hace funcionando como un análogo de aminocilosis - ARN (Nathans, 1964). Pero hay evidencia de que, al igual que otras purinas, puede promover la liberación enzimática de proteínas nacientes que están ligadas a los polisomas (Khairallah, 1967). Asimismo, este inhibidor puede estimular en discos de remolacha, la síntesis de invertasa y proteína (McDonald, 1966) como también acelerar la síntesis de fosfatasa alcalina (Moog, 1964) y promover la absorción de agua en cultivos de callo de soja (Blaydes, 1966).

Todos estos análogos además, son de interés por el hecho que puedan funcionar como citocininas.

La ribonucleasa pancreática (ARNasa) ha sido utilizada extensivamente en estudios sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos (Frutton, 1958; Davidson, 1960). La inhibición de

procesos biológicos, particularmente de la expansión y absorción de agua por la aplicación de ARNasa a los tejidos vegetales, es considerada evidencia que ARN pueda desempeñar aquí un "rol" esencial (Galston, 1964; Masuda, 1964). Así también Gunning (1963) implica a ARN en el modo de acción de cinetina en hojas aisladas de avena, ya que se produce una mayor incorporación de P-32 en la fracción ribosomal en el tratamiento con cinetina, y esta promoción es deprimida por un pretratamiento de ARNasa. Además Gunning hace la observación de que la ARNasa libre de proteasas, sin embargo, tiene de por sí un ligero efecto promotor sobre el transporte dirigido de metabolitos, tal como ocurre con cinetina. Uno de los fenómenos asociados al corte de la hoja es un incremento en la actividad total de ARNasa (Osborne, 1962). Según sea la concentración de la cinetina, en algunos casos se promueve y en otros se deprime la actividad de ARNasa en tejidos y extractos (Maciejewska, 1959; Srivastava, 1965). Es muy sugestivo el trabajo de Udvardy et al (1967) en el cual se hace la distinción entre ARNasa particulada y ARNasa soluble. Ellos observaron una correlación entre la inhibición de la ARNasa particulada causada por cinetina y la promoción de la síntesis de ARN, y concluyen que la ARNasa puede pertenecer al grupo de aquellas enzimas que están generalmente reprimidas y cuya derepresión es causada por condiciones fisiológicas adversas.

Sin embargo, reconocen que el problema de las ARNasas está lejos de aclararse hasta tanto no se conozca la especificidad de las actividades enzimáticas observadas.

Actinomicina D es muy utilizada por su propiedad inhibitoria selectiva de la síntesis de ARN dependiente de ADN. Parece que el cromopéptido producido por actinomicetes afectara predominantemente la síntesis de ARN ribosomal. Ha sido observado que actinomicina se acopla a las guaninas del ADN, alterando así la estructura y la funcionalidad de la macromolécula (Kersten, 1961; Goldberg et al., 1962; Reich, 1964). Generalmente se considera que la inhibición de procesos biológicos por actinomicina, como por ejemplo, el crecimiento y la absorción de agua mediada por auxina, es evidencia que el ARN desempeña un papel en el proceso (Masuda, 1966). Rivón (1965) observó una inhibición en la transpiración de hojas de cebada e implicó a la cinetina como que ésta al estimular la síntesis de proteínas estaría así promoviendo la apertura estomática. Pero ciertas observaciones recientes sugieren que la actinomicina puede causar alteraciones celulares muy especiales que no pueden explicarse por la mera inhibición de la síntesis de ARN. En un caso, la inhibición del antibiótico es impedida o revertida por el agregado de glucosa (Henig, 1965) y los autores sospechan que pueda estar afectando la fosforilación oxidativa. En otro caso, el antibiótico

inhibió la maduración de bacteriofago, pero no afectó el ADN, ARN o las proteínas (Korn,^{etal.} 1965). Los autores observaron la similitud de efectos de la proflavina con la actinomicina, y hacen notar la analogía estructural entre la fenoxazinona de la actinomicina y la acridina de la proflavina. En otro caso, se observó inhibición de la glicólisis y la respiración (Jaszlo, 1966). Además la droga indujo la formación de ciertas enzimas adaptativas (Moog, 1964; Rosen, 1964); y Schwartz (1964) observó que la inhibición de la síntesis de ARN puede ser temporaria.

Cleramfenicol es considerado como una sustancia muy útil en estudios de inhibición biológica y bioquímica. Se sabe que inhibe la síntesis de proteínas en las plantas y en otros organismos y en varios tejidos (Brock, 1961; Noodén, 1963), o en extractos vegetales libres de células (Rabson, 1960). Puede penetrar, trasladarse en las plantas y además ha sido recuperado en su forma activa en cantidades apreciables (Premor, 1953; Crowley, 1957). En bacterias inhibe la síntesis de proteínas pero no la fermentación, la respiración o la síntesis de ácidos nucleicos (Gale, 1953). Cleramfenicol inhibe la transferencia de aminoácidos desde s - ARN a proteínas ribosómicas, pero no afecta la activación de aminoácidos o la transferencia de aminoácidos activados al s - ARN (Sypherd, 1962). Inhibe además, la absorción de iones (Sutcliffe, 1960) y la transpiración de plantas

enteras (Uhlir, 1963). Pero existen numerosas observaciones sobre efectos secundarios que son más pronunciados en altas concentraciones. Entre ellos merece citarse una inhibición preferente de la síntesis de clorofila "a" sobre la "b" (Banerji, 1967) así como una preferente inhibición de la síntesis de enzimas inducibles por la luz (Margulies, 1964) una acción desacoplante de la fosforilación oxidativa (Hansen, 1963; Stoner, 1964; MacDonald, 1966) y una disminución selectiva de la incorporación de P-32 en azúcares fosforilados (Péaud-Jenoel, 1962). A pesar que sólo el isómero D-three- cloramfenicol tenga actividad antibiótica, MacDonald, et. al (1966) observaron que ambos isómeros, D y L, inhiben en forma similar la absorción de iones en discos de remolacha; pero aparentemente el isómero L-three no inhibe la síntesis de proteínas a bajas concentraciones. Ambos isómeros tienen en común entre sí y con dinitrofenol un grupo nitro aromático y su capacidad desacoplante de la fosforilación oxidativa. A la luz de esta información es de interés mencionar que cloramfenicol puede inhibir la síntesis de proteínas o clorofila pero no la absorción de agua promovida por cinetina en cotiledones de Cucurbita (Laloraya, 1965). En otros casos cinetina revirtió la inhibición de cloramfenicol en la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas y normalizó el metabolismo del ARN y de las proteínas (Parthier, 1964; Mothes, 1964).

Las auxinas y las giberelinas son factores del crecimiento de las plantas y como tales promueven la expansión celular y la absorción de agua en los tejidos capaces de crecer (Commoner, 1942; Burstrom, 1953; Haber, 1960; Ilan & Reinhold, 1963; Masuda, 1964 y otros).

Hay indicios que cinetina puede interactuar con auxinas y ácido giberélico. Esto se puede ver en la sensibilización causada por el ácido giberélico en tejidos de tubérculos a la acción promotora de auxina y auxina más cinetina en la absorción de agua (Masuda, 1964), o el hecho que auxina sea "atraída" y preservada por cinetina (Conrad, 1961) hace necesario considerar en qué medida el efecto de cinetina no es más que un efecto de auxina. Aquí es pertinente agregar, que tanto citocininas como giberelinas son exportadas desde la raíz; disminuyen su actividad bajo "stress" hídrico o salino, y parecen tener un "rol" cierto en la regulación estomática de las hojas (Itai, 1965, Jivnó, 1965).

En este trabajo se procuró explorar la significancia fisiológica de las citocininas en el balance hídrico de hojas aisladas de maíz. Se observó que además de afectar la apertura estomática, las citocininas pudieron promover la capacidad de absorción de agua en los tejidos foliares. Las observaciones con análogos estructurales o inhibidores sugieren la posibilidad

MATERIALES Y METODOS

A. Material biológico:

Semillas de maíz híbrido cv. "Pergamino-Guazú" obtenidas de la estación experimental del INTA, Pergamino, fueron sembradas en terrinas con grava volcánica como sustrato. Se sembraron 100 semillas por terrina y se colocaron en una cámara climática a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 45-55% ^{humedad relativa} (HR) iluminada con tubos fluorescentes "Gro-Lux" de Sylvania de 40 watts y lámparas incandescentes, de 75 watts en proporción de 4 a 1 con una intensidad lumínica total de 300-500 Lux en la superficie de las terrinas. Las plantas se regaron diariamente con agua deionizada.

Para determinar el efecto de diversas sustancias sobre la apertura estomática y la intensidad de la transpiración se prefirió hacer uso de hojas enteras de plántulas de maíz recién expandidas y cortadas a 1 cm de la base. El corte se hizo bajo agua para evitar la formación de embolias de aire en los vasos traqueales, aunque no se observaron diferencias en la velocidad transpiratoria o absorción de eosina con respecto a hojas cortadas al aire. Se optó por usar hojas de plantas entre 11 y 17 días de edad, por haberse observado previamente que este material transpiraba tanto como material similar de mayor edad (fig. 2). Si bien el uso de discos foliares permitiría el uso de material más homogéneo y de mayor uniformidad en la exposición

a la luz, existen inconvenientes en el manipuleo (flotación y secado) que, además de ser engorroso puede causar serios errores por la infiltración intercelular de agua y solutos que es mayor en relación al área foliar involucrado, que el producido en el corte de una hoja entera. Una objeción a todos los métodos que hacen uso de órganos o tejidos aislados de la planta, es que se destruye la organización y la interacción preexistentes con el resto de la planta (Gessner, 1956). Por lo general, se exponen parénquima, tejidos de conducción y epidermis a una solución no natural y séptica. Además, cuando se hacen mediciones sucesivas sobre el mismo material, como es el caso con el método de pesadas, se infligen perturbaciones que hacen a las mediciones, desde un punto de vista ecológico, poco útiles e inutilizables, aunque sí pueden ser de utilidad fisiológica. En favor del uso de hojas enteras cabe mencionar que se preserva mejor la estructura foliar que con el método por discos, y existe un menor error causado por manipuleo (infiltración de agua, mal secado) y además éstas son muy manuable cuando se puede hacer uso de hojas de poco tamaño.

B. Incubación de las hojas y determinación de su actividad transpiratoria.

Para poder determinar el curso de la transpiración en

hojas aisladas era deseable hacer pesadas rápidas con un mínimo de manipulaciones. En primer lugar se optó por colocar las bases de las hojas en frascos de vidrio de 10 cm³ llenos de la solución a ensayar y recubiertas herméticamente de tres capas de película de polivinilo o de "Parafilm". En los experimentos siempre se incluyeron un tratamiento testigo (0) donde el frasco contenía sólo agua deionizada y un tratamiento donde el frasco contenía cinetina ($5 \cdot 10^{-6}$ M). La incubación siempre fué simultánea con el proceso de transpiración medido. La cubierta de plástico de cada frasco se hendía con un bisturí y por la hendidura se introducía la base de la hoja a estudiar. Las pérdidas de agua por la hendidura fueron despreciables. El área foliar expuesta oscilaba entre 25-35cm² (fig. 1) y se determinaba por calcos sobre papel y pesado del papel recortado. Cada 24 horas se renovaba la solución de los frascos en experimentos de larga duración. Se optó por usar la segunda hoja desde la base de la planta, que en experimentos preliminares demostró ser morfológicamente más pequeña y de tamaño más apropiado.

La determinación de la actividad transpiratoria se realizó pasando el frasco con la solución y la hoja al principio y a intervalos determinados de tiempo. La velocidad de transpiración se expresó en mg/cm².h. Para poder trabajar en

condiciones controladas de iluminación e independientemente de la luz solar se realizaron experimentos de transpiración con lámparas de mercurio Phillips HPI-50 de 400W ubicadas a 60-80cm de la superficie foliar y con una intensidad lumínica de 20-25.000 Lux a nivel foliar en la cámara climática de 26°C. Los resultados se compararon con otros obtenidos en condiciones de luz solar en el invernáculo (figs 3 y 4) Las condiciones ambientales en el invernáculo para el experimento fueron las siguientes: 28-30°C, 30-45% HR y 30-42.000 Lux.

Se concluyó que era posible usar luz artificial a pesar que se observaron valores absolutos de transpiración más reducidos que con luz natural del invernáculo y un atraso en el efecto producido por cinetina (figs. 3 y 4). En todos los experimentos los frascos con las hojas sobre una bandeja se distribuyeron al azar, y se procuró siempre ubicar la bandeja en el mismo sitio, en el caso del invernáculo. Además, se expuso el material a una brisa constante de 78-85 m/min. salvo las interrupciones hechas por las pesadas a intervalos determinados de tiempo.

C. Determinación de la relación de pesos secos a áreas.

Una vez determinada el área de una hoja dada y conocido posteriormente su peso seco constante se estableció la relación

mg de peso seco por cm^2 de área foliar expuesto.

D. Determinación de la conductancia de la hoja al aire.

Para poder hacer mediciones rápidas y representativas de la resistencia viscosa al pasaje del aire a través de la hoja, se adoptó el parámetro de Alvim (Alvim, 1966). La resistencia viscosa es aquella que se opone al flujo de aire a través de la lámina foliar al ser expuesta a una presión positiva o negativa con respecto a la presión atmosférica. El aparato es sumamente sencillo y las mediciones son rápidas. Un inconveniente de los parámetros, en general, es que miden la resistencia viscosa al flujo del aire, mientras que lo que se necesita medir es la resistencia difusiva. Además, en algunos casos una porción de la hoja debe quedar encerrada por un período de tiempo considerable dentro del aparato. Se pueden obviar estos inconvenientes calibrando la resistencia difusiva contra la resistencia viscosa o también utilizando el instrumento rápido de Alvim (1965). Otro inconveniente que conviene tener presente en el uso de este parámetro es que, en algunas especies, una diferencia de la presión del aire suficientemente elevada puede afectar la apertura estomática directamente. En otras palabras el acto de la medición puede influir, modificando así la lectura del mismo parámetro medido en una determinación posterior. Raschke

(1965) recomendó utilizar diferencias de presión del orden de 100mm de agua (7,4mm de Hg) (ver también Stålfelt 1956, pag.360) En pruebas preliminares se observó que las hojas de maíz utilizadas fueron sensibles a la presión ejercida - 150 a 200mm Hg - por lo que no era de confiar una lectura posterior. Además hubo que determinar que no se produjeron pérdidas, en especial en el lugar de contacto de las arandelas de goma con la hoja. En general no hubo mayores dificultades en este respecto, pero en el caso de algunas lecturas elevadas, atípicas, hubo que verificarlas sumergiendo todo el sistema bajo agua.

Fué conveniente expresar los valores porométricos de tal modo que fueran independientes de las diferencias de presión tomadas en la medición y así estuvieran más cerca de las propiedades intrínsecas de la hoja en estudio. Esto se logró calibrando los valores de diferencia de presión obtenidos contra volúmenes de aire liberado, de acuerdo con una curva trazada con este aparato (ver fig. 5). Los resultados representan entonces la conductancia por unidad de área, en unidades ($\text{cm}^3/\text{cm}^2 \text{ min.}$).

E. Determinación de aperturas estomáticas.

Para obtener valores directos de la apertura estomática en hojas de maíz, se utilizó el método de "calcos" con silicona, de Zelitch (1961) o con metacrilato, de Heranic (1967). En

ambos casos hubo que hallar las condiciones adecuadas para producir en menos de 3 minutos el fraguado del polímero correspondiente. La ventaja del uso de la silicona consiste en que mezclada con una cantidad adecuada de catalizador fragua rápidamente en frío mientras que con el otro material hubo que diluir la mezcla original de metacrilato (Rhoplex) y detergente (Triton) sugerida por los autores hasta encontrar una dilución donde con un buen mojado de la hoja se pudiera polimerizar rápidamente una película de metacrilato. Las condiciones elegidas fueron: dilución de la mezcla del metacrilato hasta un 20% (v/v) y aplicación del material diluido en condiciones de aproximadamente 40% de HR ambiente o menos y una corriente de aire incidente de 80m/min o mayor. Luego de secada la primera capa se aplicó encima una segunda con la mezcla original sin diluir.

La ventaja de "Rhoplex" por otra parte estriba, en que el método es menos engorroso, y con un poco de práctica se pueden obtener calcos tan buenos como con la silicona. Además se notó que la silicona utilizada (RTV-11) fué tóxica para las hojas, mientras que "Rhoplex" no lo fué. Por este motivo se optó por éste último. Como apertura estomática se consideró el ancho del cuello formado entre dos células guardianas con una magnificación de X 1250 (ver Stälfelt, 1956; Metcalfe, 1960). La medición se efectuó con un ocular micrométrica calibrado y con una precisión

de 0.5μ . De cada calco se midieron 30 estomas cada uno de un campo microscópico distinto. Para aperturas de 1.5μ o menores el método resultó cuantitativamente impreciso puesto que además del cuello formado por las paredes de las células guardianas, pudo haber un cierre parcial de los labios cuticulares de la epidermis que se superponían a las células guardianas, además el borde interior de estas células pudo formar una especie de doble cuello, como se ha podido observar en algunos cortes histológicos.

F. Relación entre aperturas estomáticas y la resistencia viscosa al pasaje del aire.

Se trató de relacionar la apertura estomática obtenida de calcos con la conductancia al aire por unidad de área. En el experimento descrito en la figura 6 se utilizaron 39 hojas con 3 determinaciones simultáneas de apertura y conductancia en cada una. La curva de la fig. 6 concuerda con otras similares a partir de aproximadamente 2μ de apertura (Stålfelt, 1956) pero no coincide cuando la apertura es menor.

G. Determinación de la capacidad de absorción hídrica de las hojas.

1. Procedimiento general

En las observaciones sobre la capacidad de absorción de agua, se adoptó una variante del método de Slatyer (1965) el que a su vez es una modificación del de Weatherley (1950). Se dejaron deshidratar hojas aisladas al aire libre, en luz difusa de 10-15.000 lux hasta alcanzar un contenido relativo de agua (CRA) estimado de 75 por ciento. Luego se sumergían las bases de las hojas en frascos con agua deionizada dentro de una cámara húmeda durante 40 minutos. A continuación se determinaba el incremento producido en el CRA durante los 40 minutos de reabsorción. Estos incrementos son los valores presentados en las tablas y se designaron " $\Delta/40$ ". Se eligió 40 minutos como el período de absorción porque se determinó que hojas pretreatadas con cinetina y que son las que absorben agua más velezmente, presentan una fase inicial rápida de 40-60 minutos y luego una segunda fase más nivelada (fig. 7).

2. Modo de determinación del CRA estimado

Para determinar el CRA estimado del 75 por ciento se procedió a saturar las hojas sumergiendo sus bases en agua deionizada dentro de una cámara húmeda durante 4 horas. A continuación se secaron con papel altamente absorbente y se pesaron,

obteniéndose así el peso fresco de saturación. Para poder estimar el contenido de agua de saturación se tomaba una parte de ellas luego de obtenido su peso fresco de saturación y se ponía a secar por dos horas a 105°C. Esta se volvió a pesar y el valor obtenido se dedució del peso fresco de saturación. De este modo se obtuvo rápidamente un valor estimado del contenido de agua de saturación de la muestra. Con estos datos se procedió a calcular el peso fresco de la muestra que correspondería a un CRA estimado de 75 por ciento dejándose secar al aire el resto de las hojas hasta que alcanzaran este valor.

3. Modo de determinación del CRA real

Para determinar el CRA real de saturación, el CRA real de 75 \pm 1 por ciento, y el CRA real obtenido luego de 40 minutos de reabsorción, se procedió así: Llegada una muestra foliar al CRA estimado de 75 por ciento se interrumpió la deshidratación y se inició el experimento de reabsorción de agua. A los 40 minutos se secó la muestra con papel absorbente y se pesó. A continuación se puso a secar a 85°C por 48 horas y volvió a ser pesada. Obtenido el peso seco constante se determinó si el CRA real correspondía al CRA estimado. Por lo general los valores del CRA real de 75 por ciento no diferían del CRA estimado de 75 por ciento en más de 1 por ciento. Muestras con discrepancias mayores fueron eliminadas.

II. Determinación de la tensión de succión

Para poder tener una idea de la correspondencia entre los valores de absorción de agua y la tensión de succión en las hojas, se hicieron algunas determinaciones del déficit de presión de difusión (DPD) por el método de Chardakov (Knippling, 1967) de este modo: (1) cada muestra foliar se subdividía en 6 grupos con un número igual de discos en cada uno, (2) se sumergió cada grupo de discos en 1 ml. de solución graduada de sacarosa, (3) al finalizar 60 minutos de inmersión se retiraron los discos de la solución, (4) se agregó un cristalito de azul de metileno a cada solución incubada, (5) se introdujo con cuidado pipetas Pasteur de punta capilar, conteniendo la solución coloreada, dentro de una solución de la misma graduación pero sin preincubar y sin colorear, (6) muy lentamente se descargó la solución coloreada y se observaba si ésta subía, bajaba o tenía igual densidad que la solución original, (7) la graduación que tenía una densidad similar a la solución coloreada, se consideró la tensión de succión equivalente a la de la muestra investigada.

I. Experimentos con plantas "templadas" contra sequía, sometidas posteriormente a un régimen de sequía.

Se intentó estimar la significación fisiológica de las citoquininas suministrando cinetina a hojas de plantas "templadas"

contra la sequía y a sus testigos correspondientes, y que además fueron posteriormente sometidas (o nó) a un "stress" hídrico. Las plantas testigo (N) fueron cultivadas como indicado en Métodos, A. Para obtener plantas templadas (T) se pretrataron semillas de maíz según una ligera modificación del método de Michajlikov (1953): (1) se pesó una cantidad de semilla que se colocó en cajas de Petri sobre papel de filtro y se las recubrió con otra hoja de papel de filtro, (2) se agregó agua aproximadamente 10% del peso inicial de la semilla y se cerraron las cajas con la contratapa, (3) a las 24 y 48 horas se agregaron nuevas porciones iguales de agua, (4) durante el último período de 24 horas germinaron la mayoría de las semillas y se seleccionaron aquellas que tuvieron radículas de hasta 1 cm, (5) se quitó el papel de filtro y se dejó secar a las semillas en una cámara climática de 26°C y HR de 45-55% durante tres días, que luego (6) fueron cultivadas como indicado en Métodos, A. En estos estudios se compararon plantas N con plantas T midiendo los parámetros de la actividad transpiratoria, la capacidad de absorción hídrica y la relación de pesos secos a áreas tal como descripto anteriormente, en condiciones de riego continuo (N-R ó T-R) ó cultivadas bajo un régimen de sequía (N-S ó T-S). Para imponer el régimen de sequía se cultivaron las plantas como indicado en Métodos, A, pero a los 7 días

de sembradas se interrumpió el riego y las terrinas fueron ubicadas en el invernáculo. Al cabo de 7 días sin riego se procedía a utilizar el material siempre y cuando las plantas hubiesen mostrado durante los últimos 4 mediodías signos generalizados de marchitez, de otro modo se continuaba con el tratamiento hasta que se hubiesen observado 4 mediodías consecutivos de marchitez.

Para estimar la resistencia a la sequía en términos de supervivencia por plantas T comparadas con N se les suprimió el riego en el invernáculo hasta haber observado 7 mediodías consecutivos de marchitez. A continuación se reinició el riego y a las 48 horas se registró el número de plantas sobrevivientes con respecto al total presente. Se consideraron sobrevivientes a aquellas plantas que de acuerdo a un criterio cualitativo tenían 1 o más hojas leznas.

J. Métodos estadísticos.

Los experimentos descriptos fueron repetidos por lo menos 3 veces y con ciertas variantes hasta 14 veces. Se optó por hacer 8-10 repeticiones por tratamiento. Cada experimento presentado es el más representativo de varios semejantes. Los datos presentados son el promedio \pm un error standard. El número mínimo de repeticiones en los experimentos de transpiración, conductancia de aire y capacidad de ab-

sorción de agua para obtener diferencias significativas entre tratamientos, se determinó en base a la fórmula $n=2\left(\frac{ts}{d}\right)^2$; (Cochran, 1963), donde n : es el número de repeticiones para obtener diferencias significativas; t : es el valor de la variable normal que corresponde a la probabilidad dada. En este caso $95\% \rightarrow 1.96 \approx 2$; s : desviación estándar de la muestra analizada expresada en porciento de la media; d : diferencia significativa deseada entre tratamientos expresada en porciento de la media.

K. Drogas y reactivos

Se utilizaron las siguientes sustancias: Adenina y tiouracilo de Nutritional Biochemical Corp.; actinomicina D donada por Merck Sharp y Dohme; puronina, ARNasa pancreática Tipo I - A, adenosina, 8-azaguanina, 8-azadenina, uracilo y ácido giberólico de Sigma; IAA de L. Light & Co.; D y L-threo-cloramfenicol donados por el Sr. Marcelo O. Pagano de Parke Davis en Buenos Aires; cinctina donada por el Dr. Folke Skoog; y 6-bencilanino-9-(tetrahidropirano-2-yl)-9H-purina:(BAPP) donada por Shell Co de Modesto California, E U.; zeatina sintetizada en el laboratorio de "Plant and Cell Physiology" de la universidad de Cornell (E.U.). Los demás reactivos fueron de grado analítico.

RESULTADOS

A. Cininas

1. Efectos de Cinetina

a. Actividad transpiratoria

a₁ Descripción del efecto

Hojas aisladas de plántulas de maíz fueron incubadas en soluciones con cinetina (K) o en agua (O) como fué descrito en Métodos, B. Tratamientos de cinetina aumentaron progresivamente la actividad transpiratoria a medida que transcurría el tiempo de incubación de las hojas (fig. 9). El efecto era comúnmente visible a las dos horas de incubación en luz solar, pero ocasionalmente se evidenciaba ya a la primera hora. En general la curva de transpiración disminuía con el tiempo, sólo que las hojas tratadas con cinetina mantuvieron su ritmo relativamente mejor que los testigos (tabla 1). Hay que mencionar la notable amplificación del efecto de la droga en relación porcentual al testigo, en la oscuridad. Puede observarse que las oscilaciones de la curva relativa de cinetina en la figura 9 presentan máximos y mínimos diarios en incremento. Coincidentemente los valores de la conductancia de la hoja al aire obtenidos en hojas en la oscuridad son mayores en las tratadas con cinetina (tabla 3). Debido

a su pequeñez no fué posible, empero, medir directamente las pequeñas aperturas habidas en estas condiciones experimentales.

a₂ Efecto de diferentes concentraciones

Se observó que la curva de concentraciones cuyo rango se extendía desde 10^{-7} hasta 10^{-4} M, presentaba luego de 3 horas de incubación con la droga, una máxima actividad transpiratoria entre 10^{-6} y $5 \cdot 10^{-6}$ M (fig. 8). Concentraciones de 10^{-5} M (3 horas) promovían menos y a mayor concentración inhibían significativamente la transpiración por debajo del testigo. Una curva de concentraciones similar obtenidos luego de 24 horas de incubación presentaba también un máximo, pero a 10^{-5} - $5 \cdot 10^{-5}$ M. A concentraciones mayores disminuía el estímulo sin llegar a la inhibición. Con el mismo material se hicieron mediciones sobre muestras paralelas para determinar la conductancia al aire y se observó que $5 \cdot 10^{-6}$ M la promovía significativamente (tabla 2).

a₃ Interacción de la cinetina con tratamientos de "templado" contra la sequía y un tratamiento posterior de sequía.

Se compararon hojas provenientes de plantas no-"templadas" (N) con aquellas de plantas "templadas" (T) (ver Materiales y Métodos I). La diferencia entre estos tratamientos

se reveló mejor comparando hojas de plantas no-"templadas" que sufrieron sequía a plantas "templadas" que la sufrieron. Las primeras transpiraban menos inicialmente (fig. 10). En todos los casos las plantas tratadas con cinetina transpiraron más que sus correspondientes testigos. Al segundo día se notó que todos los tratamientos resultaron estimulantes, incluso aquellos que resultaron inhibitorios en las primeras 24 horas. Hay que hacer notar que en todos los tratamientos de este experimento se produjo en cada día un aumento progresivo de la actividad transpiratoria hasta alcanzar aproximadamente un plateau al transcurrir la mitad del período de la oscuridad. Además, comparando la figura 10 con la forma generalizada de la curva de la figura 9 se observa una similitud en la oscilación de las curvas relativas en ambos gráficos.

b. Absorción de agua por las hojas

b₁ Descripción del efecto

La absorción de agua por hojas aisladas incubadas por 48 horas con esta citoenina resultó promovida (ver Materiales y Métodos, G; tabla 4 y fig 7)

b₂ Tensión de succión

Se hicieron algunas pruebas con el método de Chardachkev

(ver Materiales y Métodos, H) comparando hojas incubadas en 5.10^{-6} M cinetina con el testigo correspondiente. Se obtuvo una tensión de 1.9 ± 2.1 y 1.3 ± 1.5 atmósferas respectivamente, para un CRA de 75%.

b₃ Interacción de la cinetina con un tratamiento de "templado" contra sequía.

Las hojas de plantas "templadas" absorbieron más agua que las no-"templadas" en cada uno de los subtratamientos (tabla 4).

Se observó en la etapa de deshidratación - que es la etapa preparatoria del experimento de absorción - que las hojas provenientes de plantas con un tratamiento de "templado" contra sequía se deshidrataban hasta llegar a un CRA de 75% más rápidamente que sus testigos correspondientes. Asimismo, en ambos casos, las hojas provenientes de plantas sometidas a un régimen de sequía se deshidrataban más lentamente que sus testigos respectivos. Lo mismo pasaba con las hojas tratadas con cinetina con respecto a las no tratadas (Materiales y Métodos, G; y fig. 7).

Concomitantemente con el proceso de deshidratación más lento se observó también en las hojas una menor conductancia al pasaje del aire (tabla 5). Se verificó el número

de estomas en hojas de plantas sometidas a un régimen de sequía comparadas a otras bajo riego. Se observó que las primeras tenían 75 ± 5 comparado a 55 ± 7 estomas por campo microscópico de las segundas, pero las del tratamiento con sequía tenían 133 comparado a 173 estomas por 1000 células epidermales del tratamiento con riego.

En un estudio sobre la resistencia a la sequía en términos de supervivencia se obtuvieron en un tratamiento de no-"templadas" con tratamiento posterior de sequía 23 plantas sobrevivientes sobre 38, mientras que con un tratamiento de "templado" y sequía sobrevivieron 32 de 37 (ver Materiales y Métodos, I).

c. Relación de pesos secos a áreas foliares

c₁ Efecto de la cinctina y su interacción con un tratamiento de "templado" contra sequía y sometimiento posterior a un régimen de sequía. Se observó que las hojas provenientes de plantas con un tratamiento de "templado" contra sequía tenían un menor peso seco por unidad de área ($\text{mg peso seco}/\text{cm}^2$) que sus testigos correspondientes (ver Materiales y Métodos, C y tabla 6). Asimismo dentro de estos grupos, las hojas provenientes de plantas sometidas a un régimen de sequía presentaban un menor peso seco que las regadas. Por otra parte, las hojas

incubadas con cinetina tenían un mayor peso seco que sus testigos correspondientes.

d. Efecto de la cinetina sobre el contenido de clorofila

Los valores para el contenido relativo de clorofila se obtuvieron en hojas incubadas con o sin cinetina. Utilizando el método de Osborne (1961) se hicieron determinaciones rápidas del contenido relativo de clorofila en hojas incubadas por 48 horas en las condiciones ambientales descritas en tabla 4 y se observó una mayor densidad óptica (670m μ) de 0,445 para las tratadas comparado a 0,309 para las no tratadas.

e. Acartuchamiento de hojas aisladas.

Cualitativamente se pudieron observar diferencias notables en el grado de acartuchamiento de las hojas a un pasaje súbito de la oscuridad a la luz intensa (en exceso de 30,000 lux). En este experimento las hojas fueron transferidas de la oscuridad (9:00) a la luz solar. Las hojas del tratamiento no-"templado"-sequía-agua, se acartucharon ya a los 20 minutos de exposición al sol mientras que sus correspondientes en cinetina mostraron sólo un ligero acartuchamiento. Las hojas del tratamiento "templado"-sequía-agua, comenzaron a acartucharse mucho más tarde, a los 60 minutos aproximadamente.

(ver tabla 6 y figuras 11 y 12).

2. Efectos de Zeatina

a Actividad transpiratoria

a₁ Descripción del efecto

En la figura 15 se nota que zeatina se comporta como cinetina respecto al aumento relativo de la transpiración y la amplificación del efecto promotor del período de oscuridad.

a₂ Curva de concentraciones de la droga

El efecto de este análogo natural de la cinetina sobre la actividad transpiratoria fué comparado en un rango de concentraciones que iba desde 10^{-9} M hasta $5 \cdot 10^{-5}$ M, con cinetina y con un testigo agua. No se usó una concentración mayor de zeatina debido a la poca cantidad de material disponible. En la figura 14 se pueden apreciar 3 curvas de concentración trazadas en relación a 3 distintos períodos de incubación de las hojas. Las curvas presentan un pico. A medida que aumentaba el período de incubación el pico se corría hacia concentraciones más elevadas de la droga. A las 2 horas de incubación se perfilaba un máximo entre 10^{-7} y $5 \cdot 10^{-7}$ M; a las 5 horas estaba éste en $5 \cdot 10^{-7}$ M y a las 24 horas aproximadamente en $5 \cdot 10^{-6}$ M. La cinetina causó a igualdad de concentración

transpiraron algo menos que aquellas incubadas en cinetina solamente (fig. 17B).

En la fig. 17C se puede apreciar la promoción causada por uracilo, tiouracilo y puronina en la transpiración.

La promoción de uracilo y tiouracilo se iniciaba con una demora de 6 a 12 horas, mientras que la de puronina pareció iniciarse inmediatamente. El efecto de tiouracilo y uracilo a $10^{-4}M$ era de similar magnitud. Tanto el efecto de uracilo como tiouracilo fueron parcialmente aditivos con el de cinetina cuando a cada uno de ellos se los aplicó en forma combinada, mientras que puronina no lo fue.

b. Absorción hídrica y la relación de pesos secos a áreas en hojas separadas de la planta.

Como se observa en la tabla 8 hubo una promoción general en la capacidad absorbente de hojas pretratadas con los análogos y ambos uracilos (excepto guanina). Un efecto aditivo claro se observó sólo con los uracilos. Los pesos secos de hojas incubadas con los análogos en general mostraban un incremento con respecto al control agua, aunque hubo excepciones (adenosina y puronina). En presencia de cinetina, en general los análogos mejoraban aún más sus pesos secos.

C. Inhibidores

1. Efecto de Actinomicina D, Ribonucleasa, D-threo cloramfenicol y L-threo cloramfenicol.

a. Actividad transpiratoria

Tanto actinomicina como ARNasa promovieron inicialmente, para luego inhibir. Suministradas cada una de ellas en combinación con cinetina se retrasaba la iniciación de la inhibición (fig. 18A).

Con ^Dthreo cloramfenicol se inhibió marcadamente la transpiración durante las 4-8 horas iniciales de incubación para luego observarse una recuperación en la capacidad transpiratoria de las hojas. Esta recuperación se convertía en franca promoción entre 24 y 36 horas de incubación. Esta respuesta a cloramfenicol se observó a 10^{-4} M y también a otras concentraciones (fig. 18B).

Las respuestas - tanto la inhibición inicial como el estímulo posterior - fueron menores a menor concentración. La cinetina eliminó completamente el efecto del inhibidor alcanzándose los mismos niveles de la cinetina sola. L-threo cloramfenicol casi no tuvo efecto. Sobre el mismo material del experimento precedente se midió la conductancia al aire en hojas tratadas con D y L-threo cloramfenicol a las 3 horas de incubación con las

drogas y se comprobó con el isómero D una clara disminución en el pasaje del aire a través de las hojas mientras que el isómero I no tuvo ningún efecto. Además la cinetina revirtió el efecto de D mientras que con el isómero I se comportó como la cinetina sola.

b. Absorción hídrica y la relación de pesos secos a áreas en hojas aisladas de maíz

Tanto actinomicina como D-three cloranfenicol promovieron notablemente la capacidad absorbente de las hojas luego de 48 horas de incubación. ARNasa también aumentó la absorción, pero no tan acentuadamente. I-three cloranfenicol sólo tuvo un leve efecto promotor y con la excepción de éste, todos los otros inhibidores tuvieron un efecto de promoción aditivo con el de la cinetina (tabla 10).

Los pesos secos del tratamiento con D-three cloranfenicol y en menor grado con actinomicina, fueron fuertemente disminuídos, y en todas los casos, cinetina mejoró ligeramente la relación aunque no significativamente

D. Factores del crecimiento

1. Efectos de los ácidos indolacético y giberélico

a. Actividad transpiratoria

Acido indolacético (AIA) promovió la transpiración inicialmente, pero su efecto duró pocas horas. En otros experimentos se observó que la concentración aquí utilizada ($10^{-5}M$) tuvo un efecto inicial mayor que $10^{-4}M$. El efecto de la cinetina no fué efectivo con el AIA.

Acido giberélico ($5 \cdot 10^{-6}M$) inhibió ligeramente la transpiración.

En la presencia de cinetina se comportó como si fuera cinetina sola (fig. 16).

b. Capacidad de absorción y la relación de pesos secos a áreas en hojas aisladas de raíz

Al final de un período de incubación de 48 horas AIA $10^{-5}M$ inhibió la absorción de agua por las hojas pero en combinación con cinetina se comportó como la cinetina sola. Es notable la absorción promovida por ácido giberélico y su efecto fué aditivo en la presencia de cinetina.



DISCUSION

El énfasis de los investigadores en el campo de las cito-
cininas ha sido puesto, indudablemente, sobre aspectos de su ac-
tividad como factor de crecimiento que más los caracteriza, esto
es, su capacidad de activar la división celular y revitalizar
la actividad de los tejidos en los cuales se encuentran. Este
área, que como tal no existe más de un decenio, es consecuencia
de las ideas sobre hormonas de Went (1928) y Chibnall (1939) y
sobre reguladores de la división celular de Wiersner (1892) y
Haberlandt (1913) y muchos otros. Este conocimiento ha crecido
muy rápidamente en sus primeros años a partir de la identifica-
ción de cinetina, el producto artificial de la degradación hidro-
lítica de ADN, por Miller (1955). Últimamente los esfuerzos han
sido dirigidos a la identificación de cininas naturales y la
síntesis de análogos más efectivos. así como amplios estudios
in vitro para dilucidar el o los modos de acción de estas di-
versas sustancias (Letham, 1967). En relación al metabolismo
foliar, son varios los aspectos afectados por las cito-
cininas, y los más documentados son aquellos que inciden sobre la senes-
cencia y el metabolismo de las proteínas. Sin embargo, es poco
lo que se ha avanzado conceptualmente desde principios de siglo
en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en el ba-
lance hídrico y los factores íntimos que regulan la tensión

de succión de plantas y sus órganos (ver Weatherley, en Fogg, 1955) y el movimiento estomático (Ketellaper, 1963; Zelitch, 1965; Meidner, 1965).

En este trabajo de tesis se ha querido integrar a los conocimientos existentes en un concepto más amplio y flexible, acorde con la información disponible y los datos aquí presentados. La motivación predominante en la realización de este trabajo fue la intrigante y a la vez sugestiva realidad biológica que tejidos jóvenes, con vitalidad, y capaces de crecer, son los que acaparan preferentemente el agua disponible de la planta. Esta realidad se pone dramáticamente en evidencia cuando las condiciones ambientales imponen una deshidratación intensa sobre los organismos expuestos. Es evidente que el movimiento del agua es una secuela de la actividad metabólica, a pesar de que ésta solo pueda desarrollarse en un medio acuoso adecuado. Es así que también el movimiento hídrico sea un reflejo amplificado de la actividad metabólica, de la vitalidad y capacidad de crecer. Si las citoquininas pueden revitalizar al metabolismo y rejuvenecer a los tejidos, estos fenómenos deben reflejarse también en el balance hídrico, en la transpiración y en la capacidad absorbente de los órganos o tejidos que las contengan.

Ya existen referencias previas en la literatura que la turgencia y la absorción de agua reflejan la capacidad de

crecimiento inducida por citocininas (Shaw, 1964; Banerji, 1965; Laloraya, 1965; van Overbeek, 1967), con la reactivación con cinetina de órganos expuestos a condiciones críticamente adversas (Mothes, 1964), y el efecto promotor de cinetina sobre la apertura estomática (Livné, 1965; Meidner, 1965).

En el capítulo de las cininas de este trabajo de tesis se mencionó, (fig. 7) que cinetina fomentó la apertura estomática en hojas de maíz y la concentración que mayor efecto tuvo fue muy similar a la determinada por Livné en cebada. Además, zeatina presentó una curva similar (fig. 14) pero la concentración de mayor efecto fue aproximadamente diez veces más diluida. Esta mayor sensibilidad a zeatina era de esperarse ya que ésta es una citocinina natural del maíz.

La pérdida relativa del ritmo transpiratorio de las hojas con el tiempo de incubación en citocininas, que se expresó por el corrimiento de los picos en las figuras 8 y 14, puede haberse debido a una menor sensibilidad o "envejecimiento". Este concepto de "envejecimiento" podría implicar que los flujos entre compartimientos en las células hayan disminuido, ya que es sabido que las citocininas debido a su basicidad son poco móviles y por ende haría falta una mayor concentración externa de citocinina que resulte en una concentración efectiva estimulante en el locus de acción. Otra explicación al

corrimiento de máximo podría ser la inducción de procesos que inactivan a la citoquinina, sea por fijación, sea por degradación. Sin descartar otras posibilidades es bien probable que cinetina y zeatina sean degradados como lo es adenina, (Bergman, 1958, Schlee, 1966). Quizá sea posible dilucidar estas alternativas, por ejemplo, con el uso de cinetina marcada en un estudio de cinetina compartamental (Cerejido, 1966).

Si bien no se hicieron observaciones con concentraciones mayores a 10^{-4} M, tanto por problemas de solubilidad como por la poca cantidad de sustancia disponible, es notable y sugestiva la similitud de la inhibición de la transpiración por cinetina y por zeatina (fig. 8 y 14) con el efecto dual en el crecimiento dependiente de la concentración de auxina. Otros autores similarmente, han observado inhibiciones con altas concentraciones de citoquininas en la síntesis de ARN (Carpenter, 1966) o en la actividad de nucleotidasas (Maciejewska, 1959; Srivastava, 1965; Udvardy, 1967) o en la absorción de agua (Katsumi, 1963).

El efecto promotor de cinetina y zeatina en el desarrollo de la capacidad transpiratoria fué aumentando progresivamente con el curso de la incubación (fig. 9 y 15) y esto concuerda con los resultados de Tivné (1965) y Meisner (1967). El último autor presenta evidencia que cinetina puede estar actuando por

Lo menos de dos modos en su promoción de la transpiración. Por un lado estaría promoviendo la fijación de CO_2 intercelular, lo que puede promover la apertura estomática, y por otro lado podría tener un efecto directo sobre los estomas que dependería de la velocidad de traslado de la droga y penetración a las células estomáticas.

El aumento de la promoción transpiratoria dependiente de cinetina fué notable durante los períodos de oscuridad (fig 9 y 15) y se observó que estas máximas aumentaban con el pasar del tiempo. Si bien en términos absolutos (tab 2.1) tanto el testigo como el tratamiento con cinetina sufren un deterioro en la capacidad transpiratoria con el correr del tiempo, este efecto es notablemente menor en los tratados. Sea cual fuera el mecanismo por el cual cinetina actúe, sea por depresión glicolítica o por incremento en la fijación del CO_2 parece ser que disminuye la "concentración" mínima intercelular de este gas (Γ) y siendo que en la oscuridad (Γ^*) tiende a crecer más en los testigos sin cinetina que en las hojas tratadas con la cinetina, se podría explicar la mayor promoción en la apertura estomática a oscuras por la mayor capacidad de fijación de CO_2 (Meidner, 1965). Sin que necesariamente haya oposición a la hipótesis sobre el papel que desempeñaría el CO_2 en el cierre estomático, no hay que descartar la posibilidad que a oscuras

La citocinina esté promoviendo procesos que favorecen la apertura, o que también, inhiba los que promueven el cierre de estomas (Zeitch, 1965) y haga valer así su efecto, manteniendo una apertura relativamente mucho mayor que de día ó bajo luz artificial.

Se observó que tanto cinetina como zeatina promovieron el poder absorbente de agua en las hojas tratadas respecto a los testigos sin cinetina. En razón de la escasa evidencia disponible referente a la promoción en la fijación de CO_2 por cinetina (Meidner, 1967) y en la distribución de hidratos de carbono (Goldberg, 1968), sería variase determinar los componentes de la tensión de succión y en especial la variación en la concentración osmótica de las hojas así tratadas. Pero no habría que descartar otras posibilidades como por ejemplo la de una activación metabólica del movimiento del agua. Pertinente a esto, Shaw y McEachron (1954) observaron que el incremento en el potencial osmótico es aproximadamente un décimo de potencia de agua desarrollado en células guardianas al ser expuestas a una fuente intensa de luz.

La observación que las citocininas promovieron la absorción de agua podría contribuir a explicar el fenómeno del acaparamiento de agua por los órganos en crecimiento. Estos órganos también tienen niveles elevados de citocininas que se sintetizan

en los ápices de la raíz y en tallos, y en los frutos jóvenes (Leopold, 1963). Además, el hecho que en estas condiciones experimentales no sólo se haya observado una promoción hídrica, podría indicar que los distintos tipos de células responden en forma similar (cambio de turgencia) a las citoquininas.

Se ha observado que hojas tratadas con cinetina comparadas a testigos sin cinetina mostraban rasgos de mayor vitalidad cuyo parámetro más evidente fué su mayor contenido en clorofila. Algo similar ocurrió en hojas de plantas "templadas" y luego sometidas a sequía, comparadas con las no "templadas". La vitalidad considerada en este caso se expresó en la mayor supervivencia de las primeras (ver pags 34 y 40). Si un incremento en la capacidad para absorber agua o para transpirar reflejara un estado de mayor vitalidad no parece ser entonces muy claro porqué hubo una mejoría tan pronunciada en la transpiración de hojas que por su tratamiento ("templadas"-sequía, no "templadas"-sequía, fig 10) tendrían que tener una menor vitalidad. Podría ocurrir que durante las condiciones hídricas adversas durante el "templado" de la semilla y el crecimiento de la planta se produjera una alteración en la composición de las bases (Kessler 1962) y una cierta degradación de los ácidos nucleicos como fue sugerido por Gates y Benner (1959). Las bases, producto de la degradación, podrían reactivar el metabolismo (Fetham, 1967) cuando nuevamente las condiciones hídricas adecuadas.

Se puede notar una cierta analogía en la neutralización del efecto de la sequía (entre cinetina y el de "templado") tanto en lo que respecta a la transpiración como a la absorción de agua (tabla 4, fig. 10). El hecho que cinetina tuvo menos efecto neutralizante sobre hojas de plantas "templadas" que sobre sus testigos correspondientes podría sugerir la formación o existencia de citocininas endógenas originadas bajo condiciones previas de "stress". Si bien el "templado" confirió a las plantas tratadas una mayor vitalidad, expresada en la mejor supervivencia en condiciones de deshidratación extrema, llama la atención el menor peso seco de las hojas de las plantas tratadas. Este hecho puede tener importancia agronómica puesto que la sequía impuesta sobre los embriones germinantes los rusticó para sobrevivir una ulterior sequía, pero por otro lado redujo aparentemente su capacidad de asimilación neta (tabla 6). Esta caída en el peso seco de las hojas de plantas "templadas" es mayor aún de lo que refleja la tabla, porque el tamaño estimado de las plantas fue en un 20-30% menor a los testigos no "templados". De modo que aparentemente las hojas de plantas "templadas" presentaban una desventaja en la asimilación fotosintética neta con respecto a las testigos correspondientes, pero a cambio de esta pérdida en peso aumentaron su vitalidad, manifestada ésta por su resistencia a condiciones de sequía y además pudieron

modelo "B" que parece ser más razonable, a pesar que nada se sepa sobre qué y cómo reprime el CO_2 la apertura estomática.

De los resultados con AIA y ácido giberélico se desprende que no es posible generalizar sus efectos sobre los distintos procesos. Eivné (1965) había observado una promoción transpiratoria del ácido giberélico considerablemente mayor que cinetina a las 3 horas de incubación de hojas de cebada, mientras que AIA no tuvo efecto. En este trabajo se observó en maíz, que es un cereal de verano, que AIA puede promover la transpiración, pero el efecto pareció ser pasajero. Esto lo distingue del efecto de las cininas que fué duradero, progresivo, más pronunciado y posiblemente más específico. El ácido giberélico si bien no tuvo acción o inhibió ligeramente la capacidad transpiratoria, en cambio promovió poderosamente la capacidad de absorción de agua y el efecto fué aditivo en presencia de cinetina. Es conocido que el ácido giberélico puede promover la absorción de agua en tejidos vegetales (Haber, 1960; Masuda, 1964 y otros) pero esto no explicaría porqué no promovió la apertura estomática e incluso mostró inhibición en la transpiración. Es posible que este factor de crecimiento, al promover la actividad amilolítica,

presentó evidencia que ni la fotofosforilación ni el metabolismo del ácido glicólico son necesarios para mantener a los estomas abiertos (Meidner, 1967), sino que más bien la concentración intercelular de CO_2 sería el factor predominante. De acuerdo a este modelo, el oramfenicol podría inhibir inicialmente los procesos enzimáticos relacionados con la fijación de CO_2 , inhibiendo la resíntesis de esas enzimas. Luego al irse acumulando las bases como resultado de la inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos, estas bases actuarían como cininas promoviendo la fijación de CO_2 y actuando además directamente sobre los estomas.

Los resultados obtenidos son de interés, por cuando hay una diferencia notable entre el efecto del isómero D y el L. El isómero D es el único de los cuatro oramfenicoles existentes que tiene actividad antibiótica. El isómero D, fué también el único que inhibió la transpiración, la apertura estomática, y deprimió el peso seco. El isómero L en cambio, no tuvo efecto significativo, salvo una excepción: el efecto aditivo en la capacidad de absorción en presencia de cinetina. Si D y L que tienen la capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa, tuvieron un comportamiento tan distinto, especialmente en la transpiración y en la capacidad de absorción, que se haría dudosa la adopción del modelo "A", mientras que no habría objeciones teóricas con el

revertir el efecto del cloramfenicol (Parthier, 1964; Mothes, 1964). Además, se ha observado que si bien cloramfenicol puede inhibir la síntesis proteica, no puede revertir la promoción de la absorción de agua promovida por cinetina en estileones de Cucurbita (Zoboraya, 1965). Las componentes del efecto observado en este trabajo pueden ser varias. Puede haber habido una inhibición en la síntesis de proteína, lo que a su vez pudo haber tenido un efecto sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y haber provocado en el curso de varias horas una acumulación de bases. Simultáneamente, D-three cloramfenicol podría haber actuado desacoplando la fosforilación oxidativa. Si se adoptara el modelo de Zelitch (1965) sobre el mecanismo de regulación estenótica, podría sugerirse un esquema "A" que explique el efecto del D-three cloramfenicol; los isómeros D y L desacoplarían la "bomba" de agua al cortar la fuente energética, y por ende las estomas se cerrarían; y luego al irse acumulando citoquininas, éstas revertirían el efecto desacoplante y al mismo tiempo fomentarían la fijación de CO_2 . Según Zelitch, el CO_2 actuaría como un represor del metabolismo de ácido glicólico, el cual a su vez genera el trifosfato de adenosina (TPA) necesario para impulsar la "bomba" de agua.

Se podría también adoptar otro esquema "B" sobre la regulación estenótica, basado sobre el trabajo de Meidner (1965) quién

hídrica, aunque deprimieron los pesos secos luego de 48 horas de incubación. El inesperado efecto promotor de estas moléculas (Livné, 1965), hace pensar en la existencia de un proceso que podría ser la acumulación de bases purínicas y pirimidínicas que no pudieron ser reutilizadas en la formación de nuevas matrices para la síntesis de macromoléculas. Ya se ha observado que ARNasa de por sí tiene propiedades similares a cinetina (Gunning, 1963). Sin duda en los fenómenos estudiados deben haber existido otras componentes, pues tanto actinomicina como la nucleotidasa pueden inhibir otros sistemas, y la resultante puede ser el deterioro acelerado y el colapso del órgano, como se ha visto aquí en varios experimentos de 3 y 4 días de duración, y que comenzó a reflejarse al final del experimento representado en la fig. 18A.

D-three cloramfenicol (fig 18B, tabla 10) fué singular por su inmediata inhibición transpiratoria y la rápida recuperación de las hojas tratadas. Al final del experimento, tanto la transpiración como la capacidad de absorción habían sido promovidas, pero los pesos secos estaban notablemente deprimidos. D-three cloramfenicol puede actuar como desacoplador de la fosforilación oxidativa, además de ser un inhibidor bastante específico de la síntesis de proteínas (Hanson, 1963; Stener, 1964; MacDonald, 1965). Es conocido que cinetina puede

transpiración al final del experimento fué ligeramente superior a la del testigo. Sería útil examinar con mayor detenimiento la relación de la salinidad con las citoquininas en el balance hídrico de las plantas.

En los experimentos con los análogos de cinetina y uracilo, que es la pirimidina característica del ARN y su análogo el tiouracilo, se observó en general (fig. 17 y tabla 8), una promoción de todos los parámetros estudiados. Entre éstos fué notable el efecto promotor de la purmicina, conocida más bien como un inhibidor de la síntesis de proteínas. Hay evidencia, sin embargo, que puede actuar promoviendo actividades anabólicas (Moog, 1964; MacDonald, 1966) e incluso incrementar la absorción de agua en cultivos de callus de soja (Blaydes, 1966). No sería extraño que este antibiótico actúe también como una citoquinina. Los uracilos, que no son análogos de cinetina, fueron seleccionados para explorar la posibilidad que productos de degradación de ARN puedan de por sí tener actividad de cininas con respecto a los parámetros aquí observados. Precisamente, los uracilos fueron los compuestos más destacados en su capacidad promotora de la transpiración y de la capacidad de absorción hídrica.

Actinomicina D y ARNase (fig. 18A, tabla 10) parecieron promover la transpiración inicial y la capacidad de absorción

aprovechar más rápidamente el agua disponible al ser reirrigadas (ver pag. 34 y 40). Además, es muy posible que en el proceso del "temple", en el estado de resistencia creado, o muy posiblemente durante la sequía producida posteriormente, se produzca un consumo más elevado de material respirable y se eleve el potencial de la fosforilación oxidativa (Livné, 1967) para poder disponer fácilmente de compuestos con una elevada energía libre en casos de "stress" ulteriores. Por lo tanto por los conceptos precedentes se podría considerar que la capacidad absorbente y transpiratoria de las hojas son un reflejo de su vitalidad a pesar de su pérdida en peso seco.

Las sales minerales si bien pueden actuar causando sequía fisiológica, son también directamente tóxicas (Adriani, 1958; Biebl, 1958; Stälfelt, 1956; Gale, 1967). Pueden en concentraciones elevadas provocar un "stress" que deteriora ciertas capacidades biosintéticas, y estas capacidades pueden ser protegidas o restauradas por cinetina (Ben-Zioni, 1967). En este contexto es interesante que concentraciones de Na tan bajas como $10^{-3}M$ y $10^{-4}M$ han podido inhibir la transpiración y, particularmente durante el período de oscuridad (fig. 11), mientras que en presencia de cinetina ó de luz se produjo una reversión de la inhibición. En el transcurso de la incubación en cinetina las hojas parecían recuperarse y "adaptarse", de modo que la

estaría suministrando grandes cantidades de sustrato y presionando sobre procesos de decarboxilación. Si el resultado neto de la activación metabólica del ácido giberélico fuera un aumento del CO_2 intercelular y particularmente en la oscuridad, quizá sea esa la probable explicación a lo observado.

Posiblemente exista un grado mayor de especificidad por parte de zeatina que por parte de cinetina y de ésta que por adenina o por uracilo. Pero las interacciones y las sustituciones con análogos y otras sustancias, y posiblemente la secuencia de los eventos modifiquen el cuadro de la especificidad.

Como conclusión, se podría decir que cualesquiera sean los mecanismos primarios de acción de las citoquininas, en este trabajo se ha podido dar una respuesta a la pregunta formulada al comienzo de esta discusión. Parece posible, al menos en el sistema experimental utilizado que el balance hídrico refleje en cierta medida el estado metabólico y la vitalidad del vegetal observado. Esto podría quizá explicar porqué órganos y tejidos en crecimiento acaparan el agua, y podría tener derivaciones ~~análogas en trabajos futuros principalmente sobre el "temple"~~

prácticas en trabajos futuros, principalmente sobre el "tempo"
contra la sequía.

RESUMEN

Se estudió el efecto de citocininas, análogos estructurales de las mismas, inhibidores del metabolismo y factores del crecimiento sobre el balance hídrico de hojas aisladas de maíz.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a - La cinetina y la zeatina promovieron la apertura estomática, con un efecto máximo por parte de la cinetina a $5 \cdot 10^{-6} M$ y la zeatina a $5 \cdot 10^{-7} M$. Hubo un mayor efecto en la oscuridad, el cual aumentó con el curso del tiempo. La sensibilidad a las drogas disminuyó con el tiempo de incubación.
- b - Ambas citocininas promovieron la capacidad de absorción hídrica y el peso seco por unidad de área foliar.
- c - La cinetina aumentó la transpiración y absorción del agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- d - La cinetina y la luz revirtieron parcialmente la inhibición de la transpiración producida por $Cl Na (10^{-3} - 10^{-5} M)$.
- e - Un tratamiento de "temple" contra la sequía al estado de semilla aumentó la transpiración y absorción de agua en hojas aisladas de plantas sometidas a sequía.
- f - Los análogos estructurales de la cinetina: adenina, adenosina, 8-azaadenina, puromicina, guanina, 8-azaguanina, 6-bencil-amino-9-tetrahidropirano-2-yl)-9 H-purina, y las pirimidinas: uracilo y tiouracilo, aumentaron en variado grado y en forma aditiva la capacidad de absorción hídrica.

Guarina y azaguanina no promovieron al peso seco; adenina, puromicina y tiouracilo no promovieron la capacidad de absorción hídrica.

- g - La actinomicina D y la ribonucleasa pancreática promovieron la capacidad de absorción hídrica y estimularon inicialmente la capacidad transpiratoria, pero luego llegaron a inhibirla. Ambas sustancias en especial la actinomicina, deprimieron el peso seco en experimentos de larga duración. En ambos casos el agregado de cinetina tuvo un ligero efecto aditivo.
- h - D-threo cloramfenicol (10^{-5} - 10^{-4} M) inhibió notablemente la transpiración la cual fué revertida parcialmente por cinetina. Al cabo de varias horas de incubación con el inhibidor hubo una recuperación y posterior estimulación de la transpiración y de la capacidad foliar de absorción hídrica. El peso seco fué muy inhibido, pero la cinetina alivió el efecto. El isómero L no tuvo un efecto apreciable.
- i - El ácido indolacético ($5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} M) estimuló temporariamente la transpiración, inhibió ligeramente la capacidad de absorción hídrica y promovió los pesos secos en experimentos de larga duración. No hubo interacción con cinetina.
- j - El ácido giberélico ($5 \cdot 10^{-6}$ M) tuvo un notable efecto sobre la capacidad de absorción hídrica, pero interactuó con cinetina.

Se concluye que la cinetina, la zeatina y posiblemente otros análogos estructurales intervienen en el mecanismo regulatorio del balance hídrico en las plántulas de maíz.

La analogía entre las respuestas de las plantas tratadas con cinetina y "templadas" sugiere la intervención de mecanismos de acción similares.

Las citocininas y productos de degradación de los ácidos nucleicos actuarían a través de un efecto revitalizante del metabolismo. Se propone además, que las plantas podrían regular el contenido de cininas de sus diversos órganos y tejidos para poder mantener el equilibrio en condiciones de "stress" hídricos.

TABLAS —————

Tabla 1. Transpiración de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo.

Hojas incubadas en cinetina en una cámara climática con un fotoperíodo de 8 horas de luz artificial con 18.000 Lux, a 28°C 45-50% HR durante los períodos de luz y a 26°C y 60-65% HR en los períodos de oscuridad.

	<u>Transpiración mg/cm²hr.</u>		
Tiempo transcurrido (horas)	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>
Control (H ₂ O)	7,1	4,3	3,5
Cinetina 5.00 ⁻⁶ M	7,8	7,3	6,5

Efecto de la cinetina sobre la conductancia al
al aire en hojas aisladas de maíz

Tabla 2.

Hojas incubadas durante 3 horas a 28°C, 50% HR bajo 22,000
Lux de luz artificial.

	$\text{cm}^3/\text{cm}^2.\text{min}$	%
Testigo (H_2O)	1.8 ± 0.42	100
Cinetina $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$	3.0 ± 0.27	167

Tabla 3.

Hojas incubadas durante 16 horas a 26°C, 60% HR en la
oscuridad.

	$\text{cm}^3/\text{cm}^2.\text{min}$	%
Testigo (H_2O)	0.8 ± 0.12	100
Cinetina $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$	1.1 ± 0.13	138

Tabla 4 Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "templado" contra la sequía sobre la absorción de agua en hojas aisladas de maíz. Hojas preincubadas 48 horas con cinetina $5 \cdot 10^{-6}$ M a 26-29°C, 40-60% HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-40.000 lux).

		(1)	(2)	(3)	(4)
		$\Delta/40'$	% TA	% A	Significación estadística
No "Templado" (N)	Riego Testigo H ₂ O (NR) (NRO)	12,7 [±] 1,7	100	100	a
	Cinetina (NRK)	20,3 [±] 2,1	160	160	b
	Sequía Testigo H ₂ O (NS) (NSO)	7,2 [±] 1,2	57	100	c
	Cinetina (NSK)	11,8 [±] 0,5	93	164	a
"Templado" (T)	Riego Testigo H ₂ O (TR) (TRO)	19,0 [±] 2,2	150	100	b
	Cinetina (TRK)	22,2 [±] 1,7	175	117	b
	Sequía Testigo H ₂ O (TS) (TSO)	18,5 [±] 1,3	146	100	b
	Cinetina (TSK)	23,1 [±] 2,5	182	125	b

- (1) /40' - Incremento producido en el CRA a partir de un CRA de 75% durante 40 minutos.
- (2) % TA - Porcentaje con respecto al testigo absoluto: No "templado" con riego y sin cinetina.
- (3) % A - Porcentaje con respecto al testigo correspondiente sin cinetina.
- (4) - Todos los resultados señalados con letras iguales expresan que no hubo diferencia significativa entre ellos.

Tabla 5. Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "templado" contra la sequía sobre la velocidad de deshidratación y la conductancia al pasaje del aire en hojas aisladas de maíz. Hojas de maíz preincubadas 48 horas con cinetina $5.10^{-6}M$ a 26-29°C, 40-60% HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar 20-40.000 Iux).

			(1)	(2)
			Deshidratación min.	Conductancia $cm^3/cm^2min.$
No "Templado" (N)	Riego (NR)	Testigo H_2O (NRO)	154	7,5
		Cinetina (NRK)	131	9,7
	Sequía (NS)	Testigo H_2O (NSO)	215	5,0
		Cinetina (NSK)	172	6,8
"Templado" (T)	Riego (TR)	Testigo H_2O (TRO)	138	7,7
		Cinetina (TRK)	130	7,8
	Sequía (TS)	Testigo H_2O (TSO)	170	6,4
		Cinetina (TSK)	147	7,0

- (1) - Duración en minutos de la deshidratación necesaria para obtener un CRA de 75% (Materiales y Métodos, G).
- (2) - Determinación de la conductancia al pasaje del aire a través de las hojas (Materiales y Métodos, D) a los 20 minutos de iniciado el proceso de deshidratación.

Tabla 6 Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "templado" contra la sequía sobre la relación de pesos secos a áreas foliares y grado de acartuchamiento en hojas aisladas de maíz. Hojas de maíz preincubadas 48 horas en cinetina $5 \cdot 10^{-6} M$ a $26-29^{\circ}C$, $40-60\%$ HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar ($20-40.000$)lux). El acartuchamiento de las hojas se produjo en condiciones de $28 \pm 1^{\circ}C$, 50% HR, $30-40.000$ lux y una brisa de $80-90$ m/min.

		(1)	(2)	(3)	(4)	
		ng. PS/cm ²	% TA	% A	Acartuchamiento	
No "Templado"	Riego	Testigo H ₂ O	1,17 [±] 0,05	100		-
		Cinetina	1,36 [±] 0,04	116		-
	Sequía	Testigo H ₂ O	1,03 [±] 0,08	88	100	+++
		Cinetina	1,18 [±] 0,09	101	115	±
"Templado"	Riego	Testigo H ₂ O	0,99 [±] 0,05	85	100	-
		Cinetina	1,22 [±] 0,07	104	122	-
	Sequía	Testigo H ₂ O	0,91 [±] 0,05	78	100	++
		Cinetina	1,15 [±] 0,06	98	126	-

- (1) -Mg de peso seco por cm² de área foliar.
 (2) -Porcentaje con respecto al testigo absoluto: no "templado", con riego, sin cinetina.
 (3) -Porcentaje con respecto al testigo H₂O correspondiente.
 (4) -Evaluación cualitativa de la marchitez en hojas de maíz, donde:
 (+) representa acartuchamiento incipiente
 (+++) representa fuerte acartuchamiento
 (-) representa sin acartuchamiento aparente (ver también figuras 11 y 12).

Tabla 7A Efecto de la zeatina sobre la absorción hídrica y relación de pesos secos a áreas en hojas aisladas de maíz. Hojas preincubadas 24 horas entre 27 y 29°C, 35-50% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar de 25-40.000 Lux.

	<u>Capacidad de absorción</u>		
	<u>Δ/40 min.</u>	<u>%</u>	<u>ng.PS/cm²</u>
Testigo (H ₂ O)	56 [±] 7	100	0,67 [±] 0,03
Zeatina 10 ⁻⁵ M	90 [±] 18	161	0,71 [±] 0,03
Zeatina 10 ⁻⁷ M	124 [±] 33	222	0,95 [±] 0,04
Cinetina 5.10 ⁻⁶ M	88 [±] 9	157	0,87 [±] 0,05

Δ/40 min.-Incremento producido en la CRA a partir de un CRA de 75% durante 40 minutos.
 ng.PS/cm² -ng. de peso seco por cm² de área foliar.

Tabla 7B Efecto de la zeatina sobre la conductancia al aire en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas durante 3 horas a 28°C, 45% HR con 30-40.000 Lux de luz solar.

	<u>cm³/cm² min</u>	<u>%</u>
Testigo (H ₂ O)	10,2 [±] 0,11	100
Zeatina 5.10 ⁻⁶ M	15,5 [±] 0,87	152
Cinetina 5.10 ⁻⁶ M	14,0 [±] 0,75	137

Tabla 8 Efecto de cinetina e interacción con diversos análogos sobre la absorción hídrica y relación de pesos secos a áreas foliares en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas en las diversas sustancias a $5 \cdot 10^{-6}M$ por 26-29°C, 35-60% HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz (20-40.000 Lux).

	Capacidad de Absorción			Peso Seco
	$\Delta/40$ min.	% TA	% A	ng.PS/cm ²
Testigo H ₂ O	14,6 [±] 0,7	100		0,73 [±] 0,04
Cinetina	21,2 [±] 1,0	145		0,83 [±] 0,03
Adenina	21,4 [±] 1,1	146	100	0,79 [±] 0,05
Adenina + Cinetina	23,0 [±] 1,6	158	108	0,69 [±] 0,03
Adenosina	16,3 [±] 0,6	112	100	0,73 [±] 0,04
Adenosina + Cinetina	18,2 [±] 0,9	125	112	0,92 [±] 0,06
Azaadenina	18,5 [±] 0,7	127	100	0,84 [±] 0,04
Azaadenina + Cinetina	21,8 [±] 0,5	149	118	0,89 [±] 0,05
Guanina	14,3 [±] 0,7	98	100	0,81 [±] 0,03
Guanina + Cinetina	21,7 [±] 1,0	149	152	0,88 [±] 0,04
Azaguanina	15,6 [±] 0,5	107	100	0,79 [±] 0,07
Azaguanina + Cinetina	23,2 [±] 1,5	159	149	0,86 [±] 0,05
Puronicina 10 ⁻⁴ M	21,7 [±] 1,3	149	100	0,74 [±] 0,03
Puronicina 10 ⁻⁴ M+Cinetina	22,3 [±] 1,7	153	103	0,85 [±] 0,04
Uracilo	18,0 [±] 0,7	123	100	0,79 [±] 0,03
Uracilo + Cinetina	23,6 [±] 1,8	162	131	0,89 [±] 0,05
Tiburacilo	18,4 [±] 1,2	126	100	0,90 [±] 0,08
Tiburacilo + Cinetina	25,0 [±] 1,0	171	136	0,86 [±] 0,07

- $\Delta/40$ min - Incremento producido en el CRA a partir de un CRA de 75% durante 40 minutos.
- % TA - Porcentaje con respecto al testigo absoluto: sin análogo y sin cinetina.
- % A - Porcentaje con respecto al incubado con el análogo correspondiente sin cinetina.
- Mg.PS/cm² - Mg. de peso seco por cm² área foliar.

Tabla 9 Efecto de la cinetina e interacción con D y L-threo cloramfenicol sobre la conductancia al pasaje del aire en hojas aisladas de maíz. Hojas preincubadas en las diversas sustancias por 3 horas a 28°C, 50% HR con 30-40.000 Lux de luz solar.

	$\text{cm}^3/\text{cm}^2 \text{min.}$	% Testigo: H_2O	% I
Testigo H_2O	8,3 \pm 0,21	100	
Testigo K	11,2 \pm 0,35	135	
D-threo cloramfenicol 10^{-4}M	5,2 \pm 0,15	63	100
D-threo cloramfenicol $10^{-4}\text{M} + \text{K}$	7,0 \pm 0,28	84	135
L-threo cloramfenicol 10^{-4}M	8,0 \pm 0,26	96	100
L-threo cloramfenicol $10^{-4}\text{M} + \text{K}$	10,5 \pm 0,99	126	135

$\%$ Testigo H_2O -- Porcentaje con respecto al testigo H_2O .
 $\%$ I -- Porcentaje con respecto al incubado con el inhibidor correspondiente sin cinetina.
 K -- Cinetina $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$.

Tabla 10 Efecto de la cinetina e interacción con diversos inhibidores del metabolismo sobre la capacidad de absorción hídrica y la relación de pesos secos a áreas foliares de hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas en las diversas sustancias por 48 horas entre 27° y 30°C, 35-55% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (25-40.000 Lux).

	<u>Capacidad de Absorción</u>			<u>Pos. Seca</u>
	<u>$\Delta/40$ min</u>	<u>% TA</u>	<u>% I</u>	<u>mg.PS/cm²</u>
Testigo H ₂ O	9,2 [±] 0,4	100		0,87 [±] 0,03
Testigo K	14,5 [±] 1,0	158		0,92 [±] 0,05
Actin 5.10 ⁻⁶ M	17,5 [±] 0,6	190	100	0,75 [±] 0,03
Actin 5.10 ⁻⁶ M + K	23,4 [±] 0,5	254	134	0,79 [±] 0,07
ARNasa 5.10 ⁻⁶ M	11,2 [±] 0,7	22	100	0,81 [±] 0,04
ARNasa 5.10 ⁻⁶ M + K	21,0 [±] 0,4	228	187	0,83 [±] 0,03
D-clor. 10 ⁻⁴ M	20,6 [±] 0,9	289	100	0,69 [±] 0,06
D-clor. 10 ⁻⁴ M + K	23,2 [±] 0,6	252	122	0,74 [±] 0,04
L-clor. 10 ⁻⁴ M	10,1 [±] 0,3	110	100	0,85 [±] 0,04
L-clor. 10 ⁻⁴ M + K	20,8 [±] 2,2	226	206	0,89 [±] 0,04

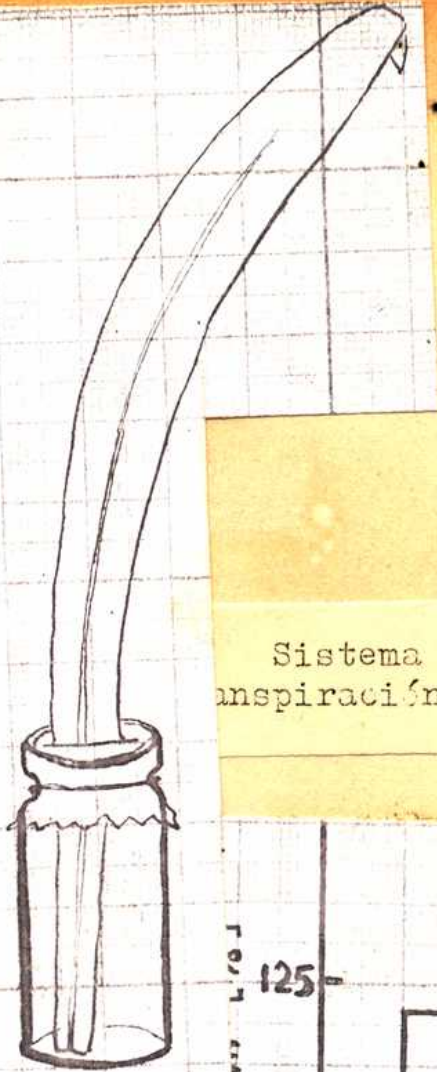
- $\Delta/40$ min. -- Incremento producido en el CRA a partir de un CRA de 75% durante 40 minutos.
- % TA -- Porcentaje con respecto al testigo absoluto: sin inhibidor y sin cinetina.
- % I -- Porcentaje con respecto al incubado con el inhibidor correspondiente sin cinetina.
- K -- Cinetina 5.10⁻⁶M.
- Actin. -- Actinomicina.
- D-clor. -- D-threo cloranfenicol.
- L-clor. -- L-threo cloranfenicol.

Tabla 11 Efecto de la cinetina e interacción con los ácidos indolacéticos y giberélicos sobre la absorción de agua y relación de peso seco a áreas foliares en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas en las diversas sustancias por 48 horas entre 26° y 29°C a 40-60% HR, con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-30.000 Lux).

	<u>Capacidad de Absorción de agua</u>			<u>Peso Seco</u>
	<u>$\Delta/40$ min.</u>	<u>% TA</u>	<u>% F</u>	<u>mg.PS/cm²</u>
Testigo H ₂ O	9,2 [±] 0,5	100		0,88 [±] 0,06
Testigo Cinetina 5 0 ⁻⁶ M	14,5 [±] 0,6	158		0,92 [±] 0,09
AIA 10 ⁻⁵ M	7,1 [±] 0,4	77	100	0,95 [±] 0,10
AIA 10 ⁻⁵ M + Cinetina	13,1 [±] 0,4	143	186	0,96 [±] 0,07
AG 5.10 ⁻⁶	20,9 [±] 0,9	227	100	0,88 [±] 0,08
AG 5.10 ⁻⁶ M + Cinetina	24,7 [±] 2,5	268	118	0,95 [±] 0,07

- $\Delta/40$ min. -- Incremento producido en el CRA a partir de un CRA de 75% durante 40 minutos.
- % TA -- Porcentaje con respecto al testigo absoluto: sin factor de crecimiento y sin cinetina.
- % F -- Porcentaje con respecto al testigo incubado con el factor de crecimiento correspondiente, sin cinetina.
- mg PS/cm² -- mg de peso seco por cm² de área foliar.

F I G U R A S



Sistema experimental utilizado para la medición de la transpiración.

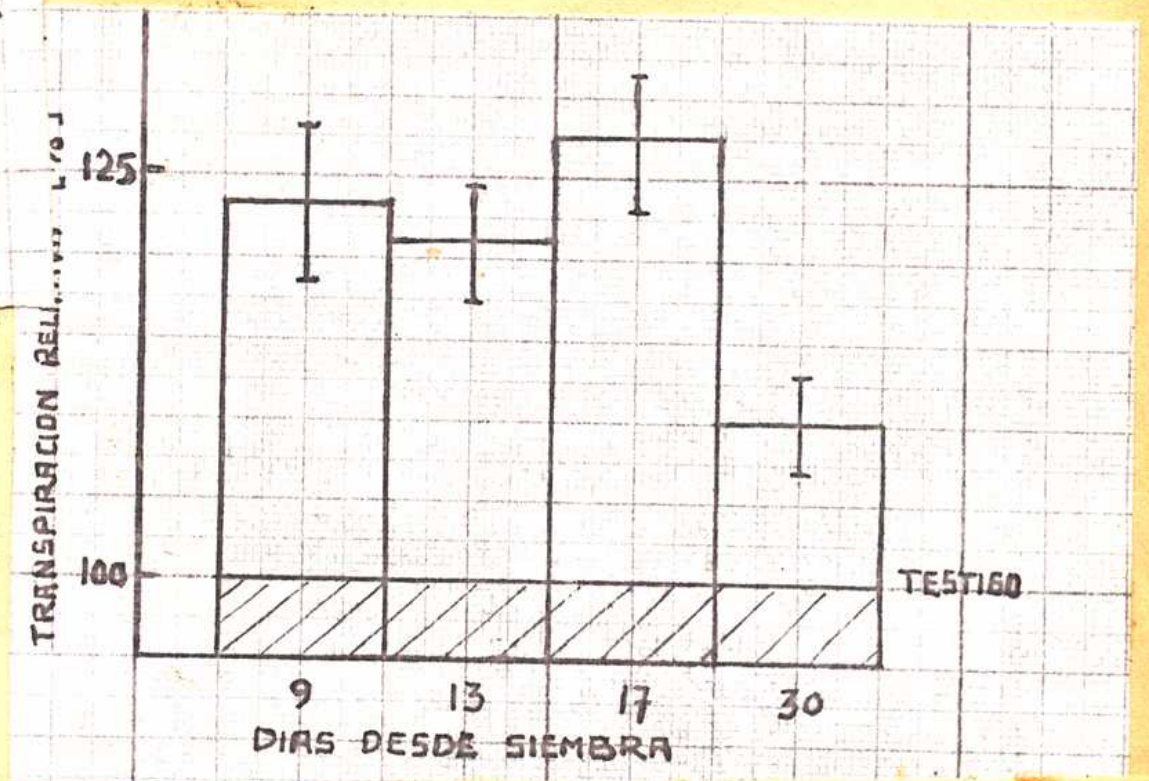


Fig. 2 Efecto de la cinetina sobre la transpiración de hojas aisladas obtenidas de plantas de distinta edad. Hojas incubadas en cinetina a $5 \cdot 10^{-6} M$ por 3 horas a $27^{\circ}C$, 40-60% HR y luminosidad de 25-30.000 Lux.

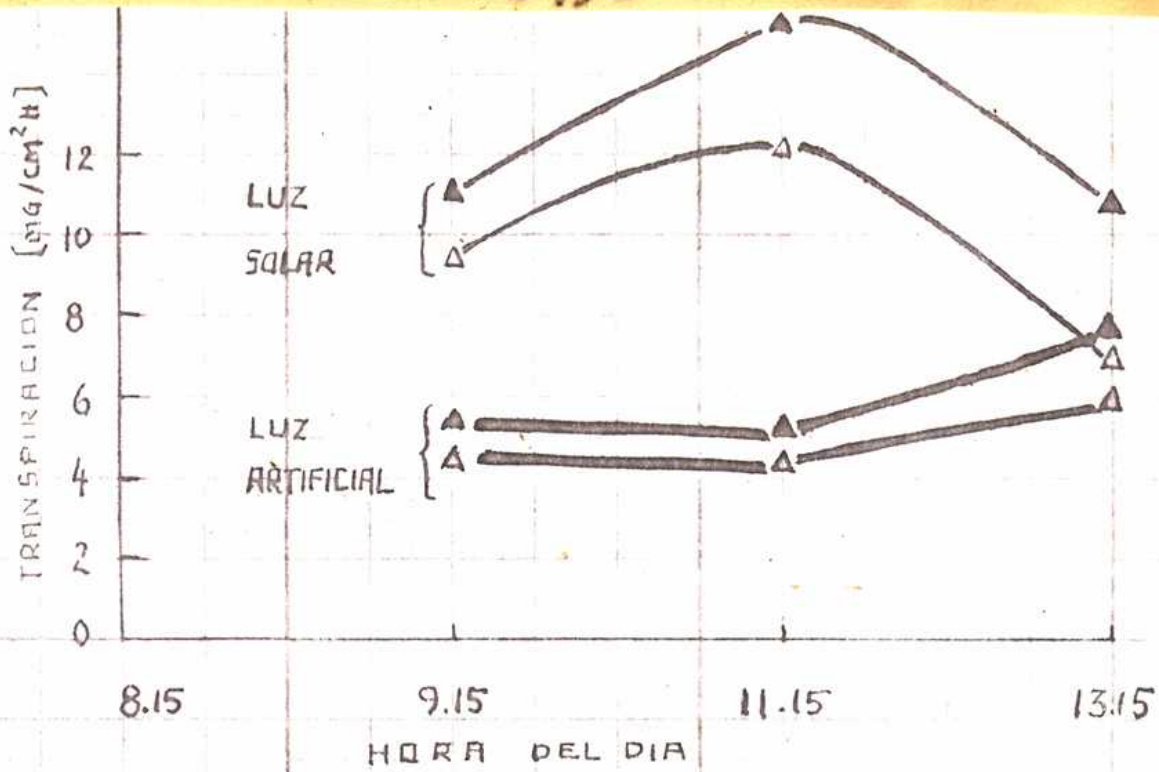
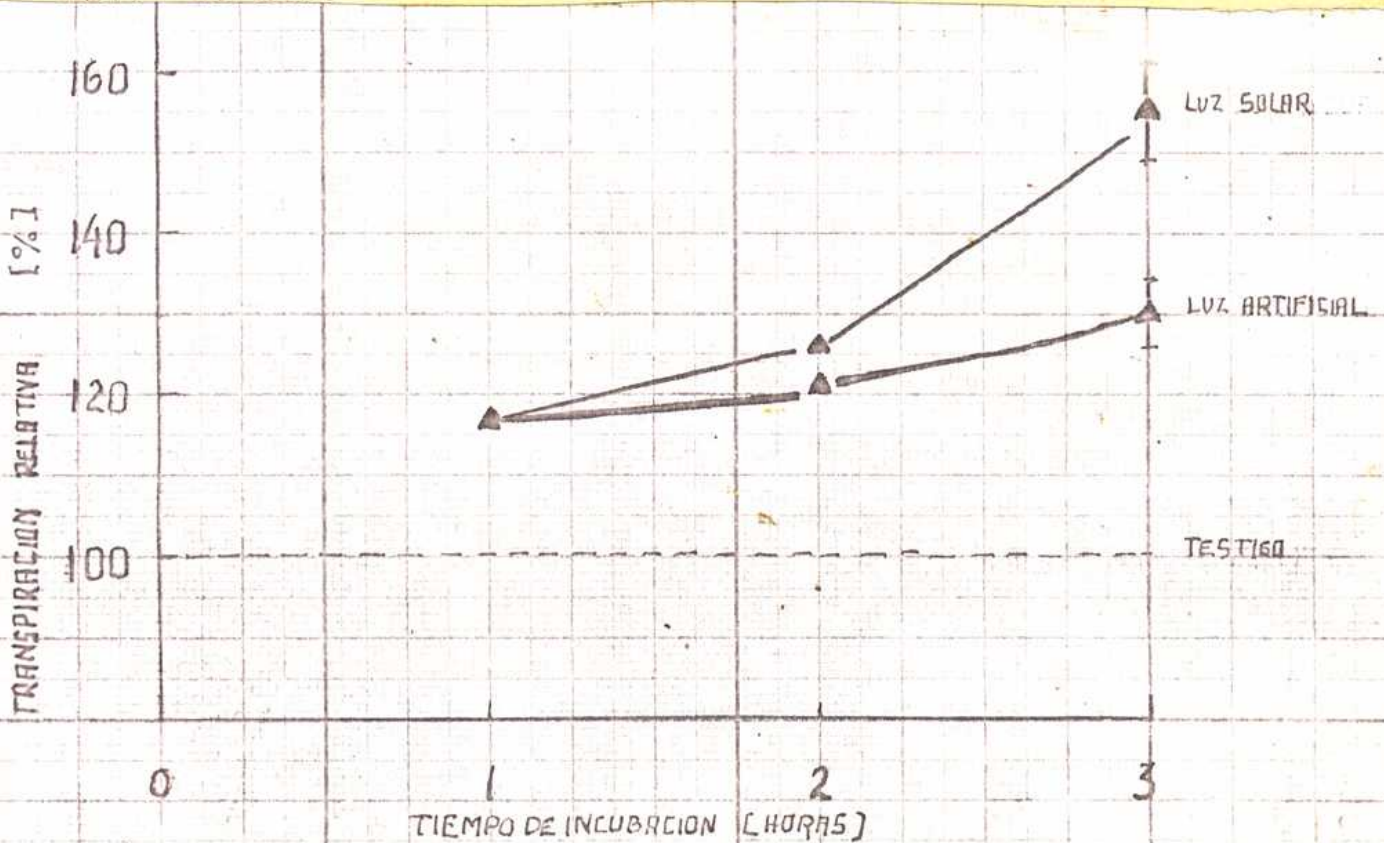


Fig 3 y 4 Efecto de la cinetina sobre la transpiración e interacción con iluminación solar y artificial. Hojas aisladas de maíz incubadas en cinetina $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ por 3 horas a $28-30^\circ\text{C}$, 30-45% HR. Iluminación solar 30-42.000 Lux en el invernáculo y 26°C , 50% HR e iluminación artificial de 20-25.000 Lux a nivel foliar.



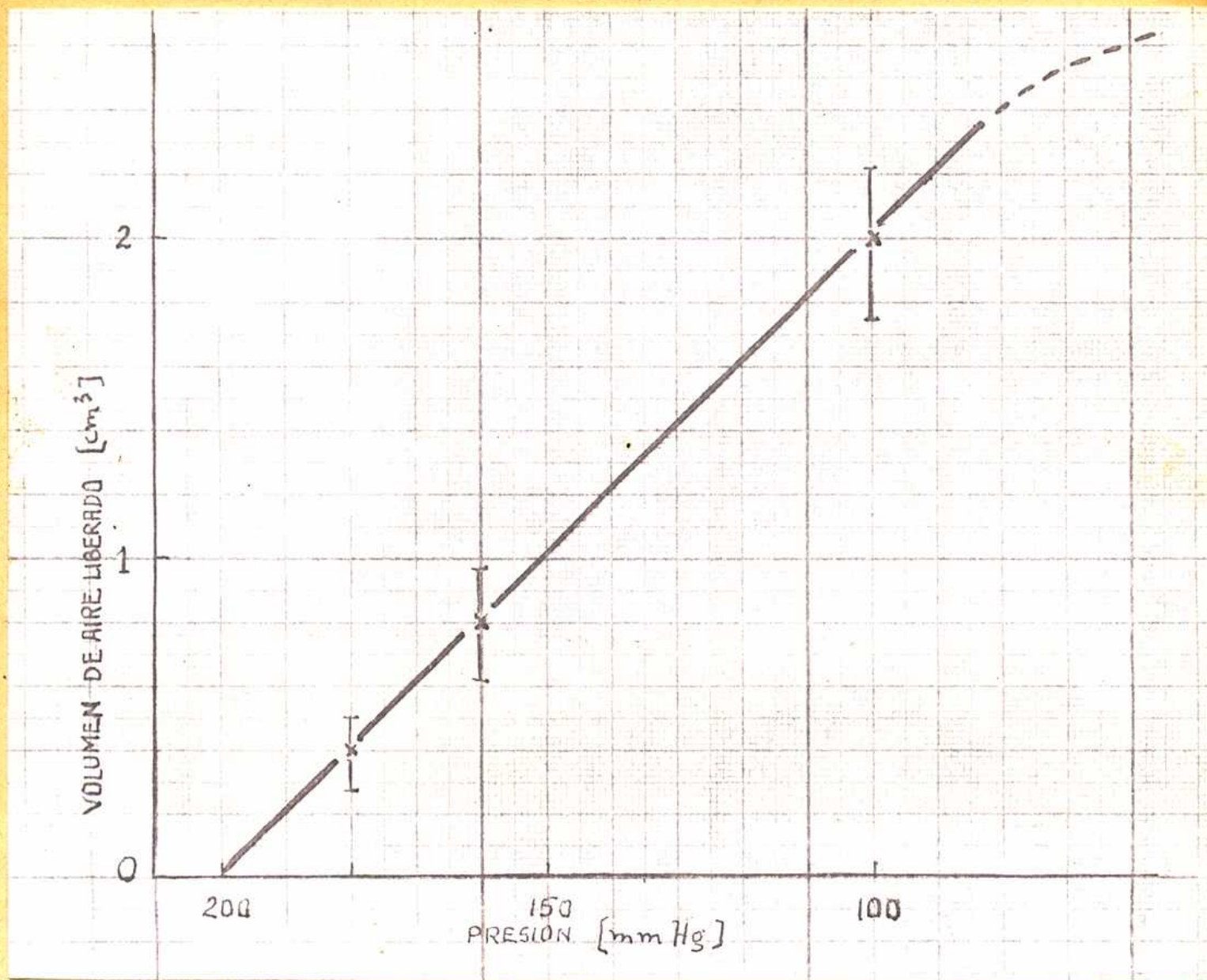


Fig. 5 Curva de calibración del porómetro de Alvim utilizado.

Fig. 6 Relación entre apertura estomática y conductancia al pasaje de aire a través de hojas de maíz.

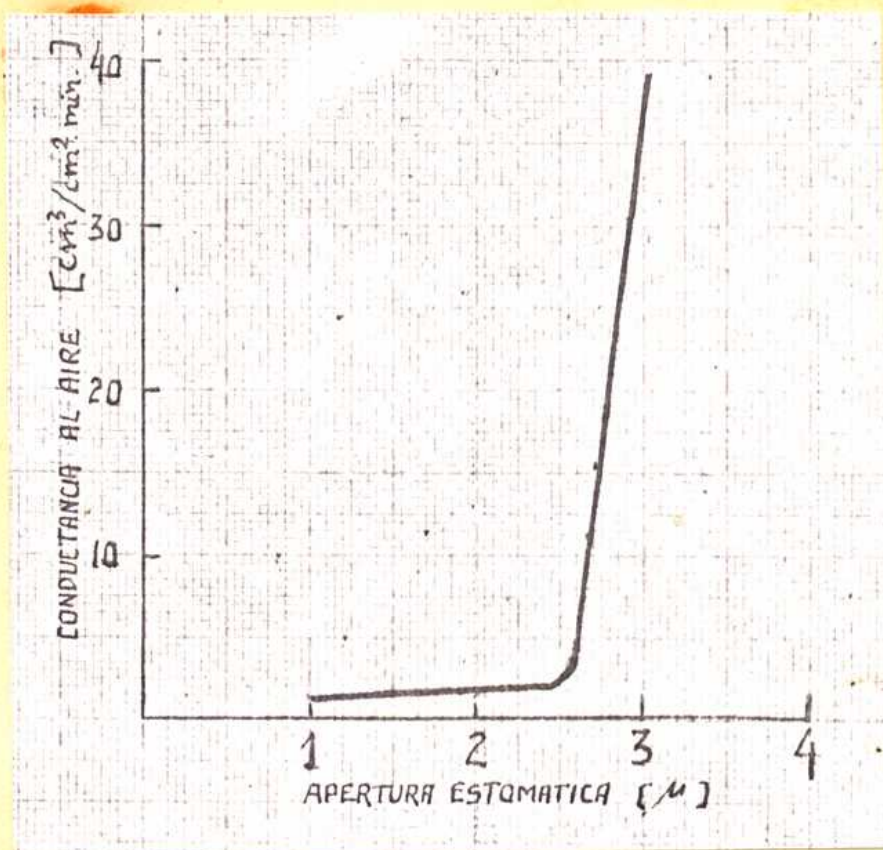


Fig. 7 Efecto de la cinetina sobre la velocidad de deshidratación y ulterior rehidratación de hojas aisladas de maíz. Hojas preincubadas en cinetina $5 \cdot 10^{-6} M$ por 24 horas a $26-29^{\circ}C$, 40-60% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar ($20-30.000 \text{ Lux}$). Deshidratación producida bajo luz solar difusa ($10-15.000 \text{ Lux}$). Reabsorción producida en cámara húmeda.

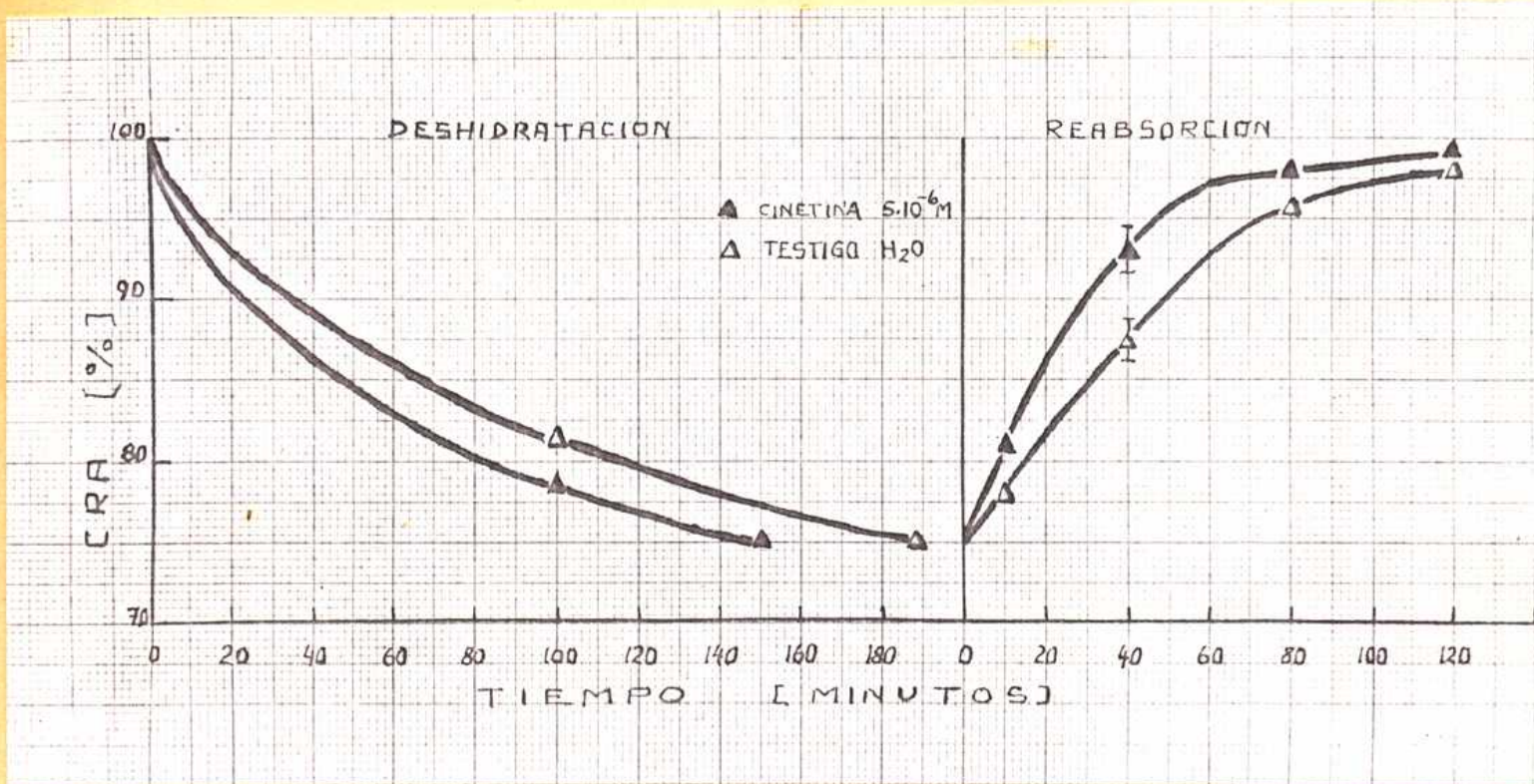


Fig. 8 Efecto de diferentes concentraciones de cinetina. Hojas incubadas 3 y 24 horas en diversas concentraciones de la droga a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% HR y 30-40.000 Lux de iluminación solar.

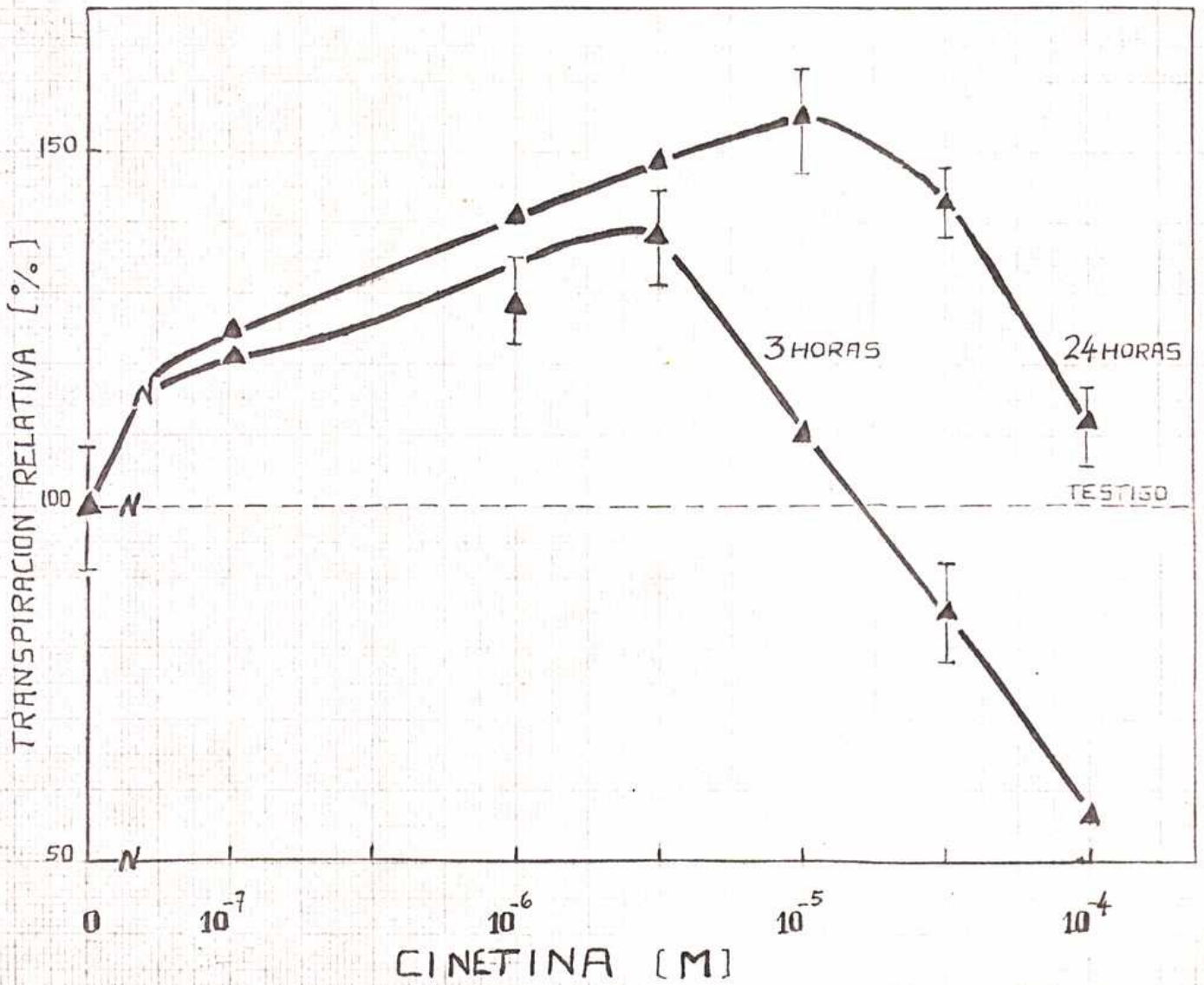


Fig. 9 Efecto de la cinetina sobre la actividad transpiratoria de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo. Hojas incubadas con la droga a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 40-60% HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-40.000 lux).

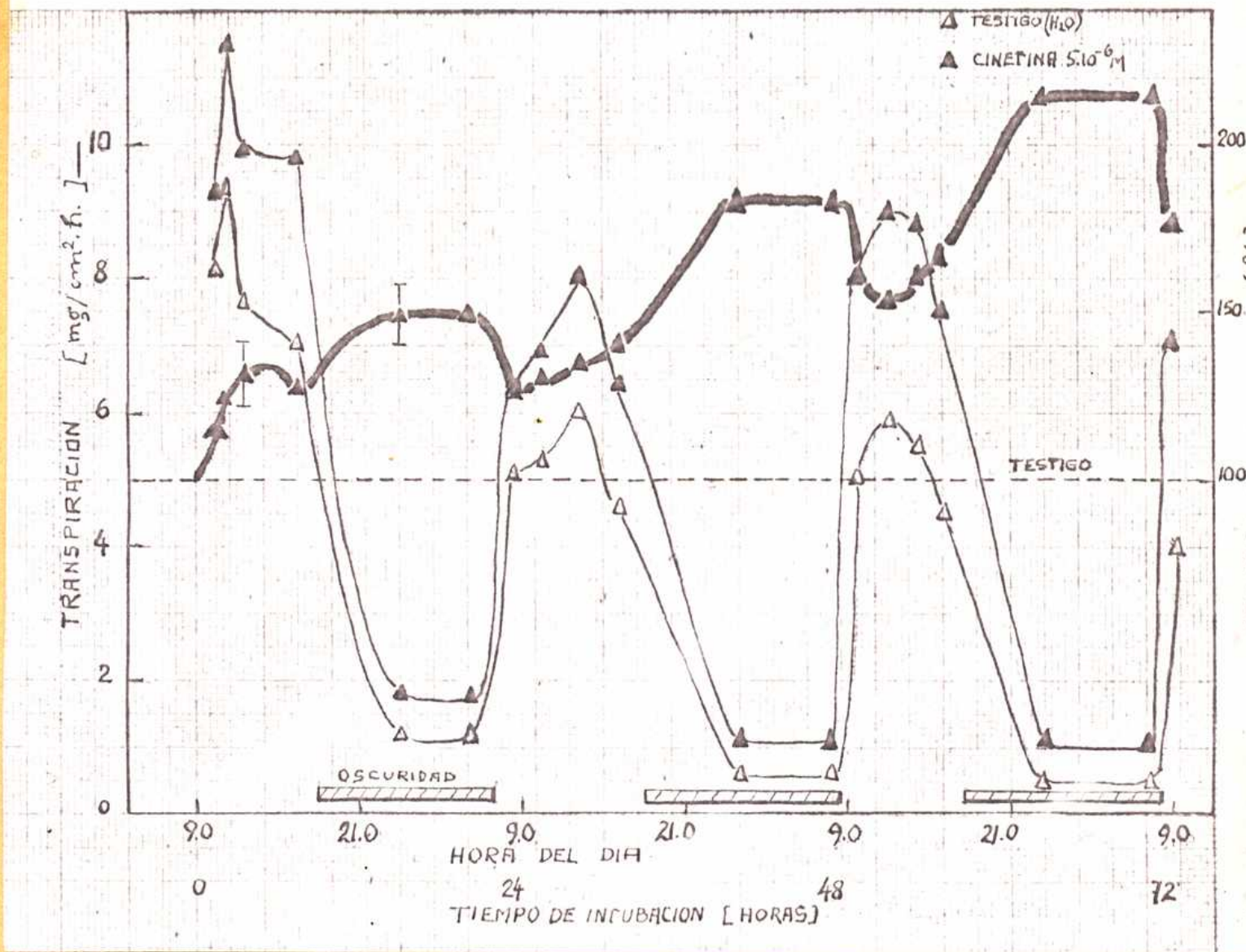


Fig. 10 Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "temple" contra la sequía sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas a 26-29°C, 40-60% HR y con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-40.000).

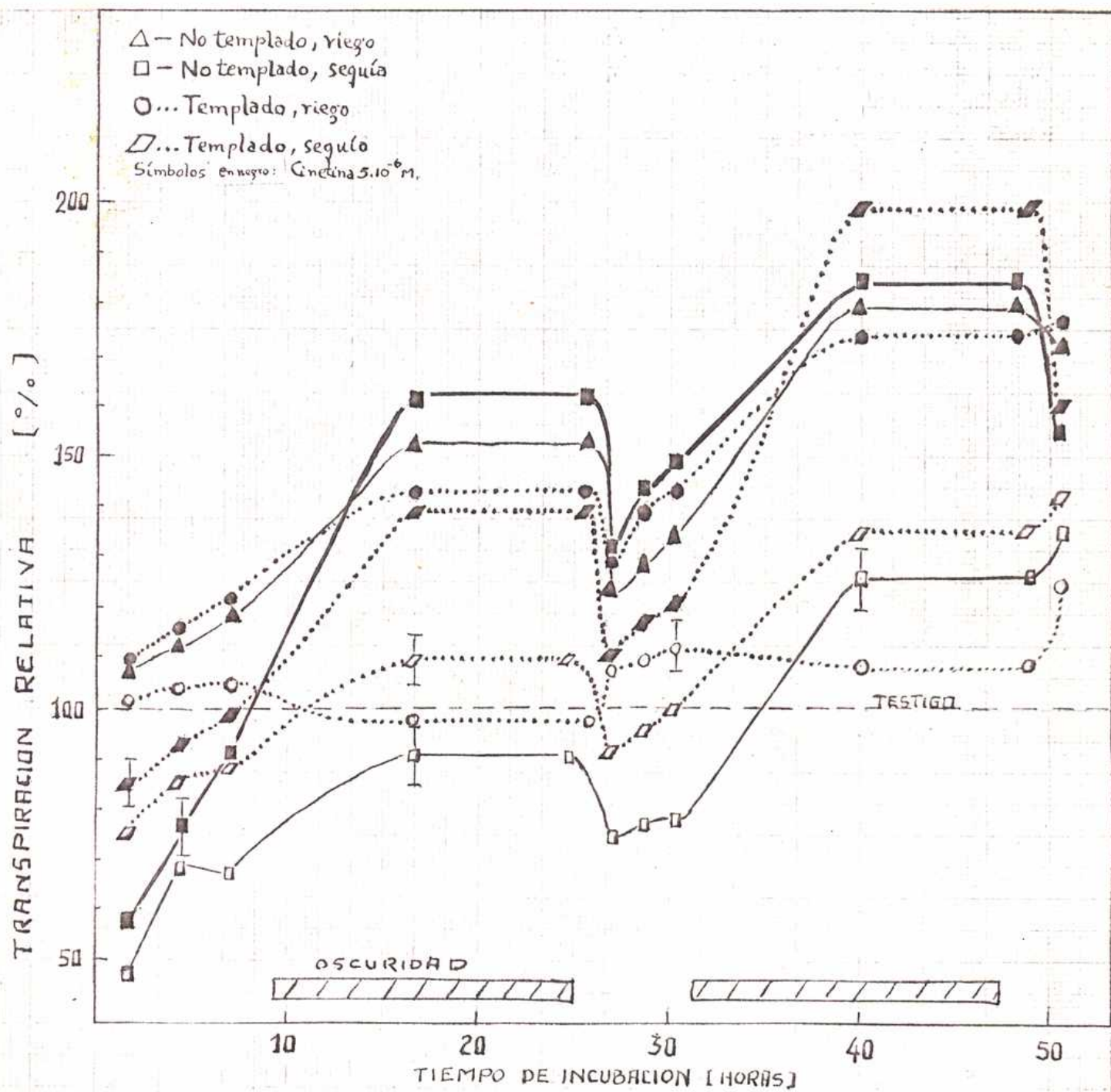




Fig. 11. Supervivencia: un criterio de vitalidad. (De derecha a izquierda). Terrina con plantas no-"templadas" expuestas a sequía que mostraron marchitez 7 mediodías consecutivos, y luego fueron reirrigados. Terrina "1" con plantas "templadas" expuestas a las mismas condiciones pero no reirrigadas. Terrina "2" con plantas "templadas" expuestas a las mismas condiciones y luego reirrigadas.

Fig. 2 Efecto de la cinetina e interacción con un tratamiento de "tempo" entre la sequía sobre el "acortamiento" de hojas viejas de maíz.

hojas preincubadas 24 horas en cinetina $5 \cdot 10^{-6}M$ a $25^{\circ}C$, 40-60% HR, 8 horas de luz solar (20-30.000 lux). Arriba: 9. 0 horas. Abajo: 1.00 horas. 30-40.000 lux, brisa de 80-90 m/min, $28^{\circ}C$ y 50% HR.

K: Cinetina $5 \cdot 10^{-6}M$; C: agua; N: hojas de plantas no "tempo" con riego; T: hojas de plantas "tempo" con un tratamiento posterior de sequía; S: hojas de plantas no "tempo" con un tratamiento posterior de sequía.

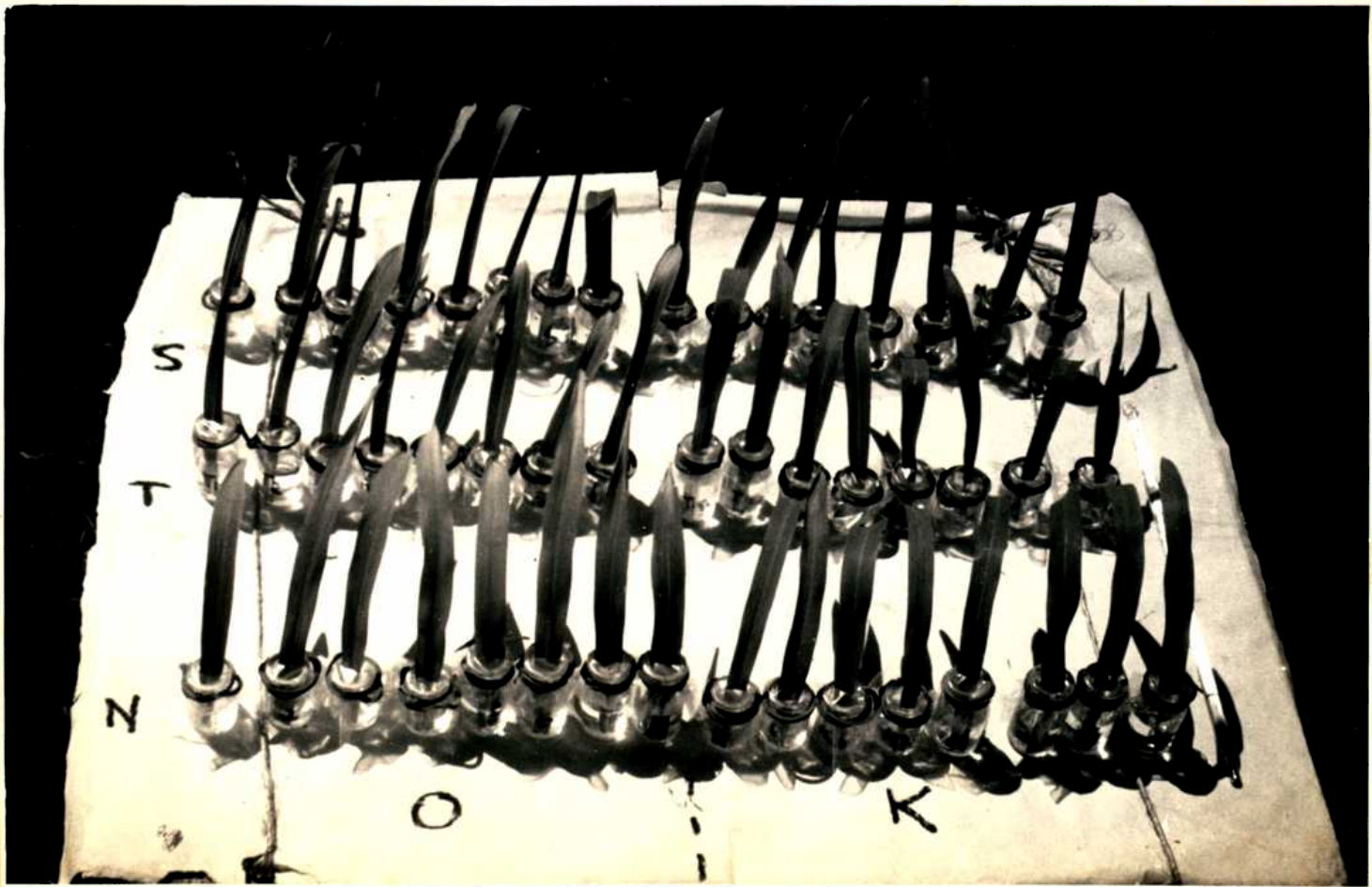
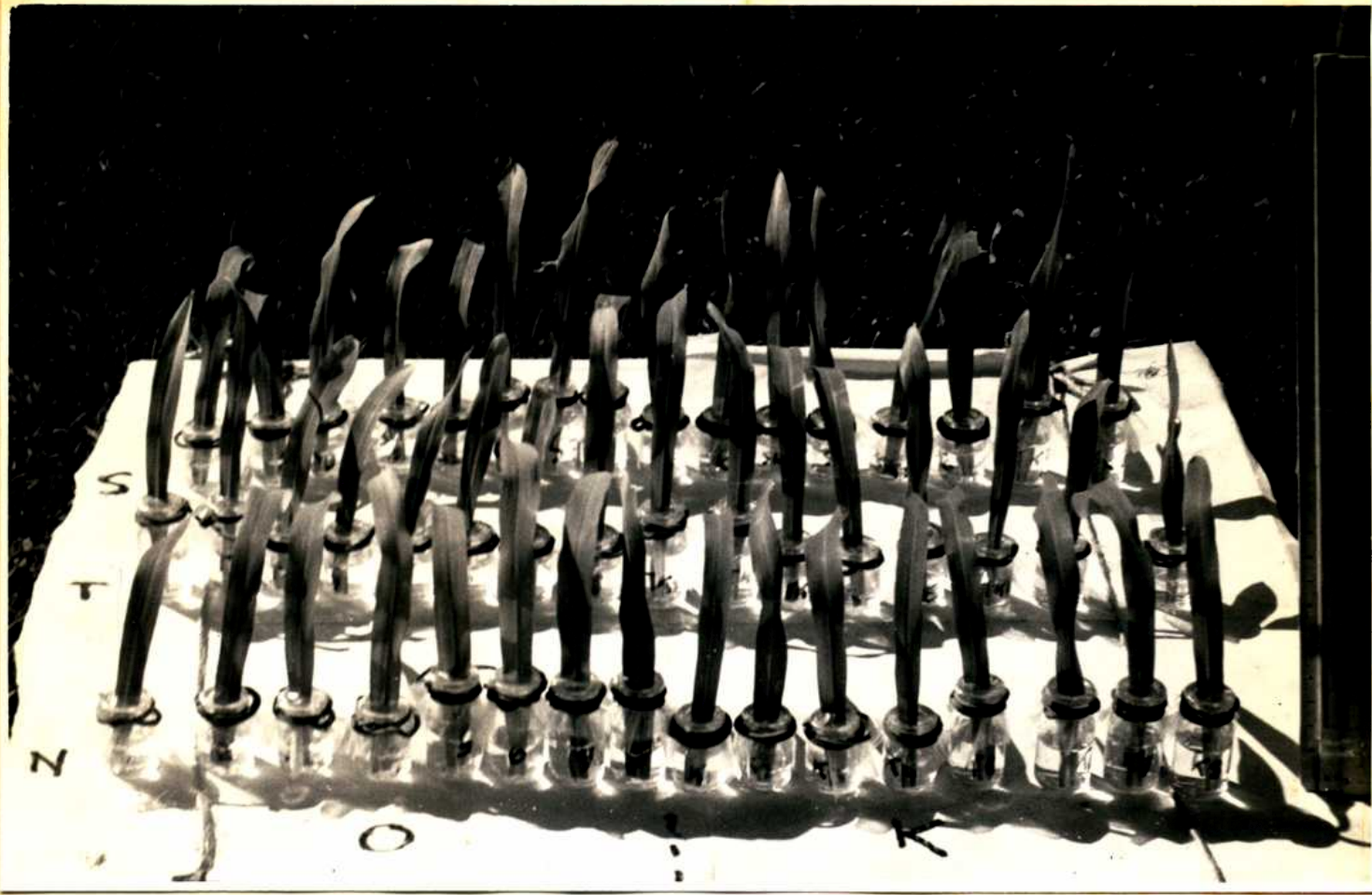


Fig. 13 Efecto de la cinetina e interacción con $ClNa^+$ sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas a 27-30°C, 35-50% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (25-40.000 Lux).

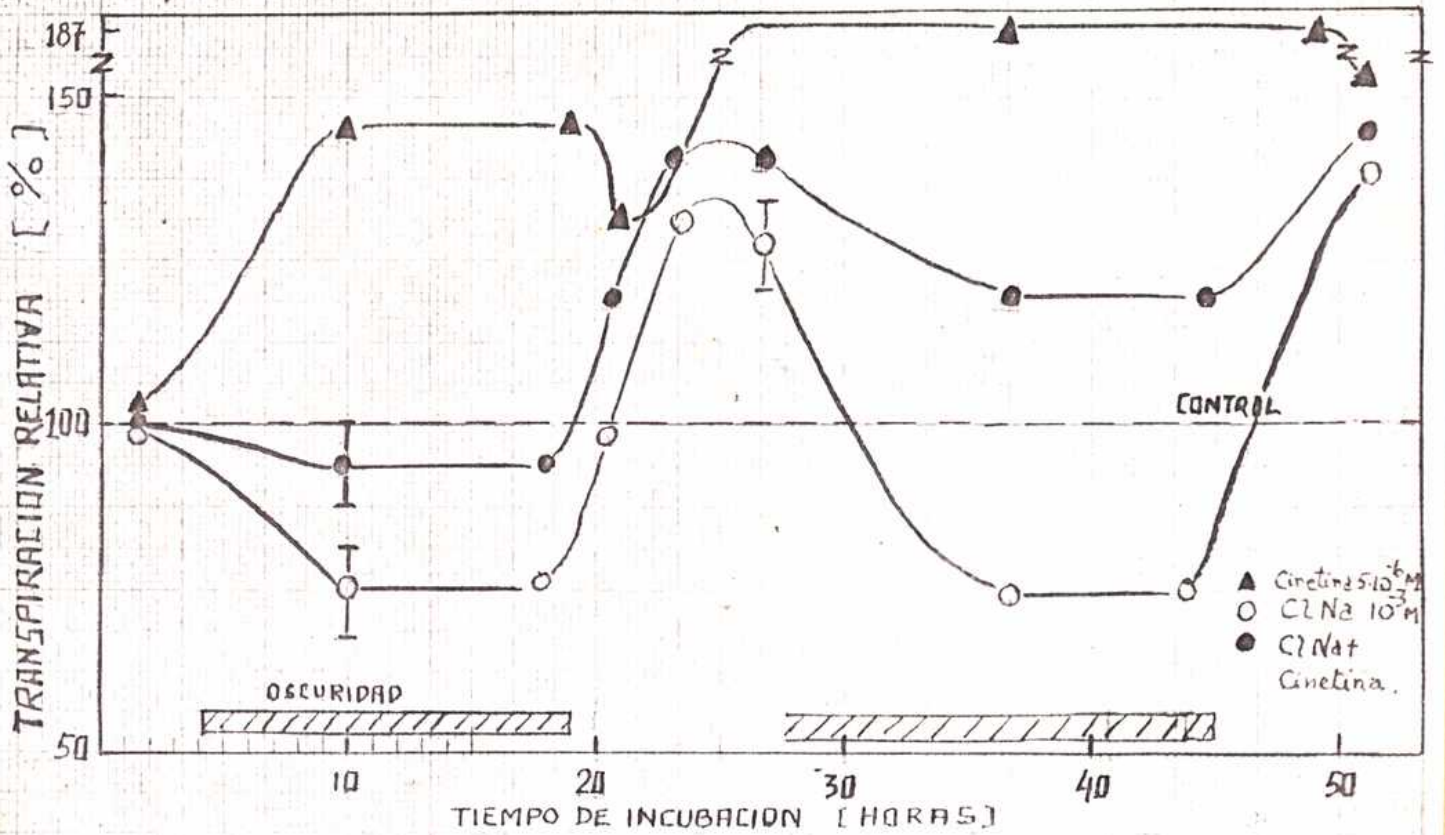


Fig. 14 Efecto de diferentes concentraciones de zeatina sobre la transpiración relativa de hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas 2, 5 y 24 horas en diversas concentraciones de la droga a 26-29°C, 50±5% HR y 30-40.000 lux de iluminación solar.

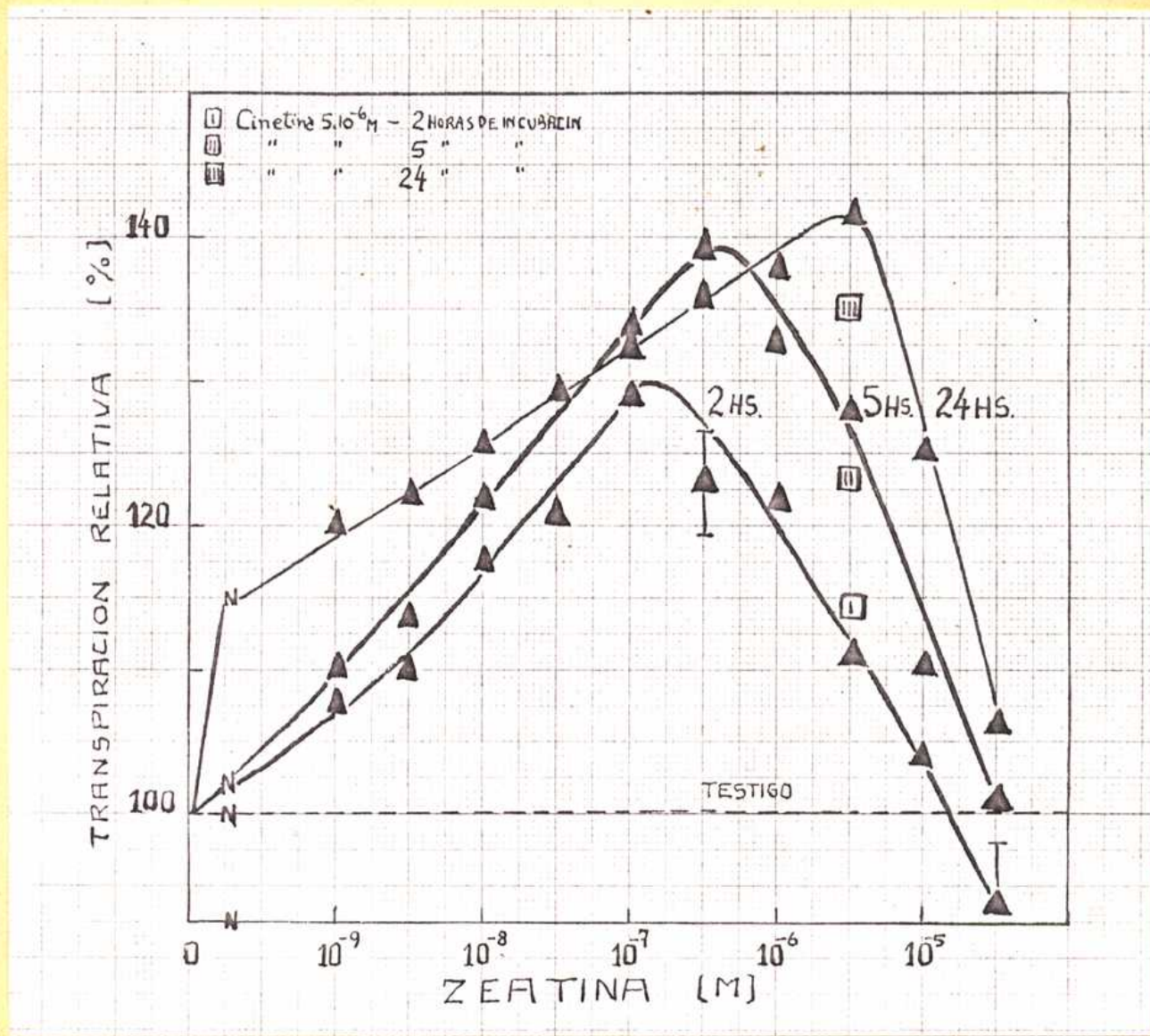


Fig. 15 Efecto de la zeatina sobre la actividad transpiratoria de hojas aisladas de maíz en el curso del tiempo. Hojas incubadas en zeatina $5 \cdot 10^{-6} M$ a $27 \pm 1^\circ C$, 40-55% HR y con un fotoperiodo de 8 horas de luz solar (20-40.000 Lux).

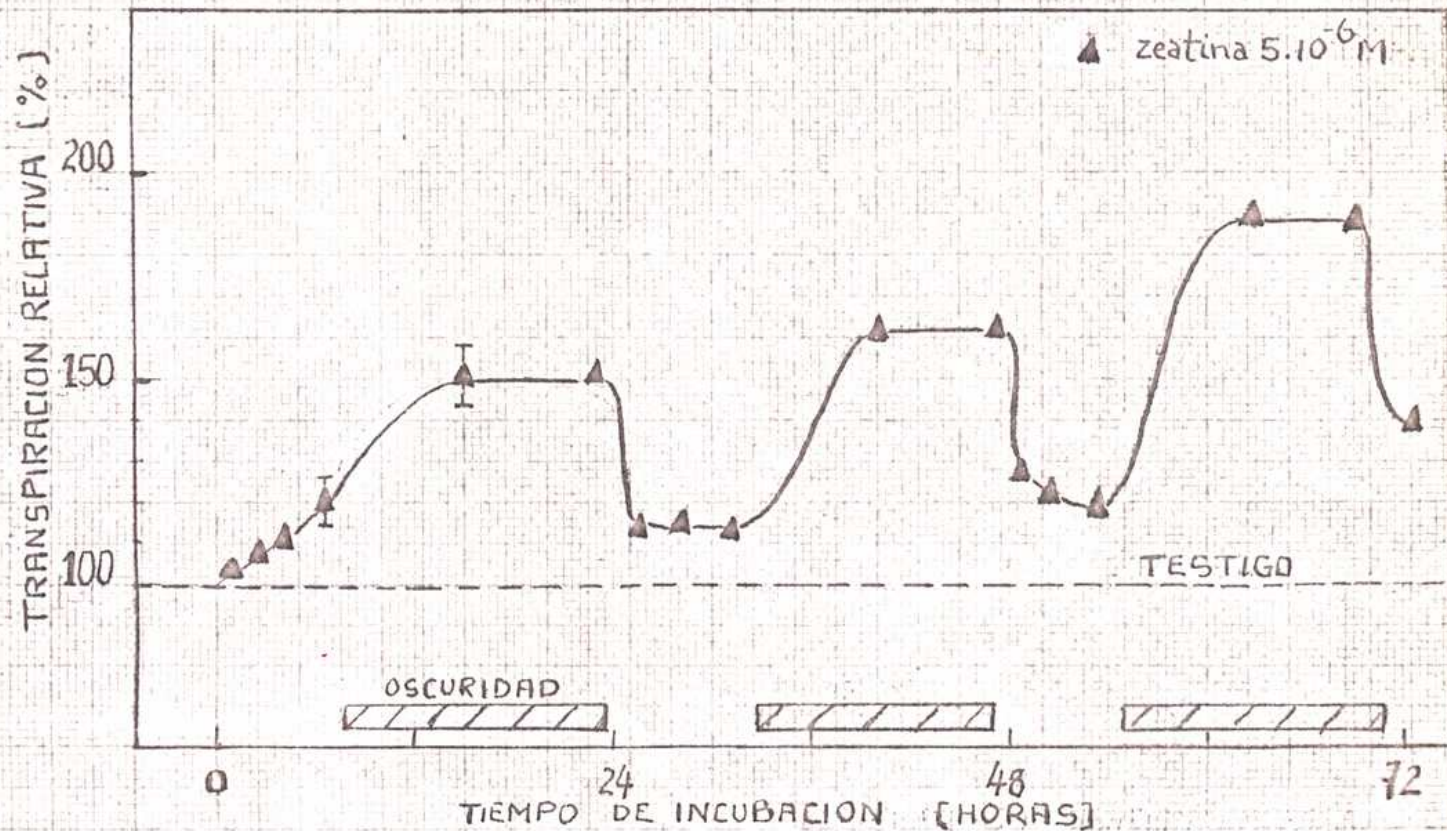


Fig. 16 Efecto de 6-bencilamino-9-(tetrahidropirano-2-yl)-9H-purina: (BAPP) sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $40 \pm 5\%$ HR e iluminación solar de 20-30.000 lux).

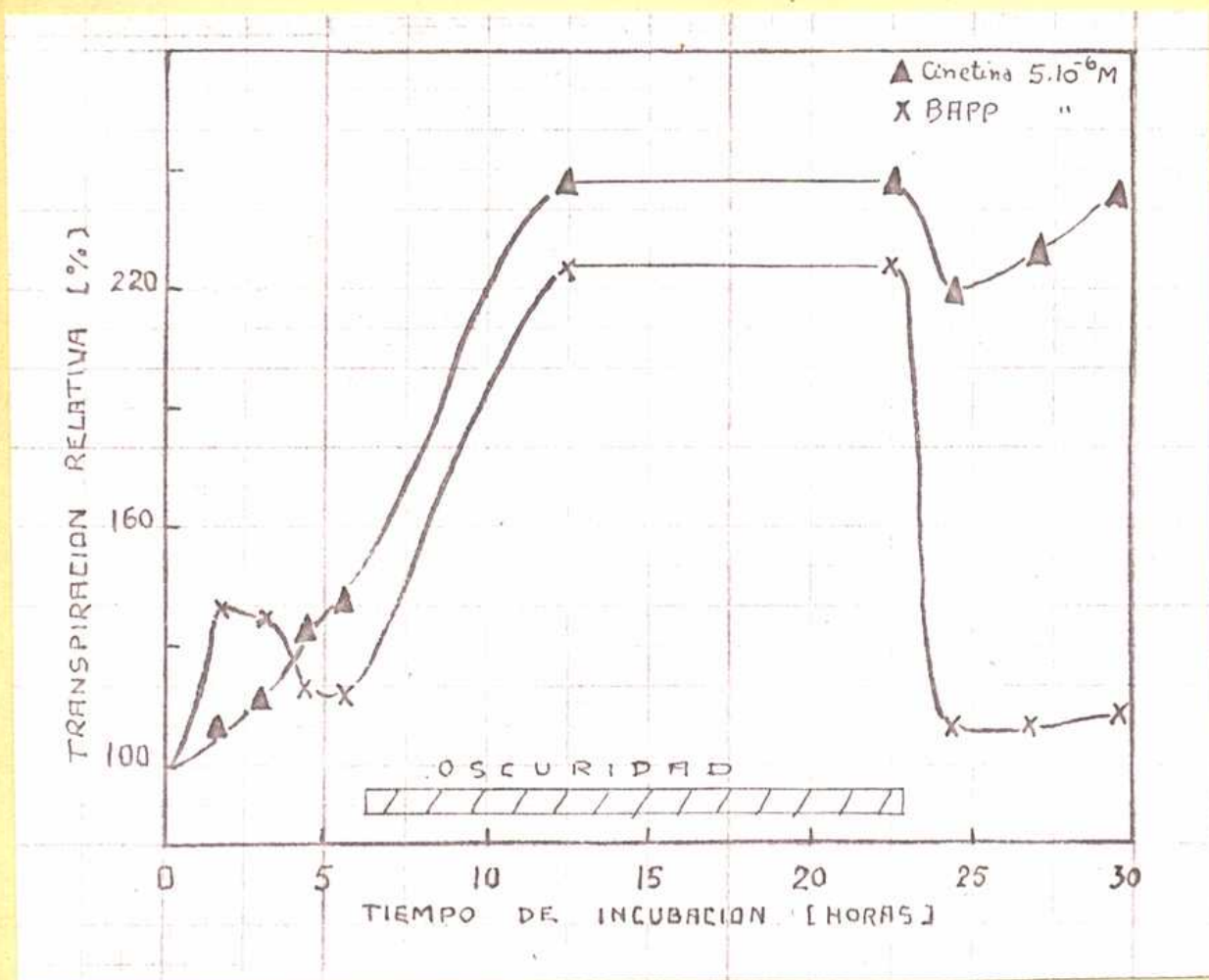


Fig.17 Efecto de la cinetina e interacción con diversos análogos estructurales sobre la transpiración de hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas en las diversas sustancias a 26-29°C, 40-60% HR y un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-40.000 Lux).

- * - (A): adenosina+cinetina y azaadenina+cinetina tuvieron curvas similares a adenina+cinetina.
 - (B): azaguanina+cinetina tuvo una curva similar a la de guanina-cinetina.
 - (C): tiouracilo+cinetina tuvo una curva similar a la de uracilo+cinetina.
-

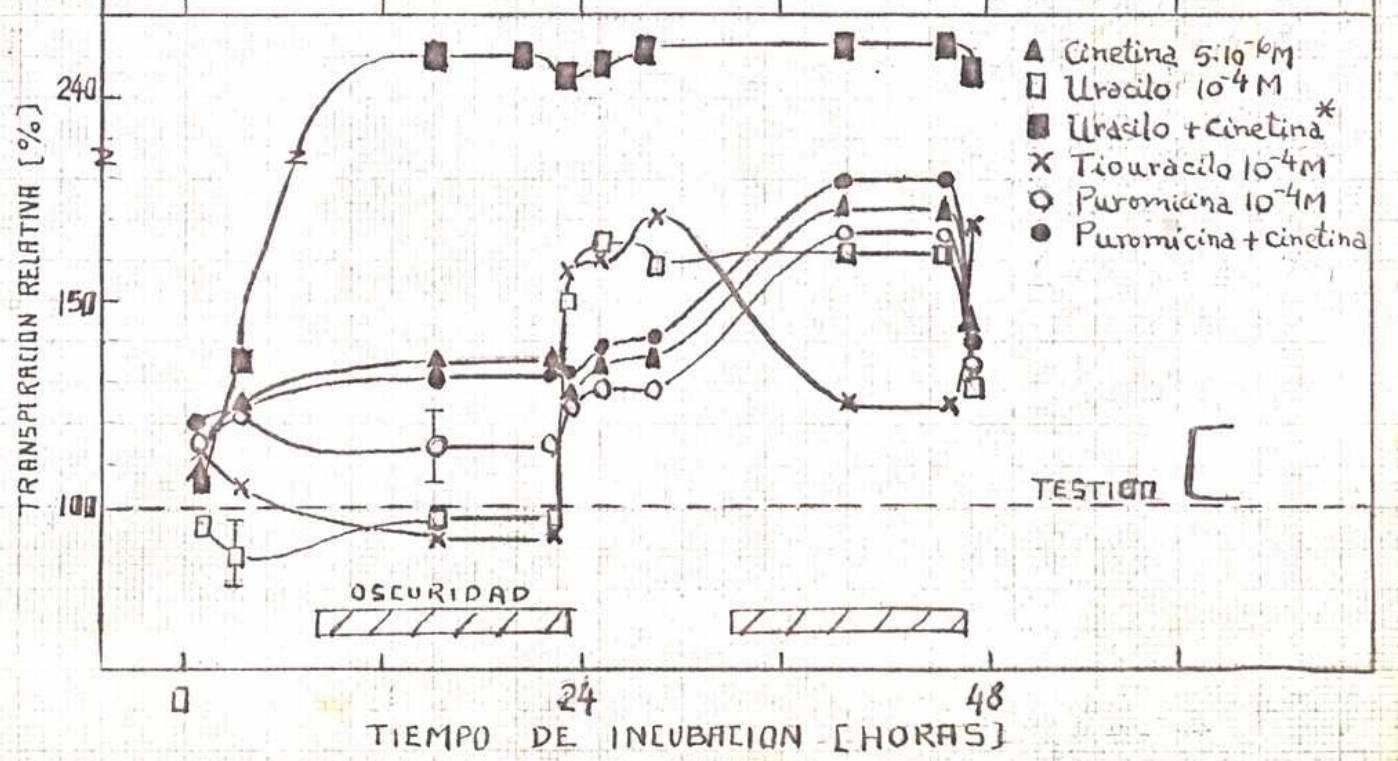
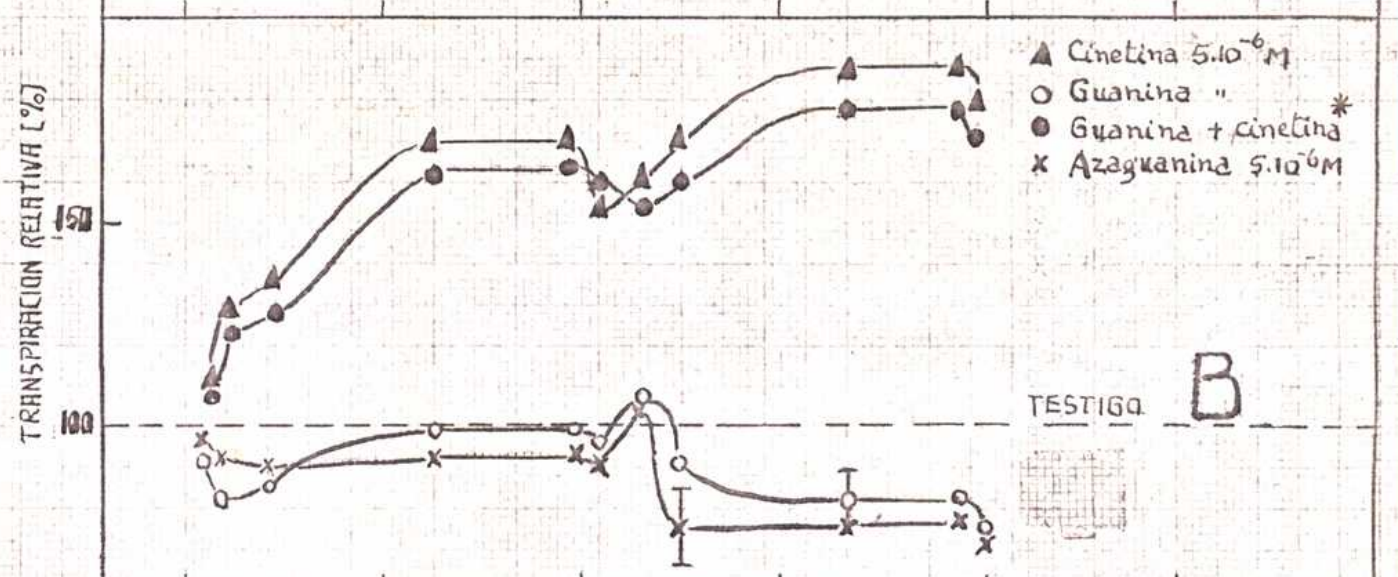
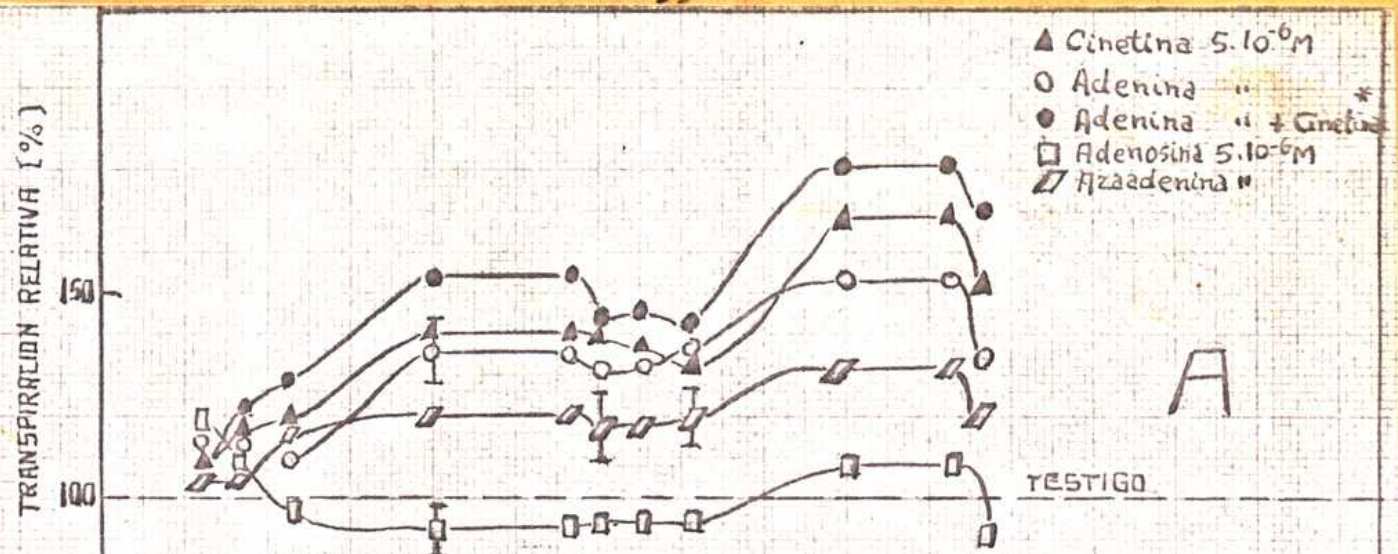


Fig. 18 Efecto de la cianotina e interacción con diversas inhibidores del metabolismo sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas con las diversas sustancias a 26-30°C, 35-55% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz de día (25-40.000 Lux).

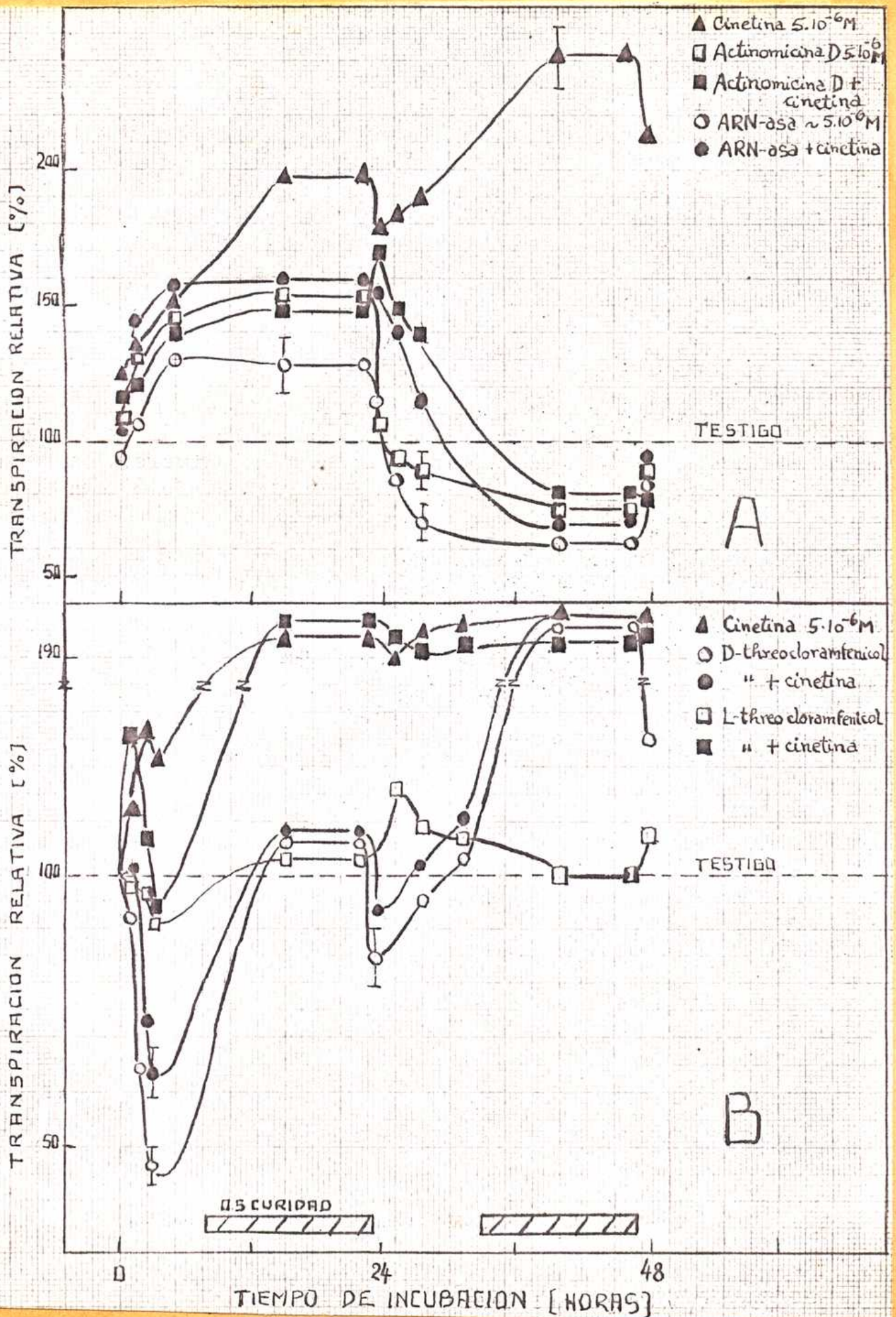
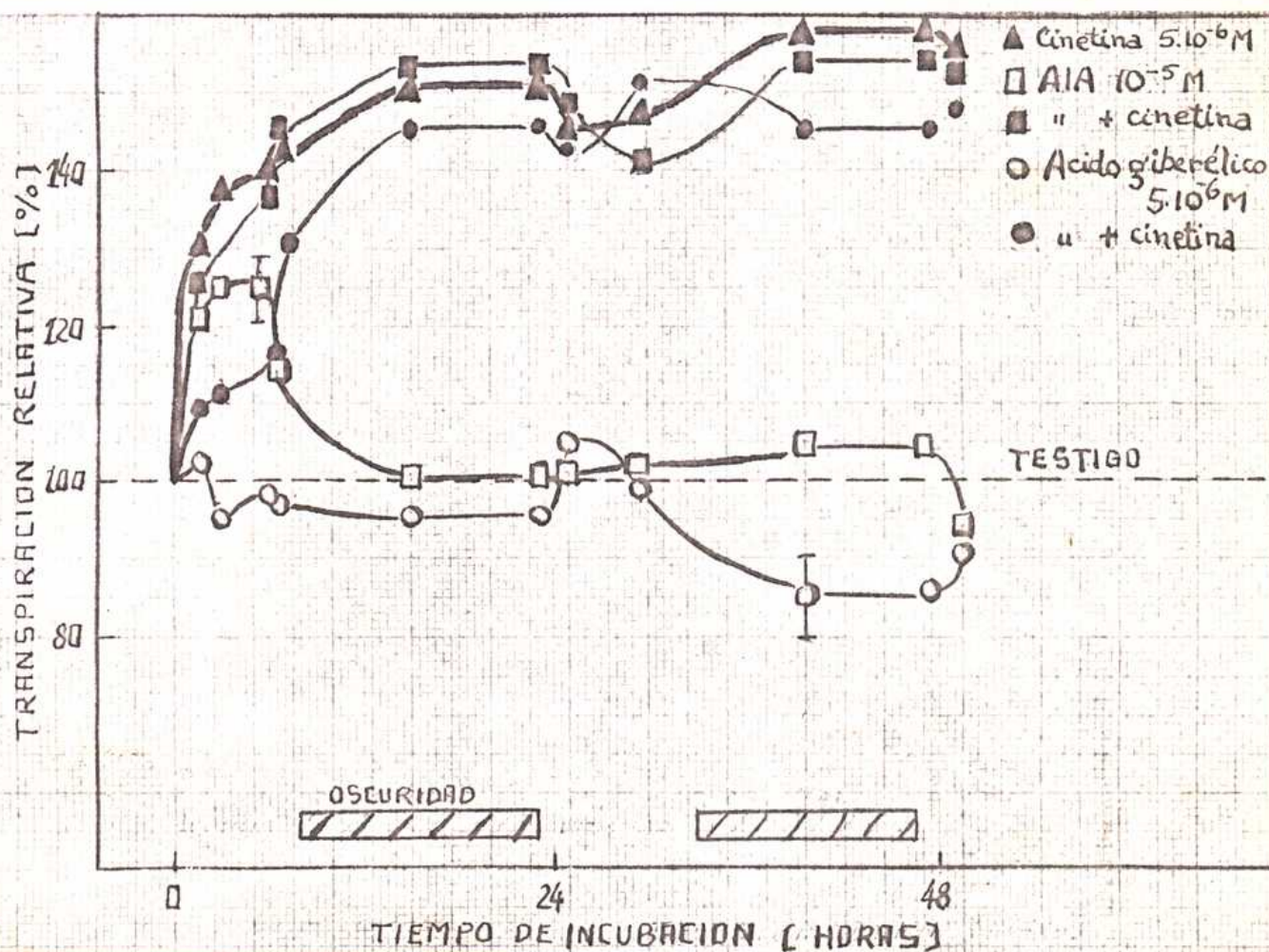


Fig. 19 Efecto de la cinetina e interacción con los ácidos indolacético y giberélico sobre la transpiración en hojas aisladas de maíz. Hojas incubadas con las diversas sustancias a 26-29°C, 40-60% HR con un fotoperíodo de 8 horas de luz solar (20-30.000 Lux).



B I B L I O G R A F I A

- Adriani, M. J. 1958. Halophyten; en: Encyclopedia of Plant Physiology. IV. Berlin, Springer, pp. 709-736.
- Alvim, P. de T. 1965. A new type of porometer for measuring stomatal opening and its use in irrigation studies; en: Methodology of Plant Eco Physiology. Proceedings of the Montpellier Symposium. pp. 325-329. Paris, UNESCO (Arid Zone Research XIV).
- Alvim, P. de T. 1966. Stomatal opening as a Practical Indicator of Moisture Stress in Cotton. *Physiol. Plant.*, 19, 303-312.
- Banerji, D. and M. M. Laloraya. 1965. Expansion of isolated pumpkin cotyledons with Kinetin: effect of seedling age. *Naturwiss.* 52, 349-350.
- Banerji, J. and M. M. Laloraya. 1966. Uncoupling of auxin induced protein synthesis and water uptake by Kinetin. *Nature*, 211, 758-9.
- Banerji, D. and M. M. Laloraya. 1967. Chlorophyll Formation in Isolated Pumpkin Cotyledons in the presence of Kinetin and Chloramphenicol. *Plant and Cell Physiol.*, 8, 263-8.
- Ben Zioni, Aliza; C. Itai and Y. Vaadia. 1967. Water and Salt Stresses, Kinetin and Protein Synthesis in Tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 42, 361-365.
- Bergmann F. and H. Kwiety. 1958. Oxidation of Kinetin by Mammalian Xanthine oxidase. *Biochim. et Biophys. Acta*, 28, 100.
- Bergmann, L. 1964. *Planta*, 62, 221-254.
- Biebl, R. 1958. Der Einfluss der Mineralstoffe auf die Transpiration; en: Encyclopedia of Plant Physiology. IV. Springer, Berlin, pp. 382-426.
- Blaydes, D. F. 1966. Interaction of Kinetin and Various Inhibitors in the Growth of Soybean Tissue. *Physiol. Plant.*, 19, 748-753.
- Brock, T. D. 1961. Chloramphenicol. *Bacteriol. Rev.* 25, 32-48.
- Burstrom, H. 1953. Growth and water absorption of Helianthus Tuber Tissue. *Physiol. Plant.*, 6, 685-691.
- Carpenter, W. J. G. and J. H. Cherry. 1966. Effects of benzyladenine on accumulation of P-32 into nucleic acids of peanut cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 640-2.
- Cereijido, M. y C. A. Retorno. 1966. Introduccion al estudio de las membranas biológicas. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, 189 pp.

- Chibnall, A. C. 1939. Protein metabolism in the plant. Yale University Press, New Haven.
- Clark, J. A. and J. Levitt. 1956. The basis of drought resistance in the soybean plant. *Physiol. Plant.*, 9, 598-606.
- Clements, F. E. 1937. Studies in drought resistance of the soybean. *Res. Studies. State Univ. Wash.*, 5, 1-16; (citado por Leopold, 1964).
- Cochran, W. G. 1963. Sampling Techniques. J. Wiley & Sons Inc. N. Y., pp. 74-7
- Commoner, B. and D. Mazia. 1942. The mechanism of auxin action. *Plant Physiol.*, 17, 682-685.
- Conrad, K. 1961. Über die Verteilung von Auxin im partiell mit Kinetin behandelten, isolierten Blatt. *Flora (Jena)*, 151, 345.
- Crowdy, S. H. 1957. The uptake and translocation of griseofulvin, streptomycin and chloramphenicol in plants. *Ann. Appl. Biol.*, 45, 208.
- Davidson, J. H. 1960. The Biochemistry of the Nucleic Acids. Fourth Ed. Methuen's Monographs in Biochemical Subjects. XI, 288 pp.
- Dedolph, R. R.; Wittwer, S. H. and Tuli, V. 1961. Senescence inhibition and respiration. *Science*, 134, 1075.
- Fogg, G. E. 1965. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* XIX, 432 pp.
- Fox, J. E. 1966. Incorporation of a kinin, N-6-benzyladenine into soluble RNA. *Plant Physiol.*, 41, 75-82.
- Frutton, J. S. and S. Simmonds. 1958. General Biochemistry. J. Wiley & Sons, Inc.; N. Y.; 1077 pp.
- Gale, E. F. and Folkes, Joan P. 1953. The assimilation of aminoacids by bacteria. 15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staph. aureus*. *Biochem. J.*, 53, 493-8.
- Gale, J.; Kohl, H. C. and Hagan, R. M. 1967. Changes in the Water Balance and Photosynthesis of Onion, Bean and Cotton under Saline conditions. *Physiol. Plant.*, 20, 406-420.
- Galston, A. W. et al. 1964. Interactions of auxins with macromolecular constituents of pea seedlings; en: *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale*. Ed. Centre Nat. de la Rech. Scient. Paris, pp. 251.
- Gates, C. T. and J. Bonner. 1959. The response of the young tomato plant to a brief period of water shortage. IV. Effects of water stress on the ribonucleic acid metabolism of tomato leaves. *Plant Physiol.* 34, 49-55.
- Gessner, F. 1956. Die Wasseraufnahme durch Blätter und Samen; en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, III. Springer, Berlin, pp. 215-246.

- Goldberg, Alberto. 1968. Benciladenina y la distribución de azúcares en plantas de maíz. Tesis de L.Sc. (comunicación personal).
- Goldberg, I.H.; M. Rabinovitz and L. Reich. 1962. Basis of Actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA polimerase synthetic reactions by actinomycin. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 48, 2094.
- Gunning, B. D. S. and W. R. Barkley. 1963. Kinin-induced directed transport and senescence in detached oat leaves. Nature, 199, 262-265.
- Haber, A. H. and H. J. Luippold. 1960. Effects of gibberellin on gamma-irradiated wheat. Am. J. Bot., 47, 140-4.
- Haberlandt, G. 1913. Zur Physiologie der Zellteilung. Sitz. Ber. K. preuss. Akad. Wiss., 318-345.
- Hanson, J. B. and Hodges, T. K. 1963. Uncoupling action of chloramphenicol as a basis for the inhibition of ion accumulation. Nature, 200, 1009.
- Harris, G. and I. G. Mac William. 1965. Utilization of 8-azapurines by yeast. Biochim. Biophys. Acta. 95, 205-208.
- Heslop-Harrison, J. 1960. Suppressive effects of 2-thiouracil on differentiation and flowering of Cannabis sativa. Science, 132, 1943.
- Hess, D. 1959. Die selektive Blockierung eines an der Blüh induktion beteiligten Ribosenuccensäure-Biwiss Systems durch 2-Thiouracil. (Untersuchungen an Streptocarpus wendlandii) Planta, 54, 74-94.
- Honig, G. and M. Rabinovitz. 1965. Actinomycin D: Inhibition of Protein Synthesis Unrelated to Effect on Template RNA Synthesis. Science, 149, 1504-5.
- Horanic, G. E. and E. L. Gardner. 1967. An improved method of making epidermal imprints. Bot. Gaz., 128(2) 144.
- Ilan, I. and Reinhold, L. 1963. Analysis of the Effects of Indole-3-Acetic acid on the Uptake of Monovalent Cations. Physiol. Plant., 16, 596-603.
- Iljin, W. S. 1922. Über den Einfluss des Welkens der Pflanzen auf die Regulierung der Spaltöffnungen. Jahrb. f. wiss. Botanik, 61, 670-697.
- Iljin, W. S. 1927. Über die Austrocknungsfähigkeit des lebenden Protoplasmas der vegetativen Pflanzenzellen. Jahrb. wiss. Botanik, 66, 947.
- Itai, G. and Y. Vaadia. 1965. Kinetin-like activity in root exudate of water stressed sunflower plants. Physiol. Plant. 18, 941-44.
- Katsumi, M. 1963. Physiological effects of Kinetin. Effect of Kinetin on the Elongation, Water uptake and Oxygen uptake of Etiolated Pea Stem sections. Physiol. Plant., 16, 66-72.

- Kende, H. 1965. Kinetin-like factors in the root exudate of sunflowers. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, 53, 1302-07.
- Kersten, . 1961. Interaction of Actinomycin D with constituents of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 610-611.
- Kerr, T. and D. B. Anderson. 1944. Osmotic quantities in growing cotton balls. *Plant Physiol.*, 19, 338-348.
- Kessler, B. and J. Frank-Tishe. 1962. Dehydration-induced synthesis of nucleic acids and changing of composition of ribonucleic acid: a possible protective reaction in drought-resistant plants. *Nature*, 196, 542-3.
- Ketellaper, H. J. 1963. Stomatal Physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14, 249
- Khairallah, B. A. and H. C. Pitot. 1967. 3'5'-cyclic AMP and the Release of Polysome-bound Proteins *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 29, 269.
- Kiraly, Z. and J. Szirmai. 1964. The Influence of Kinetin on IAA Production in Nicotiana glutinosa leaf disks. *Virology*, 23, 286-8.
- Knipling, E. B. and P. J. Kramer. 1967. Comparison of the Dye Method with the Thermocouple Psychrometer for Measuring Leaf Water Potentials. *Plant Physiol.*, 42, 1315-20.
- Korn, D. et al. 1965. A novel effect of Actinomycin D in preventing bacteriophage T₄ maturation in E. coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 473-81.
- Kozlowski, T. T. 1964. Water Metabolism in Plants. Harper and Row Biological Monographs, New York.
- Kulajeva, O. K. 1962. The effect of roots on leaf metabolism in relation to the action of Kinetin on leaves. *Soviet Plant Physiol.* 9, 182-189.
- Laloraya, M. M. and Banerji, D. 1965. Effect of Chloramphenicol on the expansion of isolated cotyledons of Cucurbita pepo in light and in the presence of Kinetin. *Experientia*, 21, 516-7.
- Mazlo, J. et al. 1966. Actinomycin D: Inhibition of Respiration and Glycolysis. *Science* 151, 1007-10.
- Leopold, A. C. 1963. Minins and the regulation of leaf aging. *Colloq. Reg. Nat. Croiss. Veg.*, 101-103.
- Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw Hill Book Co., New York, 456pp.
- Betham, D. S. 1967. Chemistry and Physiology of Kinetin-like Compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18, 349-364.

- Levitt, J. 1956. The Hardiness of Plants. Academic Press Inc. N.Y. 278pp.
- Levitt, J. 1965. The measurement of drought resistance; en: Methodology of Plant Eco Physiology. Proc. of the Montpellier Symp. pp. 407-412. Paris, UNESCO (Arid Zone Research XIV).
- Livné, A. and Y. Vaadia. 1965. Stimulation of transpiration rate in Barley leaves by Kinetin and Gibberellic Acid. *Physiol. Plant*, 7, 592.
- Livné, A. and Naomi Levin. 1967. Tissue Respiration and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation of NaCl-treated Pea Seedlings. *Plant Physiol.*, 42, 407-414.
- Mac Donald, I.R. et al. 1966. The relation between Ion Absorption and Protein Synthesis in Beet Disks. *J. Exptl. Bot.*, 17, 322.
- Maciejewska-Potapezyk, W. 1959. Influence of Kinetin, β -Indoleacetic Acid and Gibberellic Acid on Nuclease Activity of Bean (Phaseolus vulgaris) Hypocotyls. *Nature*, 134, 557.
- Mandel, H.G. et al. 1954. The incorporation of 8-azaguanine into nucleic acids of tumor-bearing mice. *J. Biol. Chem.* 206, 181-9.
- Mandel, H.G. and R. Markham. 1958. The effects of 8-azaguanine on the biosynthesis of ribonucleic acid in Bacillus cereus. *Biochem. J.*, 69, 297-306.
- Margulies, L.H. 1964. Effect of Chloramphenicol on Light-Dependent Synthesis of Proteins and Enzymes of Leaves and Chloroplasts of Phaseolus vulgaris. *Plant Physiol.*, Lancaster, 39, 579-85.
- Masuda, Y. and N. Yanagishima. 1964. RNA Functional in Auxin Action of Expanding Tuber Tissue of Jerusalem Artichoke. *Plant and Cell Physiol.*, 5, 365-8.
- Masuda, Y. and S. Madà. 1965. Requirement of RNA for the Auxin-induced Elongation of Cat Coleoptile. *Physiol. Plant.*, 19, 1055-63.
- Meidner, H. 1967. The Effect of Kinetin on Stomatal Opening and the Rate of Intake of Carbon Dioxide in Mature Primary Leaves of Barley. *J. Exptl. Bot.*, 18, 556-561.
- Meidner, H. and T.A. Mansfield. 1965. Stomatal Responses to Illumination. *Biol. Rev.*, 40, 483-509.
- Meidner, R.H. and T.A. Mansfield. 1966. Effects of supplying with α -hydroxysulphonate and glycollate on stomata, rates of photosynthesis and respiration. *J. Exptl. Bot.*, 17, 502.
- Metcalf, C.R. 1960. Anatomy of the Monocotyledons I. Gramineae. Oxford at the Clarendon Press.

- Michajlikov, V. y G. A. Juarez. 1953. Tres años de experiencias de temple contra la sequía en trigo y en maíz. *Metecros*, año III, no. 1, 54.
- Millier, E. C. 1938. *Plant Physiology*. Mc Graw Hill Book Co., N. Y. 1201pp.
- Moewus, F. 1959. Competitive antagonism between kinetin and 8-azaguanine in *Polytoma uvells*. *Science*, 130, 921.
- Moog, F. 1964. Intestinal Phosphatase Activity: Acceleration of Increase by Puromycin and Actinomycin. *Science*, 144, 414.
- Mothes, K. 1960. Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwiss.* 47, 337-351.
- Mothes, K. 1964. The Role of Kinetin in Plant Regulation; en: *Regulateurs de la Croissance Vegetale*. Coll. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris), 123, 131-140.
- Nathans, D. 1964. Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of Puromycin into peptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 51, 585.
- Hoodén, L. D. and K. V. Thimann. 1963. Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 50, 194-200.
- Osborne, D. J. 1962. Effect of Kinetin on Protein and Nucleic Acid Metabolism in *Xanthium* Leaves During Senescence. *Plant Physiol.*, 37, 595-602.
- Osborne, D. J. and D. R. Mc Calla. 1961. Rapid bioassay for kinetin and kinins using senescing leaf tissue. *Plant Physiol.*, 36, 219-21.
- vanOverbeek et al. 1967. Dormin (Abscisin II), Inhibitor of Plant DNA Synthesis? *Science*, 156, 1497-99.
- Parthier, B.; B. Malaviya and K. Mothes. 1964. Effects of chloramphenicol and kinetin on uptake and incorporation of aminoacids by tobacco leaf discs. *Plant and Cell Physiol.*, 5, 401-411.
- Pseud-Lenoël, C. and deGournay-Margerite, C. 1962. Some effects of chloramphenicol on isolated wheat roots. *Phytochem.* 1, 267-75.
- Porto, F. and S. H. Siegel. 1960. Effects of exposures of seeds to various physical agents III. Kinetin-reversible heat damage in lettuce seed. *Bot. Gaz.* 122, 70-71.
- Pramer, D. 1953. The uptake and translocation of five actinomycete antibiotics. *Ann. Appl. Biol.* 40, 617-22.
- Rabson, R. and G. D. Novelli. 1960. The incorporation of leucine-C¹⁴ into protein by a cell-free preparation from maize kernels. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 46, 484-488.

- Rai, V.K. and M.M. Daloraya. 1965. Correlative studies on Plant Growth and Metabolism. I. Changes in Protein and Soluble Nitrogen accompanying Gibberellin-Induced Growth in Lettuce Seedlings. *Plant Physiol.*, 40, 437-441.
- Raschke, K. 1965. Das Seifenblasen porometer (Zur Messung der Stoma weite an amphistomatischen Blättern). *Planta*, 66, 113-120.
- Reich, B. and I.H. Goldberg. 1964. Actinomycin and Nucleic Acid Function. en: *Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biology of J.N. Davidson and W.L. Cohn*, 3, 184-234.
- Renner, O. 1911. Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Wasserbewegung. *Flora*, 103, 173-246.
- Rimon, D. and Galun, B. 1967. Morphogenesis in *Spirodella oligorrhiza*. Effects of Pyrimidine base analogues on initiation, elongation and differentiation of fronds. *Plant and Cell Physiol.*, 8, 283-91.
- Rosen, F. et al. 1964. Induction of Several Adaptive Enzymes by Actinomycin D. *Science*, 146, 661.
- Sacher, Joseph A. 1967. Senescence: Action of Auxin and Kinetin in Control of RNA and Protein Synthesis in Subcellular Fractions of Bean Endocarp. *Plant Physiol.*, 42, 1334-42.
- Schlee, D. et al. 1966. Wirkungen von Kinetin auf den Adeninabbau in Chlorophylldefekten Blättern von Pelargonium zonale. *Zeit.f. Pflanzenphysiol.*, 54, 223-36.
- Schmidt, H. et al. 1940. Plasmatische Untersuchungen an dürreempfindlichen und dürresistenten Sorten landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. *Planta*, 31, 559-96.
- Schwartz, H.S. et al. 1964. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 5, 57.
- Shaw, H. and G.A. MacLachlan. 1954. The physiology of stomata I. Carbon dioxide fixation in guard cells. *Can. J. Bot.*, 32, 764.
- Shaw, H. and B.L.S. Srivastava. 1964. Purine-Like Substances from Coconut Endosperm and Their Effect on Senescence in Excised Cereal Leaves. *Plant Physiol.*, 39, 528-532.
- Slatyer, R.O. 1967. *Plant-Water Relationships*. Academic Press Inc. N.Y.
- Slatyer, R.O. and J.F. Bierhuizen. 1964. The influence of several transpiration suppressants on transpiration, photosynthesis and water use efficiency of cotton leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 17, 131.
- Slatyer, R.O. and H.D. Barrs. 1965. Modifications to the Relative Turgidity Technique with Notes on its Significance as an Index of the Internal Water Status of Leaves; en: *Methodology of Plant Eco Physiology. Proc. of the Montpellier Symp.* pp. 331-342,

- Smith, J.D. and Mathews, R.E.F. 1957. The metabolism of 8-azapurines. *Biochem. J.*, 66, 323-333.
- Soriano, A. 1968. Comunicacion personal.
- Srivastava, S. and G. Marc. 1965. The effect of Kinetin on Nucleic Acids and Nucleases of Excised Barley Leaves. *Plant Physiol.* 40, 62.
- Stülfe, H. G. 1956. Morphologie und Anatomie des Blattes als Transpirationsorgan; in: *Encyclopedia of Plant Physiology III*. pp 324-41. Springer, Berlin.
- Stoner, G.D. et al. 1964. Chloramphenicol as an inhibitor of energy-linked processes in maize mitochondria. *Nature*, 203, 258-61.
- Strauss, J. 1960. Anthocyanin in corn endosperm tissue cultures. II. Effect of certain inhibitory and stimulatory agents. *Plant Physiol.*, 35, 645-650.
- Sutcliffe, J.F. 1960. New evidence for a relationship between ion absorption and protein turnover in plant cells. *Nature*, 203, 258.
- Sypherd, P.S. et al. 1962. The preferential inhibition by chloramphenicol of induced enzyme synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 477-481.
- Thimann, K.V. and B.S. Radner. 1962. The biogenesis of anthocyanins. VII. The requirements for both purines and pyrimidines. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 270-9.
- Tuli, V. et al. 1964. 8-6-Benzyladenine: Inhibitor of Respiratory Kinases. *Science*, 146, 1477-79.
- Udvardy, J. et al. 1964. Alteration of Enzyme Activities in Detached Leaves and their Counteraction by Kinetin. *Experientia*, 20, 214.
- Udvardy, J. et al. 1967. The effects of sucrose and light on the level of soluble and particle-bound ribonuclease activities in excised *Avena* leaves. *Physiol. Plant.*, 20, 781.
- Unler, R.L. and R.S. Russell. 1963. Chloramphenicol Inhibition of Salt Absorption by Intact Plants. *J. Exptl. Bot.* 14, 431-7.
- Vaadia, Y. and Y. Waisel. 1963. Water Absorption by the Aerial Organs of Plants. *Physiol. Plant.*, 16, 44-51.
- Weatherley, P.E. 1950. Studies in the water relations of the cotton plant I: The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytol.* 49, 81-92.

- Went, F.W. 1938. Specific factors other than auxins affecting growth and root formation. *Plant Physiol.*, 13, 55-30.
- Wiesner, J. 1892. Die Elementarstruktur und das Wachstum der lebender Substanz. Ed. A. Hölder, Vienna.
- Wilson, C.C. 1948. Diurnal fluctuations of growth in length of tomato stem. *Plant Physiol.*, 23, 156-7.
- Woodstock, L.W. and R. Brown. 1966. Effect of 2-thiouracil on nucleic acid metabolism in roots of Pisum sativum. *Bot. Gaz.*, 127, 6-11.
- Zelitch, I. 1961. Biochemical control of stomatal opening in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 47, 1423-31.
- Zelitch, I. 1965. Environmental and Biochemical Control of Stomatal Movement in Leaves. *Biol. Rev.*, 40, 463-482.
- Zucker, H. 1963. Experimental Morphology of Stomata; en: Stomata and Water Relations in Plants. Bull. 664. Conn. Agr. Exptl. Sta., New Haven.

EDGARDO R. MONTALDI
ING. AGRONOMO

