Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio sobre algunos efectos fisiológicos causados por el déficit hídrico en porciones aéreas de plántulas de trigo

Invernati, Alberto

1988

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:
Invernati, Alberto. (1988). Estudio sobre algunos efectos fisiológicos causados por el déficit hídrico en porciones aéreas de plántulas de trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2121_Invernati.pdf

Cita tipo Chicago:
Invernati, Alberto. "Estudio sobre algunos efectos fisiológicos causados por el déficit hídrico en porciones aéreas de plántulas de trigo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2121_Invernati.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIO SOBRE ALGUNOS EFECTOS FISIOLOGICOS CAUSADOS POR EL DEFICIT HIDRICO EN PORCIONES AEREAS DE PLANTULAS DE TRIGO"

Autor: Alberto Invernati

Director de Tesis: Dr. Carlos Alberto Barassi

Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Ruta Nac. 226 km 73,5 ERA INTA Balcarce y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nac. de Mar del Plata.

Tesis presentada para optar al titulo de Doctor en Ciencias Biológicas.

Año 1988.

2121
Ej. 2

RESUMEN

Plántulas de trigo (*Triticum durum*, cv. Balcarceño-INTA) creciendo hidropónicamente en la oscuridad fueron sometidas a estrés hídrico suave mediante el agregado de polietilén glicol (PEG) 6000 al 20 % ó manitol (MAN) 0,3 M al medio de cultivo.

A diferentes lapsos y hasta las 36-48 horas de tratamiento, se tomaron muestras de plántulas, disecándose de ellas las porciones aéreas destinadas a las diversas determinaciones y análisis.

La evolución del tamaño, como así también del peso fresco de los vástagos fue menor en las plántulas tratadas que en las controles, mientras que el peso seco no mostró variaciones ni diferencias entre testigos y estresadas. Esto justificó el empleo del peso seco como parámetro de referencia para las demás determinaciones.

La concentración de proteínas disminuyó significativamente en las porciones aéreas completas de las plántulas tratadas durante 36 horas con 20 % PEG 6000.

La concentración de ADN decreció significativamente en las plántulas controles y se mantuvo casi inalterada en las plántulas parcialmente deprivadas de agua. Este resultado se ha interpretado como indicador de que la elongación celular prevalece sobre la mitosis en las plántulas testigos y que el alargamiento de las células es afectado por el estrés hídrico suave. Esto ha sido complementado con la medición del tamaño de las células epidérmicas del coleoptile, donde la elongación del mismo es proporcional al aumento en longitud de sus células. Una observación colateral de importancia en este aspecto de la tesis fue la afectación de la diferenciación estomática en coleoptiles debida al estrés hídrico suave.

El contenido total de fósforo (P) en porciones aéreas cayó tanto en plántulas controles como en estresadas durante el período de crecimiento estudiado. No obstante, en experimentos de radiomarcación *in vivo* con pulsos de ^{32}P durante la imbibición, la radioactividad específica del P experimentó modificaciones en relación con el estrés hídrico: se incrementó en un 116 % en controles, contra un 93-22 % en plántulas tratadas con 0,3 M MAN o 20 % PEG 6000, respectivamente. Estos datos sugieren que el estrés hídrico suave podría afectar el recambio de compuestos fosforilados en porciones aéreas de plántulas de trigo.

El análisis del contenido de las diversas fracciones fosforiladas

constituyentes del P total mostró a tiempos cero (2 cm de longitud de porciones aéreas) las siguientes concentraciones (en µmoles P. 100 mg peso seco^{-1}): fracción fósforo ácido soluble: 14, 6 (45,1 %); fracción fósforo de fosfolípidos: 6,2 (19,1 %); fracción fósforo orgánico álcali estable: 7,2 (22,2 %); fracción fósforo de ácidos nucleicos: 3,6 (11,1%); y fracción fósforo de fosfoproteínas: 0,8 (2,5 %). Todas las fracciones, salvo la de fósforo de fosfolípidos, disminuyeron en valores absolutos en función del crecimiento, tanto en plántulas controles como en tratadas, sin que hubiesen diferencias significativas entre ambos grupos. No obstante, y similarmente a lo hallado para el P total, la radiomarcación con ^{32}P y el estudio ulterior de las radioactividades específicas de las diversas fracciones mostró variaciones en relación con el estrés hídrico suave. En particular, se prestó mayor atención a las fracciones de fosfolípidos (FL) y de fosfoproteínas (FP), por las siguientes razones: a) FL fué la única fracción constante en nivel de P absoluto en plántulas controles y tratadas. Su radioactividad específica se incrementó menos en plántulas estresadas que en controles. Estos resultados podrían relacionarse a un efecto restrictivo del estrés hídrico sobre el recambio de la porción polar de componentes esenciales de membranas como lo son los fosfolípidos; b) FP es la fracción minoritaria (2,5 % del P total) pero a su vez, la de mayor incorporación de ^{32}P. La radioactividad específica se incrementa notoriamente con el crecimiento normal, no así bajo condiciones de estrés hídrico suave aplicado durante 36 hs. Estos resultados podrían estar de acuerdo con la hipótesis de trabajo de un posible mecanismo de fosforilación-defosforilación de proteínas relacionado al control del estado hídrico de la plántula.

A fin de ver si las modificaciones en radioactividades específicas del P total y de las fracciones fosforiladas de FL y FP experimentadas con el estrés hídrico podrían tener relación con la mayor tolerancia intrínseca que posee *Triticum durum* con respecto a *T. aestivum*, se estudió el recambio de las mismas en esta última especie. Dos cultivares de *T. aestivum* fueron analizados: el Klein Chamaco (relativamente tolerante al estrés osmótico a nivel de plántulas) y el Buck Pucará (susceptible). La radioactividad específica del P total se mantuvo constante con la elongación en Klein Chamaco, incrementándose ligeramente con el estrés hídrico suave. En Buck Pucará por el contrario, disminuyó con la elongación, siendo más marcado el efecto con el estrés osmótico. A diferen

cia de lo observado con el cv. Balcarceño-INTA de *T. durum*, las radioactividades específicas de las fracciones de FL no mostraron mayores diferencias entre testigos y tratadas en los dos cultivares de *T. aestivum* estudiados. Las fracciones de FP en cambio, mostraron una tendencia similar entre *T. durum* y el cultivar tolerante Klein Chamaco de *T. aestivum*, mientras que la inversa fué válida para el cultivar susceptible Buck Pucará de *T. aestivum*. Estos resultados estimulan el estudio ulterior de la posible relación del recambio de proteínas fosforiladas con la tolerancia al estrés hídrico en *Triticum*, con probable independencia de la especie.

Se han realizado experimentos de aplicación exógena de ácido indol acético en los cultivares citados de *T. durum* y *T. aestivum*, a fin de ver si el antagonismo citado en la bibliografía con respecto al ácido abscísico -hormona que modifica sus niveles en vegetales con relación a la sequía- se traducía en un efecto parcialmente revertidor de las consecuencias del estrés hídrico. Solamente en *T. durum*, y con sus pesos frescos, se tuvieron resultados parcialmente positivos en este sentido, no justificándose la mayor profundización de los estudios iniciados en este último aspecto.

INDICE GENERAL

Pág.

Indice de tablas..... 5

Indice de figuras..... 7

Abreviaturas..... 7

Capítulo 1.- **INTRODUCCION**..... 8

Capítulo 2.- **MATERIALES Y METODOS**

2.1.-Obtención del material vegetal..... 12

2.1.1.-Experimentos sin marca radioactiva..... 12

2.1.2.-Experimentos con incorporación de ^{32}P..... 13

2.2.-Determinación del porcentaje de humedad relativa.. 14

2.3.-Determinación de proteínas..... 15

2.4.-Determinación de fósforo inorgánico total..... 15

2.5.-Obtención de las fracciones fosforiladas..... 15

2.6.-Medición de células..... 20

2.7.-Radioactividades específicas..... 21

Capítulo 3.- **RESULTADOS Y CONCLUSIONES PARCIALES**

3.1.-Puesta apunto del sistema experimental..... 23.

3.2.-Pruebas de germinación..... 26
3.3.-Alturas, pesos frescos y pesos secos de las plántulas..... 28

3.4.-Determinación del porcentaje de humedad relativa al equilibrio, en porciones aéreas de plántulas controles y sometidas a estrés hídrico..... 32
3.5.-Proteínas totales y estrés hídrico..... 34
3.6.-Contenido de ADN y estrés hídrico..... 38
3.7.-Medición del tamaño de las células..... 40
3.8.-Fósforo total y radioactividad específica..... 42
3.9.-Fracciones fosforiladas..... 46
3.9.1.-Fósforo ácido soluble (FAS)..... 47
3.9.1.1.-Determinación de fósforo ácido soluble (FAS), cortando los vástagos a diferente altura..... 48
3.9.2.-Radioactividad específica de FAS..... 50
3.9.3.-Fósforo de fosfolípidos (FL)..... 52
3.9.4.-Radioactividad específica de (FL)..... 53
3.9.5.-Fracción de fósforo orgánico álcali estable (FOAE).. 54
3.9.6.-Fósforo de ácidos nucleicos (FAN)..... 55
3.9.7.-Radioactividad específica de FAN..... 57
3.9.8.-Fósforo de fosfoproteínas (FP)..... 58
3.9.9.-Radioactividad específica de FP..... 59
3.10.-Hormonas y estrés de agua..... 61

3.10.1.-Aplicación de AIA en plántulas controles y estresadas..... 62

3.10.2.-Aplicación de AIA a trigos susceptibles y resistentes al estrés hídrico..... 67

3.11.-Radioactividades específicas de fósforo total, de fosfolípidos y de fosfoproteínas en especies y cultivares de trigo con diferentes susceptibilidades al estrés hídrico..... 72

3.11.1.-Radioactividad específica del fósforo total..... 73

3.11.2.-Radioactividad específica de fosfolípidos en *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará..... 75

3.11.3.-Radioactividad específica de fosfoproteínas en *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y BUck Pucará..... 77

Capítulo 4.-**DISCUSION GENERAL** 81

Capítulo 5.-**BIBLIOGRAFIA** 88

INDICE DE TABLAS

Número Pág.

1.-Porcentaje de humedad relativa en plántulas testigos y estresadas..... 34
2.-Proteínas totales en vástagos (porciones aéreas completas)..... 36
3.-Proteínas totales en coleoptiles..... 37
4.-Contenido total de ADN en vástagos..... 39
5.-Contenido total de fósforo en vástagos..... 43
6.-Contenido total de fósforo en coleoptiles..... 44
7.-Radioactividades específicas del fósforo total en vástagos 46
8.-Fracción de fósforo ácido soluble (FAS) en vástagos. 48
9.-Determinación de fósforo total y fósforo de FAS en vástagos cortados a diferente altura..... 50.
10.-Radioactividades específicas de la FAS en vástagos. 51
11.-Fracción fosfolipídica (FL) en vástagos..... 52
12.-Radioactividades específicas de la fracción de fosfolípidos en vástagos..... 54
13.-Fracción de fósforo orgánico álcali estable (FOAE) en vástagos..... 55
14.-Fracción de fósforo de ácidos nucleicos (FAN) en vástagos..... 56

15.-Radioactividades específicas de la fracción de fósforo de ácidos nucleicos (FAN) en vástagos..... 57
16.-Fósforo de fosfoproteínas en vástagos..... 59
17.-Radioactividades específicas de la fracción de fósforo de fosfoproteínas (FP) en vástagos..... 60
18.-Aplicación de pasta de AIA con lanolina a plántulas decapitadas. Peso fresco, peso seco y altura de vástagos.66
19.-Aplicación de pasta de AIA con lanolina a plántulas intactas. Peso fresco, peso seco y altura de vástagos. 66
20.-Acción del AIA sobre vástagos de *Triticum aestivum* cv. Buck Pucará..... 69
21.-Acción del AIA sobre vástagos de *Triticum aestivum* cv. Klein Chamaco..... 70
22.-Acción del AIA sobre vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA..... 71
23.-Radioactividad específica del fósforo total en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará..... 74
24.-Radioactividad específica de fosfolípidos totales en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv.Klein Chamaco y Buck Pucará..... 76
25.-Radioactividad específica de fosfoproteínas en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará..... 78

INDICE DE FIGURAS

Fig. Nº Pág.

1.-Esquema del procedimiento utilizado para la separación de las distintas fracciones fosforiladas..... 18

1 bis.-Continuación de la figura 1..... 19

2.-Altura de vástagos en función del tiempo..... 29

3.-Pesos frescos de vástagos en función del tiempo..... 30

4.-Pesos secos de vástagos en función del tiempo..... 31

5.-Respuesta de las plántulas a distintas concentraciones de AIA..... 64

ABREVIATURAS

PEG : Polietilenglicol

MAN : Manitol

TCA : Acido tricloroacético

FAS : Fósforo ácido soluble

FL : Fósforo de fosfolípidos

FOAE : Fósforo orgánico álcali estable

FP : Fósforo de fosfoproteínas

FAN : Fósforo de ácidos nucleicos

1.-Introducción.

El agua, al intervenir en multitud de procesos metabólicos, se constituye en el principal factor que determina finalmente la distribución de las especies vegetales. Hay que tener en cuenta que más de la tercera parte de la superficie terrestre está clasificada como árida o semiárida pues está sujeta a sequía permanente. Asimismo, las zonas bien irrigadas de las regiones templadas que se constituyen en las productoras de alimentos, sufren períodos de sequía a menudo muy severos. Por esta razón, investigadores de todo el mundo han indagado acerca de la comprensión del fenómeno de la tolerancia a la sequía y la eficiencia del uso del agua por los vegetales. En este sentido se han reportado numerosos experimentos que versan sobre diversos cambios que el déficit hídrico provoca en las plantas. Dichas variaciones dependen de la severidad de la carencia de agua, de la duración de las condiciones del estrés y de la especie estudiada, como así también de la porción de la planta que se investigue y de los diversos estadios o etapas de desarrollo del vegetal.

Si el déficit hídrico es moderado sólo resultarán alterados aquellos procesos metabólicos más sensibles, pero, si la escasez de agua se torna más severa los cambios pueden

intensificarse y si ésta persiste en un lapso más prolongado es probable que se manifiesten respuestas secundarias y terciarias. Con todo, y tratándose especialmente de una carencia de agua moderada, los cambios que se producen se admite que representan operaciones de control homeostático, las cuales actuarían ajustando los procesos vitales a las nuevas o cambiantes condiciones ambientales.

Por otra parte, el estrés hídrico moderado, el cual afecta normalmente a las plantas bien irrigadas en cualquier día soleado, -cuando la cantidad de agua que pierden por transpiración excede a la que obtienen del suelo- induce efectos que son reversibles (Bradford and Hsiao, 1982). Por ejemplo, la expansión celular, la plasticidad de la pared como así también su síntesis, la síntesis proteica, la elaboración y transporte de reguladores de crecimiento, la diferenciación estomática, la fotosíntesis, la acumulación de solutos, son algunos de los procesos que resultan alterados debido a la escasez moderada de agua.

A pesar de que existen abundantes estudios acerca de los efectos causados por el estrés hídrico en plantas maduras, la información referida a los primeros estadios de desarrollo de plántulas es más escasa. Es por esta razón que para la elección del sistema experimental se optó por estudiar las primeras etapas de crecimiento del trigo. En esta fase del desarrollo las plántulas crecen en la obscuridad a expensas de las reservas

seminales, previamente a la emergencia de la tierra y la obtención de fotosintatos. En estas condiciones se produce un apreciable alargamiento de los vástagos etiolados de las plántulas con la concomitante síntesis de membranas. El déficit hídrico, al alterar la expansión celular incidirá indudablemente sobre esa síntesis de membranas y sobre algunas de sus biomoléculas componentes tales como los fosfolípidos. Además, las fosfoproteínas y otras fracciones fosforiladas podrían resultar modificadas de manera cuantitativa y/o cualitativa. En especial las fosfoproteínas han adquirido recientemente una importancia crucial en relación con los procesos de regulación metabólica en vegetales (Ann. R. Plant Physiol., 1987). Esto fue sugerido por nuestro grupo de trabajo como hipótesis en 1982.

En cuanto a la elección del trigo, ésta se basó en el hecho de que sus cariopses poseen un bajo contenido lipídico, dependiendo la fuente de energía germinativa de las reservas amiláceas del endosperma. En cambio, si se tratase por ejemplo de una planta oleaginosa, la reserva lipídica en lugar de glucídica provee de la energía necesaria para la germinación de la semilla, pero por esta razón las pequeñas variaciones en lípidos asociadas a la biogénesis de membranas pueden quedar enmascaradas por el gran "pool" de reserva. Además, con la idea de que los resultados generales pudieran contribuir indirectamente a la caracterización química de una variedad producida en la Estación Experimental del INTA Balcarce, se

escogió en principio el *Triticum durum* cultivar Balcarceño-INTA.

Por otra parte, se controló el sistema experimental escogido, el cual, para ser apropiado, debía reflejar adecuadamente las posibles variaciones en la tasa de crecimiento de las plántulas cuando se les aplicaba un estrés hídrico moderado. Al respecto se realizaron determinaciones de alturas, pesos frescos, pesos secos y proteínas.

Se estudió además la posible relación entre la división de las células y la elongación de los vástagos con respecto al estrés hídrico. Para ello se realizaron mediciones de tamaño de las células y determinaciones de ADN.

Se investigó también la evolución del fósforo y de los grupos mayoritarios de moléculas fosforiladas en plántulas en elongación y su símil bajo estrés hídrico moderado.

Asimismo, se indagó acerca de la posible correlación entre la susceptibilidad de especies y/o cultivares de trigo a la carencia moderada de agua y el recambio de fosfolípidos y fosfoproteínas.

Por último, se estudió si el AIA exógeno podía revertir parcialmente el efecto de la deprivación de agua sobre la elongación de los vástagos.

2.-**Materiales y métodos.**

2.1.-Obtención del material vegetal.

2.1.1.-Experimentos sin marca radioactiva.

Las semillas de trigo, luego de uniformizadas en cuanto a pesos y tamaños, fueron tratadas con hipoclorito de sodio (ClONa 1%) durante 15 minutos a fin de eliminar esporas fúngicas y se colocaron luego entre papeles secantes, los que a su vez fueron ubicados sobre soportes de plástico dentro de bateas con agua destilada. Producida la germinación, las plántulas que alcanzaron los 2 cm de altura (a las 96 horas de puestas a germinar, aproximadamente) fueron transferidas -siempre entre papeles secantes y sostenidas por los soportes- a bandejas con agua destilada, en el caso de los controles o a otras con PEG 6000 al 20% o manitol 0,3 M, para las plántulas sometidas a tratamiento de déficit hídrico moderado. En todos los casos, las germinaciones, como así también los tratamientos posteriores, fueron realizados bajo condiciones controladas, a saber: obscuridad y 20°C de temperatura constante en estufa dentro de un cuarto climatizado. A los tiempos requeridos por cada tratamiento: 0, 12, 24, 36 ó 48

horas, los vástagos (coleoptile y hojas primarias) fueron cortados con la ayuda de un bisturí -siempre bajo lámpara de seguridad de luz verde a los efectos de eliminar los efectos de la fotosíntesis- y empleados para medir , según los casos, altura, peso seco, peso húmedo o para ser sometidos a distintas determinaciones químicas.

2.1.2.-Experimentos con incorporación de ^{32}P.

Se pusieron a imbibir los granos de trigo en agua destilada que contenía 5 mCi de $^{32}PO_4HNa_2$. En los primeros experimentos se colocó el ^{32}P en la bandeja donde se producía la germinación, de manera tal que el material radioactivo se disolvía en tres litros de agua aproximadamente y, evidentemente, la marca que se incorporaba era escasa. Ante la disyuntiva de tener que aumentar los milicuries de ^{32}P -con el concomitante incremento del riesgo de contaminación- o disminuir todo lo posible el volumen de imbibición, se optó por esta última alternativa. Para ello se determinó el volumen total de agua que absorbían las semillas durante las primeras 24 horas de imbibición, el cual fue de unos 30 ml para 500 granos

y en un volumen igual se disolvieron los 5 mCi de ^{32}P. Con este método se realizaron casi todos los experimentos que requerían imbibición con material radioactivo, lográndose de esta forma optimizar la incorporación de marca. Al término de la imbibición las semillas fueron lavadas primero con agua corriente -para eliminar la marca no incorporada que quedaba sobre la superficie de los granos- y luego con agua destilada y de inmediato puestas a germinar entre papeles secantes sobre los soportes, según ya ha sido descripto en 2.1.1.

2.2.-Determinación del porcentaje de humedad relativa.

Se utilizó un sensor electrónico de humedad Rotronic Hyroscop ubicado en el INTI CITEP de Mar del Plata. Los recipientes empleados fueron cazoletas que se sellaron con pasta siliconada. Para todas las determinaciones se usaron dos cazoletas; se colocó una cazoleta en la sonda 1 y la otra en la sonda 2, se las dejó estabilizar unos 30 a 45 minutos y se midió el porcentaje de humedad relativa en el equilibrio. Luego, la cazoleta que estaba en la sonda 1 fue pasada a la sonda 2 y viceversa, volviéndose a medir luego de otros 30 a 45 minutos. Esto evita las diferencias que puedan existir entre sondas, promediándose los datos.

2.3.-Determinación de proteínas.

El dosaje de proteínas se realizó siguiendo el método colorimétrico de Lowry et al. (1951), modificado (Markwell et al., 1978), utilizándose suero humano como referencia.

2.4.-Determinación de fósforo inorgánico total.

Para la determinación de fósforo se utilizó el método colorimétrico de Chen et al. (1965), con una digestión con ácidos sulfúrico, nítrico y perclórico.

2.5.-Obtención de las fracciones fosforiladas.

El fraccionamiento de la muestra en los distintos compuestos fosforilados se realizó siguiendo el método de Schmidt-Thannhauser-Schneider (Volkin and Cohn,1954); el esquema del procedimiento utilizado se muestra en la figura 1 y 1 bis.

Para la muestra, etapa (1), se utilizaron 4 vástagos; entre 100 y 500 mg aproximadamente de material fresco.

Etapa (2): se homogeneizó el material vegetal en mortero, con arena lavada, empleando ácido tricloroacético (TCA) al 10% a menos de 5 ºC. Se centrifugó durante 15 a 20'. El volumen final fue de 10 ml aproximadamente. El sobrenadante (3) constituyó la fracción de fósforo ácido soluble (FAS).

Los pasos (5) y (29) implicaron 5 lavados con eter y se realizaron para impedir la partición de los componentes del líquido de centelleo debido al bajo pH del extracto obtenido con el TCA.

En los pasos (4), (15), (20), (28) y (32) se realizó una digestión previa con 0,2 ml de ácido perclórico. El fósforo inorgánico se determinó posteriormente de acuerdo a Chen et al. (1956).

Los conteos radioactivos de las etapas (6), (24) y (30) fueron realizados en los primeros experimentos usando la mezcla de Bray (1960) y en los posteriores midiendo directamente la radiación de Cerenkov (Mardh, 1975), mientras que los conteos de los pasos (16) y (23) lo fueron con líquido de Dogras et al. (1977), previo llevado de la muestra a sequedad.

En el paso (7) se siguió el método de Folch et al. (1957): se redisolvió el residuo con 6 ml de cloroformo-metanol (1:1) y se centrifugó; el residuo obtenido se extrajo con cloroformo-metanol (2:1) y se centrifugó nuevamente; los sobrenadantes (8) y (10) se unieron. El nuevo residuo se extrajo

según Dawson y Eichberg (1965), con cloroformo-metanol-ClH concentrado (200 : 100 : 0,75 en volumen) y se centrifugó durante 15' , paso (12). El sobrenadante (8+10) se particionó con un volumen de Cl_2Ca 0,003 N igual al 20% del volumen de la muestra, paso (11), descartándose las fases superiores; la fase inferior fue lavada con cloroformo-metanol-ClH. El sobrenadante (13) fue particionado con un volumen de ClH 1N igual al 20% del volumen de la muestra, las fases superiores fueron eliminadas y la fase inferior fue lavada con cloroformo-metanol-ClH. Los sobrenadantes particionados y lavados (11+14) constituyeron la fracción fosfolipídica.

El residuo (17) fue tratado con 2 ml de HOK 1N durante 20 horas a 37°C con agitación cada 30'; luego se agregaron 0,4 ml de ClH 6N y 2 ml de TCA al 5% frío y se centrifugó durante 15'. El sobrenadante (19) es la fracción que contiene al fósforo de fosfoproteínas; el fósforo inorgánico (21), determinado sin digestión ácida, es el fósforo de fosfoproteínas. En el paso (22) se realizó la extracción con isobutanol y partición según Martin y Doty (1949).

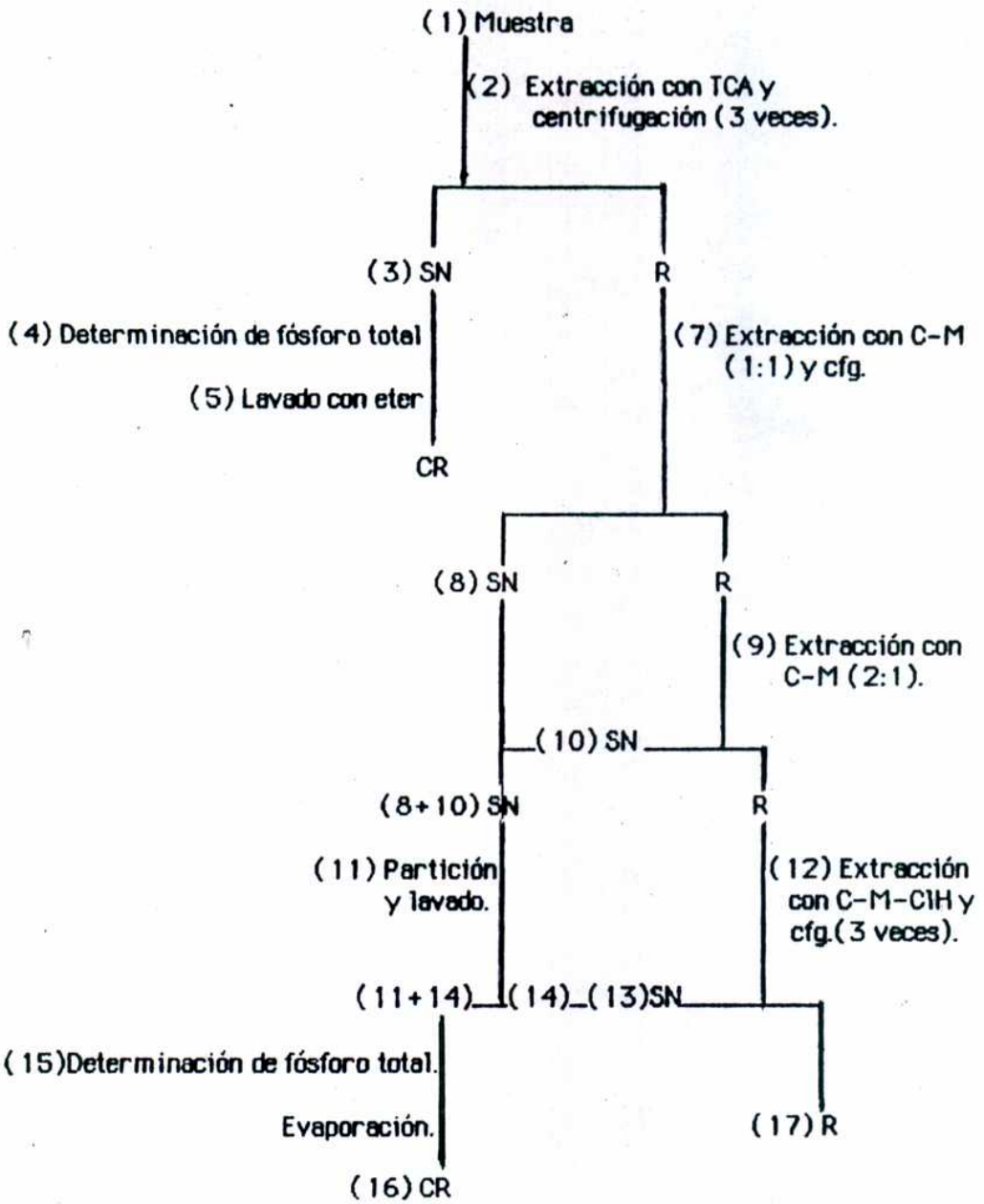

Fig. 1 . Esquema del procedimiento aplicado para la separación de las distintas fracciones fosforiladas.

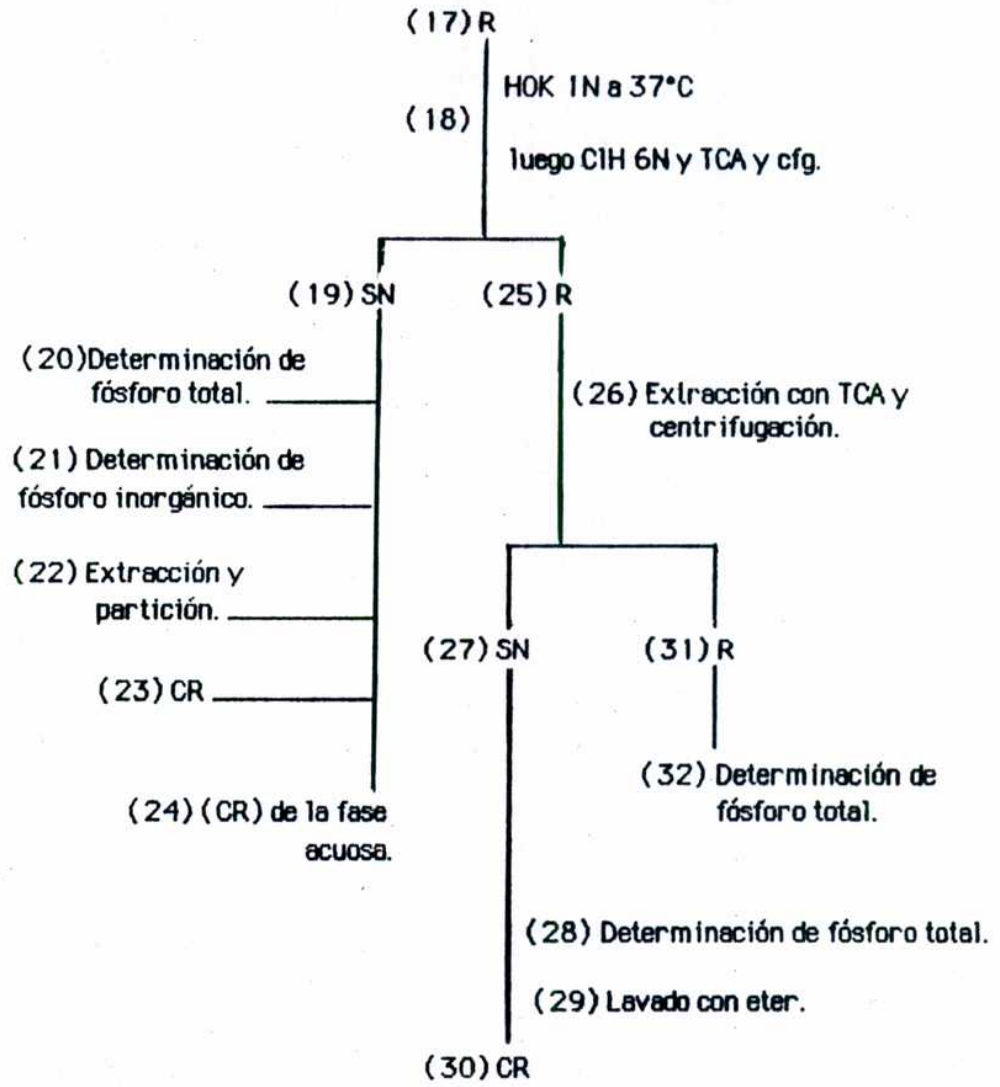

Fig. 1 bis . Esquema del procedimiento aplicado para la separación de las distintas fracciones fosforiladas. Entre paréntesis figuran los números de las distintas etapas que están explicadas más detalladamente en el texto. Abreviaturas: TCA, ácido tricloroacético; S, sobrenadante; R, residuo; C, cloroformo; M, metanol; CR, conteo radioactivo; cfg, centrifugacion.

El fósforo orgánico de la fracción (19) calculado sustrayendo la fracción de fósforo inorgánico (21) del fósforo total (20), fue llamado fósforo orgánico álcali estable.

El residuo (25) se extrajo con 2,5 ml de TCA al 5% a 90°C durante 15' y luego se centrifugó otros 15', paso (26); esta operación se realizó dos veces.

El sobrenadante (27) es la fracción de fósforo de ácidos nucleicos. El fósforo que se halló en el residuo, paso (31), fue siempre menos del 0,5% del fósforo total de la muestra.

2.6.-Medición de células.

Se midieron las células largas y las células estomáticas presentes en trozos de epidermis de coleoptiles de plántulas controles de 0 y 24 horas y de plántulas estresadas con 24 horas de tratamiento. Las tiras epidérmicas fueron obtenidas realizando una incisión con bisturí y posterior arrancado del material con pinza de punta fina, luego montadas con glicerina y agua y posteriormente teñidas con una solución de safranina en agua. Las mediciones se realizaron empleando un

microscopio Carl Zeiss equipado con ocular micrométrico.

2.7.-Radioactividades específicas.

Fueron calculadas en base al contenido de fósforo total de cada fracción fosforilada y a las dpm determinadas por conteo radioactivo, estas últimas a partir de las cpm corregidas.

Alícuotas de cada muestreo destinado a determinación de fósforo colorimétrico se sometieron a conteo radioactivo, previo tratamiento según se tratase de a) muestras acuosas o b) muestras en solventes orgánicos.

a) Muestras acuosas: Durante los primeros experimentos se utilizó la mezcla de Bray (1960). Para esto se empleó 15 ml de cóctel de centelleo en viales de vidrio.

Para los últimos experimentos se midieron directamente alícuotas de 2 ml ubicadas en viales descartables de polietileno.

b) Muestras en solventes orgánicos: Las muestras fueron llevadas a sequedad y luego redisueltas en líquido de Dogras et al. (1977). Los primeros experimentos fueron realizados con viales de vidrio y el volumen de cóctel de centelleo fue de 15 ml.

En los experimentos posteriores se utilizaron viales de polietileno descartables y el volumen de líquido de centelleo

utilizado fue de 2 ml.

Para la medición de la radioactividad se empleó un contador de centelleo líquido marca Packard modelo 2002 ó Beckman LS 100 C.

3.-**Resultados y conclusiones parciales.**

3.1.-Puesta a punto del sistema experimental.

Experiencias previas en invernáculo con macetas permitieron comprobar que era prácticamente imposible lograr condiciones reproducibles de carencia de agua en plántulas, debido a la dificultad de mantener automaticamente las diversas tasas de humedad requeridas por las experiencias, Además, otras variables incidían sobre el sistema, complejizándolo aún más: temperatura , fotosíntesis, presencia de hongos y depredadores, etc. Por estas razones se decidió trasladar las experiencias al laboratorio. Asimismo, para obtener condiciones reproducibles de estrés se pensó en utilizar agentes osmóticos colocados en cultivos hidropónicos. Como no se tenía experiencia con estos cultivos, se comenzó a experimentar con diversas condiciones de temperatura, previo lavado de las semillas con hipoclorito de sodio y posterior imbibición en agua destilada.

Las semillas a germinar fueron seleccionadas en cuanto a peso (50 mg aproximadamente) y tamaño, a fin de obtener un grupo de plántulas con la probabilidad de crecer lo más sincrónicamente posible y poder tratar así a esta población como si fuese una unidad. En este aspecto, Akalehiywot y Bewley

comunicaron que, aplicando determinadas temperaturas con shock osmótico simultáneo sobre semillas de avena y trigo se lograba un aumento significativo en el porcentaje de germinación y también la sincronía del crecimiento de las plántulas. Se realizaron experiencias de este tipo, remojando las semillas durante seis días a 5°C en solución al 27% de polietilenglicol 6000 (PEG), con un potencial osmótico aproximado de -1MPa (Michel y Kaufman, 1973). Luego se lavaron y traspasaron a cajas de petri con papel húmedo, colocándolas en estufa conjuntamente con controles no tratados con PEG. Los resultados no arrojaron diferencias significativas respecto de los controles tanto en porcentaje de germinación como en dinámica de crecimiento.

A pesar de la imposibilidad de obtener un desarrollo absolutamente sincrónico, se observó que la velocidad de crecimiento de la porción aérea presentaba características bifásicas. En efecto, el tiempo necesario para alcanzar aproximadamente los 2 cm de altura fue mayor que el requerido para duplicar esa longitud, luego de superar la cota mencionada. Por esta causa, antes de que los vástagos alcanzaran ese tamaño era difícil distinguir las distintas subpoblaciones que presentaran una relativa sincronía de desarrollo, mientras que, a partir de los 2 cm de altura de vástago y durante las 48 horas subsiguientes , el crecimiento de las plántulas fue muy homogéneo, lo que permitió considerar a la población seleccionada dentro de cotas decrecimiento muy

similares entre individuos.

Por otro lado , para evitar que la incidencia de una variable tal como la diferenciación de protoplastos inducida por la luz enmascarase en esos primeros estadios las respuestas al estres hídrico, se decidió trabajar en estufa y obscuridad, controlando periódicamente el crecimiento bajo lámpara de seguridad verde. Puesto que en ausencia de luz se produce una manifiesta elongación de la porción aérea, sería de esperar una biosíntesis efectiva de membranas, prevaleciente sobre la división celular. Con el objeto de controlar este último factor, se determinó ADN total y se realizaron simultáneamente observaciones anatómicas de las porciones aéreas en diversos estadíos de la germinación en obscuridad.

Paralelamente, fueron probadas distintas concentraciones de manitol (MAN) o PEG agregados al medio hidropónico. El objetivo de estos experimentos fue el de ajustar las condiciones para lograr un estrés moderado, reversible, a fin de poder obtener información sobre los procesos biológicos primarios de respuesta. En estas experiencias preliminares se adoptó el suguiente esquema: se dividió un grupo de plántulas germinadas en agua y creciendo en obscuridad hasta una altura de 2 cm, en cinco grupos, tratadas a posteriori bajo las siguientes condiciones: a) en agua; b) en PEG al 10%; c) en PEG al 20%; d) en MAN 0,15 M y e) en MAN 0,3 M. En los vástagos de todos los grupos de plántulas se realizaron determinaciones de alturas, pesos húmedos y pesos secos, en función del tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el PEG al 10% como el MAN 0,15M causaban un efecto notorio en las alturas y los pesos húmedos recién a las 72 horas. En cambio, la duplicación de las concentraciones provocó diferencias en crecimiento con respecto a controles ya a las 12 horas. Estas concentraciones de agentes osmóticos proveen de un estrés hídrico moderado, a nivel de plántulas . Además, si se retiraban las plántulas del medio estresante en cualquiera de los lapsos de tratamiento estudiados durante la realización de este trabajo, se lavaban sus raíces y se resembraban en agua, las plántulas recuperaban la velocidad de crecimiento que poseían los controles de igual altura.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, todos los experimentos sucesivos se llevaron a cabo utilizando PEG 6000 al 20% ó MAN 0,3M en agua como desarrollo, empleando agua como control.

3.2.-Pruebas de germinación.

Todos los años, antes de cada experimento con semillas de trigo de una nueva cosecha obtenida en la ERA INTA Balcarce, se efectuaron ensayos de poder germinativo. A continuación se describe un experimento tipo representativo de los varios

realizados:

Para llevar adelante estas pruebas se siguieron las pautas contenidas en las Reglas Internacionales para el Ensayo de Semillas (Proceedings of the International Testing Association). Se sometió a las semillas a un tratamiento previo de frío (prechill) en heladera a 5°C y presecado (predry) a 30-35°C durante 48 horas. Luego, los granos de trigo fueron puestos a germinar sobre papeles de filtro o entre papeles de filtro y en arena lavada a una temperatura constante de 20°C. Se realizaron las pruebas de germinación empleando para ello 400 granos divididos en cuatro grupos de 100 (cuatro repeticiones) para cada tratamiento. La energía germinativa se determinó a los 4 días y el poder germinativo a los 8 días. En todos los casos se descartaron aquellas partidas cuyo poder germinativo resultó inferior al 85%.

En todos los casos los granos de trigo fueron seleccionados previamente por su peso (50-60 mg) y fueron excluidos aquellos que presentaban anormalidades, como así también ataques de hongos o insectos.

3.3.-Alturas, pesos frescos y pesos secos de las plántulas.

A fin de hallar un parámetro de referencia relativamente invariable, contra el cual poder comparar variaciones de las biomoléculas a ser indagadas bajo condiciones de estrés hídrico - y como para otras especies se ha reportado (Hall y Hodges, 1966) que el peso húmedo de la porción aérea sigue un comportamiento diferente al del peso seco durante la germinación -, se determinaron alturas, pesos húmedos y pesos secos en porciones aéreas.

Estas experiencias mostraron que el peso húmedo del total de la porción aérea se incrementaba linealmente en controles. Empero, cuando estas plántulas con una altura de vástago de 2 cm fueron sometidas a un déficit hídrico moderado, se observó una rápida disminución de la velocidad de crecimiento del coleoptile y hojas primarias (ver fig. 2). Estas diferencias en alturas fueron correlacionadas con el virtual cese del

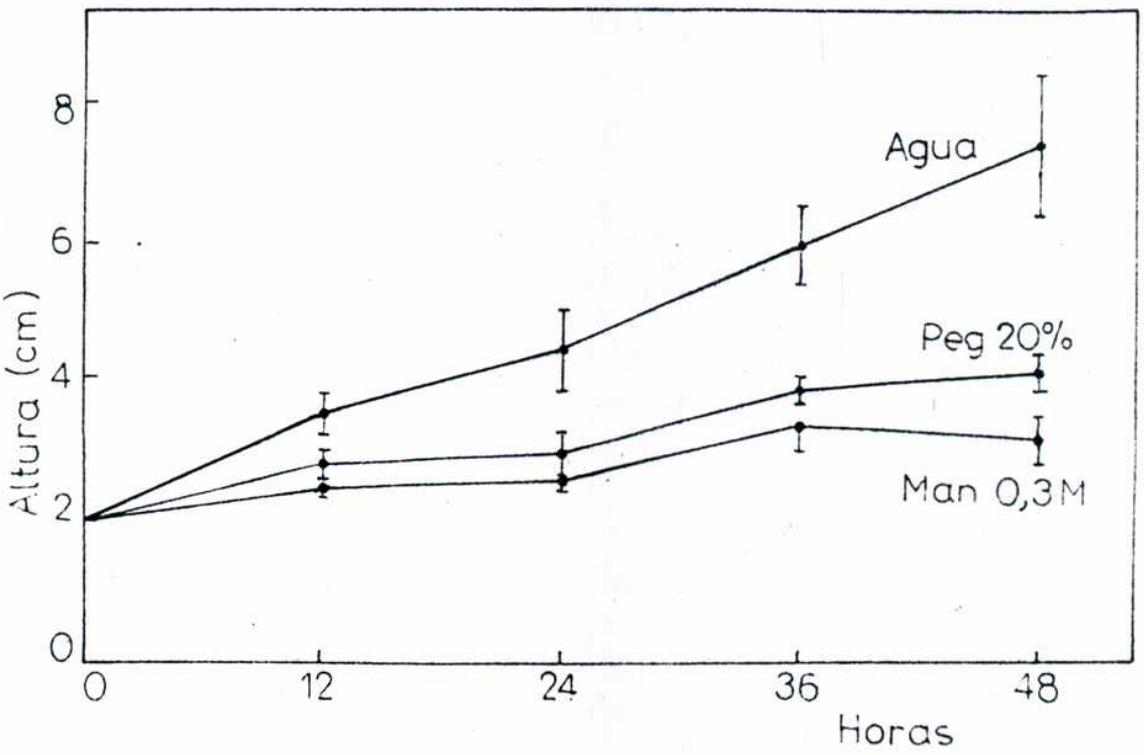

Fig.2. Altura de vástagos en función del tiempo.

incremento en el peso fresco que exhibieron las plántulas tratadas con las dos soluciones osmóticas (ver fig. 3).

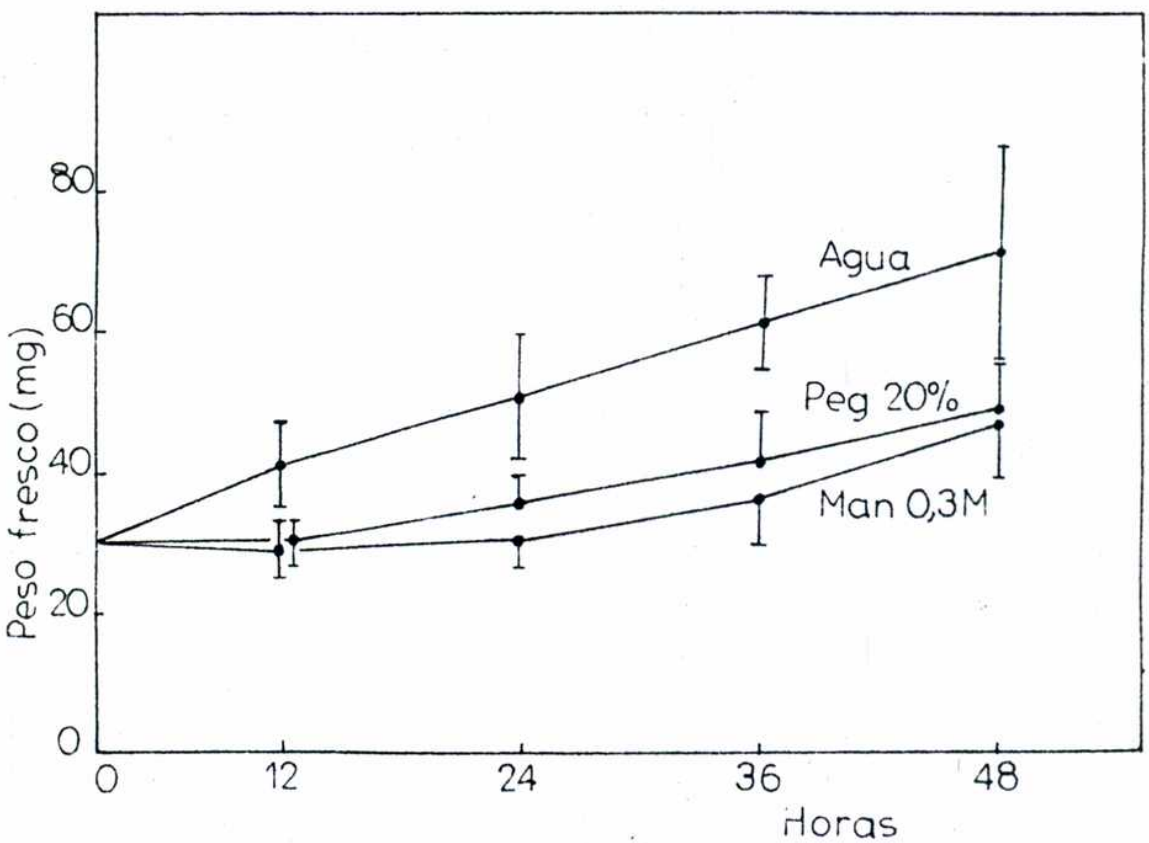

Fig.3. Pesos frescos de vástagos vs. tiempo.

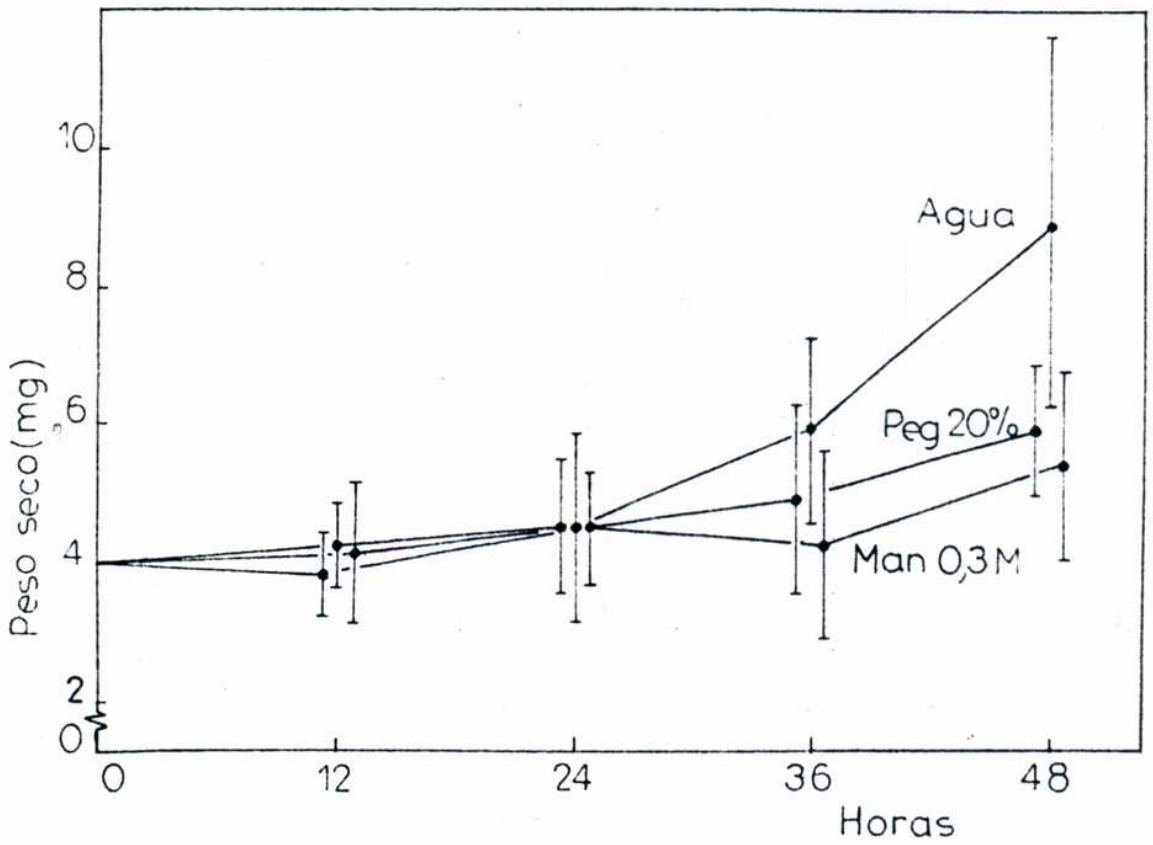

Fig.4. Pesos secos de vástagos vs. tiempo.

En efecto, las plántulas con carencia de agua mantuvieron constantes sus valores de peso húmedo hasta las 12 horas, incrementándose luego hasta las 48 horas con una pendiente menor que la de los controles.

Estas observaciones preliminares donde el peso húmedo de las plántulas variaba en función del tiempo, permitieron inferir que el contenido hídrico no puede ser tomado como parámetro de referencia para las determinaciones químicas diversas. Por el contrario, cuando las plántulas se trataron con PEG al 20% o MAN 0,3 M no se observaron diferencias significativas entre los valores de los pesos secos de las porciones aéreas de plántulas controles y estresadas (ver fig. 4). Esto permitió validar el uso del peso seco como referencia de las distintas determinaciones químicas, en las condiciones experimentales descriptas anteriormente.

3.4.-Determinación del porcentaje de humedad relativa al equilibrio, en porciones aéreas de plántulas controles y sometidas a estrés hídrico.

Existía la posibilidad de que las plántulas controles y las

sometidas a déficit hídrico llegaran a alcanzar el equilibrio con distinto porcentaje de humedad relativa. De ocurrir esto los datos obtenidos no serían comparables.

Con vistas a responder a este interrogante se conformó un "pool" de plántulas que estuvieron sometidas a 24 y 36 horas de estrés hídrico. Se prepararon tres recipientes herméticos (cazoletas) con tapa plástica y se colocaron unos 40 vástagos dentro de cada uno de ellos. En la primera cazoleta se colocaron porciones aéreas controles, en la segunda cazoleta se ubicaron los vástagos estresados con PEG 6000 al 20% y en la última cazoleta se pusieron aquellos tratados con MAN 0,3M. Estos recipientes fueron transportados al CITEP, en la ciudad de Mar del Plata, lugar en donde se realizaron las mediciones. Aparte, se preparó un control en el CITEP, que a su vez sirvió para controlar a los testigos transportados desde Balcarce. Este control lo constituyeron plántulas testigos de 24 y 36 horas, ubicadas dentro de un recipiente con papel secante embebido con agua destilada. Los resultados obtenidos se agrupan en la tabla Nº1; no se observaron diferencias entre las porciones aéreas testigos y las tratadas.

Tabla Nº 1. Porcentaje de humedad relativa en plántulas testigos y estresadas.

	Muestra			
	Testigo del testigo	Testigo transportado	PEG 20%	MAN 0,3M
%HR	97,0	96,8	96,7	95,6

Cada dato fue el promedio de dos mediciones.

3.5.-Proteínas totales y estrés hídrico.

La cantidad de proteínas por unidad de peso seco medida en la porción aérea de las plántulas de trigo experimentó un descenso significativo ($P<0,01$), cuando se las sometió a estrés hídrico con PEG 6000 al 20% durante 36 horas, con respecto a

las plántulas controles (Tabla Nº2).

Por otro lado, las plántulas tratadas con manitol no experimentaron cambios en su contenido proteico respecto de lo determinado en los controles a lo largo del mismo lapso (ver Tabla Nº2). Esta disminución del contenido proteico observada en las plántulas deprivadas de agua por efecto del PEG, podría atribuirse a una acción sobre la velocidad de la síntesis proteica o sobre la degradación, o ambos procesos desarrollados en forma conjunta. No obstante, los experimentos realizados no permiten arribar a conclusiones en este sentido. Con todo, se ha reportado que el estrés hídrico provoca la inhibición de la síntesis proteica debido a la disrupción de los polirribosomas (Hsiao, 1970). Esta aseveración está avalada por estudios sobre un musgo tolerante a la desecación (Dhinsa y Bewley, 1976), como así también en distintas especies de plantas superiores (Rhodes y Matsuda, 1976; Barlow et al, 1977). Asimismo, trabajando con tejido de tallo de trigo, se ha mostrado (Rhodes y Matsuda, 1976) que la disminución del crecimiento debida al déficit hídrico podría estar relacionada con la reducción en el nivel de polirribosomas, lo cual implica la alteración de la síntesis proteica.

Con respecto al presente trabajo experimental, los resultados obtenidos mostraron que la disminución en la velocidad de crecimiento tanto en plántulas tratadas con manitol o con PEG 6000 (ver figs. 2 y 3), no podía ser correlacionada directamente con un decrecimiento en el

contenido proteico (ver Tabla Nº2), aún cuando las plántulas tratadas con PEG 6000 exhibieron una disminución tanto del crecimento como así también de la síntesis proteica.

Tabla Nº2. Proteínas totales en vástagos (porción aérea completa).

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (mg/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	23,9(24)±3,5	23,9(24)±3,5	23,9(24)±3,5
24	17,3(20)±2,1	14,6(18)±2,6	17,5(20)±2,4
36	18,8(15)±2,3	13,6(12)±1,9	17,0(15)±1,6

Se considera tiempo cero cuando las plántulas alcanzaron una altura de vástago de 2 cm. Entre paréntesis figura el número de experimentos, seguido por el límite de confianza del 98% ($P<0,01$).

Se planteó en este momento la necesidad de conocer la contribución del coleoptile y de las hojas primarias al contenido proteico total, con relación al estrés hídrico. Para esto se disecaron los coleoptiles y se determinó su contenido proteico. En la Tabla Nº3 se agruparon los resultados obtenidos de contenido proteico en coleoptiles, referido siempre a

unidades de peso seco. En primer lugar, la concentración de proteína en coleoptile fue idéntica a la que presentó el vástago total, por lo que su contribución con respecto a la de la hoja es mayoritaria. A diferencia de lo obtenido con la porción aérea total, no se observaron diferencias significativas entre el contenido proteico por 100 mg de peso seco de los coleoptiles de plántulas tratadas con PEG 6000 al 20% y manitol 0,3M y el contenido proteico de los coleoptiles de las plántulas controles, durante el período de experimentación.

Tabla Nº3. Proteínas totales en coleoptiles.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (mg/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	23,9(16)±4,1	23,9(16)±4,1	23,9(16)±4,1
24	19,5(18)±2,3	21,1(17)±3,1	17,8(18)±1,6
36	17,6(18)±2,1	18,9(18)±2,8	17,4(16)±3,4

Las mismas especificaciones de la tabla Nº2. Límite de confianza 95% (P<0,025).

No obstante, y dados los resultados presentados en la Tabla Nº2 y la contribución mayoritaria del coleoptile al contenido de proteínas en porción aérea total, la caída observada en ese experimento podría atribuirse principalmente al descenso en hojas primarias.

3.6.-Contenido de ADN y estrés hídrico.

Los resultados obtenidos sobre el contenido total de ADN presente en porciones aéreas de plántulas de trigo creciendo hidropónicamente en la obscuridad , mostraron que en estos testigos hubo una disminución ($P<0,025$) de la cantidad de ADN/peso seco, mientras el vástago creció de 2 a 6 cm aproximadamente durante un lapso de 36 horas.

Pero cuando se trataron plántulas del mismo lote con PEG 6000 al 20% desde los 2 cm iniciales de longitud de la porción aérea y durante 36 horas, se observó un crecimiento menor (de 2 a 4 cm) comparado con las plantas testigos (Figura Nº2) y no se detectó un descenso significativo ($P<0,025$) en el contenido de ADN/peso seco (Tabla Nº4). Las plántulas tratadas con manitol 0,3M en igual lapso, en cambio, tuvieron una tendencia similar a la de los testigos, aunque menos marcada.

Tabla Nº4. Contenido total de ADN en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Control (mg ADN/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	2,2(7)±0,5	2,2(7)±0,5	2,2(7)±0,5
12	1,5(8)±0,5	1,3(7)±0,6	1,2(10)±0,4
24	1,2(16)±0,2	1,1(12)±0,3	1,3(16)±0,2
36	0,9(10)±0,2	1,5(8)±0,4	1,3(10)±0,2

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

El hecho de que los controles experimentaran crecimiento conjuntamente con un descenso de la cantidad de ADN/peso seco con las plántulas creciendo en la obscuridad, está de acuerdo con la suposición de una prevalencia de la elongación celular con respecto a la mitosis. En las plántulas tratadas con PEG 5000 al 20%, el estrés osmótico suave produciría la disminución de la presión de turgencia (se detiene, en efecto, el aumento del peso húmedo), con lo cual se afectaría preponderantemente la elongación (no disminuye el contenido de ADN/peso seco). Con respecto a las plántulas tratadas con MAN 0,3M, exhibieron un comportamiento intermedio, puesto que el estrés es aquí más suave, mostrando un descenso en la cantidad

de ADN/peso seco, que no alcanzó a ser significativo. Se sabe por la bibliografía, que existe una estrecha correlación entre la elongación de las células vegetales y la presión de turgencia (Ordin, 1960); en cuanto a la mitosis, resultaría ser menos afectada por la carencia de agua que la elongación celular (Vaadia et al., 1961). Se ha reportado incluso que el PEG 6000 y el manitol suprimen la elongación en hipocótiles (Hall y Hodges, 1966).

3.7.-Medición del tamaño de las células.

Como complemento de los resultados del punto anterior, se realizaron observaciones de células epidérmicas de plántulas controles y deprivadas de agua.

Las células de la epidermis de los testigos de 0 horas (coleoptile de 2 cm) tenían una longitud de 32,8 ± 5,5 µm. Estas mediciones se realizaron en todos los casos sobre el eje mayor de las células largas, las cuales están dispuestas en sentido paralelo al eje del coleoptile. En estos coleoptiles testigos de 0 horas se observaron además de las células largas, las células cortas y algunos tricomas, pero no así estomas, los cuales aún no estarían diferenciados en esta etapa de desarrollo.

Cuando se midieron las células epidérmicas de los

coleoptiles testigos de 24 horas se halló que su longitud era de 128,5 ± 8µm. En esta caso los estomas se observaron perfectamente y fueron medidos: su longitud fue de 7,3 ± 0,7µm.

En cuanto a los coleoptiles tratados con PEG 6000 al 20% durante 24 horas sus células midieron 47,4 ± 6,6µm. En estos preparados no se observaron estomas.

Al comparar todos estos datos de medición de células con las longitudes de los coleoptiles se vio que las células se elongaron de manera paralela a los coleoptiles. En efecto, las longitudes de estos últimos fue de 2 cm a 0 horas, de 2,8 ± 0,2 cm para plántulas tratadas con PEG durante 24 horas y de 4,3 ± 0,4 cm para testigos de 24 horas, siendo su incremento del 40% y del 115% respectivamente, en tanto que las células se elongaron un 45% en las plántulas tratadas con PEG y un 291% en los testigos correspondientes.

Estos datos biológicos no contradicen a los resultados bioquímicos obtenidos en la determinación de contenidos de ADN descriptos en 3.6.

Esto mismo ocurrió en células epidérmicas de hipocótile de plántulas etioladas de *Pisum sativum* (Hall et al.,1985).

Otro hecho que hay que destacar es la ausencia de diferenciación estomática en los coleoptiles de plántulas tratadas durante 24 horas con PEG 6000 al 20%. Al respecto Sakurai et al. (1986) observaron alteraciones en la diferenciación de los estomas de los cotiledones de *Cucurbita maxima* , no así en los hipocótiles de dicha planta, en condiciones de estrés moderado.

Nota: no se realizaron mediciones para tratamientos de más de 24 horas dado que los coleoptiles en esos casos ya han sido perforados por la primera hoja.

3.8.-Fósforo total y radioactividad específica.

Como la elongación celular está íntimamente relacionada con la síntesis de membranas, era de esperar que el metabolismo del fósforo resultara alterado cuando el fenómeno de la elongación fuese modificado por la aplicación, en este caso, de agentes osmóticos.

Los resultados obtenidos (Tabla Nº5), indicaron un descenso significativo ($P<0,025$) del contenido de fósforo /peso seco en las porciones aéreas de las plántulas controles como así también de las plántulas estresadas luego de 36 horas de crecimiento en la obscuridad, sin diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla Nº5. Contenido total de fósforo en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	26,9(42)±1,5	26,9(42)±1,5	26,9(42)±1,5
24	19,2(14)±1,6	22,6(18)±1,2	22,6(18)±1,5
36	19,7(18)±1,1	19,7(18)±1,3	18,8(21)±0,7

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

Se planteó aquí también el interrogante de conocer la contribución del coleoptile y de las hojas primarias a la cantidad de fósforo total/peso seco, por el hecho de no poder descartar la posibilidad de que -a pesar de no detectarse cambios entre las plántulas controles y las estresadas al finalizar el experimento- hubiera un descenso en el contenido de fósforo de una de las porciones del vástago (hojas primarias o coleoptile) que resultare compensado por el contenido de fósforo de la otra porción. En la Tabla Nº6 se agrupan los resultados de contenido total de fósforo en coleoptiles. A diferencia de lo observado con el contenido de proteínas

totales, donde la contribución del coleoptile parece ser mayoritaria (Tablas 2 y 3), la concentración de fósforo en el coleoptile fue algo menor que la mitad de la correspondiente a la porción aérea total, (Tablas 5 y 6). En cuanto a la comparación con el contenido de fósforo de las porciones aéreas completas, lo sucedido en los coleoptiles fue similar: no existieron diferencias significativas en el contenido de fósforo entre plántulas testigos y tratadas y hubo una caída en el tenor de fósforo para las plántulas testigos como así también para las tratadas con MAN 0,3M, al cabo de las 36 horas que duró el experimento.

Tabla Nº6. Contenido total de fósforo en coleoptiles.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	12,6(17)±2,5	12,6(17)±2,5	12,6(17)±2,5
12	10,2(18)±1,9	10,7(20)±1,6	10,2(18)±1,6
24	8,7(23)±0,7	10,5(13)±2,4	9,2(16)±1,2
36	8,3(15)±1,2	9,8(18)±1,4	8,2(17)±1,4

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2. (P<0,025).

En base a estos datos parecía en principio que el estrés moderado no afectaba el metabolismo de los compuestos fosforilados totales. Sin embargo, no se podía excluir la posibilidad de que el recambio de fósforo total fuere afectado a causa del estrés. Más aún, como el fósforo total incluye una gran heterogeneidad de moléculas fosforiladas, era probable que alguna/s de ella/s aumentaran de nivel a expensas de la disminución de otras, lo cual no podía ser detectado por mediciones de fósforo total. Con el objeto de responder a este interrogante es que se realizaron experiencias con ^{32}P, imbibiendo las semillas con una solución acuosa con material radioactivo y dejándolas germinar en estas condiciones hasta que alcanzaron una altura de 2 cm (tiempo cero). En este momento se lavaron las plántulas con agua corriente y luego con agua destilada y se separaron en tres lotes: uno de ellos fue el control y los otros dos los tratados con PEG 6000 al 20% y manitol 0,3M, todos libres de marca, y se dejó desarrollar a las plántulas durante 36 horas más.

A pesar de que el fósforo/peso seco disminuyó, se produjo concomitantemente un aumento de la radioactiviadad específica como consecuencia de una incorporación contínua de ^{32}P en porciones aéreas . Dicho incremento en controles fue de un 116% contra 93% de las plántulas tratadas con manitol 0,3M y de sólo un 22% para las estresadas con PEG 6000 al 20% (ver Tabla Nº7).

Tabla Nº7. Radioactividades específicas del fósforo total en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo ($d\,min^{-1}\mu mol^{-1}P$)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	14843	14843	14843
36	32099	18112	28638

Las semillas germinaron en agua con ^{32}P. Cuando las plantas alcanzaron los 2cm de altura fueron transferidas a medios sin marca. Valores de dos experimentos.

Estos resultados están indicando que la radioactividad específica del P total se incrementa con la elongación, siendo afectada por el estrés hídrico.

3.9.-Fracciones fosforiladas.

Con el objeto de investigar la posibilidad de que existiesen variaciones en el tenor de las distintas fracciones fosforiladas durante el crecimiento de las plántulas de trigo en obscuridad, como así también de medir las radioactividades específicas de las moléculas fosforiladas mayoritarias que pudieran ser afectadas por el déficit hídrico, se estudiaron las fracciones fosforiladas presentes, a saber: fósforo ácido soluble (FAS),

fósforo de fosfolípidos (FL), fósforo orgánico álcali estable (FOAE), fósforo de fosfoproteínas (FP) y fósforo de ácidos nucleicos (FAN).

3.9.1.-Fósforo ácido soluble (FAS).

En las condiciones experimentales ya descriptas, la fracción de ácido soluble endógena fue la mayoritaria (45,1%). Este dato concuerda con lo reportado para plántulas de *Avena sativa* que se desarrollaron en el mismo lapso (Hall y Hodges, 1966) y con lo determinado en plántulas de trigo que crecieron en obscuridad (Garcha et al., 1972). Se observó una rápida caída en el contenido de esta fracción tanto en controles como así también en plántulas sometidas a estrés hídrico moderado durante las 36 horas de tratamiento, lo cual es comparable con lo hallado para contenido de fósforo total (ver Tabla Nº8).

Tabla Nº8. Fracción de fósforo ácido soluble (FAS) en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	14,6(31)±0,5	14,6(31)±0,5	14,6(31)±0,5
12	9,9(12)±0,9	9,4(14)±1,2	10,3(17)±1,5
24	9,8(26)±0,5	8,5(19)±0,7	9,9(16)±0,9
36	10,2(16)±1,2	10,5(22)±0,7	10,0(23)±1,1

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2. ($P<0,025$).

3.9.1.1.-Determinación de fósforo ácido soluble (FAS), cortando los vástagos a diferente altura.

En la tabla 5 los valores de fósforo, obtenidos por determinación directa del total, para tiempos cero (2 cm de altura del vástago), fueron de 26,9 ± 1,5 µmoles/100 mg peso seco. En cambio, de la sumatoria de los valores según tablas 8, 11, 13, 14 y 16, correspondientes a las fracciones fosforiladas constituyentes, surgió el valor de 32,4 ± 1,5. Estas diferencias no son tan notorias para 24 y 36 horas de tratamiento. Por lo

tanto, considerando que la semilla -dada su gran cantidad de reservas- podría contribuir al enriquecimiento de la fracción de fósforo ácido soluble, especialmente cuando el vástago es aún relativamente corto, se planeó el siguiente experimento: se dosó FAS a tiempo cero en plántulas de las que se obtenían los vástagos cortándolos al ras de la semilla y otras donde se cortaban las porciones aéreas a 3 mm de la semilla. Los resultados de este experimento están agrupados en la Tabla Nº9.

Los mismos no muestran diferencias significativas en concentración entre los dos tipos de muestreo probados, tanto para fósforo total como para FAS. De modo que la diferencia anotada precedentemente no sería atribuible a una metodología de muestreo inadecuada.

Tabla Nº9. Determinación de fósforo total y fósforo de FAS en vástagos cortados a diferente altura.

	Corte	
	al ras	a 3mm
P total	29,2(15)±3,6	22,9(14)±3,9
P de FAS	15,0(18)±1,7	17,5(15)±2,2

P total y P de FAS en µmoles/100mg peso seco. Entre paréntesis el número de muestras. ($P<0,025$).

3.9.2.-Radioactividad específica de FAS.

Cuando se proporcionó a los granos de trigo un pulso de ^{32}P durante la imbibición previa a la germinación, se observaron diferencias en las radioactividades específicas medidas a posteriori en las plántulas originadas a partir de esas semillas marcadas radioactivamente. En efecto, mientras en las plántulas controles se detectó una caida de la radioactividad específica a las 36 horas de tratamiento, en las plántulas deprivadas de agua tanto por efecto del PEG 6000 al 20% como así también del manitol 0,3M, hubo un incremento de dichos valores (ver Tabla Nº10).

Tabla Nº10. Radioactividades específicas de la FAS en vástagos.

Tiempo (horas)	Exp.	Tratamiento		
		Testigo ($d\,min^{-1}\,\mu mol^{-1}\,P$)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	A	375	375	375
36	A	280	452	502
0	B	3272	3272	3272
36	B	3108	4117	4899

Quinientas semillas fueron puestas en imbibición durante 24 horas en agua destilada que contenía 5 $mCi^{32}P$. Las actividades específicas del $^{32}PO_4HNa_2$ en las soluciones fueron: 96,84 Ci g^{-1} y 115,39 Ci g^{-1} para los experimentos A y B respectivamente. Los volúmenes del agua de imbibición fueron de 3 litros en A y 25 ml en B. Cada valor representa la media de tres muestras. El promedio de la desviación standard fue menor de ±5%.

3.9.3.-Fósforo de fosfolípidos (FL).

La fracción del fósforo incluída en los fosfolípidos alcanzó al 19,1% del total y permaneció invariable en las condiciones del experimento tanto en plántulas controles como deprivadas de agua (ver Tabla Nº 11).

Los fosfolípidos, al ser componentes esenciales de las membranas biológicas, están implicados en la mayoría de los procesos metabólicos. Aceptando esta aseveración, sería lógico suponer que la cantidad de fosfolípidos debería mantenerse constante a los efectos de garantizar el correcto funcionamiento de la maquinaria biológica.

Tabla Nº 11. Fracción fosfolipídica (FL) en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	6,2(15)±0,2	6,2(15)±0,2	6,2(15)±0,2
12	5,8(80±2,5	5,8(13)±2,3	6,7(14)±2,4
24	6,2(18)±2,2	7,9(14)±2,4	6,2(15)±1,8
36	5,9(16)±1,5	6,1(21)±1,8	5,5(20)±1,5

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

3.9.4.-Radioactividad especifica de FL.

Cuando se determinó fósforo total en vástagos, a pesar de no haber diferencias en el contenido de fósforo/peso seco entre plántulas controles y estresadas, se vió que la radioactividad especifica variaba de manera tal que, tanto el PEG 6000 al 20% como el manitol 0,3M afectaban el recambio de fósforo total, el primero con una incidencia más marcada. En cuanto a la fracción de fosfolipidos, experimentó una continua incorporación de ^{32}P, de tal manera que la radioactividad especifica se incrementó fuertemente en los vástagos, tanto de las plántulas controles como de las tratadas con manitol 0,3M. En cuanto al PEG 6000 al 20%, produjo una reducción del incremento de la radioactividad específica respecto de la obtenida con los controles. Este efecto podría estar relacionado con una restricción del recambio del fósforo de componentes esenciales de la membrana como son los fosfolípidos (ver Tabla Nº12).

Tabla Nº12. Radioactividades específicas de la fracción de fosfolípidos en vástagos.

Tiempo (horas)	Exp.	Tratamiento		
		Testigo ($d\,min^{-1}\mu mol^{-1}P$)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	A	394	394	394
36	A	668	636	824
0	B	1165	1165	1165
36	B	2989	1555	3475

Las mismas indicaciones de la tabla Nº8.

3.9.5.-Fracción de fósforo orgánico álcali estable (FOAE).

Esta fracción, que contiene ARN como constituyente mayoritario (Schmidt y Thannhauser, 1945), representó el 22,2% del fósforo total cuando las plántulas crecieron en la obscuridad. El valor inicial a tiempo cero (2 cm de altura del

vástago) experimentó un descenso significativo durante las 36 horas de tratamiento (ver Tabla Nº13).

Tabla Nº13. Fracción de fósforo orgánico álcali estable (FOAE) en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento			
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN	0,3M
0	7,2(7)±0,4	7,2(7)±0,4	7,2(7)±0,4	
12	5,2(9)±0,9	4,3(10)±0,8	5,0(9)±1,2	
24	3,7(14)±0,5	3,1(10)±0,4	3,3(10)±0,7	
36	4,4(15)±0,5	3,9(13)±0,4	3,8(17)±0,4	

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

En cuanto a la medición de la radioactividad específica, la fracción de fósforo orgánico álcali estable no incorporó marca.

3.9.6.-Fósforo de ácidos nucleicos (FAN).

Esta fracción representó el 11,1% del contenido de fósforo total de coleoptile y hojas primarias en plántulas de trigo en el

tiempo cero. El fósforo de la fracción de ácidos nucleicos en relación al peso seco en plántulas de trigo que crecieron en la obscuridad decreció en los vástagos después de 36 horas de tratamiento. Este resultado está de acuerdo con lo determinado previamente para ADN total, sin embargo, no existieron diferencias significativas cuando se compararon los controles con las plántulas sometidas a estrés hídrico con PEG 6000 al 20% o manitol 0,3M (ver Tabla Nº14). La relativamente menor sensibilidad de determinación de contenido de ADN por medición de su P, con respecto a la reportada en 3.6, podría explicar la falta de diferencias entre ADN de plántulas testigos y tratadas presentadas en tabla 4.

Tabla Nº14. Fracción de fósforo de ácidos nucleicos (FAN) en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	3,6(10)±0,1	3,6(10)±0,1	3,6(10)±0,1
12	2,4(10)±0,6	1,9(9)±0,4	2,1(12)±0,4
24	2,2(16)±0,3	1,9(10)±0,3	2,1(14)±0,3
36	1,9(17)±0,2	2,0(13)±0,1	1,9(19)±0,1

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

3.9.7.-Radioactividad específica de FAN.

A pesar de que no se detectaron cambios entre controles y plántulas sometidas a estrés hídrico moderado en lo que respecta a fósforo de ácidos nucleicos, hubo diferencias en la incorporación del ^{32}P. La radioactividad específica de la fracción de fósforo de ácidos nucleicos se incrementó durante las 36 horas de tratamiento en obscuridad, pero hubo menor incorporación en plántulas tratadas con manitol 0,3M o PEG 6000 al 20% (ver Tabla Nº15).

Tabla Nº15. Radioactividades específicas de la fracción de fósforo de ácidos nucleicos (FAN) en vástagos.

Tiempo (horas)	Exp.	Tratamiento		
		Testigo ($d\,min^{-1}\,\mu mol^{-1}\,P$)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	A	427	427	427
36	A	987	563	623
0	B	1106	1106	1106
36	B	2050	1132	1994

Las mismas indicaciones de la tabla Nº8.

3.9.8.-Fósforo de fosfoproteínas (FP).

La fracción de fosfoproteínas resultó ser la menor de todas las fracciones fosforiladas analizadas en coleoptiles y hojas primarias de plántulas de trigo que crecieron en la obscuridad, ya que su tenor alcanzó sólo al 2,4% del fósforo total. Durante el tratamiento de 36 horas se observó que la relación entre fósforo de fosfoproteínas y peso seco, que era de 0,8 µmol/mg de peso seco en el tiempo cero (2 cm de altura de vástagos), descendió de manera muy marcada tanto en plántulas controles como en tratadas. No se detectaron diferencias significativas en el nivel de la fracción de fósforo de fosfoproteínas entre las plántulas controles, las deprivadas de agua con PEG 6000 al 20% o las tratadas con manitol 0,3M durante el período del experimento (ver Tabla Nº16).

Tabla Nº16. Fósforo de fosfoproteínas en vástagos.

Tiempo (horas)	Tratamiento		
	Testigo (µmol/100mg peso seco)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	0,8(7)±0,4	0,8(7)±0,4	0,8(7)±0,4
12	0,5(9)±0,1	0,3(10)±0,0	0,4(11)±0,1
24	0,3(14)±0,0	0,3(12)±0,0	0,3(14)±0,1
36	0,2(15)±0,0	0,3(14)±0,1	0,3(17)±0,0

Las mismas indicaciones de la tabla Nº2.

3.9.9.-Radioactividad específica de FP.

A pesar de lo visto en el párrafo precedente, es esta la fracción que incorporó la mayor cantidad de marca radioactiva cuando se les suministró ^{32}P a los granos de trigo durante la imbibición previa a la germinación. Esto se reflejó en la elevada radioactividad específica a tiempo cero (altura de vástagos de 2 cm). Más aún, a pesar de que el nivel de fósforo descendió en un 75% durante las 36 horas que duró el

experimento, la radioactividad específica se incrementó firmemente en ese lapso (ver Tabla Nº17).

Tabla Nº17. Radioactividades específicas de la fracción de fósforo de fosfoproteínas (FP) en vástagos.

Tiempo (horas)	Exp.	Tratamiento		
		Testigo ($d\,min^{-1}\mu mol^{-1}P$)	PEG 20%	MAN 0,3M
0	A	758	758	758
36	A	4455	3019	3579
0	B	22650	22650	22650
36	B	50524	24666	41424

Las mismas indicaciones de la tabla Nº8.

Este particular comportamiento fue marcadamente afectado cuando se sometió a las plántulas a un estrés hídrico moderado, tanto con manitol 0,3M como asi también con PEG 6000 al 20%, siendo la incidencia de este último sobre el decrecimiento de la radioactividad específica aún más evidente.

3.10.-Hormonas y estrés de agua.

Se sabe que diversas hormonas vegetales varían en su concentración en relación al estrés hídrico. Por otra parte, cuando en el presente trabajo se evaluaron las distintas fracciones fosforiladas mayoritarias resaltaron las fracciones de fosfolípidos totales y de fosfoproteínas, las cuales resultaron afectadas en su recambio del fósforo sin que en cambio se alterara el valor absoluto del fósforo presente en ambas fracciones. Teniendo en cuenta que en animales el mecanismo de acción de diversas hormonas implica procesos de fosforilación y defosforilación de proteínas, se planteó la posibilidad de que en plantas existiera un mecanismo análogo. Como hasta el presente no se han hallado referencias bibliográficas que permitan establecer una posible relación entre hormonas vegetales, fosfolípidos y fosfoproteínas y estrés de agua en vástagos de plántulas, es que se proyectó estudiar en primer término el efecto biológico del agregado de hormonas vegetales exógenas a porciones aéreas de plántulas sometidas a shock osmótico suave y posteriormente determinar si las hipoteticas modificaciones pudieran relacionarse al recambio de fosfolípidos y fosfoproteínas.

3.10.1.-Aplicación de AIA en plántulas controles y estresadas.

Como virtualmente todos los aspectos del desarrollo de las plantas están influenciados por la disponibilidad de agua y por los reguladores de crecimiento, no resulta sorprendente que las principales hormonas vegetales hayan sido muy estudiadas en relación al estrés hídrico.

Sin embargo, en cuanto al ácido indol acético, la información acerca del efecto del déficit de agua sobre los niveles endógenos de AIA es escasa y aún contradictoria (Bradford y Hsiao, 1982).

En realidad, la restricción en el crecimiento causada por el estrés de agua suave parece estar relacionada a un incremento del nivel endógeno de ABA y no al AIA (Sakurai et al, 1985), pero el efecto inhibitorio del ABA puede revertirse con AIA exógeno (Noggle y Fritz, 1976).

Si, tal como se demuestra en los primeros estudios efectuados -los cuales forman parte de esta tesis-, la elongación predomina sobre la división celular en plántulas de trigo creciendo hidropónicamente en la oscuridad y que desde hace tiempo se ha mostrado que el AIA y otras auxinas promueven la elongación, la aplicación de AIA exógeno podría

contrarrestar el efecto del ABA endógeno y revertir la elongación restringida a causa del estrés de agua.

Los primeros experimentos de aplicación de AIA consistieron en utilizarlo a distintas concentraciones en solución acuosa. Estas experiencias resultaron infructuosas, quizá debido a que la solución de auxina se evaporaba con facilidad a pesar de ser repuesta periódicamente.

Se procedió entonces a trabajar siguiendo el método clásico de aplicar la auxina mezclada en lanolina. Se buscó al efecto una concentración tal que ejerciera su efecto de promoción sin tener acción inhibitoria. Para ello se probaron varias concentraciones de auxina en lanolina, siendo la más efectiva -para las condiciones de estos experimentos- aquella que tenía 5000ppm de AIA (5gr de AIA/kg de lanolina), la cual es utilizada comunmente en trabajos prácticos de fisiología vegetal.

En la figura Nº 5 se muestra una curva de respuesta de las plántulas de trigo en función de la concentración de auxina.

Aparentemente esta era la concentración de AIA más apropiada para estas condiciones experimentales pero ¿qué sucedería si se cortaban los ápices de los vástagos? La hormona actuaría de esta manera en forma más eficiente al eliminarse probables barreras a su difusión.

Se programó al respecto un experimento en el cual se decapitaron los coleoptiles a 3mm de los ápices. De esta manera se descartaba presuntamente el efecto de la auxina

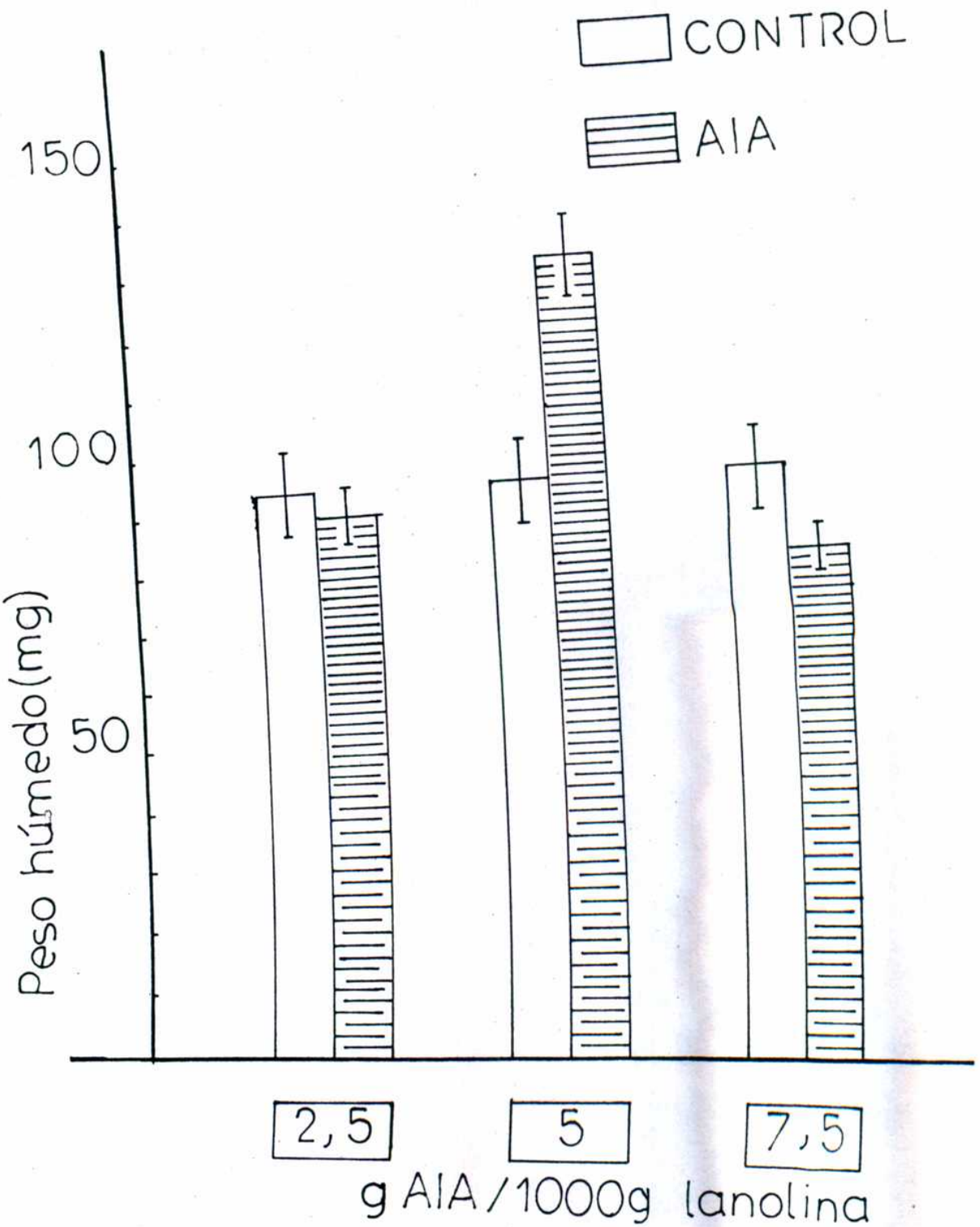

Fig. 5.-Respuesta de las plántulas a distintas concentraciones de AIA.

endógena y la que actuaba era sólamente la hormona que estaba presente en la pasta de lanolina. Este experimento no arrojó luz sobre los interrogantes planteados, ya que no hubo diferencias significativas en pesos frescos, pesos secos y alturas entre vástagos de plántulas cortadas controles y vástagos de plántulas cortadas con aplicación de AIA. Estos resultados están ordenados en la Tabla Nº18.

En cambio, cuando se repitió el mismo esquema pero utilizando plántulas intactas -ver Tabla Nº19- , se observó un incremento en los pesos frescos de los vástagos de las plántulas tratadas con respecto a las porciones aéreas de las plantas controles.

Tabla Nº18. Aplicación de pasta de AIA con lanolina a plántulas decapitadas. Peso fresco, peso seco y altura de vástagos.

Parámetro	Tratamiento	
	Testigo	AIA
Peso fresco (mg)	87,6(20)±1,0	92,1(19)±6,3
Peso seco (mg)	8,59(20)±0,2	8,9(19)±0,3
Altura (cm)	7,3(20)±1,0	6,8(19)±0,8

Duración del experimento 48 hs. Las plántulas fueron cortadas a 3 mm del ápice. Entre paréntesis número de muestras. Nivel de confianza 95%.

Tabla Nº19. Aplicación de pasta de AIA con lanolina a plántulas intactas. Peso fresco, peso seco y altura de vástagos.

Parámetro	Tratamiento	
	Testigo	AIA
Peso fresco (mg)	105,7(26)±6,5	130,5(18)±7,5
Peso seco (mg)	10,9(24)±0,6	11,8(19)±0,5
Altura (cm)	7,4(26)±0,8	7,3(16)±0,4

Las mismas indicaciones de la Tabla Nº18, excepto que se trata de plantas intactas.

A partir de este momento se trabajó sin practicar cortes en los ápices de los vástagos, manteniendo las plantas intactas, lo cual tiene la ventaja adicional sobre el precedente procedimiento quirúrgico de no introducir ningún otro efecto estresante más que el acarreado por el déficit hídrico moderado.

3.10.2.-Aplicación de AIA a trigos susceptibles y resistentes al estrés hídrico.

El objetivo de este experimento era determinar si la aplicación de auxina exógena -en estas condiciones de laboratorio- revertía los efectos del estrés hídrico en trigos resistentes y susceptibles a la deprivación moderada de agua. Se sabía, por ejemplo, que *Triticum durum* era más resistente a los efectos del estrés hídrico que el *T. aestivum*. En efecto, la acumulación de prolina, que se interpreta como una respuesta al estrés hídrico, es evidente en las variedades que son conocidas por su gran resistencia a la desecación. Esto es lo que ocurre con el *T. durum*, (Moveveaux y Nemmar, 1986).

En cuanto a los cultivares autóctonos de *T. aestivum*, no existen en nuestro país sistemas de selección en base a resistencia al estrés de agua, por lo cual se desconoce a priori cuáles son resistentes o no, (C. Bariffi, comunicación

personal).

En nuestro laboratorio se han realizado ensayos a nivel de plántulas (Sueldo y Barassi, datos sin publicar), que señalaron a ciertos cultivares como resistentes y a otros como susceptibles al estrés osmótico moderado.

En el experimento que se explica a continuación se eligieron dos de esos cultivares ensayados, a saber: *T. aestivum* cv. Buck Pucará, que se manifiestó como susceptible al estrés hídrico, con poca capacidad de recuperación y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco, resistente al estrés hídrico y con buena recuperación y se los comparó conjuntamente con *T. durum* cv. Balcarceño INTA. La labor consistió en medir pesos frescos, pesos secos y alturas de porciones aéreas de plántulas. Al respecto, para cada tipo de trigo se agruparon las plántulas en cuatro lotes: el primer grupo fue el control; el segundo lo constituyeron las plantas a las que se les aplicó AIA en pasta de lanolina en las condiciones ya descriptas; el tercer lote lo formaron plántulas que fueron sometidas a los efectos del estrés hídrico moderado mediante la aplicación de PEG 6000 al 20% y el último grupo lo fue de plántulas deprivadas de agua mediante la aplicación de PEG 6000 al 20% y al unísono tratadas con AIA en pasta de lanolina. En todos los casos los tratamientos comenzaron a aplicarse cuando las plantas alcanzaron una altura de vástago de 2 cm (tiempo cero) y las mediciones se efectuaron luego de lapsos de 24 y 48 horas. Los datos de este experimento se agruparon en las tablas Nº20 a 22.

Tabla Nº20. Acción del AIA sobre vástagos de *T. aestivum* cv. Buck Pucará.

TIEMPO 24 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	5,3±0,1 (20)	5,8±0,1 (20)	2,6±0.1 (20)	2,9±0,1 (20)
Peso fresco (mg)	71,5±2,7 (23)	74,0±2,2 (18)	26,4±1,4 (20)	28,2±2,4 (20)
Peso seco (mg)	5,1±0,4 (21)	4,9±0,4 (18)	4,2±0,2 (20)	4,5±0,2 (20)

TIEMPO 48 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	7,5±0,5 (25)	7,4±0,4 (18)	2,8±0,3 (30)	3,4±0,3 (30)
Peso fresco (mg)	87,5±5,8 (26)	102,7±6,7 (26)	33,5±3,8 (30)	39,2±4,4 (30)
Peso seco (mg)	7,7±0,5 (23)	7,7±0,7 (19)	5,3±0,4 (30)	6,3±0,5 (30)

Entre paréntesis número de muestras. ($P<0,025$).

Tabla Nº21. Acción del AIA sobre vástagos de *T. aestivum* cv. Klein Chamaco.

TIEMPO 24 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	6,2±0,2 (18)	6,0±0,3 (20)	4,0±0,1 (19)	4,5±0,4 (17)
Peso fresco (mg)	76,5±2,1 (20)	75,1±3,2 (23)	47,1±1,8 (19)	45,5±3,2 (17)
Peso seco (mg)	5,2±0,2 (17)	5,3±0,4 (20)	5,0±0,2 (18)	5,2±0,4 (17)

TIEMPO 48 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	7,3±0,3 (16)	6,5±1,0 (16)	2,7±0,3 (20)	3,5±0,3 (20)
Peso fresco (mg)	90,2±7,1 (16)	80,2±6,5 (16)	31,4±3,0 (19)	38,1±3,2 (19)
Peso seco (mg)	6,4±0,7 (16)	6,7±0,9 (16)	5,9±0,2 (20)	5,9±0,4 (20)

Las mismas indicaciones de la Tabla Nº20.

Tabla Nº22. Acción del AIA sobre vástagos de *T. durum* cv. Balcarceño INTA.

TIEMPO 24 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	4,9±0,1 (26)	6,6±0,3 (16)	2,3±0,2 (18)	3,8±0,1 (22)
Peso fresco (mg)	67,1±4,1 (26)	85,6±4,6 (20)	35,4±0,5 (20)	48,2±1,2 (24)
Peso seco (mg)	5,0±0,8 (25)	5,1±0,6 (20)	4,0±0,7 (18)	5,2±0,5 (22)

TIEMPO 48 HORAS

Parámetro	Tratamiento			
	Testigo	AIA	PEG	PEG+AIA
Altura (cm)	8,1±0,5 (20)	7,8±0,6 (18)	4,3±0,5 (25)	4,5±0,4 (25)
Peso fresco (mg)	92,8±6,8 (20)	130,5±7,5 (18)	56,6±3,7 (25)	76,7±4,6 (25)
Peso seco (mg)	9,1±0,4 (20)	9,4±0,8 (16)	8,8±0,3 (25)	9,9±0,5 (25)

Las mismas indicaciones de la Tabla Nº20.

De la comparación de los datos de las Tablas Nº20 , 21 y

22 surge como observación que: en estas condiciones experimentales a) el PEG 6000 al 20% ejerce su acción sobre pesos frescos y alturas, no así sobre pesos secos y b) el AIA no revierte los efectos causados por el PEG sobre los pesos frescos de ambos *T. aestivum*. En cuanto a *T. durum* cv. Balcarceño INTA se observó que, aunque sin alcanzar los valores de los testigos, el AIA revertía en parte los efectos causados por el estrés hídrico sobre pesos frescos. En realidad no se apreció una respuesta distinta entre trigos resistentes y susceptibles al estrés hídrico moderado, sino que aparentemente el comportamiento diferencial fue específico, comportándose de manera similar los dos *T. aestivum* y de otra forma el *T. durum*. En realidad con los datos presentes no se pudieron realizar aseveraciones firmes en este sentido, pero sería interesante de tener en cuenta para futuros estudios a los cuales podría dar origen la presente tesis.

3.11.-<u>Radioactividades específicas de fósforo total, de fosfolípidos y de fosfoproteínas en especies y cultivares de trigo con diferentes susceptibilidades al estrés hídrico.</u>

Los experimentos realizados con el cv. Balcarceño-INTA de *Triticum durum* en relación con el estrés osmótico moderado aplicado a nivel de plántulas, mostraron efectos

sobre el recambio del fósforo total y dentro de este, la atención se centró sobre las fracciones fosfolipídica y fosfoproteica. El interrogante surgido a posteriori fue : ¿se trata de una respuesta general en trigo o la misma es inherente a una relativa tolerancia al estrés hídrico que, debido a su origen, exhibe *T. durum*? Para responder a este interrogante es que se realizaron experimentos en cultivares susceptibles y resistentes al efecto de la deprivación moderada de agua. Para ello se comparó a los trigos Buck Pucará y Klein Chamaco (ambos *T. aestivum*) entre sí y tomando como patrón al *T. durum* cv. Balcarceño INTA, proporcionando al efecto un pulso de ^{32}P durante la imbibición de las semillas.

3.11.1.-<u>Radioactividad específica del fósforo total.</u>

Los resultados de la Tabla Nº23 muestran que, mientras en

Tabla Nº23. Radioactividad específica del fósforo total en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará.

Trigo	Tratamiento	Tiempo(horas)	
		0 ($d\ min^{-1} \mu mol^{-1} P$)	48
Balcarceño	Testigo	13425	20053
	PEG 20%	-	5768
Chamaco	Testigo	8515	8526
	PEG 20%	-	10047
Pucará	Testigo	13993	6239
	PEG 20%	-	4906

1

Quinientos granos de trigo fueron puestos en imbibición durante 24 horas en 30 ml de agua destilada que tenía disueltos 5 mCi de ^{32}P, según se describe en 2.1.2. Cada valor es el promedio de por lo menos cuatro muestras. El promedio de la desviación standard fue menor de ± 5%.

el caso del cultivar Balcarceño INTA -resistente al estrés hídrico moderado- hubo un marcado incremento en la radioactividad específica (66%) después de 48 horas de crecimiento de las plántulas, en Pucará -susceptible al estrés hídrico- el comportamiento fue el opuesto, ya que se observó un descenso del 55%, en tanto que en Chamaco -medianamente

resistente al estrés- no se observaron cambios. El efecto del estrés hídrico produciría un agudo descenso de la radioactividad específica en el cultivar Balcarceño INTA , revirtiendo lo que sucede para los testigos de 48 horas, mientras que en Pucará se acentuó el descenso observado en las plántulas testigos. Por otro lado, el cultivar Klein Chamaco no siguió estas tendencias, manteniéndose relativamente constante la radioactividad específica durante las 48 horas del experimento, tanto en las plántulas testigos como en aquellas sometidas a estrés hídrico moderado.

De lo precedente surgen diversos interrogantes, como ser : a) ¿ el incremento en controles de Balcarceño-INTA es una característica inherente a la especie ?; b) ¿ el incremento de radioactividad específica observada en Chamaco con PEG 20%, se debe a que es resistente al déficit hídrico y con buena capacidad de recuperación ? Para dilucidar estas dudas sería interesante realizar en el futuro experimentos con otros cultivares de *Triticum*.

3.1.1.2.-Radioactividad específica de fosfolípidos en *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv.Klein Chamaco y Buck Pucará.

Para el caso de los fosfolípidos (tabla Nº24), la

radioactividad específica en Balcarceño se incrementó en las plántulas testigos, luego de 48 horas de crecimiento. Este ascenso fue atenuado en las plántulas tratadas con PEG 6000 al 20%, todo lo cual es concordante con datos ya expuestos en la presente tesis, (ver Tabla Nº12). En cuanto a los dos cultivares de *Triticum aestivum*, su comportamiento ha sido distinto, observándose un descenso de la radioactividad específica en las plántulas testigos a las 48 horas de desarrollo; dicho descenso pareció no ser afectado por el estrés hídrico.

Tabla Nº24. Radioactividad específica de fosfolípidos totales en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará.

Trigo	Tratamiento	Tiempo(horas)		
		0	24	48
		($d\,min^{-1}\mu mol^{-1}P$)		
Balcarceño	Testigo	6434	7928	11222
	PEG 20%	-	6073	6251
Chamaco	Testigo	16742	13651	11441
	PEG 20%	-	13587	11836
Pucará	Testigo	21386	8608	8956
	PEG 20%	-	7273	9243

Las mismas indicaciones de la Tabla Nº23.

3.11.3.-Radioactividad específica de fosfoproteínas en *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará.

En lo que respecta a las fosfoproteínas (ver Tabla Nº25), se produjo un incremento de la radioactividad específica para las plántulas testigos a las 48 horas de desarrollo, tanto en Balcarceño INTA como en Klein Chamaco , ambos cultivares resistentes al estrés hídrico, mientras que en Buck Pucará, el cultivar susceptible, se verificó un descenso de la radioactividad específica. En cuanto al estrés hídrico causado por el PEG 6000 al 20%, se observó que se atenuaba el incremento que se había apreciado en plántulas testigos de los cultivares Balcarceño y Chamaco, mientras que hubo un marcado

Tabla Nº25. Radioactividad específica de fosfoproteínas en vástagos de *Triticum durum* cv. Balcarceño INTA y *T. aestivum* cv. Klein Chamaco y Buck Pucará.

Trigo	Tratamiento	Tiempo(horas)	
		0 ($d\,min^{-1}\mu mol^{-1}P$)	48
Balcarceño	Testigo	4659	7324
	PEG 20%	-	2865
Chamaco	Testigo	3624	6041
	PEG 20%	-	4860
Pucará	Testigo	5465	3139
	PEG 20%	- -	6333

Las mismas indicaciones de la Tabla Nº23.

aumento de la radioactividad específica en plántulas privadas de agua con respecto a las plántulas controles en el cultivar Pucará.

Como conclusión parcial se puede decir que, los resultados de radioactividad específica de fosfolípidos muestran un

comportamiento similar de los cultivares Pucará y Chamaco entre sí, pero diferente con respecto al cultivar Balcarceño INTA. Esto podría responder a una característica diferencial del *Triticum aestivum* con respecto al *T. durum* , ya que, en relación con la resistencia al estrés hídrico, el cultivar Klein Chamaco se aproxima más al cultivar Balcarceño INTA que al cultivar Buck Pucará, (Tabla Nº25).

En cambio, las diferencias apuntadas en radioactividades específicas de fosfoproteínas entre los diversos cultivares, podrían representar un nexo con la susceptibilidad diferencial al estrés hídrico entre distintas especies y/o cultivares de trigo.

Hay que hacer notar que, si bien el número de muestras tomadas en estos experimentos fue considerablemente menor al empleado cuando se estudió exclusivamente al cultivar Balcarceño INTA de *T. durum* , la tendencia obtenida con respecto a la evolución de los parámetros estudiados es similar, lo cual sirve de contralor para la metodología aplicada en el estudio de los restantes cultivares. Además, de otra manera, el incremento en el número de muestras iría en desmedro de la capacidad de manejo simultáneo de los cultivares que se desea comparar entre sí.

Por otra parte se realizaron también determinaciones de incorporación de fósforo radioactivo (d/min 100mg peso seco) en fósforo total, fosfolípidos y fosfoproteínas, con el objeto de descartar aquellos datos que presentaron valores iniciales

de incorporación de ^{32}P no coincidentes.

Capítulo 4.- **Discusión general.**

Se realizará aquí el análisis global de los resultados obtenidos, no obstante hay que señalar que ya se han esbozado conclusiones parciales en el capítulo 3 a medida que se fueron materializando las distintas experiencias.

Cuando en 3.1 se habló de la puesta a punto del sistema experimental se hizo hincapié en las dificultades que se presentaban para lograr condiciones de déficit hídrico que fueran reproducibles. Además, se trató -a diferencia de gran cantidad de experimentos en este tópico, los que están realizados con cortes de tejidos y/o fragmentos de hoja, lo cual produce migración de solutos y en consecuencia resultados espurios (Nonami and Boyer, 1987)- de trabajar con plántulas intactas, a los efectos de no introducir otro factor adicional de estrés.

El estrés hídrico moderado fue obtenido con la utilización de PEG 6000 al 20% y manitol 0,3M. En cuanto al primero, si bien se han reportado efectos tóxicos -aconsejando algunos autores (Leshem, 1966; Reid, 1978) el uso de resinas de intercambio iónico para purificar las soluciones de PEG- la información es contradictoria (Lawlor, 1970). El PEG es frecuentemente utilizado para producir déficit hídrico (Ciamporova and Luxova, 1976 ; Gergely et al., 1980; Greeway,

1970; Janes, 1974; Quarri and Jones, 1979; Steuter et al., 1981; West et al. 1980; Williams, 1969; Yaniv, 1983. Yee and Rost (1982), dicen que el PEG 6000 produce cambios en las relaciones hídricas de las plantas similares a los causados por la deshidratación del suelo al mismo potencial agua y Oertli (1985) y Hasewaga (1985) lo consideran un osmótico no penetrante. Con respecto al manitol también fue frecuentemente utilizado, (Parmar and Moore, 1968; Resnick, 1970; Thill et al., 1979). Este osmótico ha sido empleado en los primeros experimentos de esta tesis, pero luego se descartó dado que fue reportado en cereales (Cram, 1984), que atraviesa el plasmalemma y el tonoplasto. Asimismo el manitol, que se elabora en Europa a partir de maíz importado de Brasil, contendría picomoles de ABA (E. Zeiger, comunicación personal).

La síntesis de proteínas, como la síntesis de pared, es un obvio requerimiento para la elongación celular. La miríada de funciones que cumplen las proteínas como enzimas o como componentes estructurales, hace pensar que la expansión celular no podría durar mucho tiempo sin una simultánea síntesis de proteínas. Con todo, la inhibición de la síntesis proteica durante el estrés hídrico no es indiscriminada: en efecto, la síntesis de algunas proteínas es promovida mientras la de otras es inhibida durante la carencia de agua. En general las actividades enzimáticas descienden, excepto para las de aquellas enzimas involucradas en hidrólisis o catabolismo, las que a menudo se incrementan (Bradford and Hsiao, 1982). Se ha

reportado, por ejemplo, que la actividad de la superóxido dismutasa, (enzima cuyo test se realiza sobre la base del incremento de la producción del anión superóxido durante la senescencia) aumentó en plántulas de trigo frente a estrés de agua moderado (Luna et al., 1985). En cuanto a la disminución del nivel de polirribosomas debida a la deprivación hídrica, según Bewley et al. (1983) no podría ser utilizada como un indicador de tolerancia al estrés, ya que se observó una respuesta distinta en diferentes porciones del mesocótile de plántulas de maíz. En nuestro caso se ha observado (Tabla Nº2) una disminución en el contenido proteico, el cual se tornó más evidente en el tratamiento con PEG. No obstante, las plántulas tratadas con soluciones osmóticas crecieron, aunque con una velocidad menor que las controles. Estas evidencias no permitieron establecer una relación entre la caída del contenido proteico y la disminución de la tasa de crecimiento en estas condiciones experimentales.

Tanto la división como la elongación celular resultan reducidas por el déficit hídrico, aunque existe incertidumbre acerca de la relativa sensibilidad de ambos procesos (Kramer, 1983). En efecto, algunos autores como Kirkham et al. (1972) dicen que en cotiledones de una crucífera la división celular fue inhibida a mayor turgor que el alargamiento celular, mientras que Mc Cree and Davies (1974) hallaron que la mitosis y la elongación de las células contribuían por igual al crecimiento de las hojas de sorgo cuando eran estresadas con distinta

intensidad. Hsiao (1973) concluye que la división celular es inhibida menos que la elongación. En el caso del presente estudio, durante el lapso que duró el experimento (36 horas) se detectó una prevalencia de la elongación sobre la división de las células del vástago. Cuando se observaron y midieron las células epidérmicas de los coleoptiles se determinó que la elongación de estos últimos era aproximadamente proporcional a la elongación sufrida por las células. Mientras tanto, en las plantas sometidas a estrés hídrico la elongación de los vástagos fue menor (fig. 2), y asimismo lo fue en proporción el alargamiento de las células. Hay que hacer notar también que en la epidermis de estas plántulas no se observaron estomas diferenciados, lo cual indicaría que el estrés hídrico -en estas condiciones experimentales- podría afectar la diferenciación estomática. A este respecto se sabe que en algunas especies la carencia de agua reduce el área foliar, aumenta el espesor de las hojas, incrementa el espesor de la cutícula y la cantidad de ceras de la superficie foliar (Kramer, 1983), como así también la producción de tricomas (Ehleringer, 1980).

Cuando se determinó el contenido total de fósforo con respecto al peso seco se verificó una caída tanto en plántulas controles como en las tratadas con los estresantes (Tabla Nº5). No obstante, la determinación del contenido total de biomoléculas en general sólo produce información estática. Para tener una idea aproximada del balance entre la síntesis y degradación que redunda en los valores totales determinados,

se recomienda marcar las moléculas en estudio y determinar luego la relación entre moléculas marcadas y moléculas totales. Esto se asocia entonces a recambio, y se habla de radioactividad específica si es que la marca empleada es radioactiva. Cuando se estudió el recambio del fósforo total con semillas que fueron imbibidas con ^{32}P, se observó (Tabla Nº7) una marcada afectación en las radioactividades específicas de las plántulas sometidas a déficit hídrico. Los resultados obtenidos en estos dos experimentos precedentes indujeron a plantear la necesidad de estudiar las distintas fracciones fosforiladas y determinar asimismo sus radioactividades específicas. De las fracciones fosforiladas analizadas resaltaron la fracción fosfolipídica y la de fosfoproteínas, dado que evidenciaron incrementos marcados en sus radioactividades específicas y éstas resultaban alteradas en las plántulas deprivadas de agua.

El recambio de la porción polar de fosfolípidos totales se incrementó en el cultivar Balcarceño-INTA de *T. durum* durante el crecimiento. Es interesante considerar que ello implicaría la existencia de fosfolipasas C activas, cuya actividad se modificaría con el estrés hídrico suave. También es importante destacar que la presencia de estas enzimas en vegetales y su funcionalidad han cobrado especial trascendencia en fechas muy recientes, dado que se ha sugerido que podrían estar reguladas hormonalmente o por una proteína quinasa y tendrían relación con el metabolismo del calcio (Trewavas, 1986).

Los resultados expuestos en la presente tesis justificaron la realización de estudios más profundos, que nuestro grupo de trabajo está llevando adelante sobre la composición y recambio de fosfolípidos individuales con relación al estrés hídrico.

En cuanto al recambio de fósforo de fosfoproteínas en *T. durum* cv. Balcarceño-INTA, se ha visto que el mismo se incrementó con la elongación, siendo afectado por el estrés osmótico suave. Esta tendencia es también evidente en el cultivar Klein Chamaco de *T. aestivum* , que posee una tolerancia manifiesta al estrés hídrico (Sueldo y Barassi, sin publicar) con respecto a otros cultivares de *T. aestivum,* a nivel de plántulas. El cv. Buck Pucará de *T. aestivum* es, en cambio, susceptible al estrés osmótico suave y su recambio de fosfoproteínas disminuyó en los controles, no así en las plántulas deprivadas de agua. La posibilidad de que el recambio de fosfoproteínas se halle relacionado a mecanismos de tolerancia al estrés hídrico merece, en vista de los resultados expuestos, ser estudiada con mayor detenimiento y profundidad.

Con respecto a hormonas vegetales, se admite que hay una estrecha relación entre el déficit hídrico y la concentración y transporte de esos reguladores de crecimiento. Pero la única manera de saber si existen cambios en los niveles endógenos de los reguladores del crecimiento con relación al estrés hídrico en nuestro sistema experimental, sería midiéndolos en esas condiciones. No obstante que la naturaleza de estas investigaciones iría más allá de los objetivos de la presente

tesis, se indagó sobre el posible efecto del agregado de una hormona antagónica al ABA sobre la velocidad de crecimiento de plántulas sometidas a estrés hídrico suave. Si esto tuviera un efecto evidente, justificaría estudiar en particular qué correlación existiría entre el agregado de hormonas y el recambio total de fósforo y de fosfolípidos y fosfoproteínas, moléculas que acusaron cambios evidentes con el estrés moderado de agua en nuestro sistema. Los experimentos efectuados en este sentido no mostraron efectos significativos del AIA en revertir la velocidad de crecimiento disminuída por el estrés en los dos cultivares de *T. aestivum* estudiados. En el cv. Balcarceño-INTA de *T. durum* sometido a estrés osmótico suave se apreció (Tabla Nº22) un efecto parcial sobre el peso fresco, pero ni la altura ni el peso seco acusaron cambios significativos.

Capítulo 5.-**Bibliografía**

AKALEHIYWOT, T. and BEWLEY, J.D., 1977, *J. Agricol. Sci.* **89**, 503-6.

BARASSI, C.A., CRUPKIN, M., SUELDO, R.J. and INVERNATI, A., 1980, *J. Exp. Bot.* **31**, 1565-72.

_____, 1982, Ibid. **33**, 1058-67.

BARLOW, E.W.R., MUNNS, R., STEELE SCOTT, W. and REISNER, A.H., 1977, Ibid. **28**, 909-16.

BEWLEY, J.D., LARSEN , K.M. and PAPP, J., 1983, Ibid. **34** :1126-33.

BRADFORD, K.J. and HSIAO, T.C., 1982, *Physiological Responses to Moderate Water Stress.* En : *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 12 B. Springer Verlag, Berlin. Cap. 9. pp.263-68.

BIELESKI, R.L., 1973, *A. Rev. Plant Physiol.* **24**, 225-52.

BOYER, J.S., 1973, *Phytopathology* **63**, 466-72.

_____ and Mc PHERSON, H.G., 1975, *Adv. Agron.* **27**, 1-22.

BRAY, G.A., 1960, *Analyt. Biochem.* **1**, 279-85.

BRIGGS, E.D., 1973, *Biosynthesis and its control in plants.* Academic Press, London, 217-77.

CIAMPOROVA, M. and LUXOVA, M., 1976, *Biol. Plant*, **18**, 173-8.

CRAM, W.J. *Physiol. Plant*, **61**, 396-404. 1984.

CHEN, P.S., TORIBARA, T.I. and WARNER, H. 1965, *Analyt. Biochem.*, **28**, 1756-8.

DHINSA, R.S. and BEWLEY, J.D., 1976, *J. Exp. Bot.*, **27**, 513-23.

EHLERINGER, J., 1980, *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, Turner and Kramer Eds., Wiley, New York.

FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H., 1957, *J. Biol. Chem.***226**,497-509.

GARCHA, J.S., BHATTI, K., SHARMA, B.N. and BHATIA, I.S., 1972, *Indian J. Agric. Sci.***48**,810-13.

GERGELY, I., KORCAK, R.F. and FAUST, M., 1980, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **105**, 858-61.

GREENWAY, H. and LEAHY, M., 1970, *Plant. Phisiol.*, **46**, 259-62.

HALL, J.L., BRUMMELL, D.A. and GILLESPIE, J., 1985, *New Phytol.* **100**, 341-345.

HALL, J.R. and HODGES, T.K., 1966, *Plant Physiol., Lancaster* **41**, 1459-64.

HASEWAGA, P.M., BRESSAN, R.A., HANDA, S. and HANDA, A., 1984, *Hort Sci.*, **19**, 371-77.

HSIAO, T.C., 1970, *PlantPhysiol* **46**, 281-85.

_____, 1973, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 519-70.

JANES, B.E., 1974, *Plant. Physiol.*, **54**, 226-40.

KAUFMANN, M.R. and ECKARD, A.N., 1971, Ibid., **47**, 453-56.

KIRKHAM, M.B. , GARDNER, W. and GERLOF, G.C., 1972, Ibid., **49**, 961-62.

KRAMER, P.J., 1983, *Water Relations of Plants*. Academic Press, Orlando, Florida.

LAWLOR, D.W., 1970, *New Phytol.*, **69**, 501-13.

LESHEM, B., 1966, *Plant and Soil*, **24**, 322-24.

LUNA, M., BADIANI, M., FELICI, M., ARTEMI, F. and GIOVANOZZI, 1985, *Environ. Exp. Bot.*, **25**, 153-56.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951, *J.Biol.Chem.* **193**, 265-75.

MARDH, S., 1975, *Anal. Biochem.* **63**, 1-4.

MARKWELL, M.A.K., HAAS, S.M., BIEBER, L.L. and TOLBERT, N.E., 1978, Ibid. **87**, 206-10.

Mc CREE, K.J. and DAVIS, S.D., 1974, *Crop Sci.*, **14**, 751-755.

MICHEL, B.E. and KAUFMANN, M.R., 1973, *Plant Physiol.* **51**, 914-16.

MILTHORPE, F.L., 1950, *Ann. Bot.* **14**, 79-89.

MONNEVEUX, O. and NEMMAR, M., 1986, *Agronomie* **6**, 583-90.

NOGGLE,G.R. and FRITZ, G.J., 1976, *Plant Growth Substances*. En : *Introductory plant physiology*,pp.457-501.

NONAMI, H. and BOYER, J., 1987, *Plant Physiol.*, **83**, 596-601.

OERTLI,J.J., 1985, *J. Plant Physiol.*, **121**, 295-300.

ORDIN,L.,1960, Ibid.**35**,443-49.

PARMAR, M.T. and MOORE, R.P., 1968, *Agron. J.*, **60**, 192-95.

QUARRI, S.A. and JONES, H.G. 1979, *Ann. Bot.*, **44**, 323-32.

Reglas Internacionales para el ensayo de Semillas. Proceedings of the International Testing Association. 1983.

REID, C.P., 1978, *Plant Physiol.*, **61**, 708-09.

RESNIK, M.E., 1970, *Ann. Bot.*, **24**, 497-504.

RHODES, P.R. and MATSUDA, K., 1976, *Plant Physiol.* **58**, 631-35.

RICHARDS, G.M., 1974, *Analyt. Biochem.* **57**, 369-76.

SAKURAI, N., AKIYAMA, M. and KURAISHI, S., 1985, *Plant Cell Physiol.***26**, 15-24.

SCHMIDT, G. and THANNHAUSER, S.J., 1945, *J. Biol. Chem.* **161**, 83-9.

STEUTER, A.A., MOZAFAR, A. and GOODIN, J.R., 1981, *Plant Physiol.*, **676**, 64-67.

THILL, D.C., SCHIRMAN R.D. and APPLEBY, A.P., 1979, *Agron. J.* ,**71**, 105-08.

VAADIA, Y., RANEY, F.C. and HAGAN, R.M., 1961, *A. Rev. Plant Physiol.***12**,265-92.

VOLKIN, E. and COHN, W.E., 1954. En: *Methods of biochemical analysis*. Ed. D. Glick. Interscience Publishers Inc., New York,pp.290-96.

WEST, D.W., MERRIGAN, J.F., TAYLOR, J.A. and COLLINS, G.M., 1980, *Plant and Soil*, **56**, 99-111.

WILLIAMS, J. and SHAYKEWICH, C.F., 1969, *Can. J. Soil Sci.*, **49**, 397-401.

YANIV, Z. and WERKER, E., 1983, *J. Exp. Bot.*, **34**, 1577-84.

YEE,V.F. and ROST, T.L., 1982, *Cytologia*, **47**, 615-24.