

METABOLISMO DE AIA-¹⁴C POR SECCIONES DE PLÁNTULAS DE ALTRAMUZ: INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES

J. Sánchez Bravo*, A. Montalbán*, M. Acosta* y F. Sabater*

Recibido: septiembre 1984

ABSTRACT

Metabolism of IAA-¹⁴C by sections of Lupine seedlings: Influence of some factors

The auxinic metabolism in etiolated hypocotyls of Lupine is studied by incubation of sections in solutions of IAA-¹⁴C. The products are sequentially extracted with 95% ethanol, water and 1M NaOH. The radioactivity in each fraction depends on different factors such as: time of incubation, hormone concentration, order of use of the solvents, permanence of auxin in the tissue and localization of the section in the hypocotyls. This suggests that conjugation or degradation of auxin can be affected and so the suspected equilibrium between the different forms of auxins is altered.

RESUMEN

Se estudia el metabolismo del ácido indolil-3-acético, mediante incubación de secciones de hipocotilos etiolados de altramuz en disolución de AIA-¹⁴C. Los metabolitos formados se extraen secuencialmente con etanol, agua y NaOH, comprobándose que la radiactividad extraída en cada caso varía en función de diversos factores: tiempo de incubación, concentración de hormona, orden de utilización de los disolventes, permanencia de la hormona en el tejido y localización de las secciones en el hipocotilo. Se sugiere que dichos factores afectan a procesos metabólicos como conjugación o degradación, y por tanto alteran el equilibrio que puede existir entre las diversas formas auxínicas.

INTRODUCCIÓN

La hormona vegetal ácido indolil-3-acético (AIA) se puede encontrar en la planta en forma libre (auxina libre) o ligada a diferentes moléculas orgánicas (aminoácidos, azúcares, proteínas, etc.). Además, el AIA puede ser enzimáticamente oxidado originando varios productos de descarboxilación sin actividad biológica aparente (SABATER, *et al.*, 1976). El significado fisiológico de este complejo metabolismo auxínico, no ha sido definitivamente establecido, aunque por lo general se acepta que las auxinas ligadas serían formas de almacenamiento, mientras que la oxidación constituiría una vía de desintoxicación del exceso de hormona (UEDA & BANDURSKI, 1974; SABATER *et al.*, 1982).

La investigación del metabolismo del AIA se

ha basado en gran medida en experimentos *in situ* o *in vitro* en los que secciones de órganos o extractos vegetales, respectivamente, son tratados con disoluciones de la hormona, que puede estar marcada radiactivamente con ¹⁴C o ³H. Los resultados muestran la gran diversidad de metabolitos formados, y la influencia de numerosos factores en el metabolismo. Así, se ha comprobado la variación con la especie, estado de desarrollo, tipo de tejido y edad. Igualmente se ha estudiado el efecto de inhibidores metabólicos, herbicidas y otras sustancias de crecimiento sobre diversos aspectos del metabolismo auxínico (PILET & GASPARD, 1968; SEMBDER *et al.*, 1980).

Pese a los numerosos trabajos publicados, aún se desconoce el mecanismo de los diversos procesos implicados y su interconexión. A este respecto, BENTLEY (1961) sugirió la existencia de

* Departamento Interfacultativo de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Matemáticas. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

un equilibrio entre las distintas formas de auxina, idea que recientemente ha vuelto a ser formulada por COHEN & BANDURSKI (1982) bajo el concepto de homeostasis de la hormona.

En este trabajo se estudia el efecto producido por diversos factores sobre el metabolismo de AIA-¹⁴C₂ en secciones de hipocotilos etiolados de altramuz, siguiendo el método propuesto por DAVIES (1976). Con ello se pretende poner de manifiesto la existencia de interconversiones entre las distintas formas de auxina a fin de verificar la hipótesis propuesta por COHEN & BANDURSKI (1982).

MATERIAL Y MÉTODOS

Semillas de altramuz (*Lupinus albus* L.) se hacen germinar sobre vermiculita, en cámara de cultivo a 24 ± 1° C y oscuridad. Una vez desarrollado el hipocotilo se cortan secciones de 0,5 cm de longitud y se determina su peso fresco.

La incubación de secciones en AIA-¹⁴C₂ y la extracción de radiactividad absorbida, se lleva a cabo por el método descrito por DAVIES (1976) con algunas modificaciones.

INCUBACIÓN DE LAS SECCIONES EN AIA-¹⁴C₂

El medio de incubación contiene AIA-¹⁴C₂, sacarosa 30 mM y tampón fosfato M/60 ajustado a pH=4,6. El volumen del medio de incubación se establece en 1,25 ml por pareja de secciones. La incubación se prolonga durante 24 h (salvo cuando se estudia la cinética de absorción) a 24°C y oscuridad. El AIA-¹⁴C₂ utilizado procede de una disolución acetona-benceno de 56 mCi/mmol suministrada por Amersham-Searle. Una alícuota de dicha disolución se lleva a sequedad redisolviéndose en hidróxido sódico de concentración adecuada para neutralizar el ácido indolacético. La disolución acuosa así obtenida se utiliza como disolución de partida para preparar los medios de incubación. La pureza radioquímica de dicha disolución se comprueba cromatográficamente.

EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS

La extracción de la radiactividad presente en las secciones incubadas se realiza secuencialmente mediante etanol 95%, agua, NaOH 1M y ocasionalmente PCS (*Phase Combining System*, solubilizante de tejidos de Amersham-Searle con líquido de centelleo incorporado). El número de extracciones con cada disolvente y el orden de los mismos se indica en cada caso. Para los ensayos de cinética de absorción se realizan primero dos extracciones sucesivas con etanol, seguidas de una con agua, una con NaOH y se finaliza disolviendo el material vegetal en PCS. Cada extracción con los diferentes disolventes se prolonga durante 24 h a 24 ± 1° C y oscuridad, utilizando por cada pareja de secciones los siguientes volúmenes de disolvente: 2 ml de etanol 95%, 1,4 ml de agua y 0,5 ml de NaOH 1M.

La solubilización con PCS (2 ml) se realiza a 55° C durante 3-4 días.

Antes de iniciar el proceso de extracción, las secciones se lavan durante 15 s con agua destilada para eliminar la radiactividad superficial. Inmediatamente después, una pareja de secciones se introduce en un vial de centelleo de 25 ml que contiene el primer disolvente. Transcurridas 24 h, las secciones se trasvasan a un segundo vial que contiene el mismo o diferente disolvente, según los casos. Para las extracciones con NaOH se utilizan tubos de ensayo tapados. Durante la extracción se agitan ocasionalmente los viales o tubos. Las extracciones se hacen siempre por duplicado.

DETERMINACIÓN DE LA RADIATIVIDAD DE LOS EXTRACTOS

La radiactividad de cada extracto se determina por centelleo líquido utilizando una mezcla que contiene 4 g de PPO, 0,2 g de POPOP, 333 ml de tritón X-100 y 667 ml de tolueno.

Antes de añadir el líquido de centelleo, los extractos etanólicos se concentran directamente en el vial, a presión reducida, hasta un volumen aproximado de 0,5 ml para eliminar así la extinción producida por el alcohol. A los viales con agua se adiciona directamente el líquido de centelleo. A los tubos que contienen los extractos de NaOH se adiciona 1 ml de agua destilada para evitar la precipitación, vertiéndose a continuación en viales para proceder a su medida. Los viales de PCS se miden directamente.

Se ha comprobado que siguiendo el procedimiento descrito la medida de radiactividad no es afectada por la presencia de ninguno de los disolventes empleados.

La radiactividad se mide en un contador de centelleo (Nuclear Chicago, Isocap/300), equipado con cadena portaviales y cámara refrigerada, cuya eficacia es del 80-90%.

Los resultados se expresan como valor medio de los duplicados para una pareja de secciones, bien en valores absolutos (datos directos corregidos por fondo, cpm), valores corregidos por peso (valores absolutos divididos por el peso fresco medio en gramos, cpm/g) o valores relativos al total extraído (porcentaje extraído en cada disolvente sobre el total extraído por toda la secuencia de disolventes, %).

RESULTADOS

CINÉTICA DE ABSORCIÓN

La influencia del tiempo de incubación de las secciones en la disolución de hormona se investiga aplicando directamente el método de extracción de Davies a secciones tratadas durante periodos variables de 2 a 48 h.

Para bajas concentraciones de AIA-¹⁴C₂ (6 × 10⁻⁸ M), se aprecia un aumento casi lineal de la radiactividad absorbida durante las primeras 24 h de incubación, mientras que el segundo día de incubación produce un efecto poco apreciable (fig. 1). Las diferencias entre la radiactividad to-

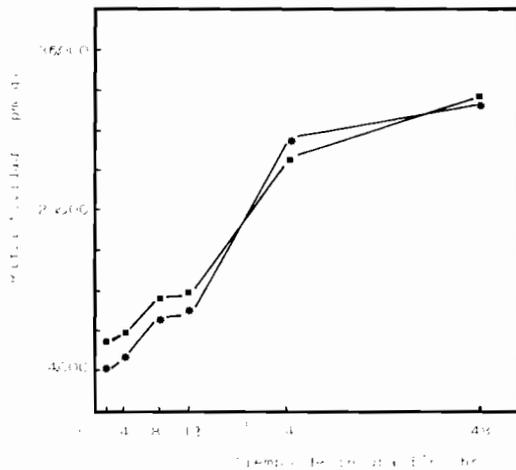


FIGURA 1. Variación de la radiactividad absorbida por las secciones con el tiempo de incubación. La radiactividad absorbida se calcula bien por diferencia entre la radiactividad inicial y final en el medio de incubación (Ro - Rt, cuadrado negro), bien sumando la radiactividad extraída en cada fracción del método de DAVIES (1976; asterisco). La incubación se lleva a cabo con AIA- $^{14}\text{C}_2$ $6 \cdot 10^{-8}\text{M}$, a 24°C y oscuridad.

Uptake of radioactivity by the sections at different incubation time. The total uptake is calculated either subtracting the initial and final radioactivity in the incubation media (Ro-Rt, black square), or adding the extracted radioactivity in each fraction with the method of DAVIES (1976; asterisk). Incubation in $6 \times 10^{-8}\text{M}$ AIA- $^{14}\text{C}_2$ at 24°C and darkness.

tal extraída de las secciones y la radiactividad perdida por los medios de incubación son prácticamente despreciables. La figura 2 muestra que la radiactividad extraíble con etanol 95% y agua varía de forma análoga con el tiempo de incubación, mientras que los agentes más energéticos (PCS y NaOH 1M) aún extraen una cantidad considerable de radiactividad de secciones incubadas durante dos días en relación con las incubadas un día.

La duración del período de incubación influye de forma diferente sobre el porcentaje de radiactividad extraída en cada fracción (fig. 3). La fracción etanólica y la de NaOH 1M experimentan poca variación, oscilando entre el 82,6 y el 85% la primera y entre el 3,3 y el 5,1% la segunda. La acuosa desciende durante las 12 primeras horas de incubación (del 9,3 al 6,4%), estabilizándose a partir de ese momento. Por el contrario, la de PCS aumenta durante este período inicial del 2,9 al 6,9%.

Para concentraciones superiores de auxina ($6 \times 10^{-7}\text{M}$), la radiactividad extraída aumenta entre 3 y 10 veces según el tiempo de incubación, en relación con el ensayo anterior (fig. 4: compá-

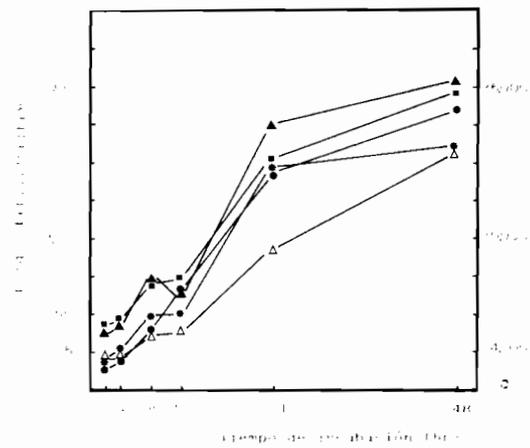


FIGURA 2. Radiactividad extraída con los diferentes disolventes al variar el tiempo de incubación. Etanol 95% (asterisco) y total perdida por el medio (Ro-Rt, cuadrado negro) en la escala derecha. Agua (triángulo negro), NaOH 1M (triángulo blanco) y PCS (círculo negro), en la escala izquierda. Datos de incubación como en fig. 1.

Radiactivity extracted by the different solvents at variable incubation time. 95% ethanol (asterisk) and radioactivity lost from the media (Ro-Rt; black square), on the right scale. Water (black triangle), 1M NaOH (open triangle) and PCS (black circle), on the left scale. Data of incubation as in Fig. 1.

rese con fig. 2), apreciándose un comportamiento algo diferente entre las secciones, en función de su localización en el hipocotilo. En este caso, de las secciones incubadas 48 h se extrae poca radiactividad debido probablemente a que parte de la inicialmente absorbida difunde al medio de incubación una vez metabolizada (DAVIES, 1972).

Después de estos ensayos, se constata que incubando en AIA- $^{14}\text{C}_2$ $6 \times 10^{-7}\text{M}$ durante 24 h, los valores de radiactividad de las diferentes fracciones son suficientemente altos como para permitir en todos los casos una medida fiable y reproducible. Por esta razón, se decidió adoptar estas condiciones de incubación para sucesivos ensayos.

EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS FORMADOS

El objetivo de este estudio es determinar la influencia de algunas de las condiciones de extracción en el contenido radiactivo de las diferentes fracciones, a fin de obtener información acerca de la selectividad y especificidad de los distintos extractantes, así como tratar de conseguir los rendimientos de extracción óptimos.

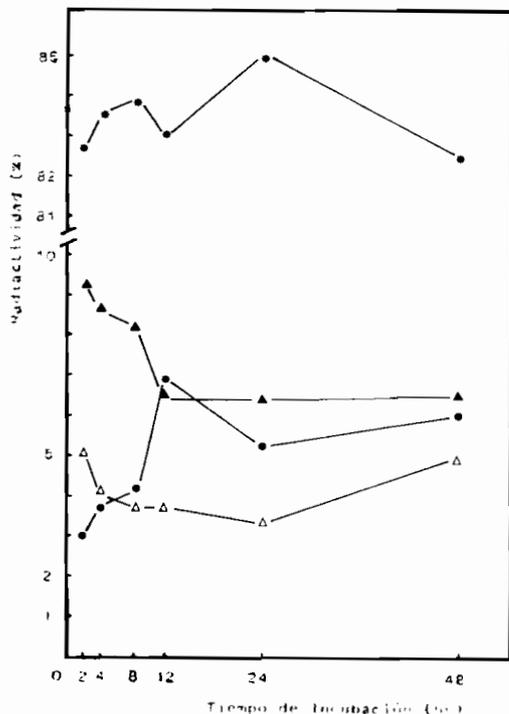


FIGURA 3. Porcentaje de radiactividad extraída con cada disolvente, respecto del total obtenido por la suma de todos, a distintos tiempos de incubación. Etanol 95% (asterisco), agua (triángulo negro), NaOH 1M (triángulo blanco) y PCS (círculo negro). Datos de incubación como en fig. 1.

Percentage of extracted radioactivity with each solvent at different incubation time. 95% ethanol (asterisk), water (black triangle), 1M NaOH (open triangle) and PCS (black circle). Data of incubation as in Fig. 1.

El estudio se lleva a cabo variando el orden de extracción y número de extracciones, manteniendo en todos los casos las mismas condiciones de extracción (oscuridad, 24°C, 6×10^{-7} M en AIA- $^{14}\text{C}_2$), los mismos extractantes (etanol 95%, H_2O y NaOH 1M) y material vegetal de la misma edad y localización en el hipocotilo.

Siguiendo el orden de extracción propuesto por DAVIES (1976), se comprueba un solapamiento de las fracciones etanólicas y acuosa (tabla I) ya que la radiactividad extraída durante la segunda y tercera extracciones con etanol puede obtenerse en su totalidad con dos extracciones acuosas. La fracción de NaOH se mantiene constante en todos los casos. La tercera extracción con etanol es prácticamente despreciable.

Si el proceso se inicia con agua, la repetición múltiple de la extracción acuosa no consigue

extraer la radiactividad correspondiente a la primera extracción etanólica del ensayo anterior (tabla II), lo que implica la existencia de metabolitos solubles en etanol pero insolubles en agua. Al comparar el porcentaje de radiactividad total extraída con cada extractante en las diferentes series (fig. 5), se puede apreciar la complementariedad de las extracciones con agua y etanol: al aumentar el número de extracciones acuosas disminuye el porcentaje de radiactividad extraído en etanol, y viceversa. Por su parte, la fracción de NaOH es ligeramente superior en las series con mayor número de extracciones acuosas.

La extracción con NaOH es la más inespecífica ya que en sucesivas extracciones puede obtenerse casi la totalidad de la radiactividad extraíble (tabla III). Los menores valores de radiactividad total extraída en relación con los ensayos anteriores, hace sospechar alguna pérdida por inmovilización.

El especial comportamiento del agua como primer agente de extracción (tabla II) sugiere alguna transformación de la radiactividad incorpo-

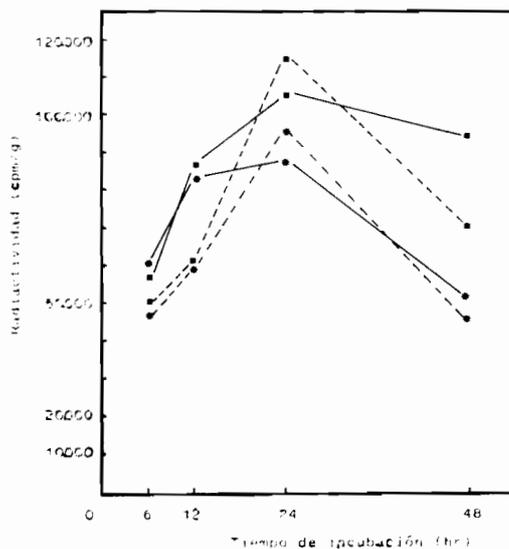


FIGURA 4. Variación con el tiempo de incubación de la radiactividad extraída con etanol 95% (asterisco) y pérdida por el medio de incubación (Ro-Rt, cuadrado negro). Las líneas discontinuas corresponden a secciones de la zona de maduración, y las continuas a secciones de la zona de crecimiento. La incubación se realiza en AIA- $^{14}\text{C}_2$ $6 \cdot 10^{-7}$ M a 24°C y oscuridad.

Variation of the 95% ethanol extracted radioactivity (asterisk) and of the radioactivity lost from the incubation media (Ro-Rt; black square), with the incubation time. The dotted lines correspond to sections of maturity zone, and the continuous lines to sections of growth zone. Incubation in 6×10^{-7} M IAA- $^{14}\text{C}_2$ at 24°C and darkness.

TABLA I. Rendimiento de la extracción con etanol 95%. Serie A: Tres extracciones sucesivas con etanol seguidas de una con agua y una con NaOH 1M. Serie B: Dos extracciones sucesivas con etanol seguidas de dos con agua y una con NaOH 1M. Serie C: Una extracción con etanol seguida de dos con agua y una con NaOH 1M. En la parte superior de cada casilla se indican los valores absolutos corregidos por peso fresco (cpm/g) y en la parte inferior el porcentaje relativo al total extraído. Incubación en $6 \times 10^{-7} M$ $^{14}C_2$ durante 24 h a 24°C y oscuridad.

Yield of the extraction with 95% ethanol. Series A: Three consecutive extractions with ethanol followed by two with water and one with 1M NaOH. Series B: Two consecutive extractions with ethanol followed by two with water and one with 1M NaOH. Series C: One extraction with ethanol followed by two with water and one with 1M NaOH. The radioactivity per fresh weight (cpm/g) is indicated in the upper side and the relative values (%) in the under side of each panel. Incubation in $6 \times 10^{-7} M$ $^{14}C_2$ during 24 h at 24°C and darkness.

Serie	1. ^a Etanol	2. ^a Etanol	3. ^a Etanol	1. ^a H ₂ O	2. ^a H ₂ O	NaOH	Total	Total Etanol
A	167.112 88,1	10.537 5,5	1.412 0,7	3.450 1,8		7.133 3,7	189.624 100	179.061 94,3
B	167.412 88	10.462 5,5		3.891 2	1.233 0,6	7.083 3,7	190.081 100	177.874 93,5
C	163.341 88			14.039 7,5	1.876 1	6.347 3,4	185.603 100	163.341 88

TABLA II. Rendimiento de la extracción con agua. El número de extracciones sucesivas varía desde 7 (serie A) hasta 1 (serie F). En las series A y B, se hace una sola extracción con etanol; en las restantes se hacen dos extracciones sucesivas. Todas las series finalizan con una extracción con NaOH 1M. Expresión de los resultados y condiciones de incubación como en la tabla I.

Yield of the extraction with water. The number of consecutive extractions varies from 7 (Series A) to 1 (Series F). In the series A and B only one extraction with ethanol is made; in the remainder series two consecutive extractions with ethanol are made. All series finish with a 1M NaOH extraction. The values are presented as in table I. Data of incubation as in table I.

Serie	1. ^a H ₂ O	2. ^a H ₂ O	3. ^a H ₂ O	4. ^a H ₂ O	5. ^a H ₂ O	6. ^a H ₂ O	7. ^a H ₂ O	1. ^a Etanol	2. ^a Etanol	NaOH	Total	Total H ₂ O
A	20.524 18	10.708 9,3	20.800 18,2	13.600 11,9	4.928 4,3	9.600 8,4	6.500 5,7	22.768 20		4.864 4,2	114.292 100	86.660 75,8
B	24.491 19,6	13.846 11,1	19.508 15,6	27.645 22,1	9.058 7,2	2.166 1,7		22.908 18,3		5.054 4	124.676 100	96.714 77,3
C	19.688 16,5	14.674 12,3	30.763 25,8	16.506 13,8				30.750 25,8	3.381 2,8	3.341 2,8	119.103 100	81.631 68,4
D	19.405 13,8	11.475 8,1	17.100 12,2					83.345 58,6	7.865 5,6	2.205 1,6	140.465 100	48.050 34,1
E	18.371 17,3	12.460 11,7						66.076 62,3	5.625 5,3	3.468 3,2	106.000 100	30.831 29
F	21.105 26							53.118 65,3	4.589 5,6	2.484 3	81.296 100	21.105 26

rada a las secciones durante la propia extracción, ya que a diferencia de los otros dos extractantes las extracciones sucesivas no son decrecientes sino que oscilan, como indica la figura 6.

Un fenómeno semejante se observa cuando se

prolonga la permanencia de la radiactividad absorbida por las secciones, antes de proceder a su extracción. La experiencia se realiza situando las secciones previamente incubadas durante 24 h en una cámara húmeda, durante tiempos variables,

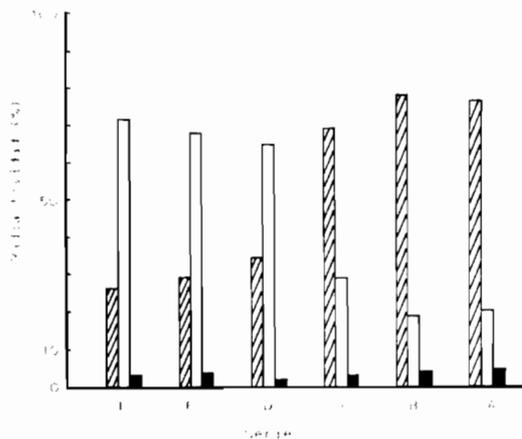


FIGURA 5. Porcentaje de radiactividad extraída con agua (rayado), etanol 95% (blanco) y NaOH 1M (negro) en cada una de las series de la tabla II.

Percentage of extracted radiactivity with water (dashed bar), 95% ethanol (open bar) and 1M NaOH (black bar) in each series of table II.

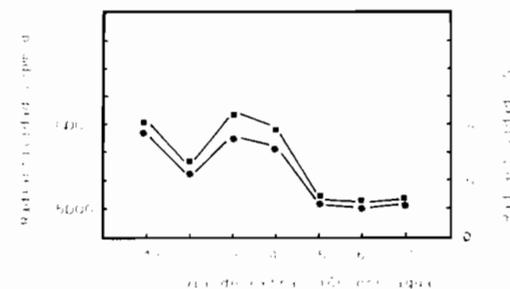


FIGURA 6. Radiactividad extraída con agua en extracciones sucesivas. Los valores corresponden a la media aritmética de los resultados obtenidos en cada una de las series de la tabla II. Valores absolutos corregidos por peso fresco (cpm/g, cuadrado negro) y relativos (%; asterisco).

Radiactivity extracted with water in consecutive extractions. The data correspond to the mean of each series in table II. Radiactivity per fresh weight (cpm/g, black square) and relative values (%; asterisk) are presented.

TABLA III. Rendimiento de la extracción con NaOH 1M. Se realizan cinco extracciones sucesivas con NaOH 1M, seguidas de una extracción con etanol 95% y una con agua. Expresión de los resultados y condiciones de incubación como en la tabla I.

Yield of the extraction with 1M NaOH. Five consecutive extractions with 1M NaOH followed by one with 95% ethanol and one with water, are made. The values are presented as in table I. Data of incubation as in table I.

1. ^a NaOH	2. ^a NaOH	3. ^a NaOH	4. ^a NaOH	5. ^a NaOH	Etanol	H ₂ O	Total	Total NaOH
43.479	14.258	5.011	2.593	2.074	2.262	1.008	70.685	67.415
61,5	20,1	7,1	3,6	3	3,2	1,4	100	95,3

antes de proceder a la extracción de la radiactividad. La tabla IV muestra que después de 2 días de permanencia en la cámara húmeda, el porcentaje de radiactividad extraído con los agentes más energéticos (NaOH y PCS) aumenta apreciablemente a expensas de las extracciones con etanol y agua.

DISCUSIÓN

El estudio realizado pone de manifiesto algunos aspectos importantes del método utilizado por DAVIES (1976) para el estudio *in situ* del metabolismo auxínico, y que aportan nueva información para comprender mejor la naturaleza de este complejo proceso.

En relación con el rendimiento de extracción con cada agente, si se sigue el orden de actuación

utilizado por Davies (1.^o etanol, 2.^o agua, 3.^o NaOH 1M), se confirma, de acuerdo con la tabla I, el número de extracciones que dicho autor propone: dos extracciones sucesivas con etanol, seguidas de una con agua y una con NaOH 1M.

En cuanto al orden de extracción, los resultados obtenidos con agua y NaOH los descartan como primer agente de extracción, que debe ser por tanto etanol. Por la misma razón de su inespecificidad, NaOH no debe ser utilizado en segundo lugar, sino agua, quedando el tratamiento hidrolítico como última etapa del proceso. Procediendo de esta forma cabe esperar que la extracción inicial con etanol detenga el metabolismo auxínico dado el carácter tóxico del alcohol. Por otra parte, en preparaciones microscópicas, se ha observado que tras la extracción etanólica las células epidérmicas de las secciones sufren plasmólisis, lo que indudablemente favo-

TABLA IV. Recuperación parcial con PCS de la radiactividad perdida durante el tratamiento en cámara húmeda (C.H.; véase texto). Expresión de los resultados y condiciones de incubación como en la tabla I.

Partial recovery with PCS of the radiactivity lost during the humid chamber treatment (C.H.; see text). The values are presented as in table I. Data of incubation as in table I.

Días en C.H.	cpm/g perdidas	H ₂ O	Etanol	H ₂ O	NaOH	PCS	Total
0		57.764	19.856		4.378	1.423	83.421
		69,4	23,8		5,2	1,7	100
2	4.469	40.504	19.208		8.024	1.734	73.939
	6	54,8	26		10,8	2,3	100
2	5.587		50.685	5.800	6.850	6.068	75.010
	7,4		67,5	7,7	9,1	8	100

rece los procesos de difusión necesarios para la extracción.

Nuestros estudios posteriores sobre la naturaleza de los metabolitos formados (CABALLERO BLEDA, 1982) confirman este solapamiento de las fracciones extraídas, ya que las primeras extracciones etanólicas suministran AIA libre, productos de oxidación de AIA (indolaldehído, indolmetanol, oxindoles) y dos auxinas ligadas, mientras que la extracción acuosa posterior proporciona una única auxina ligada y el tratamiento final con NaOH 1M libera AIA y productos de oxidación más fuertemente ligados. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (DAVIES, 1972) y coinciden con la idea generalmente aceptada de que para el estudio del metabolismo auxínico es necesaria una extracción secuencial con diferentes agentes de extracción del material tratado, a fin de obtener las distintas formas de auxina: libre, ligada a moléculas sencillas y ligada a macromoléculas; las dos primeras solubles en diferente grado en agua y etanol, y la tercera solubilizable únicamente por un tratamiento hidrolítico como el de NaOH 1M.

A lo largo del estudio realizado se constata, por procedimientos diferentes, la posibilidad de alterar el metabolismo auxínico, en el sentido de provocar interconversiones de unas formas auxínicas en otras. Este hecho viene a confirmar la hipótesis formulada inicialmente por BENTLEY (1961), según la cual existe un equilibrio dinámico entre las distintas formas de auxina en la planta, que puede verse afectado por diversos factores. A la vista de nuestros resultados, algunos de estos factores serían: la concentración de AIA en el

medio de incubación, el tiempo de incubación, el orden de extracción, la prolongación del metabolismo en condiciones favorables después de la incubación (postincubación en cámara húmeda) y la localización en la planta de las secciones tratadas.

La influencia del tiempo de incubación se aprecia en la figura 3, ya que al prolongar el tratamiento de las secciones se produce un desplazamiento de las auxinas ligadas a moléculas sencillas solubles en agua hacia formas más fuertemente ligadas solubilizables en NaOH o PCS. Al aumentar la concentración de AIA en el medio de incubación aumenta en proporción diferente, según el tiempo de incubación, la fracción soluble en etanol (figs. 2 y 4). Cuando la extracción se inicia con agua, en las sucesivas extracciones oscila el valor de la radiactividad extraída (tabla II), lo que sugiere un desplazamiento del equilibrio hacia formas auxínicas más polares, solubles en agua después del período de incubación; este desplazamiento se produciría a expensas de algún componente de la fracción etanólica, probablemente el AIA libre, ya que esta fracción disminuye proporcionalmente al aumentar el número de extracciones acuosas. Si se prolonga la permanencia de la radiactividad absorbida por las secciones durante la incubación antes de proceder a su extracción (tabla IV), el equilibrio se desplaza hacia formas más complejas sólo extraíbles con NaOH o PCS, a expensas de las formas más sencillas solubles en etanol o agua.

Finalmente, la localización en la planta de las secciones a incubar o, lo que es lo mismo, el

grado de desarrollo de los tejidos presentes, influye en la radiactividad absorbida ya que, como indica la figura 4, las zonas con crecimiento acumulan más radiactividad soluble en etanol que las zonas sin crecimiento; este aspecto ha sido objeto de un estudio posterior más detallado.

En resumen, los resultados obtenidos muestran la idoneidad del método propuesto por DAVIES (1976) para el estudio *in situ* del metabolismo auxínico en hipocotilos de altramuza y sugieren la existencia de un equilibrio entre las diversas formas auxínicas, que puede verse influenciado por diversos factores, incluido el estado de desarrollo del material vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

- BENTLEY, J. A. 1961. The states of auxin in the plant. In: RUHLAND, W. (Ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, XIV: 609-619. Springer, Berlin.
- CABALLERO BLEDA, M. 1982. *Metabolismo de AIA-¹⁴C₁ y AIA-¹⁴C₂, aplicado a hipocotilos de altramuza (Lupinus albus)*. Naturaleza de los productos formados. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- COHEN, J. D. & BANDURSKI, R. S. 1982. Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. In: *Ann. Rev. Plant Physiology*, 33: 403-430. Annual Reviews Palo Alto.
- DAVIES, P. J. 1972. The Fate of Exogenously Applied Indoleacetic Acid in Light Grown Stems. *Physiol. Plant.*, 27: 262-270.
- DAVIES, P. J. 1976. Bound Auxin Formation in Growing Stems. *Plant Physiol.*, 57: 197-202.
- PILET, P. E. & GASPARD, T. 1968. *Le catabolisme auxinique*. Masson, Paris.
- SABATER, F., CUELLO, J., SANCHEZ, J. & ACOSTA, M. 1976. Absence of Biological Activity in Oxidation Products of IAA. *Biol. Plant.*, 18: 460-463.
- SABATER, F., ACOSTA, M. & SANCHEZ BRAVO, J. 1982. Catabolismo auxínico: papel de las peroxidasas vegetales. In: *Estudios sobre Biología*: 79-99. Editorial Universidad Complutense, Madrid.
- SEMBDER, G., GROSS, D., LIEBISCH, H. W. & SCHNEIDER, E. A. 1980. Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. In: MACMILLAN, J. (Ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, N.S., 9: 281-445. Springer, Berlin.
- UEDA, M. & BANDURSKI, R. S. 1974. Structure of indole-3-acetic acid myoinositol esters and pentamethylmyo-inositols. *Phytochemistry*, 13: 243-253.