



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
- IZTACALA -

INMUNOCITOCALIZACION DEL ACIDO ABSCISICO
EN CELULAS GUARDA DE *Vicia faba* L. BAJO
CONDICIONES DE ESTRES HIDRICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A

HUGO VIRGILIO PERALES VELA

LOS REYES IZTACALA

EDO. DE MEXICO 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LOS
LABORATORIOS DE INMUNOLOGIA, BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA CELULAR DE LA ESCUELA NACIONAL DE
ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA BAJO LA
DIRECCION DEL BIOL. GERARDO ORTIZ MONTIEL Y
EL M.C. RAFAEL JIMENEZ FLORES.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES HUGO V. PERALES SANDOVAL Y YOLANDA VELA DE PERALES POR SU EJEMPLO DE AMOR, RESPETO Y JUSTICIA. POR TODO SU APOYO INCONDICIONAL.

A MIS HERMANAS OLGA ELENA, YOLANDA SUSANA, REBECA Y NORA CECILIA PERALES VELA, POR SU AMOR, CUIDADOS Y APOYO

A MIS PADRES RAUL CARRILLO ROJAS Y ANGELICA RUBIO DE CARRILLO POR SU APOYO Y AMOR.

A MIS HERMANOS DAVID HOMERO, RAUL AARON, MINERVA HAYDE, GRACIA ESTHER (BEIS), POR SU APOYO Y AMOR.

A MI ESPOSA ANGELICA CARRILLO RUBIO, POR ESCUCHARME SIN ENTENDER LO RELACIONADO CON ESTA TESIS, POR SU GRAN AMOR POR MI, POR SUS CUIDADOS Y SIEMPRE ESTIMULO. TE AMO.

A MI HIJO DAVID ASAF QUIEN SIN ENTENDER A VENIDO A LLENAR MI VIDA Y A PERMITIRME VER LA VIDA DESDE OTRA PERSPECTIVA. TE AMO.

A MARTHA SALCEDO ALVARES, MANUEL MANDUJANO PINA, GERARDO ORTIZ MONTIEL Y ALBERTO ARRIGA FRIAS, POR GASTAR MUCHO DE SU TIEMPO ENSEÑANDOME . POR SU INCONDICIONAL AMISTAD Y POR SU CONTINUO ESTIMULO. GRACIAS.

A ROBERTO VELASCO GARCIA, JOSEFINA VASQUEZ MEDRANO, RAFAEL QUINTANAR ZUÑIGA Y SERGIO GONZALEZ MORENO, POR SU AMISTAD, APOYO, DIRECCION Y CONTINUO ESTIMULO. GRACIAS.

A EL M.C. RAFAEL JIMENEZ FLORES POR SU INCONDICIONAL ASESORIA DE ESTA TESIS, POR SU AMISTAD Y APOYO.

AL GRUPO DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA DE LA ENEP-IZTACALA POR SU APOYO Y AYUDA. EN ESPECIAL A LA BIOL. JULIA REYES REALI POR LA DIRECCION EN LAS TECNICAS INMUNOLOGICAS

A MIS COMPANEROS ROSARIO GONZALES VALLE, POR SU ESTIMULO Y APOYO, A ALFREDO MORALES LARA, GERARDO SANCHEZ ROJAS, ELIAS CADENA BASURTO Y JOSE LUIS ARMENTA RIVERA. POR SU AMISTAD. GRACIAS

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA, LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y EL AREA DE BIOLOGIA CELULAR DE LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE IZTACALA, POR LO CUAL AGRADEZCO A LOS JEFES DE LOS MISMOS POR LA AYUDA Y DIRECCION PRESTADA.

" Y A TODO LO CREADO QUE ESTA EN EL CIELO, Y SOBRE LA
TIERRA , Y DEBAJO DE LA TIERRA, Y EN EL MAR, Y A
TODAS LAS COSAS QUE EN ELLOS HAY, OI DECIR: AL QUE
ESTA SENTADO EN EL TRONO, Y AL CORDERO, SEA LA
ALABANZA, LA HONRA, LA GLORIA Y EL PODER, POR LOS
SIGLOS DE LOS SIGLOS " Apocalipsis 5:13

INDICE

	pagina
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	12
OBJETIVO	35
METODOLOGIA	36
RESULTADOS Y DISCUSION	54
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFIA	93

LISTA DE ABREVIATURAS

CO ₂	Bioxido de Carbono
CG	Célula Guarda
Ph	Potencial hidrico
atm	Atmósferas
Po	Potencial osmótico
ác.	ácido
ABA-GE	Beta-D-glucopiranosil abscísico
cél	célula
vol	volumen
ELISA	Enzyme link insuno essay
CM	Célula del mesófilo
SDS	Dodecil disulfato de sodio
PA	Acido pasético
DPA	Acido dihidroxipasético
HSA	Albumina serica de Humano
EDMC	1-etil-3-(dimetil aminopropil)carbodimida
BBS	Buffer salino de Boratos
PBS	Buffer salino de Fosfatos
IgG	Gama globulina de tipo G
FITC	Isocianato de Floresceina
PM	Peso molecular
Kd	Kilo dalton
pb	pares de bases
Rf	movilidad relativa
rpm	revoluciones por minuto
prot	proteína
c	centi
m	mili
u	micro
n	nano
p	pico
f	femto
a	atto
RNA	Acido ribonucleico
C1	Carbono 1 de la molécula de ABA
Ci	Concentración de Bioxido de Carbono interna
mol	molécula
RUBisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxygenasa
CACGTG	citocina-adenina-citocina-guanina-timina-guanina.

RESUMEN

Se investigó la distribución celular y los sitios blanco del ácido abscísico, (ABA) en las células guarda de Vicia faba bajo condiciones de turgencia y estrés hídrico, mediante la técnica de inmunofluorescencia; Para lo cual se desarrolló un anticuerpo policlonal contra la mezcla racémica de ABA, utilizando como inmunogénico un conjugado entre ABA y albúmina sérica de Humano (HSA) vía el carbono 1 de la hormona. El anticuerpo se semipurificó por precipitación con sulfato de amonio. Encontrándose, por pruebas de inhibición por hapteno, que 100µl del anticuerpo aislado, unen 20 ng de ABA libre. Se utilizó la epidermis abaxial de la cuarta hoja bifoliada de plantas de 4 a 5 semanas. No se localizó hormona libre en células turgentes, posiblemente debido a que la cantidad en estas es muy baja, además de que existe la posibilidad de que la hormona se libere al medio de ensayo. En células estresadas, la hormona se localizó unida a la membrana plasmática, la envoltura del cloroplasto y la envoltura nuclear. Los datos indican que ABA no solo interacciona con la membrana plasmática para modificar su permeabilidad, como se había reportado, sino que también interacciona con la envoltura del cloroplasto y del núcleo, posiblemente regulando el proceso fotosintético y la expresión genética en condiciones de estrés hídrico.

INTRODUCCION :

Cuando las plantas invadieron la placa continental se enfrentaron a un ambiente desecante, por lo cual se desarrollaron estructuras y se constituyeron mecanismos para regular la pérdida de agua (Andrade, 1981). A diferencia de las plantas acuáticas, las cuales toman sus nutrientes directamente del medio acuoso, las plantas terrestres deben obtener sus nutrientes del suelo y el CO₂ de la atmósfera. Este problema ha tenido durante la historia diferentes y variadas respuestas adaptativas según el medio donde se desarrollaron las plantas. En general las plantas desarrollaron un sistema radicular y vascular para la absorción de agua y nutrientes. Se formó también, sobre toda la planta, una capa externa llamada epidermis, la cual fue recubierta con otra compuesta de materiales hidrófobos (cutina y ceras) llamada cutícula, la que impidió que la planta se desecara por contacto directo con el medio ambiente, sin embargo, esta capa además de ser impermeable al agua, lo era también al bióxido de carbono, indispensable para el proceso fotosintético. La solución a este problema se fue dando paulativamente. Las plantas que tenían aun dependencia de un medio acuoso para su reproducción, desarrollaron cutícula, pero su intercambio gaseoso lo realizaban por la raíz, ejemplos de estos son plantas no vasculares inferiores (musgos y espermatofitas), otras formaron poros sobre la cutícula, los cuales permitieron el intercambio gaseoso, pero, sin ninguna regulación, y finalmente, en todas las plantas vasculares (a excepción de Styloles andicola, la cual no posee estomas y lleva a cabo su intercambio gaseoso a través de la raíz, Keeley, 1984), se desarrollaron alrededor de este poro, un par de células capaces de regular el diámetro del

mismo y, de esta manera, modular el intercambio de CO₂ y la salida de agua por evapotranspiración (Zeiger, 1983; Willmer, 1983).

El complejo estomático, denominado así por DeCandolle en 1827 (autor citado por Meidner, 1986), se encuentra situado en la epidermis de las hojas (o su equivalente en plantas suculentas) y está compuesto de dos células guarda (CG) y algunas veces, junto a estas, un par de células acompañantes; ambas son diferentes al resto de las células epidérmicas. Las células guarda se originan de una división asimétrica de las células epidérmicas y a diferencia de estas poseen cloroplastos (Essau, 1981; Willmer, 1983). En algunas plantas estos cloroplastos están poco desarrollados o ausentes, como en el caso de Paphiopedilum harrisianum (Zeiger, 1983), pero en Vicia faba se ha comprobado que estos llevan a cabo acarreo electrónico, así como fijación de CO₂ (Zeiger, 1987). Las células guarda no poseen plasmodesmos funcionales, por lo que la única vía de relación que poseen con el resto de la planta es apoplástica (Willmer, 1988). Esta característica apuntan Pesmasda, 1981 y Willmer, 1988, hace del complejo estomático, por su posición y funcionalidad, un sensor medioambiental y un mecanismo de regulación homeostática de la planta.

Las células guarda son capaces de regular la pérdida de agua por transpiración. El complejo estomático regula la dimensión del poro a través de la salida y entrada de agua a la célula guarda. El movimiento de agua en las células guarda se ocasiona por un cambio en los niveles de concentración de algunos iones y ácidos orgánicos que funcionan como moduladores del gradiente osmótico, y por consiguiente del movimiento del agua (Zeiger, 1983).

Se han postulado muchas teorías sobre el mecanismo que conlleva a

este cambio osmótico, la evidencia indica que es el ion potasio el responsable de generar estos gradientes osmóticos (Outlaw, 1983). La hipótesis investigada inicialmente por McCallum en 1905 y reafirmada por Fujino en 1967 y Fisher y Hsiao en 1968 (autores citados por Outlaw, 1983), establece que los cambios osmóticos entre las células guarda y las epidérmicas están dados por un flujo de potasio dentro (en la apertura) y fuera (en el cierre) de la célula guarda. Los datos experimentales indican que este transporte está mediado por un mecanismo de antiporte acoplado a una ATPasa que bombea protones fuera de la célula a medida que se transporta el potasio. El balance de cargas está dado por una incorporación de iones cloro y la formación de malato, y también por una salida de sodio (Zeiger, 1983, Tallman, 1988).

El mecanismo de movimiento de iones, es activo, por lo que depende del aporte energético de parte de la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación, además de un mecanismo recientemente descrito (Zeiger, 1987; Tallman, 1988), en cual, la bomba de protones es estimulada por luz azul.

Los factores que regulan la dimensión del poro estomático son externos e internos. Los externos involucran parámetros ambientales como son: La intensidad y calidad de luz; en general la luz estimula la apertura y la oscuridad el cierre. La concentración de CO₂; bajas concentraciones de CO₂ estimulan la apertura y altas el cierre. La humedad relativa, la temperatura y el viento entre otros (Willmer, 1988). Como se puede notar, los factores externos causan una apertura en momentos donde se puede llevar a cabo la fijación fotosintética de CO₂ y el cierre cuando los factores no la favorecen.

Los factores internos, por otro lado, optimizan la fijación de CO₂, como es el caso de la regulación por los niveles internos de este gas.

El factor interno más importante son los niveles hormonales, producto de factores externos como son stress hídrico, salinidad, congelamiento, inundación, entre otros; estos factores llevan a la modificación del potencial hídrico de la planta, lo cual estimula cambios en los niveles hormonales que disparan mecanismos de regulación de la pérdida de agua, como son la inhibición del crecimiento, el cierre estomático, aumentó en la conductividad hidráulica de las raíces, entre otros (Addicott 1983).

Sobre los mecanismos de modulación del cierre estomático se ha reportado la participación de todas las hormonas, pero ninguna tiene el efecto y la correlación del ácido abscísico (ABA) (Willmer, 1983; Zeieger, 1987).

El ácido abscísico es una hormona vegetal que se describió desde los años treinta como una fracción ácida de los extractos de varias plantas, el cual tenía efectos inhibitorios en el bioensayo de la curvatura del hipocotilo de avena inducido por auxinas, a esta fracción se le denominó "Beta inhibidor" (Bennet-Clark y Kefford, 1953 citado por Milborrow, 1984). Durante los años 50's los investigadores que siguieron esta línea metodológica lo denominaron el "complejo beta inhibidor", por su posición en la cromatograma y porque se creía que se trataba de varios compuestos. Wareing en 1954 encontró una relación entre la concentración del inhibidor y la latencia de las yemas de árboles caducifolios; Henberg, en 1958, encontró que este complejo inducía la latencia en tubérculos de papa. Wareing propone el nombre de "Dormina" al complejo beta inhibidor. (autores citados por

Milborrow, 1984). En 1965 Cornforth, Milborrow, Ryback y Wareing aislan en forma cristalina y lo denominan "Dormina"; por otro lado en ese mismo año Okhuma, Lyon, Addicott y Smith aislan suficiente cantidad del complejo beta inhibidor de la planta de algodón, del que obtienen un espectro de resonancia magnética, y a partir del cual proponen la estructura química del compuesto (fig 1) y la denominan "Abscisina II", por su relación con la abscisión y otro compuesto antes aislado. Cuando ellos mismos comparan los espectros de la abscisina II y la dormina resultan ser el mismo compuesto. La estructura química propuesta por Okhuma y colaboradores es corroborada once días después cuando Cornforth (1965) y su equipo sintetizan artificialmente la cual posee las mismas propiedades fisicoquímicas y fisiológicas (autores citados por Addicott, 1983).

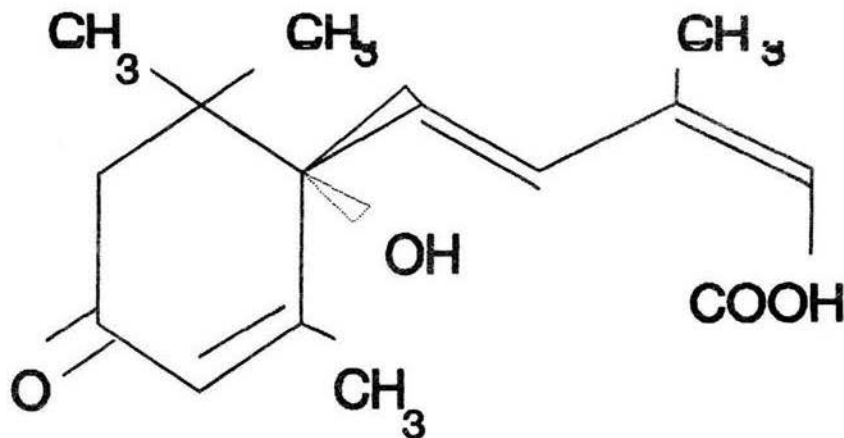


FIGURA 1.- Cis (+) Acido Abscisico.

El ácido abscísico se ha encontrado en todas las plantas vasculares (dicotiledoneas y monocotiledoneas), en helechos y equisetos, y a excepción de dos hongos no se ha encontrado en algas, hongos, ni en bacterias (Zeevart, 1989). En los vegetales se ha encontrado en todos los tejidos, órganos y estructuras (Milborrow, 1974).

EL ácido abscísico se ha encontrado involucrado en procesos fisiológicos tales como: inhibición y promoción del crecimiento, inhibición correlativa, geotropismo, abscisión, latencia, partenocarpia, cierre estomático, germinación, adaptación al estrés, entre otros (Milborrow, 1974; Walton, 1980; Zeevart, 1988),

La relación entre el ABA y el complejo estomático, en la regulación de la pérdida de agua, fué descrita desde 1929 por Stalfelt (autor citado por Raschke, 1987). Stalfelt encontró que las hojas de Vicia faba no cierran sus estomas inmediatamente después de la privación de agua, sino trece minutos después; él encontró también que una vez iniciado el movimiento de cierre, este no se detenía si se suministraba nuevamente agua a la planta. Stalfelt sospecho que una "respuesta metabólica" estaba involucrada en iniciar el cierre y en prevenir la apertura cuando se suministraba nuevamente el agua; él llamo a este mecanismo "El sistema Hidroactivo" pero no fué sino hasta 1968 cuando Little and Eidt descubrieron que la aplicación de ABA a plantas leñosas reducía la transpiración. Mittelheuser y Steveninck en 1969 demostraron que esta reducción en la transpiración era producto del cierre estomático inducido por la aplicación de ABA (autores citados por Raschke, 1987).

Estas observaciones empezaron a formar una idea de la

participación de la hormona en la regulación de la pérdida del agua, vía la modulación del poro estomático; sin embargo, la explosión de la hipótesis del ABA como mensajero entre el mesófilo y la epidermis en un estrés hídrico fue dada por la observación de Wright en 1969; Wright encontró que el estrés hídrico y la pérdida de turgencia en la hoja iba acompañada de un incremento de un compuesto beta, por su posición en la placa cromatográfica. Wright y Hiron en 1969 reportaron que este compuesto beta era el ácido abscísico y que este incremento estaba correlacionado con la pérdida de agua, lo cual en respuesta provocaba el cierre estomático y con esto la recuperación de la turgencia en la planta.

El mecanismo sospechado por Stalfelt fue corroborado por una serie de investigaciones que demostraron que la aplicación de ABA en flujo transpiratorio provocaba el cierre estomático en unos cuantos minutos, y no solo eso, sino que impedía que se volvieran a abrir. Por otro lado, la aplicación directa de la hormona sobre la epidermis desprendida tenía el mismo efecto. (Addicott, 1983).

El descubrimiento del papel fisiológico del ácido abscísico durante un estrés hídrico dio inicio a una serie de investigaciones, las cuales se dirigirían a contestar las siguientes preguntas:

(A) ¿Cuál es el estímulo bioquímico y celular que lleva a la acumulación de ABA y como se relaciona esta acumulación con el cierre estomático durante el estrés hídrico ?.

(B) ¿ Donde se sintetiza ABA y como esta regulada esta síntesis ?.

(C) ¿Cuál es el mecanismo mediante el cual ABA regula la apertura estomática?.

(D) ¿Cuál es la distribución del ABA en la célula guarda y si existe cual es su función?.

La razón e importancia de estos estudios radica en el hecho de que las plantas pierden a la atmósfera de un 70% a 90% del agua que absorben para sus funciones generales (Trejo, 1981; Colinas, 1982). La importancia de la eficiente regulación estomática en la vida de una planta es crucial, ya que el cierre estomático trae como consecuencia el evitar perder agua y mantener la turgencia celular para el crecimiento. En materia de producción se busca que una planta tenga una conductancia estomática máxima en el momento en el cual existe una mayor eficiencia fotosintética, pero también se busca que la eficiencia del uso del agua sea alta, de esta manera el eficiente funcionamiento estomático es un carácter fenotípico que se busca incorporar y transmitir en los cultivares (Blum, 1978). Por tanto, los estudios dirigidos a explicar los mecanismos por los cuales se regula el funcionamiento estomático son de vital importancia en el entendimiento general de la fisiología vegetal y su aplicación en la productividad de las cosechas. Por lo anterior, del presente trabajo tiene como objetivo el "Inmunolocalizar el Acido Abscísico en Células Guarda de Vicia faba" bajo condiciones de estrés hídrico.

ANTECEDENTES :

(A) ESTIMULO BIOQUIMICO.

Desde los descubrimientos de Wright y Hiron, en 1969, se ha buscado cual es la señal bioquímica y/o celular, que dispara el incremento de ABA durante un estres hídrico. En 1974 Zabadal encontró una relación entre el potencial hídrico (Ph) y la concentración del ABA en plantas de Ambrosia sp. Zabadal encontró una media del (Ph) de -10 a -12 ata. Beardsell y Cohen, en 1975, reportaron un cambio del potencial hídrico de -7 a -9 bars en sorgo y maíz, el cual inducía el incremento de ABA, pero por otro lado observaron que el cierre estomático se daba mucho antes que el inicio de la acumulación del ABA. Wright en 1977 encontró datos similares para Triticum aestivus.

Aún cuando estos datos indicaban que un pequeño cambio en el potencial hídrico inducía el incremento de ABA, no indicaban que componente del (Ph) era el responsable de esta acumulación. Beardsell y Cohen, en su trabajo de 1975, mencionaron que el cambio de potencial hídrico en el que se da el incremento de ABA, es muy cercano a 0 de presión de turgencia. Piercey y Raschke, en 1980, trabajando con frijol y algodón encontraron que el componente que se relacionaba directamente con el incremento de ABA era el potencial de turgencia; ellos encontraron que al aproximarse la turgencia a cero, se disparaba el incremento de ABA. Piercey y Raschke encontraron que no existe una relación directa entre el potencial hídrico u osmótico con el incremento de ABA, sino que estos se daban en rangos muy amplios, tal como Zabadal había descrito en 1974, sin embargo ellos encontraron una relación directa entre la historia de la planta y los valores del

potencial hídrico donde se daba el disparo del incremento de ABA; esto es, que la planta que había sido estresada hídricamente con anterioridad, iniciaba el incremento de ABA en potenciales hídricos más bajos que aquellas que no habían experimentado un estrés hídrico. Este valor de (Ψ_h) estaba directamente relacionado con el potencial osmótico (Ψ_o) a cero potencial de turgencia, lo cual habla de un ajuste osmótico celular. Creelman y Zeevart, en 1985, realizaron un análisis de lo propuesto por Pierce y Raschke en 1980. Ellos utilizaron discos de hoja de espinaca tratados con soluciones penetrantes y no penetrantes para distinguir el componente del potencial hídrico que provocaba el incremento de ABA; sus resultados reafirmaron lo antes dicho; El potencial de turgencia es el componente relacionado con el incremento de ABA. En estudios hechos con protoplastos de células guarda, se encontró que son incapaces de producir ABA cuando son sometidas a un estrés osmótico, la posible razón es que estas se comportan como un osmómetro, ya que no poseen potencial de turgencia (Weiler *et al.*, 1988).

Por lo anterior, se deduce que el mecanismo por medio del cual se traduce la disminución del potencial de presión en un incremento de ABA puede estar relacionado a receptores sensibles de presión en la membrana o a cambios conformacionales en la misma, los cuales podrían inducir este incremento (Zeevart, 1988).

(B) BIOSÍNTESIS Y COMPARTAMELIZACIÓN :

a) Biosíntesis.

En los primeros trabajos para deducir la vía de síntesis del ABA, Milborrow, en 1974, propuso la vía de síntesis a partir del ácido Melavónico (Figura 2).

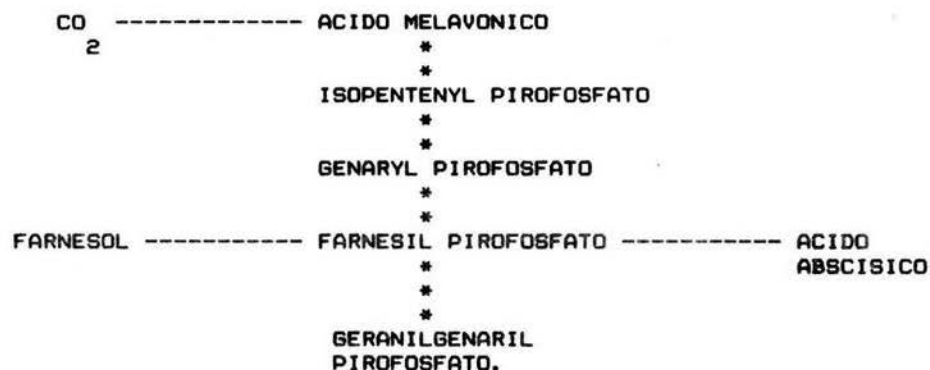


Fig 2. Ruta de Síntesis del Acido Abscísico apartir del ácido melavónico, tomado de Milborrow, 1974.

Por otro lado, la estructura de ABA sugeria también una similitud con algunos carotenoides (Violaxantina), por lo cual Milborrow en 1974 sugirió que era posible que el lugar de síntesis del ABA fueran los cloroplastos. Milborrow (1974) encontró que el ácido melavónico era poco permeable en el cloroplasto, pero cuando este se lizaba, el contenido era capaz de sintetizar ABA apartir del ác. melavónico. En 1977 Loveys reportó que en estudios hechos en espinaca, la mayor concentración de ABA se encontraba en el cloroplasto de las plantas no estresadas. Utilizando los antecedentes de Milborrow, 1974, Loveys, 1977 y los de Beardshell y Cohen en 1975, Manfield y Wilson (1981) propusieron un sistema de "retroalimentación", el cual regulaba la síntesis de ABA a partir de la redistribución del ya preexistente. El modelo tenia como regulador a otro compuesto con acción antitranspirante, el farnesol, el cual era un producto de una

ramificación de la vía de síntesis de ABA a partir del ác. melavónico. Mansfield y Wilson, sugirieron que el estres hídrico bloqueaba la síntesis de geranylgeranyl pirofosfato y este provocaba un incremento de farnesol. El farnesol se acumulaba en el cloroplasto, provocando un cambio en la permeabilidad del mismo, permitiendo que el ABA se liberara, además de inducir su síntesis. Cuando las condiciones hídricas se restablecían en la planta, los niveles de farnesol retornaban a su normalidad y la permeabilidad del cloroplasto era restablecida y la síntesis de ABA se detenía. El modelo nunca fué corroborado a falta de antecedentes que lo sustentaran, sin embargo sugirió la redistribución del ABA preexistente, como primer paso en el cierre estomático durante el inicio del estres hídrico.

En 1983 Hartung et al retomaron lo antes reportado y encontraron que la síntesis de ABA a partir del ácido melavónico, en el cloroplasto y en la fracción intracloroplástica, era nula o no detectable, no siendo el caso para la fracción citoplasmática, donde se encontraban valores similares a los de protoplastos intactos. Stewart et al, en 1986, y Guerrero Felix y Mullet J., también en 1986, reportaron que el incremento de ABA durante el estres hídrico era inhibido por ciclohexamina, y no por cloramfenicol, y por otro lado por cordicepina y actinomicina D, lo cual sugiere directamente que la síntesis de ABA requiere de la transcripción nuclear y que la síntesis es citoplasmática y no cloroplastica o mitocondrial.

b) Compartamentización.

El conocimiento de la distribución del ABA en las células y órganos es de vital importancia en el entendimiento de su modo de

acción (Zeevaart , 1988). Es generalmente reconocido que los niveles endógenos de ABA en cualquier parte en particular de la planta depende de un balance interno de un numero de procesos , como son: síntesis, conjugación, compartamentización, transporte y/o degradación (Hethergton y Quantro, 1991).

El ácido abscísico es un ácido débil con pK de 4.7 (Zeevaart, 1988). Werner Y Hartung, en 1981, y Hartung, en 1983, reportaron que la incorporación de ABA en la células del mesófilo y las células guarda dependia del pH del medio donde la hormona estuviera disuelta, y por tanto del estado ionico de la hormona; cuando la molécula se encontraba en su forma protonada (ABAH) a pH ácidos, esta permeaba libremente através de la membrana citoplasmática, pero cuando se encontraba en su forma disociada (ABA -) no era permeable. Cowan et al, en 1982, (autor citado por Hartung et al, 1982) utilizando los datos de pK de ABA y los diferentes pH de cada compartimento celular, obtuvo los grados de disociación de la molécula y por ende su distribución (tabla 1) :

	LUZ	OBSCURIDAD
APOPLASTO	4.4%	8.2%
CLOROPLASTO	68.4%	40,7%
CITOPLASMA	17.2%	32.4%
VACUOLA	10.0%	18.7%

Tabla 1.- Distribución intracelular de ABA (en % total de ABA en células del mesófilo). Tomado de Hartung et al 1982.

El modelo de Cowan et al se apegaba mucho a lo encontrado experimentalmente por otros autores. Loveys en 1977 encontró que la

mayor cantidad de ABA en las plantas no estresadas se encontraba en el cloroplasto. Sotta et al, en 1985, utilizando inmunocitoquímica encontraron en Chenopodium polysperum que la mayor cantidad se localizaba en el cloroplasto y en menor cantidad en el citoplasma. En vacuola no se detecto presencia de la hormona. Esta ausencia puede estar relacionada con el pH que este compartimento tienen normalmente. La presencia de ABA en la vacuola se ha reportado, pero en forma conjugada con glucosa (Zeevaart, 1988).

El Beta-D-glucopiranosil abscisico (ABA-GE) es una conjugación de ABA con glucosa, la cual se ha reportado ser una manera de desactivar y/o almacenar la hormona (IBID). Bray y Zeevaart, en 1985, encontraron que en Xanthium y Vicia el 91% y 80%, respectivamente, de ABA-GE se encontraba en la vacuola de las células del mesófilo. Bray y Zeevaart atribuyen esta distribución a que el pH de la vacuola (5.5) es el óptimo para la función de la glucosiltransferasa, por lo que concluyen que probablemente éste sea el lugar de la síntesis del conjugado.

A nivel de órgano se ha prestado mucho interes en la epidermis, ya que en ella se encuentran las células guarda, las cuales son el blanco del ácido abscisico. En los primeros trabajos se reportó que la epidermis desprendida de hojas estresadas acumulaba ABA, pero que en ensayos invitro, no lo hacia por sí misma (Lovey, 1977). Por otro lado, se reportó que la hormona se acumulaba en el complejo estomático cuando la esta era inyectada en el flujo transpiratorio o si la epidermis se incubaba en medios conteniendo la hormona (Weyer y Hillman, 1979); por lo anterior se concluyó que la epidermis y las células guarda eran incapaces de sintetizar ABA, y que mas bien

durante un stress hídrico esta se translocaba desde el mesófilo a la epidermis (Milborrow, 1974; Walton, 1980). Las células guarda maduras no poseen plasmodesmos funcionales, así que la ruta que el ABA debe seguir para llegar a las células guarda es apoplástica o a través del flujo transpiratorio (Willmer, 1983). Sin embargo, reportes recientes han demostrado que las células guarda son capaces de sintetizar y catabolizar ABA (Sing et al., 1979; Cornish y Zeevaart, 1986; Zeevaart, 1988).

El contenido de ABA en las células guarda ha sido medido por varios autores. Weyer y Hillman, en 1979, encontraron que al inyectar ABA radioactivo en el flujo transpiratorio (500nmoles a 5 μ moles) de la hormona se acumulaba en el complejo estomático en una concentración de 2.5 a 695 attomoles, reportando que 12.6 a 45.6 attomoles eran suficientes para inducir el cierre de una célula estomática. Weiler et al., en 1982, encontraron que la concentración de ABA en la epidermis era de 14 pmoles/cm cuadrado de epidermis y para las células guarda era de 26.1 pmol/mg de proteína. Weiler et al. reportaron también que el incremento de ABA durante un stress hídrico se daba más rápido en la epidermis que en el mesófilo. Por otro lado, estos autores demostraron que cuando la hoja perdía 10% de su peso fresco los estomas se cerraban en un 30%, pero ABA se incrementaba solo el 10% en la epidermis (2.5 pmol/cm cuadrado de epidermis). Cornish y Zeevaart, en 1986, señalan que en las células guarda "aisladas" de epidermis de hojas, las cuales se habían estresado dejándolas perder el 12% de su peso fresco, el contenido de ABA se incrementaba de 0.009 \pm 0.003 ng/mg de peso seco a 0.16 ng/mg de peso seco. Sin embargo, a lo igual que Weiler et al., en 1982, estos

autores concluyeron que este incremento podría no ser de relevancia durante el estrés hídrico y que más bien el rápido cierre estomático podría estar dado por una redistribución de ABA preexistente. Behl y Hartung, en 1986, examinaron el movimiento y compartimentación del ABA en células guarda "aisladas" de Valeriana locusa encontrando que a pH natural de 5.8 (según lo medido por Pfanz and Dietz, 1985 citado por Behl y Hartung, 1986) la concentración de ABA en el citoplasma era de 0.45 fmol/cél. y para la vacuola de 1.81 fmol/cél., pero considerando el volumen de la célula (3500µm³) y el volumen que ocupa la vacuola (90% del volumen celular) y el del citoplasma (10% vol./cel.), las concentraciones encontradas eran de 1.28µM para el citoplasma y 570µM para la vacuola. El incremento del pH en el medio externo (8.0) reducía el contenido de ABA en el citoplasma y la disminución del pH (5.0) la aumentaba, mientras que el contenido de ABA vacuolar permanecía sin cambio. Cuando se midió el efecto del estrés osmótico en el medio, ABA disminuía conforme se aumentaba la presión osmótica del medio. A una presión de 0.14 MPa el contenido de ABA en el citoplasma era de 1.31µM; a presión de 0.26 MPa el contenido era de 260 µM y a presión de 0.796 MPa el contenido era de 280 µM. Cabe mencionar que el potencial osmótico de la epidermis no estresada era de 0.796 MPa. El contenido vacuolar no se modificó por el cambio de potencial en el medio. Lo más relevante del trabajo de Behl y Hartung (1986) reside en lo siguiente:

- (a) El contenido intracelular de ABA en las células guarda no estresadas es sorprendentemente alto (1.28µM).
- (b) La compartimentación de ABA en las CG es afectada por cambios en el potencial osmótico por debajo del potencial osmótico celular.

(c) El contenido vacuolar de ABA durante el estrés osmótico se mantiene constante, de tal manera que las células guarda liberan ABA a su medio externo (apoplasto).

(d) El flujo de ABA al apoplasto se completa en un tiempo de 10 a 20 minutos.

(e) Bajo condiciones de estrés moderado (por un corto tiempo) puede esperarse una concentración aproximada de 1 μ M de ABA en el apoplasto, asumiendo que este no es más del 10% del volumen total de la célula.

(f) La liberación de ABA, a presiones osmóticas más bajas que la celulares, no estimulan la síntesis de ABA.

(g) El incremento de ABA en el apoplasto, y la velocidad con que este se da, pueden ser de importancia en la inducción del cierre estomático inicial durante un estrés hídrico y quizás independiente del aporte del mesófilo.

Lahr y Raschke, en 1988, encontraron valores de ácido abscísico en células guarda de hasta 100 veces más que para las del mesófilo. Las concentraciones, basadas en el volumen celular, iban desde 36 a 228 μ M para los protoplasto, de CG, y de 2.7 a 3.3 μ M en protoplastos del mesófilo. Sin embargo, en las células estresadas osmóticamente no encontraron ningún incremento de ABA, concluyendo que tal vez sea necesaria la presencia de la pared celular para la transducción de los cambios de presión o volumen en la señal que dispara la síntesis de ABA. Harris, M. *et al.*, en 1988, utilizando una técnica de disección de CG microsucción y cuantificación por ELISA-amplificado, encontraron que los valores de las células guarda y las del mesófilo eran similares (0.2ng/mg de peso seco para CM y de 0.15ng/mg peso seco para CG). Para el caso de estrés hídrico los valores también fueron

similares para ambos tipos celulares (7 a 13 μM , sin considerar el compartimento celular). Briinckmann, E. et al, en 1990, hicieron un acercamiento aún más real, utilizando micropunción, microsucción y cuantificación por ELISA-amplificado, directamente en células guarda de hojas de Commelina communis y Tradiscantia virginiana. Los resultados muestran una concentración de 6.5 μM de ABA en las células guarda y de 3.0 μM para células del mesófilo. Por otro lado, Brinckmann et al no encontraron diferencias en el contenido de ABA de células guarda abiertas y cerradas. Harris y Outlaw, en 1991, utilizando técnicas de disección y microsucción y cuantificación con ELISA-amplificada, encontraron que la cantidad de ABA en hojas estresadas durante 15 minutos (periodo en que se perdía 90% del peso fresco), se incrementaba 9 veces en las células guarda, pero en las células de la lamina foliar se mantenían sin cambio alguno. A las dos horas el valor para las células del mesófilo era de 15 $\mu\text{moles/kg}$ de peso seco y para las células guarda de 13 $\mu\text{moles/kg}$ de peso seco, teniendo ambas un incremento aproximado de 6 μmol de ABA/kg de peso seco/hr.

El alto contenido de ABA en el cloroplasto (Loveys, 1977; Sotta et al, 1985) y en la vacuola y citoplasma (Behl y Hartung, 1986; Briinckman et al, 1990) sugiere la posibilidad de que estos compartimentos secuestren ABA fisiológicamente activo en tiempos cuando el efecto de este no sea necesario, pudiendo ser redistribuido lo suficientemente rápido antes de que se dispare la síntesis, esto como una primera línea de defensa durante un estrés hídrico (Slovik y Hartung, 1992).

(C) MECANISMOS DE ACCION DE ABA.

La modulación del poro estomático, como ya se había mencionado, depende de la turgencia de las células guarda. La regulación de la turgencia esta dada principalmente por movimientos de iones potasio, cloro y protones, así como de aniones orgánicos, principalmente el malato (Zeiger, 1983). La apertura estomática es el resultado de la acumulación de cloruro de potasio y malato de potasio dentro de la vacuola de las células guarda. El cierre ocurre cuando las sales de potasio salen de la vacuola y son liberadas de las células guarda o son metabolizadas, como en el caso del malato (figura 3). Durante la apertura y el cierre, el movimiento de iones a través del plasmalema y tonoplasto estan acoplados a los procesos metabólicos en el citoplasma, cloroplasto y mitocondria, los cuales suplementan la energía y remueven o proporcionan el malato (Raschke, 1987).

Durante un estres hídrico la pérdida de agua por transpiración es reducida por ABA, la cual promueve el cierre estomático e inhibe su apertura. El mecanismo básico de esta respuesta de ABA involucra alteraciones de la turgencia celular, lo que provoca la salida de varios cationes y aniones, dentro de los cuales los más importantes son: Potasio, Cloro y malato (Zeiger, 1983). El primer paso de estas reacciones en cadena, la cual finalmente conlleva a la modulación del diametro del poro, es una interacción de ABA con la membrana plasmática; esta interacción podria darse a través de receptores protéicos o lipidicos del plasmalema (Hetherington y Quantro, 1991). La concepción de un receptor en la cara externa de la membrana plasmática proviene de los trabajos de Hartung, 1983 y Hornberg y Weiler, 1984.

PARED CELULAR

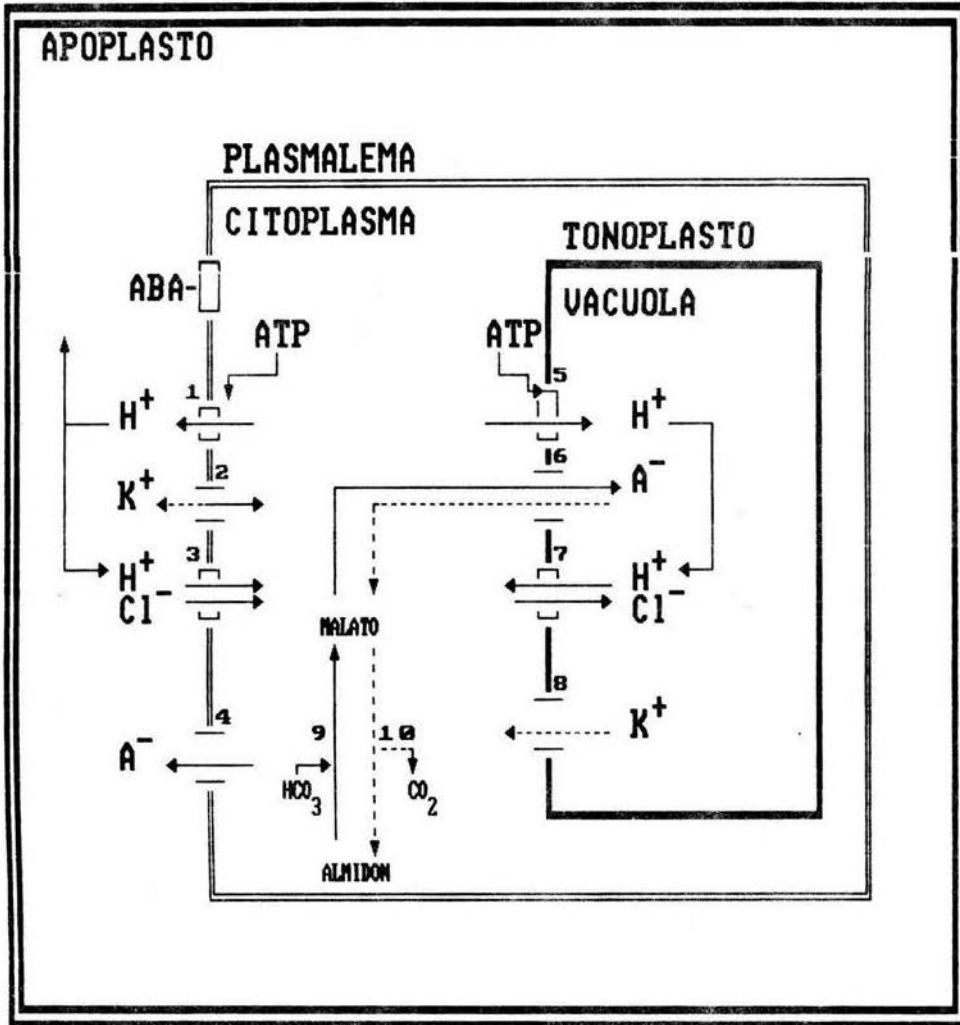


FIGURA 3.- Modelo simplificado de los mecanismos estomáticos relacionados con la acción de ABA. Líneas continuas (apertura) discontinuas (cierre). 1,5 bombas de protones, 2,8 canal de potasio, 3 cotransporte de H⁺/Cl⁻, 4,6 canales aniónicos, 7 cotransporte de H⁺/K⁺. 9 y 10 Metabolismo del Malato. Tomado de Raschke, 1987.

Hartung, en 1983, utilizando los antecedentes de Kaiser y Hartung (1981), donde se demostraba que ABA solo era permeable a la célula cuando se hallaba en su forma protonada, encontró que no existe una dependencia entre la inducción del cierre estomático, provocado por ABA, y el pH, por lo tanto esto indicaba que para las células guarda "aisladas" de Valerianella locusta no era necesario que la hormona fuera transportada dentro de la célula guarda para que se llevara a cabo la respuesta. Hartung (1983) concluyó que el sitio de acción de ABA se encontraba en la cara externa de la membrana plasmática o al menos una parte de la membrana accesible desde afuera. Hornberg y Weiler, en 1984, trabajando con protoplastos de células guarda de Vicia faba encontraron, por estudios de marcado por fotoafinidad, que el acoplamiento del ácido abscísico a la membrana plasmática era considerablemente más específico para el enantiomero fisiológicamente activo (ABA+). Por otro lado, observaron que cuando se trataban los protoplastos con tripsina, de manera que no se afectará su viabilidad, eliminaban completamente el acoplamiento de ABA al plasmalema, indicando que los sitios de acoplamiento eran proteínas, las cuales estaban localizadas en el plasmalema de las células guarda, con el área receptora hacia el espacio apoplástico y en una proporción aproximada de 2,200 receptores por micrometro cuadrado. Hornberg y Weiler (1984) aislaron estas proteínas de unión en geles con SDS, tres de las cuales tenían un peso de 20.2, 19.3 y 14,3 kd, las que unían específicamente a la molécula de ácido abscísico en relación con análogos de la misma. El patrón electroforético se encontró también en las células del mesófilo, pero expresado en mucho menor cantidad.

La unión del ácido Abscísico con su receptor en el plasmalema

causa el cierre del poro en minutos. ABA estimula la salida de los osmólitos desde la vacuola, a través del tonoplasto, citoplasma y el plasmalema (Hetherington y Quantro, 1991). Por otro lado se ha determinado que ABA bloquea la salida de protones de la célula, inhibiendo las ATPasas bombeadoras de protones en el plasmalema. Sin embargo, la explicación simple de que ABA causa el cierre estomático, solo por la inhibición del cotransporte de protones - iones potasio no es suficiente, ya que ABA debe provocar la salida de los osmólitos de la vacuola y transportarlos fuera de la célula; de este modo, debe existir un mensajero entre lo externo (unión de ABA con su receptor) y lo interno (flujo de iones) (Raschke, 1987). ABA podría ser por sí misma este mensajero, pero como ya se mencionó, Hartung, en 1983, demostró que la entrada de ABA a la célula no era factor necesario para que se diera el cierre estomático. El cambio de pH, provocado por la inhibición de la bomba de protones, podría ser un buen candidato para explicar la conexión entre ABA y la salida de los iones, ya que es fácil notar que un cambio de pH puede modificar las propiedades del plasmalema y el tonoplasto simultáneamente, garantizando el flujo sincronizado de las sales a través de ambas membranas. Por otro lado, una disminución del pH en el citoplasma movería el equilibrio de la reacción malato (-----) almidón hacia el lado derecho, provocando que el malato sea descarboxilado por la enzima málica y se forme almidón.

Los estudios realizados con epidermis desprendida y protoplastos de células guarda, utilizando quelantes de calcio, y así como los trabajos de electrofisiología, utilizando la técnica de "patch clamping", apoyan la idea anterior, pero también proponen que

se involucra otro mensajero : el calcio (figura 4). En resumen, la evidencia de estos estudios es la siguiente:

(1) ABA actúa directamente sobre el canal de potasio inhibiendo la entrada de este ión (posiblemente por la inhibición de la ATPasa) y estimulando su salida a través del mismo canal. Cabe mencionar que el número de receptores para ABA, por célula, (aproximadamente 2 millones), reportado por Hornberg y Weiler, en 1984, es mucho mayor que el reportado para los canales de potasio (300 por célula). (Raschke, 1987).

(2) ABA actúa indirectamente sobre los canales de potasio a través de un segundo mensajero, que podría ser el Calcio. MacAnish et al y Schroeder y Hagiwara, en 1990, (autores citados por Hetherington y Quantro, 1991), encontraron que la adición de ABA causaba un incremento inmediato del calcio citoplasmático, a través, al parecer, de la apertura de un canal iónico no selectivo para calcio, pero también por la liberación de calcio de compartimentos subcelulares; la inhibición del cierre estomático por antagonistas del calcio y quelantes solo causaron un cierre parcial (Figura 4) (Owen, 1988; Hetherington y Quantro, 1991).

La actividad de ABA en el cierre estomático, durante el estrés hídrico, se mantendrá mientras que el nivel de síntesis exceda al nivel de degradación. Esto es, durante un estrés hídrico se estimula la síntesis de ABA y se alcanzan niveles de hasta 40 veces la concentración de las hojas turgentes; por tanto, bajo un estrés, los niveles de ABA son controlados por la degradación de la misma. ABA es generalmente degradada o desactivada en ácido fásético (PA), ácido dihidroxifásético (DPA) y por la conjugación de ABA a una glucosa (ABA-GE) (figura 15) (Zeevaart, 1988).

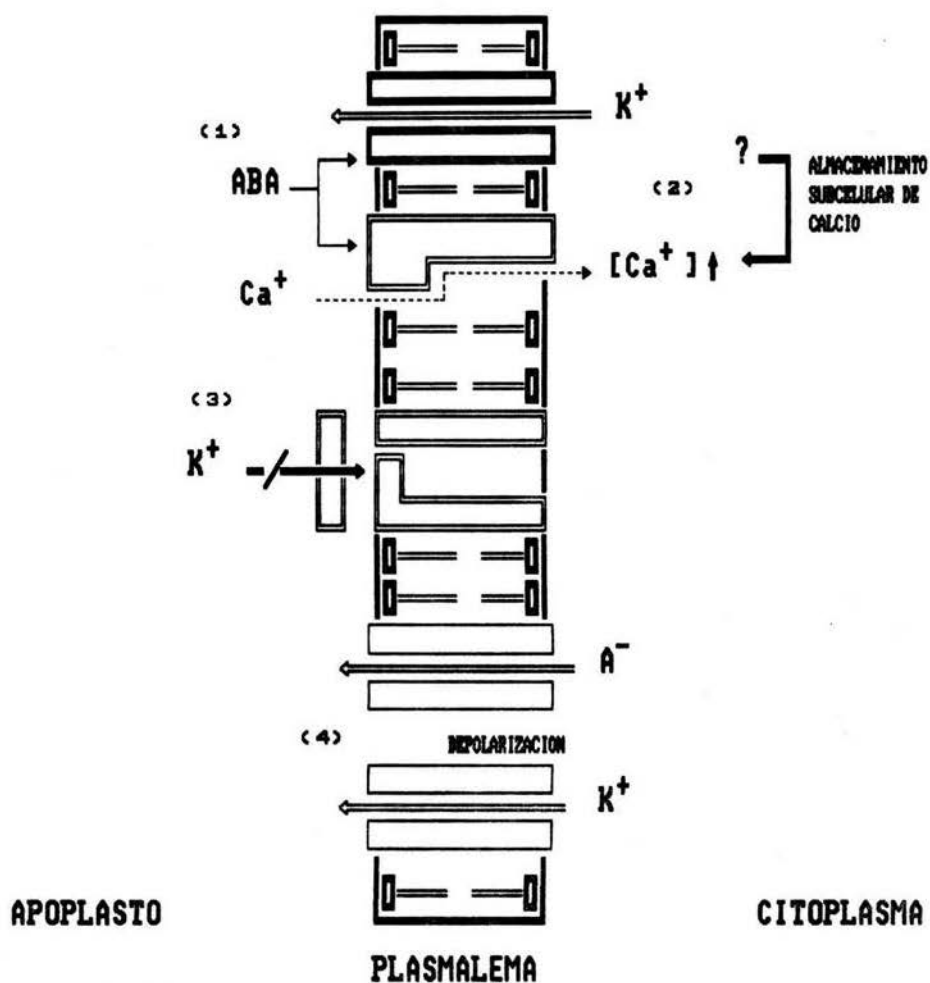


FIGURA 4.- Acción del ABA a nivel celular en durante el cierre estomático. (1) Unión de ABA con su receptor en la membrana, (2) Apertura canales de Calcio no específicos. (3) Cierre de canales de entrada para Potasio, (4) Despolarización de la membrana y apertura de canales de salida de aniones y iones Potasio. Tomado de Hetherington y Quantro, 1991.

Cuando se restablecen las condiciones hídricas en la planta (hidratación) y se restablece la turgencia celular, la síntesis de ABA se detiene. Por otro lado se incrementa la velocidad de conversión de ABA a PA y DPA, dando como resultado un incremento de PA y una disminución de ABA (Zeevaart, 1983). Esto último, podría pensarse, es contraproducente en la fisiología estomática, ya que se ha reportado que PA puede inducir el cierre estomático, pero en mucha mayor concentración que ABA (Raschke, 1987). Sin embargo, PA a su vez también puede ser degradado rápidamente o conjugado con glucosa, además de que, para el caso de Vicia faba, PA no tiene actividad en células guarda (Grantz *et al.*, 1985). Para Vicia faba los niveles de ABA, después de un estrés hídrico, son restablecidos a su concentración basal de turgencia en aproximadamente 8 horas, y su principal catabolito es PA y conjugados de este con glucosa.

En resumen, la síntesis de ABA es provocada por el estrés hídrico, este a su vez, al unirse con su receptor inhibe la salida de protones y provoca la expulsión de potasio desde la vacuola hasta el apoplasto, a través de un mecanismo que tal vez involucra cambios de pH y diferencias de la concentración de calcio intracelular. Cuando se restablecen las condiciones de turgencia celular, la síntesis de ABA es detenida y se estimula su degradación, restableciéndose los niveles endógenos de la hormona.

(D) EL PAPEL DEL ACIDO ABSCISICO EN LA REGULACION HIDRICA.

Las plantas están constantemente confrontadas con el problema de mantener un ambiente acuoso en sus hojas expuestas a la influencia de una atmósfera desecante. Cuando la cantidad de agua perdida por transpiración excede a la cantidad de agua tomada por las raíces, un

estres hídrico se desarrolla en las hojas. El efecto del stres hídrico en la planta, depende del grado de pérdida de agua, por ejemplo: pequeñas reducciones en la turgencia celular, disminuyen la división celular y por ende, la expansión de la hoja, reduciendo el área foliar fotosintética, lo cual repercute de manera directa en la productividad (Davies y Mansfield, 1983). Reducciones más drásticas en la turgencia celular, disminuyen la tasa fotosintética y respiratoria, además de la síntesis de proteínas (Bradford y Hsiao, 1982; Chavez, 1991). Si el stres hídrico continúa, la tasa fotosintética puede ser aun más reducida por la aceleración de una senescencia y abscisión foliar prematura (Davies y Mansfield, 1983).

Los procesos que permiten a la planta mantener un control hídrico foliar, o que al menos conducen a que el establecimiento del stres hídrico sea gradual, tienen un efecto directo en el desarrollo de la planta, y por ende, en su productividad. Existen evidencias de que en condiciones de stres hídrico moderado, el mantenimiento de la turgencia celular, está dado por un adecuado control de la toma de agua por las raíces y por el control de la pérdida de agua vía la transpiración (Ibid). Mansfield y Davies, en 1981, propusieron que existen dos líneas de defensa en las plantas durante el desarrollo de un stres hídrico, en las que el complejo estomático y el ácido abscísico están involucrados. La "primera" línea de defensa permite que las células guarda detecten cambios en la atmósfera externa, los que podrían considerarse como el inicio de un stres hídrico (por ejemplo una caída en % de humedad del aire). Es decir, cuando comienza un stres hídrico, los potenciales de la planta no están relacionados con los de la epidermis, ni tampoco con la conductancia estomática o

los niveles de ABA, por lo que el control dinámico de la pérdida de agua está dado por la variación de la apertura estomática, dado a su vez por la capacidad propia de la célula guarda como sensor medio ambiental, evitando en un principio la caída del potencial hídrico en el mesófilo (Davies y Mansfield, 1983; Willmer, 1988). Cuando el estrés hídrico continúa, la primera línea de defensa parece ser inadecuada, ya que el cierre parcial estomático no es capaz de controlar la pérdida de agua, aunado a que la cantidad de agua en el suelo se hace cada vez menos accesible a la toma por las raíces. Al disminuir aún más el potencial hídrico, se dispara la "segunda" línea de defensa, la que involucra la redistribución del ácido abscísico almacenado (Slovik *et al.*, 1992) y la síntesis del mismo, lo cual induce: (1) El cierre estomático, reduciendo la pérdida de agua por transpiración; (2) La inhibición del crecimiento en las partes más jóvenes de la planta, manteniendo la turgencia celular (Zeevaart, 1988); (3) El establecimiento de un gradiente de potencial hídrico en la planta, a través de la inhibición de la translocación de fotosintetatos, (aunado con la producción de algunos compuestos osmoreguladores) (Rhodes, 1987). (4) El incremento en la toma de agua por las raíces, a través del aumento de la conductividad hidráulica en las mismas (Zeevaart, 1988).

(E) EXPRESION GENETICA EN RESPUESTA A ESTRES.

Como ya se mencionó, los niveles de ABA se incrementan en los tejidos cuando son sujetos a estrés hídrico, osmótico, salino o por frío. Bajos estas condiciones, genes específicos son expresados, los cuales también pueden ser inducidos en tejidos no estresados por la aplicación de ABA exógenamente. Algunos de estos genes son específicos

para el tejido o el estado fenológico, pero la mayoría al parecer están involucrados a la respuesta osmótica. Los genes que responden a un estrés se han clasificado como genes "rab". Un ejemplo de esto son los genes abundantes de la embriogénesis tardía o genes "lea", los cuales impiden la germinación precoz en semillas. La expresión de estos genes coincide con los niveles endógenos de ABA inducidos por el desecamiento de la semilla. La misma respuesta se da cuando se aplica exógenamente ABA en la semilla. En plantas sometidas a un estrés hídrico o salino, muchos de estos genes "rab" son expresados, dando origen a la síntesis de proteínas, de las cuales aun no se conoce su función, pero se piensa están involucradas en la adaptación de la planta a la condición ambiental (Skirver y Mundy, 1990).

En contraste con los modelos moleculares de la acción de las hormonas en animales, donde se conocen los receptores, los factores que regulan la transcripción y la activación por segundos mensajeros, el modelo de la acción de ABA está aun incompleto, ya que se desconocen las características de sus receptores (Hornberg y Weiler, 1984); por otro lado, la acción del calcio como un segundo mensajero, aún no se ha definido completamente (Hetherington y Quantro, 1991). De esta manera, la meta en los estudios moleculares es entender como estos factores regulan la expresión genética inducida por ABA, durante un estrés (Skirver y Mundy, 1990).

(F) METODOS DE CUANTIFICACION DE ABA.

Los métodos de cuantificación del ácido abscísico han evolucionado con el desarrollo de la tecnología instrumental. En sus inicios ABA fue detectado en cromatografía de capa fina y cuantificado

por bioensayos, tal vez el más usado era el de la inhibición del crecimiento o curvatura de hipocotilos de avena (Zeevaart, 1984). Sin embargo, estos ensayos llevaban en sí mismos errores tales como el de la translocación y degradación de la hormona en el tejido mismo, además de la variabilidad de los tejidos a la acción de la hormona. Con la introducción del uso de la cromatografía de gases, la espectrofotometría de masas y la cromatografía líquida de alta resolución, se dio un avance en la cuantificación de ABA en extractos de distinto origen. Sin embargo, el problema de esta técnicas (además del elevado costo del equipo y de la necesidad de un conocimiento técnico del mismo), es que para toda determinación de la hormona, están involucrados una serie de pasos, como son la extracción de la hormona del tejido, el lavado del extracto para eliminar contaminantes que interfieren con la cuantificación y por último, la cuantificación, lo cual implica grandes cantidades de tejido y mucho tiempo de extracción.

En adición a los métodos de bioensayo y fisicoquímicos, un tercer método para la detección y cuantificación de la hormona ha sido desarrollado en los últimos 10 años, la técnica inmunológica. Esta técnica, además de ser relativamente sencilla una vez estandarizada, no requiere de equipos costosos, ni de experiencia técnica; por otro lado, esta técnica combina sensibilidad y especificidad en un grado que ningún otro método tiene. La técnica inmunológica es rápida y gran cantidad de muestras sin purificar pueden ser procesadas en un día. Como las demás, presenta problemas de interferencia con compuestos relacionados con la hormona (ver figura 15), sin embargo, el análisis, es mucho más sencillo que en las otras metodologías (Weiler, 1982; Weiler, 1984; Hanke, 1984).

Se han hecho comparaciones entre las técnicas fisicoquímicas y las inmunológicas y se ha encontrado que ambas dan la misma respuesta, sin embargo, las técnicas inmunológicas son más sensibles que las fisicoquímicas (500 attogramos a 4 femtogramos, respectivamente) (Rhosher, 1985).

Existen muy pocos estudios dirigidos a la localización celular de hormonas vegetales usando anticuerpos específicos. Roberts (1986) menciona que uno de los problemas en la detección de antígenos en plantas, es la incapacidad de los anticuerpos en penetrar la pared celular, sin embargo, esto se puede evitar usando métodos para eliminar la pared o por cortes histológicos. Para el caso específico de ABA, Sotta *et al.*, en 1985, encontraron en Chenopodium polysperum que durante un estrés hídrico, la hormona se acumula en las partes más jóvenes y en las hojas, localizándose en el citoplasma, en la membrana de la envoltura del cloroplasto y ligeramente en la membrana nuclear, y ausente dentro de núcleo y vacuola. En 1986 Curvetto *et al.* reportaron que ABA se acumulaba en las células epidérmicas, incluyendo las células guarda, pero sin indicar claramente su posición celular. Bertrand *et al.* (1991), trabajando con raíz de tomate estresado hídricamente, encontraron que ABA se acumulaba en pared celular, apoplasto, plasmalema y citoplasma.

El problema de la penetración de los anticuerpos a través de la pared celular de las células guarda ha sido resuelto usando sonicación (Curvetto *et al.*, 1986), y enzimas degradantes de la pared (Celulasa) (Madhavan *et al.*, 1982; Zemel *et al.*, 1983), dando buenos resultados para el caso de la localización de la Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa y el complejo fotosintético II en Vicia faba (Ibid).

Walton, en 1980, menciona que el conocimiento de la localización celular de las hormonas es uno de los pasos para entender el funcionamiento de las mismas. Una herramienta útil para realizar esto, es el uso de anticuerpos específicos contra las hormonas vegetales. El conocimiento de su lugar de síntesis, almacenamiento, degradación, receptores específicos, características de unión y componentes asociados al sistema del receptor, darán una perspectiva más clara de su participación en la fisiología total de la planta (Vanderhoef y Kousuge, 1984; Hanke, 1984).

OBJETIVO GENERAL :

INMUNOLocalizar EL ACTIDO ABSCISICO EN CELULAS GUARDA DE Vicia faba.

- A) En condiciones de turgencia celular.
- B) En condiciones de estres hidrico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- A) Realizar el acoplamiento del hapténo (ABA) al acarreador (HSA).
- B) Obtener un anticuerpo policlonal en conejo, contra la mezcla racémica de ABA.
- C) Estandarizar la técnica para la detección celular de ABA en células guarda de Vicia faba.

METODOLOGIA.-

I.- PREPARACION DE UN CONJUGADO DE ALBUMINA SERICA DE HUMANO-ACIDO Y ABSCISICO (HSA-ABA).

A) ACOPLAMIENTO (HSA-ABA)

El acoplamiento de la hormona con la proteína acarreadora se realizó según lo reportado por Fuchs y Mayak, en 1979, Walton en 1979 y Weiler en 1980. El acoplamiento se llevó a cabo en el carbono 1 de la molécula de ABA (figura 1). La metodología desarrollada fue la siguiente:

1a.- Se disolvieron 60mg de la mezcla racémica de ABA en 2.5ml de una solución 1:2 de dimetil formamida/agua destilada y se mantuvo a la oscuridad.

2a.- Por otro lado, se disolvieron 500mg de HSA en 4ml de agua destilada y se ajustó el pH de la solución a 8.5 con una solución de NaOH 0.1 N.

3a.- La solución preparada de HSA, se enfrió, y se le agregó gota a gota la solución de ABA manteniendo un pH cercano a 8.0 con una continua agregación de NaOH 0.01 N y finalmente la mezcla se ajustó a pH 8.0.

4a.- A la mezcla anterior de ABA/HSA se le agregó 26.25 mg. de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDMC) en 4 porciones cada 30 minutos.

5.- La mezcla se mantuvo en agitación a la oscuridad durante 24 horas a 4 grados centígrados.

6.- Transcurrido el tiempo, la mezcla se dializó durante tres días contra agua bidestilada (2 lts), con 2 cambios diarios.

7.- El dializado obtenido se almacenó en porciones de .5 ml (4mg-prot/ml). en viales estériles y se almacenaron -20 grados centigrados hasta su posterior uso.

B) CARACTERIZACION DEL CONJUGADO.

El acoplamiento obtenido se verificó por espectrofotometría y electrofóresis en acrilamida antes de realizar los esquemas de insunización. La metodología es la reportada por Hernández, 1987.

1.- ESPECTROFOTOMETRIA.

Se utilizó como base de verificación, el cambio de absorción del conjugado, contra los espectros de absorción de cada componente (ABA y HSA). El método se realizó de la siguiente manera:

1b.- Se obtuvo la proteína total del conjugado por el método de Bradford 1976 y se hizo un barrido espectrofotométrico de 200nm a 700nm con un intervalo de 4nm en un espectrofotómetro marca Philips (PU UV/vis 8710).

2b.- Se realizó un barrido de HSA libre, ajustando la proteína a la misma concentración de la obtenida para el conjugado (540ug).

3b.- El barrido para ABA libre se ajustó a una concentración de 1 µM.

2.- ELECTROFORESIS EN ACRILAMIDA.

Se utilizó el método reportado por González y Peñaloza en 1984 para condiciones no desnaturalizantes, y las de Lammeli, 1976 para condiciones desnaturalizantes, ambas con el objeto de verificar la movilidad relativa (Fr) de la proteína acarreadora libre con respecto al conjugado. La corrida electroforética se realizó para ambos métodos en geles de acrilamida al 7.5% según las siguientes condiciones.

1b.-Preparación de las muestras:

Para ambos casos se utilizaron muestras de la proteína acarreadora HSA y del conjugado ABA-HSA. Para la condición no desnaturizante las muestras fueron mezcladas con sacarosa al 2M y azul de bromofenol al 0.5% en una proporción de 3:5:1 respectivamente. Para las condiciones desnaturizantes las muestras se mezclaron con SDS al 10% (1:1) y se calentaron durante 5 minutos a baño maria, para después ser mezcladas con sacarosa 2M y azul de bromofenol al 0.5% en una proporción de 3:5:1 respectivamente.

2b.- Preparación de los tubos:

Se prepararon 24 tubos de 9.5cm de largo y 5mm de diámetro, a los cuales se les sembró 10µg de proteína para ambos casos: conjugado y proteína acarreadora.

3b.- Condiciones de corrida:

La corrida se llevó a cabo a 4 grados cent. utilizando un buffer de corrida de Tris-Glicina 0.1 M pH 8.3, para el caso de las condiciones no desnaturizantes y para la condición desnaturizante se utilizó un buffer de Tris-Glicina 0.025M, SDS 0.1% a pH de 8.3. Durante la corrida se mantuvo un voltaje 3-4 volts por tubo. La corrida se detuvo a 1/2 cm. antes de que el frente de corrida llegara al final y se marcó su posición con un alambre de acero inoxidable.

4b.- Tinción de los geles:

Los geles se tiñeron a temperatura ambiente durante 12 horas utilizando una solución de azul de Coomassie (G25) al .1%, disuelta en una solución de metanol 50% y ácido acético al 7%.

5b.-Decoloración de los geles :

Los tubos se decoloraron a temperatura ambiente durante 12 horas en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

II.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL CONJUGADO HSA-ABA.

A) PROTOCOLO DE INMUNIZACION.

Se utilizaron 3 conejos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 5kg de peso, en los cuales se probaron 3 cuadros de inmunización (A,B Y C), según las siguientes especificaciones:

PROTOCOLO " A "

INMUNIZACION	DIA	ESPECIFICACIONES
1.-	0	0.5ml de conjugado (4mg prot./ml) + 0.5ml de adjuvante completo de Freund. Inmunización subcutanea en 2 puntos del lomo.
2.-	7	0.5ml de conjugado (4mg prot/ml) + 0.5 ml 0.5ml de adjuvante incompleto (aceite mineral). Inmunización subcutanea en 2 puntos del lomo.
3.-	14	Las mismas del punto anterior.
S A N G R A D O	21	Punción cardiaca 20 ml

PROTOCOLO " B "

INMUNIZACION	DIA	ESPECIFICACIONES
1.-	0	0.5ml de Conjugado (4mg prot/ml) + 0.5ml de adjuvante completo de Freund. Inmunización subcutanea en 2 puntos del lomo.
2.-	15	0.5ml de conjugado (4mg prot./ml)+ 0.5ml adjuvante incompleto. Inmunización igual al punto anterior.
3.-	30	Las mismas que la de la segunda inmunización.
4.-	31	0.5ml de conjugado (4mg prot./ml) + 0.5 ml de sol. Salina .85% pH 6.8. Inmunización igual al punto anterior.
5.-	32	Las mismas del punto anterior.
6.-	33	Las mismas del punto anterior.
S A N G R A D O	40	Punción cardiaca 20ml.

PROTOCOLO " C "

INMUNIZACION	DIA	ESPECIFICACIONES
1.-	0	0.5ml de conjugado (4mg prot/ml) + 0.5ml de adjuvante completo de Freund. Inmunización subcutanea en 10 sitios localizados del lomo.
2.-	10	0.5ml de conjugado (4mg prot/ml) + 0.5ml de adjuvante incompleto. Inmunización igual al punto anterior.
3.-	20	La misma que el punto anterior. Inmunización intramuscular en cada cadera.
4.-	30	La misma que el punto anterior.
S A N G R A D O	37	Punción cardiaca 20 ml.

B) SANGRADO Y SEPARACION DE SUERO.

Los conejos fueron sangrados por punción cardiaca, previamente anestesiados con .1ml de Pentobarbital comercial. Para el sangrado se utilizaron jeringas de 20ml con aguja hipodérmica del #20 heparinizadas. En cada sangrado se obtuvo solamente 20 ml de sangre por conejo, lo cual permitió mantener con vida al conejo. La sangre se depositó en tubos de ensaye y se almacenó a 4 grados centígrados durante 1 h para permitir que se formara el coágulo. Una vez formado, se separó con un aplicador de madera y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm. por 15 minutos para separar el suero del coágulo. Los sueros se almacenaron en frascos estériles a -20 grados centígrados hasta su posterior uso.

C) PURIFICACION DE LAS GAMA-GLOBULINAS.

Las gama-globulinas se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio de la siguiente manera:

1c.- Se preparó una solución de sulfato de amonio saturada en solución salina .85% y se le ajustó el pH a 7.8.

2c.- En agitación ligera pero constante, se le agregó al suero una cantidad de la solución de sulfato de amonio equivalente a la mitad de volumen obtenido. La solución obtenida se centrifugó a 3000rpm. por 5 min. para obtener las proteínas precipitadas (básicamente gamaglobulinas y algo de albúmina, Garvey 1977). El precipitado se resuspendió en solución salina .85% pH 7.8 hasta alcanzar el volumen original de suero. La purificación de las gamaglobulinas por este método se obtuvo repitiendo la precipitación una segunda y tercera vez con sulfato de amonio conservando las mismas condiciones.

3c.- El precipitado de la tercera centrifugación se resuspendió en una

solución de buffer salino de borato (BBS) a la mitad del volumen original de suero. La resuspensión se dializó durante 4 días contra 2 litros de BBS a 4 grados centígrados para limpiarla de las sales de amonio, realizándose dos cambios diarios de la solución dializante. El dializado se centrifugó a 3,000 rpm. durante 5 minutos y se desechó toda pastilla formada. Al sobrenadante conteniendo las gamaglobulinas se le midió la cantidad de proteínas por el método de Bradford, 1976. y se almacenó en viales esteriles en volúmenes de 0.5 ml. a -20 grados centígrados hasta su posterior uso.

D) CARACTERIZACION DEL ANTISUERO.

1.- DOBLE DIFUSION.

Se verificó cualitativamente la especificidad del anticuerpo contra el antígeno (conjugado HSA-ABA) a través de la técnica de doble-inmunodifusión de Duchtreloy (Garvey, 1977). El procedimiento fue el siguiente:

1d.- Se prepararon geles de agarosa al .1% disuelta en solución salina .85% pH 7.8 y se vaciaron en cajas petri de 5.5 cm de diámetro. En los geles sólidos se perforaron pozos de 2mm de profundidad y 3mm de diámetro, a una distancia de 1cm entre si.

2b.- En cada pozo se sembraron 10µl de muestras según la siguiente disposición:

- 0.- Pozo del centro
(antisuero según el tratamiento).
- 1.- CONJUGADO HSA-ABA 5mg/ml
- 2.- HSA 0.1 %
- 3.- ABA 1.0 µM
- 4.- ABA 10 nM
- 5.- ABA 1.0 pM
- 6.- AGUA DESTILADA

3c.- Las cajas se depositaron en una cámara húmeda a 4 grados centígrados para permitir la difusión y los resultados se verificaron a las 24 hrs.

4d.- Las placas positivas se dializaron durante 24 h en cada una de las siguientes soluciones: a) solución salina 1% b) solución salina solución.

2) INMUNOELECTROFORESIS EN AGAROSA.

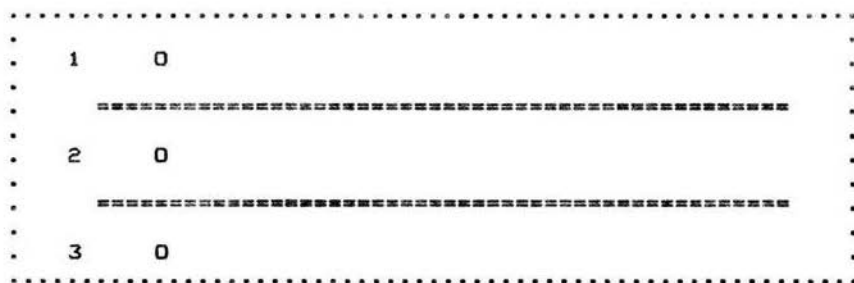
La especificidad del antisuero, así como algunas características del antígeno (movilidad), se verificaron por inmunolectroforesis en agarosa (Reyes Reali, 1990). El método utilizado es el siguiente:

1a.- Se preparó un gel de agarosa al 1% disuelto en bufer de Barbituratos comercial (Sigma Chemical).

2b.- Utilizando un sacabocado de 5mm de diámetro y par de navajas a 2mm de distancia, se realizaron una serie de perforaciones sobre la placa y se sembraron los siguientes antígenos, según el siguiente esquema:

POZOS

- 1) 5 mg/ml conjugado
- 2) HSA 0.1%
- 3) Agua destilada



3b.- La inmunolectroforesis se realizó a cuatro grados centígrados y a un voltaje de 100 mV, utilizando como buffer de corrida, un buffer

de Barbituratos comercial (Sigma Chemical) pH 8.6 Terminada la corrida se retiró el gel de las perforaciones a lo largo de la placa y el pozo se llenó con el antisuero según el tratamiento y se permitió la libre difusión del mismo, poniendo la placa en una cámara húmeda a cuatro grados centígrados durante 24 horas.

4b.- Las placas positivas se dializaron durante 3 días para eliminar el exceso de proteínas colocandose en las siguientes soluciones: a) Día 1; sol. salina 1% b) Día 2; sol. salina .85% c) Día 3; agua destilada. Se realizaron dos cambios de cada solución diariamente.

5b.- Los geles dializados, tanto los de la doble difusión, como los de la inmunolectroforesis se depositaron en placas de vidrio transparente según su tamaño y se pusieron a secar en una estufa a 37 grados centígrados durante 24 h. para después teñirse directamente.

6b.- Los geles fueron teñidos durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de azul de Coomassie GR25 al 0.1% en una solución de Metanol al 50% y ácido Acético al 7.0%. Los geles teñidos fueron decolorados a temperatura ambiente durante 12 horas con una solución de Metanol 50% y ácido Acético al 10%. Los geles teñidos se secaron a temperatura ambiente.

3) TITULO DEL ANTISUREO CONTRA EL ANTIGENO (CONJUGADO HSA-ABA)

La determinación del título mínimo de detección del antisuero se llevó a cabo utilizando la técnica de precipitación en tubo capilar reportada por Garvey, 1977.

1d.- Se prepararon las siguientes diluciones del conjugado utilizando solución salina al .85% pH 7.8 :

TUBO	DILUCION
1	1:1
2	1:2
3	1:4
4	1:8
5	1:16
6	1:32
7	1:64
8	1:128
9	1:256

2d.- Utilizando un tubo capilar, se llenó éste hasta 1/3 con antisuero sin diluir (según el tratamiento) y se giró 180 grados, por capilaridad se tomó la primera dilución del conjugado llevando el volumen del capilar hasta 2/3, y se mezcló repetidamente por inversión. Esto se hizo para cada una de las diluciones.

3d.- Cada uno de los tubos se depositó en una gradilla de plastilina y se incubaron a 4 grados centígrados durante 24 horas.

4d.- Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos capilares se taparon por uno de sus extremos con plastilina y se centrifugaron dentro de un tubo de ensaye a 500rpm. durante 10 minutos.

5d.- El precipitado obtenido en cada tubo se midió en milímetros con un vernier y se graficó contra la dilución del conjugado.

4.- INHIBICION POR HAPTENO (Fuchs y Mayak, 1972)

1d.- Curva de precipitación.

a) Se prepararon en tubos de microcentrífuga de 0.5ml las siguientes diluciones del antígeno (conjugado HSA-ABA) en un buffer salino de

fosfatos (PBS), y se le adicionó 100µl del antisuero según el tratamiento y se ajustó el volumen final a 200µl con PBS (ver cuadro 1).

b) Los tubos se incubaron a baño maría a 30 grados centígrados durante 15 minutos y terminado el tiempo se almacenaron a 4 grados centígrados durante 24 horas.

c) Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm. durante 3 minutos y el precipitado se resuspendió en PBS pH 7.4. El procedimiento se repitió 3 veces para lavar la pastilla.

d) La pastilla de la tercera centrifugación se resuspendió en 1 ml de una solución de NaOH 0.1N y se leyó su absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro (Espectronic 21). Con los datos se construyó la curva de precepitación del antígeno a volumen constante del antisuero.

TUBO	CONJUGADO (mg prot)	ANTISUERO	PBS pH 7.4
A	0.0	100 µl	100 µl
B	150	0.0 µl	170 µl
1	25.8	100 µl	194 µl
2	38.7	100 µl	191 µl
3	51.6	100 µl	188 µl
4	64.5	100 µl	185 µl
5	77.4	100 µl	182 µl
6	90.3	100 µl	179 µl
7	103.2	100 µl	176 µl
8	116.1	100 µl	173 µl
9	129.0	100 µl	150 µl

CUADRO 1. CURVA DE PRECIPITACION.

2d.- Curva de inhibición por hapteno.

a) En tubos de centrifuga de 0.5ml se prepararon diluciones del hapteno (ABA) en PBS pH 7.4 ajustando el volumen final a 190 μ l y entonces se le adicionaron 100 μ l del antisuero según el tratamiento (ver cuadro 2), hecho ésto, los tubos fueron incubados en baño maría a 30 grados cent. durante 15 min.

TUBO	ANTISUERO	INHIBIDOR ABA (7.5671 nmoles/ml)	PBS	ANTIGENO (ABA-HSA) (5 mg prot/ml)
1	100 μ l 0.0 190 μ l 10 μ l
2	100 μ l 0.0378 185 μ l 10 μ l
3	100 μ l 0.0757 180 μ l 10 μ l
4	100 μ l 0.1135 175 μ l 10 μ l
5	100 μ l 0.1513 170 μ l 10 μ l
6	100 μ l 0.3027 150 μ l 10 μ l
7	100 μ l 0.4540 130 μ l 10 μ l
8	100 μ l 0.6054 110 μ l 10 μ l
9	100 μ l 0.7567 90 μ l 10 μ l
10 ...	100 μ l 1.1357 40 μ l 10 μ l

CUADRO 2. INHIBICION POR HAPTENO.

b) Transcurrido el tiempo de la primera incubación, a cada uno de los tubos se les agregó 10 μ l del antígeno (Conjugado 5mgprot/ml) y se incubaron por segunda vez a 30 grados centígrados durante 15 min. Terminado el tiempo de incubación, los tubos se almacenaron a 4 grados centígrados durante 24 horas.

c) Los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm. durante 3 minutos y la pastilla se resuspendió en PBS pH 7.4, repitiendo este procedimiento

tres veces para lavar la pastilla. La pastilla de la tercera centrifugación se resuspendió en 1ml de NaOH 0.1N y se leyó a 280nm.

III.- INMUNOCITOLocalIZACION EN PLANTAS.

A) MATERIAL VEGETAL.

Las plantas de Vicia faba se crecieron desde semilla en un invernadero externo del Campus de la ENEP-Iztacala durante los meses de Septiembre a Octubre de 1992, bajo un fotoperíodo natural. Las plantas fueron crecidas en un sustrato compuesto de una mezcla de agrolita y tierra negra (1:1), siendo regadas con agua corriente cada tercer día.

B) TRATAMIENTO: INDUCCION DE LA SINTESIS DE ABA.

La inducción de la síntesis de abscisico en las hojas, fue llevada a cabo según lo reportado por Harris y Outlaw, en 1991. El método consistió en lo siguiente:

1b.- Las plantas fueron colectadas al final del periodo de luz natural (6:00 PM) y fueron transportadas al laboratorio. Se cortó rápidamente la cuarta hoja bifoleada (de aproximadamente 4 a 5 semanas de emergencia) y ambas se pesaron en fresco en una balanza analítica.

2b.- Una de las hojas se tomó como control, para lo cual fue envuelta en una toalla absorbente saturada de agua y se guardó en una bolsa negra humedecida, la cual se selló perfectamente.

3b.- La otra hoja fue puesta en una corriente de aire caliente y se monitoreó su peso continuamente, cuando hubo perdido el 12% de su peso fresco, la hoja se envolvió en una toalla absorbente seca y se colocó en una bolsa negra humedecida. Este procedimiento tomó aproximadamente de 30 a 45 minutos. Cada uno de los tratamientos se hicieron por

triplicado, a la cuarta, quinta y sexta semana de emergida la cuarta hoja bifoleada.

4b.- Las hojas en las bolsas negras según su respectivo tratamiento fueron incubadas en esta condición durante 12 horas a una temperatura de 25 grados centígrados y en completa oscuridad.

5b.- Transcurrido el tiempo se dispuso a obtener la epidermis.

C) OBTENCION DE LA EPIDERMIS.

Las epidermis fueron obtenidas según el método reportado por Travis en 1981, el cual permite obtener un mayor número de células epidérmicas y guarda vivas. La metodología consistió en lo siguiente:

1c.- Para cada una de las hojas según el tratamiento se obtuvieron tiras de tejido foliar libre completamente de nervaduras de aproximadamente 5mm X 40mm.

2c.- La tira de hoja se colocó sobre una superficie plana. Dejando un extremo libre de 5mm como solapa para jalar la epidermis, se hizo un corte transversal en la parte adaxial sin llegar hasta el extremo opuesto de la parte abaxial.

3c.- Tomando la tira del extremo libre de 5mm se jaló la epidermis en un ángulo de 90 grados y con un movimiento lento para obtener una porción de epidermis de 30 a 25mm de largo y 5mm de ancho.

4c.- Una vez obtenida la epidermis, se limpió con un pincel del número cero por la parte adherida al tejido foliar con el propósito de quitar todo resto de célula del mesófilo. Todo el proceso tomó aproximadamente 3 minutos por epidermis. Por cada hoja se obtuvieron un mínimo de tres epidermis.

5c.- Las epidermis obtenidas fueron puestas en agua destilada en hielo (2 grados centígrados). Esto con el propósito de que la

salida de la hormona hacia el medio externo fuera la mínima (Weiler et al, 1982).

D) INMUNOCITOLocalización.

La localización de la hormona en las células guarda fue realizada por el método de inmunofluorescencia indirecta, utilizando como anticuerpo primario el generado contra el conjugado HSA-ABA y como secundario, un anticuerpo comercial contra IgG de conejo, generado en Chivo y purificado por columna de afinidad, y al cual se le ha acoplado isocianato de fluoresceína (FTIC) (Sigma Chemical Co.). Los resultados fueron examinados en un microscopio óptico y de contraste de fases marca Nikon (OpiPhot II) con un equipo de epifluorescencia (lámpara mercurio de 100W y filtro de corte de 482nm) y fotografía integrado. Las imágenes fueron fotografiadas utilizando rollos de ASA 100 y 400 a color.

Debido a que Madhavan y Smith en 1982, Roberts, H. en 1986 y Zemel en 1988 reportan que los anticuerpos son incapaces de penetrar la pared celular y los cloroplastos y por otro lado Weiler en 1983 y Outlaw en 1991 reportan que la hormona se libera al medio en que la epidermis está incubada, se montaron las técnicas por ellos descritas, modificando y combinando con lo reportado por Sotta et al en 1983 y Curvetto en 1986.

1d.- PREINCUBACION CON CELULASA AL 5%.

Se preparó celulasa (Sigma Chemical Co. obtenida de Aspergillus sp.) al 5% en PBS a pH 5.0, el anticuerpo primario se utilizó sin diluir, el anticuerpo secundario fue diluido 1:20 en PBS pH 7.4. La metodología fue la siguiente:

a) Se lavaron las epidermis en agua destilada fría durante 30 minutos

después de su obtención. Cada tratamiento fue tratado por separado.

b) Las epidermis fueron entonces incubadas en celulasa al 5% durante 10 minutos a 30 grados centígrados en baño maría.

c) Terminado el tiempo de incubación en celulasa, las epidermis fueron lavadas en 30ml de agua destilada fría durante 15 minutos.

d) Las epidermis fueron incubadas en tubos de microcentrífuga de 0.5ml con 50µl de anti-ABA durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente (25 grados centígrados).

e) Al término del tiempo de incubación, las epidermis fueron lavadas durante 15 seg. en agua destilada fría y transferidas a 30ml de PBS frío pH 6.0 e incubadas durante 30 minutos para lavar el exceso de anticuerpo no incorporado.

f) Las epidermis fueron transferidas a tubos microcentrífuga de .5ml e incubadas con 80µl de anti-IgG marcada con FITC durante 90 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente.

g) Terminado el tiempo de incubación las epidermis fueron lavadas durante 15 seg. en agua destilada fría y transferidas a 30ml de PBS frío pH 6.0, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

h) Las epidermis fueron montadas en luz tenue, en una solución de glicerina al 50% y el cubre objetos fue sellado con esmalte transparente para uñas. Los ensayos fueron observados en un tiempo no mayor de 12 horas.

2d.- PREINCUBACION CON DIMETIL-AMINOPROPIL CARBODIMIDA (EDMC) Y GLUTARALDEHIDO.

Se preparó una solución de EDMC al 2% , glutaraldehido al 1% en agua destilada y celulasa al 5% en PBS pH 5.0. El anticuerpo primario se utilizó sin diluir y el secundario en una dilución 1:20 en PBS pH

7.4. La metodología fue la siguiente:

- a) Se lavaron las epidermis en agua destilada fría durante 30 minutos después de su obtención. Cada tratamiento fue ensayado por separado.
- b) Las epidermis fueron incubadas en 10 ml de EDMC al 2% durante 30 minutos a 4 grados centígrados.
- c) Terminado el tiempo de incubación las epidermis fueron lavadas en 30ml de agua destilada fría durante 5 minutos para quitar el exceso de EDMC.
- d) Las epidermis fueron incubadas en glutaraldehído al 1% durante 2 horas a 4 grados centígrados.
- e) Terminado el tiempo de incubación las epidermis fueron lavadas en 30 ml de agua destilada fría para quitar el exceso de glutaraldehído.
- f) Las epidermis fueron entonces incubadas en celulosa al 5% durante 10 minutos a 30 grados centígrados en baño maría.
- g) Terminado el tiempo de incubación en celulosa las epidermis fueron lavadas en 30ml de agua destilada fría durante 15 minutos.
- h) Las epidermis fueron incubadas en tubos de microcentrífuga de 0.5ml con 50µl de anti-ABA durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.
- i) Transcurrido el tiempo de incubación las epidermis fueron lavadas durante 15 seg. en agua destilada fría y transferidas a 30ml de PBS frío pH 6.0 durante 30 minutos para quitar el exceso de anticuerpo no incorporado.
- j) Las epidermis fueron transferidas a tubos de microcentrífuga de 0.5ml e incubadas con 80µl de anti-IgG marcada con FITC durante 90 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- k) Terminado el tiempo de incubación las epidermis fueron lavadas

durante 15 seg. en agua destilada fria y transferidas a 30 ml de PBS frio pH 6.0 para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

1) Las epidermis fueron montadas en luz tenue, en una solución de glicerina al 50% y el cubre objetos fue sellado con esmalte de uñas transparente.

3d.- CONTROLES.

Para ambas metodologías se montaron controles individuales que consistieron en la omisión de la incubación con celulasa, EDMC, glutaraldehido y el anticuerpo primario, incubandolas en su lugar en una solución de PBS pH 6.0 para todos los casos.

RESULTADOS Y DISCUSION .

(A) CARACTERIZACION DEL CONJUGADO ALBUMINA SERICA DE HUMANO Y ACIDO ABCISICO:

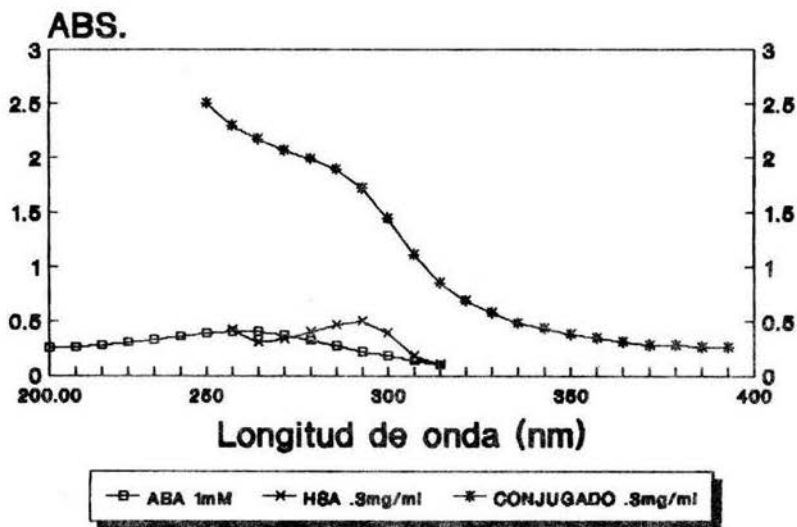
Substancias de un peso molecular menor a 1000 no son ordinariamente antigénicas; a estas substancias se les conoce como Hapténos (Erlanger, 1980). ABA con un peso de 264.3 no genera una respuesta inmunológica, sin embargo si se acopla a una molécula acarreadora, se puede inducir una respuesta inmunogénica contra la hormona vegetal (Fuchs y Mayak, 1972). La explicación de esto radica en la teoría de que en las etapas primarias de inmunización se requiere de la cooperación entre los linfocitos T y B. Los linfocitos T son los que se unen con la substancia extraña y la presentan como un antígeno de superficie a los linfocitos B dando origen a anticuerpos contra éstos. Esta cooperación es imposible si el antígeno es tan pequeño que el contacto entre las dos células no se puede dar; sin embargo, un complejo de un antígeno con un acarreador adecuado se convierte en un inmunogénico activo. Los anticuerpos producidos en respuesta a una inmunización con conjugados de haptenos, generalmente "reconocen" aquella parte del hapteno que está más alejada del punto de unión con el acarreador, lo cual determina su especificidad (Hurn y Chantler, 1980).

Las características del conjugado formado y los anticuerpos generados fueron las siguientes:

1a.- Espectrofotometría.

Como se muestra en la grafica 1, el espectro de absorción para el ácido abscísico muestra un pico máximo a 244.8 nm de longitud de onda, la albúmina sérica de humano un pico máximo a 278nm y el conjugado de

HSA-ABA presenta un rango de absorción entre los 250 y 300nm, con un pico a los 275nm.



GRAFICA 1.- Espectro de absorción del ácido absísico (1μM), albúmina sérica de Humano (0.3mg) y el conjugado HSA-ABA (0.3mg).

Los espectros de absorción de los componentes muestran una diferencia marcada con el conjugado, sin embargo el hecho de que el cambio de absorción del conjugado se deba simplemente al acoplamiento entre HSA-ABA no es una prueba definitiva. Esto es, a diferencia del método reportado por Hernández en 1987, en donde el acoplamiento era de tipo específico, el utilizado en esta investigación es inespecífico. Como se muestra en la figura B, el acoplamiento entre ABA y HSA está dado entre los grupos amino de la proteína

acarreadora y el carboxilo de la hormona (C1). Sin embargo, puede existir unión inespecífica entre los grupos amino y carboxilo propios de la molécula de proteína, lo cual generaría cambios en la conformación espacial de la proteína, y aun más, pudiendo desarrollar, dimeros, trimeros, tetrameros (n...mol) de proteína. Por lo cual, la validación del acoplamiento no puede estar dada solamente en el cambio de absorción del conjugado contra sus componentes, sino también en la verificación del cambio en peso molecular del conjugado con respecto a sus componentes.

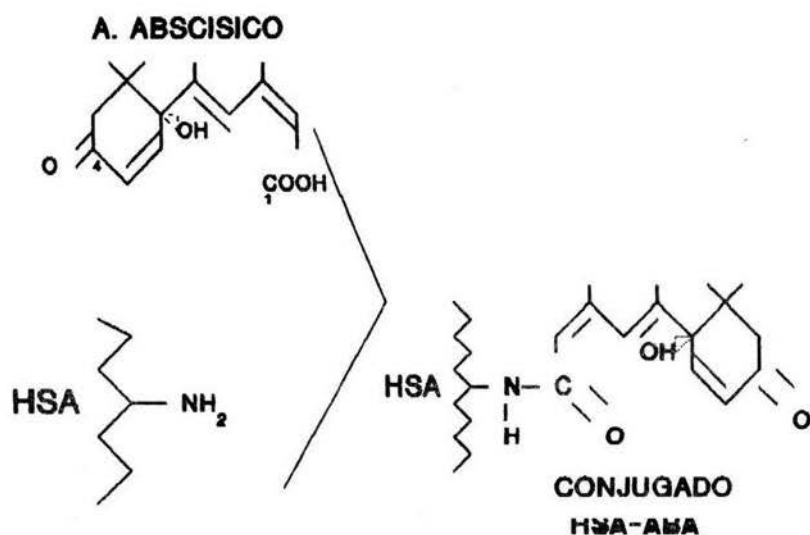


Figura 8.- Síntesis y estructura propuesta para la conjugación entre ABA-C1-HSA, utilizando EDMC como acoplante. Tomado de Weiler, 1980.

2a.- Electrofóresis.

La electrofóresis para la albúmina sérica de humano, en condiciones no desnaturizantes, (fig. 9) muestra una banda de mayor concentración, que corresponde al monómero de la molécula con un Rf de 0.416 \pm 0.02 y una en mucho menor concentración, con un Rf de 0.250 \pm 0.014, que es el un dímero de la molécula. En la condición desnaturizante, se encontró un Rf de 0.369 \pm 0.002 para el monómero de HSA. Para el caso de el conjugado, se encontraron bandas correspondientes hasta tetrameros de la molécula debido a la unión inespecífica entre la moléculas de HSA, tal y como se discutió en la parte de espectrofotometría. Para la condición no desnaturizante, el monómero presentó un Rf de 0.368 \pm 0.010 y el dímero de 0.184 \pm 0.011 y para la condición desnaturizante el monómero presentó un Rf de 0.366 \pm 0.001 (figura 9). Como se puede observar, el cambio en la movilidad del conjugado está dado en gran parte por el rearrreglo de la proteína acarreadora y en menor proporción, debido a la ganancia de peso por el acoplamiento de la molécula de ABA (Tabla 1). Aun cuando no se cuantificó, se ha reportado, utilizando esta técnica de acoplamiento con la mezcla racémica de ABA, que por cada molécula de la proteína acarreadora HSA se unen 18 (Fuchs y Mayak, 1972), 17.5 (Daie y Wyse, 1982), 10 (Weiler, 1982) y 6 (Kannangara *et al*, 1989) moléculas de ABA; De esta manera, si se considerara una media de acoplamiento de 13 moléculas de ABA por cada una de HSA, la ganancia neta en peso sería de 73436 P.M., si tomamos como peso molecular de la HSA 70,000 y el de ABA de 264.3. Como se puede observar el cambio en el peso no es muy alto y por ende el cambio que se puede notar en los Rf. de la proteína acarreadora y el conjugado son también bajos.

Por otro lado, Landsteiner en 1945 (autor citado por Erlanger, 1980), determinó cuantos grupos hapténicos deben estar en la molécula acarreadora para desarrollar una buena respuesta antigénica, y encontró que muy pocos y muchos daban una respuesta pobre. Para albúmina sérica encontró que alrededor de diez grupos antigénicos, generaban una buena respuesta inmunológica. De esta manera podemos decir que en número de grupos antigénicos reportados para el acoplamiento ABA-HSA vía el carbono 1 con EDMC, están dentro del rango propuesto por el autor antes mencionado.

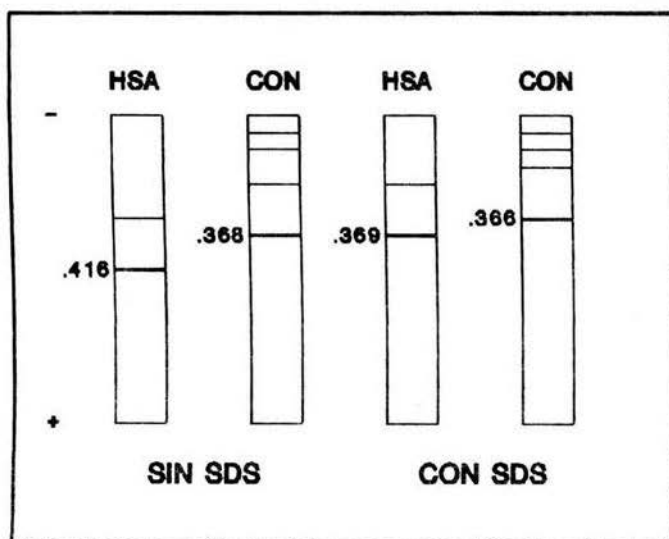


FIGURA 9.- Electroforesis en geles de poliacrilamida 7.5% para condiciones desnaturizantes (SDS) y no desnaturizantes. Conjugado 10ug-prot/ml, HSA 10ug-prot/ml

COMPUESTO	***** SDS (-)	Rf	***** SDS (+)
HSA	0.416 +/- .02		0.369 +/- .002
CONJUGADO ..	0.368 +/- .01		0.366 +/- .001

Tabla 1.- Relación de los Rf encontrados para los monomeros de HSA y el Conjugado en electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.0%, bajo condiciones no desnaturalizante y desnaturalizantes. HSA 10ug-prot/ml, Conjugado 10ug-prot/ml.

(B) OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL CONJUGADO HSA-ABA.

1B.- Protocolo de inmunización.

Como ya se describió en la metodología, se probaron tres esquemas de inmunización; la razón de ésto es que se desconocía la respuesta del inmunogénico (conjugado), además que la bibliografía consultada no daba detalles en cuanto a los tiempos de inmunización. La diferencia entre cada esquema de inmunización está dada en la ruta de inmunización, el número de sitios de inmunización y la espaciación entre cada refuerzo. En un primer acercamiento a la obtención del antisuero contra el conjugado, se probaron los tres esquemas propuestos; al término de cada uno se probó la existencia de anticuerpos dirigidos contra el conjugado a través de una doble difusión de Duchtreloy . Se encontró una respuesta positiva muy baja y sólo contra el conjugado en el protocolo " C ", por lo que se optó por dar un refuerzo a cada tratamiento diez días después del primer sangrado de oscultamiento (esto es un sangrado inicial por la vena lateral del pabellón del oído y donde solo se extraen de 1 a 3 ml de sangre). A los siete días del refuerzo, se volvió a hacer un sangrado

de oscultamiento y sólo se encontró respuesta positiva e incrementada en el protocolo " C ". Hurn y Chantler (1980), mencionan que la ruta de inmunización tiene un efecto directo en la eficiencia de la respuesta inmunogénica del organismo a un antígeno. Ellos proponen la siguiente serie de rutas de inmunización en orden descendente en su eficiencia inmunogénica: intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intraarticular, intranodal. Las razones principales en la diferencia de la eficiencia, es la rapidez en la que el antígeno es desechado desde su lugar de inserción y la probabilidad de que éste pueda pasar a través de los nodos linfales y otros centros de actividad inmunológica. Por otro lado, Mayer y Walker (1987), mencionan que el método de inmunización en sitios múltiples utilizando las rutas subcutáneas e intramusculares, ofrece ventajas, ya que presenta el antígeno en variedad de rutas, provocando una respuesta inmune máxima. Harboe y Ingild (1973), mencionan que la inmunización intradérmica en el lomo del conejo genera mayores respuestas que otras rutas de inmunización (autor citado por Mayer y Walker, 1987). Una vez encontrado el mejor esquema de inmunización " C ", se inmunizaron tres conejos siguiendo este esquema; de esta manera, todos los resultados posteriores están dados por antisuero producido mediante el esquema " C ".

2B.- Título del Antisuero.

La respuesta de los conejos inmunizados con el conjugado HSA-ABA se encontró al tercer refuerzo según el esquema planteado, aunque los títulos no eran muy altos (1:100). Cabe mencionar además que para el ensayo final para la detección del ácido abscísico se utilizó el

el complejo de gamaglobulinas precipitadas con sulfato de amonio y no el suero completo.

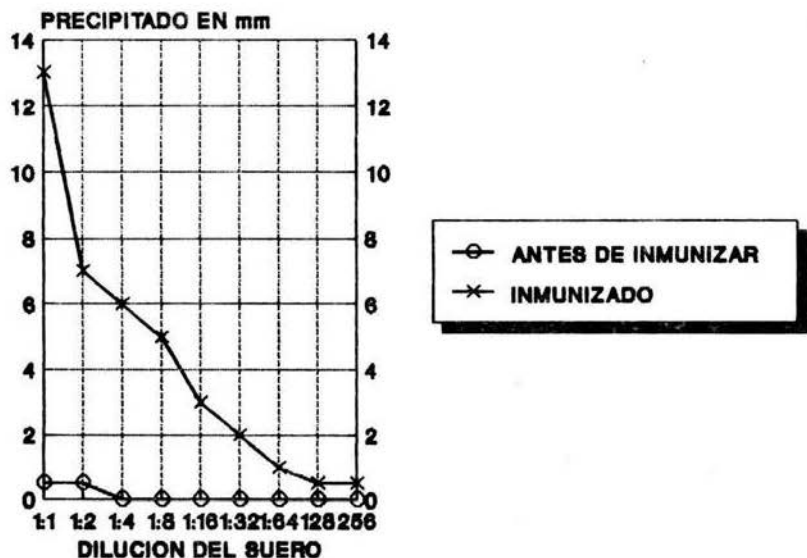


Figura 10.- Curva de titulo minimo de detección del antisuero "C" al cuarto refuerzo (40 días), según el protocolo de inmunización. Antígeno (conjugado) constante 4.0 mg/ml.

3B.- Caracterización del Antisuero.

a) Doble Difusión de Ouchtrelyony.

Como se observa en la figura 10, el arco de precipitación dado entre la proteína acarreadora libre (HSA) y el conjugado HSA-ABA es de identidad completa, lo que significa que en ambos antígenos se reconocen los mismos sitios. Se esperaría, como menciona Erlanger en 1980, que el acoplamiento del hapteno a la molécula acarreadora generará nuevos sitios antígenicos, sin embargo al parecer este no fue

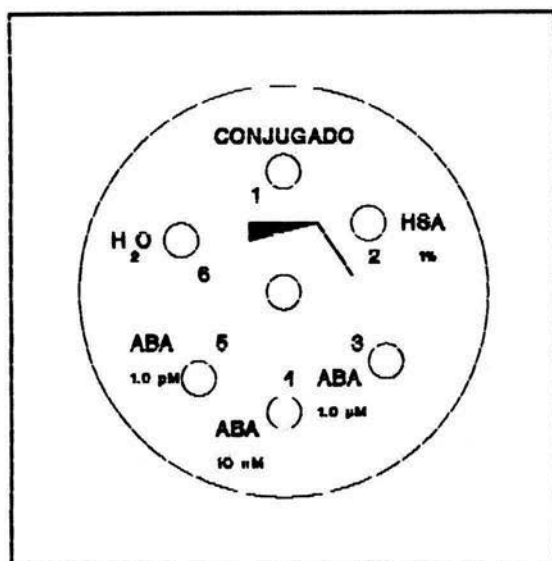


Figura 11.- Doble inmunodifusión. Se observa que el antisuero total "C" reconoce tanto al HSA libre, como al Conjugado HSA-ABA, no siendo el caso para el Hapteno, ABA libre. HSA 1%, Conjugado 540 μ g-prot/ml, ABA 1.0 μ M, 10 nM, 1.0 μ M.

el caso, ya que cuando se incubó el antisuero en un exceso de HSA (5%) y se recuperó el sobrenadante, en este desaparecía la respuesta tanto para HSA libre, como para el conjugado, lo que indicaba que los sitios de reconocimiento eran los mismos. Esto resulta ventajoso, ya que Erlanger (1980) y Maldiney *et al* (1986), mencionan que los nuevos sitios que se pueden generar en la proteína acarreadora, por efecto del acoplamiento con EDMC, pueden ser mucho más inmunogénicos que los naturales y que los mismos sitios hapténicos. Por otro lado, uno pensaría que deberían formarse anticuerpos contra el puente HSA-ABA y

que éstos podrían ser parte de la respuesta de identidad parcial en los ensayos de inmunodifusión doble. Lo encontrado puede tener dos explicaciones, una es que este puente no sea inmunogénico o que la respuesta sea muy baja y por lo tanto no evidenciable a través de este método, que en si mismo es de baja resolución (Catty, 1988); y otra es, como Weiler (1979) menciona, por sus estudios de reacción cruzada con compuestos estructuralmente relacionados con ABA, que los anticuerpos generados en el acoplamiento HSA-ABA no involucran sitios relacionados o cercanos al brazo de acoplamiento entre el grupo amino de la proteína y el carboxilo de la hormona, sino solo el resto de la hormona no relacionada con el carbono 1.

4B.- Inmunolectroforesis.

Como se observa en la figura 12, se forma un arco de precipitación único para HSA, y uno muy evidente y otros muy tenues para el conjugado; sin embargo, la posición de las más evidentes para ambos antígenos difiere. La razón de esto es que la electroforesis en agarosa no involucra una separación por tamaño, sino más bien por peso y carga. Para este caso, la diferencia de peso, al menos de los monómeros de ambos antígenos, es mínima. La diferencia en la posición del arco de precipitación se debe a que la molécula del conjugado migra más por estar cargada negativamente. Esto se explica si consideramos que al acoplarse el hapteno, la molécula de HSA pierde cargas positivas, convirtiéndose en neutras, y al pH de la corrida la molécula se comporta como un anión. Esto es una prueba de que existen grupos hapténicos en la molécula de la proteína acarreadora.

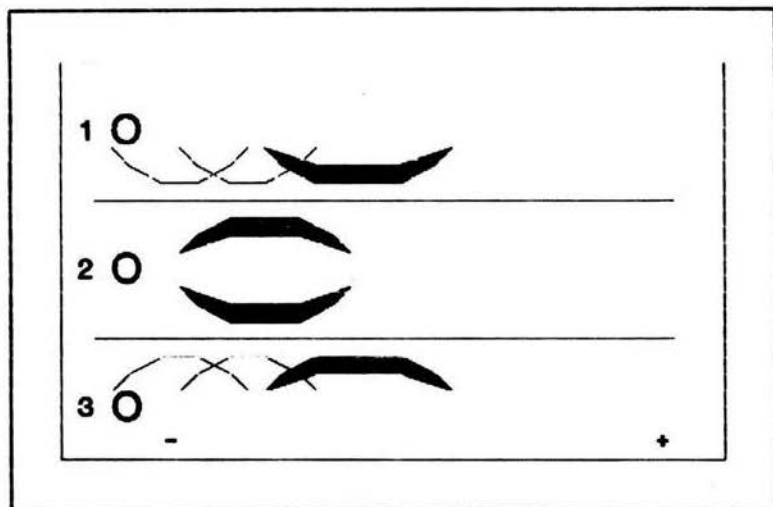


Figura 12.- Inmunolectroforesis en agarosa 0.1% . Pozo 1, Conjugado 4mg-prot/ml; Pozo 2, HSA 0.1% ; Pozo 3, Conjugado 4mg-prot/ml. Fosas paralelas: antisuero "C" completo.

5B.- Inhibición por Hapteno.

a) Curvas de Precipitación e Inhibición.

Como se puede observar en la figura 13 la zona de equivalencia para el anticuerpo completo aislado es de 103.2 ug-prot/ml. La figura 14 muestra que la reacción de precipitación es inhibida en un 25% por 0.0757 umoles de ABA libre. Dicho de otra manera, 100ul de gamaglobulinas anti-conjugado unen un máximo de 20ng de ABA libre.

Utilizando radioinmunoanálisis y ELISA, Daie y Wyse (1982), encontraron que cada 50 ul de suero obtenido por esta misma técnica unían 24.5pmol de ABA libre, el suero aislado por Weiler en 1979 unía de 0.1 a 5 ng, y el aislado por Kannangara et al 1989, 5 a 75 ng de ABA libre. Catty (1980), menciona que por la técnica de inhibición de la precipitación por hapténo, no se pueden resolver cantidades del antígeno mayores a 20ng ni y menores a 1 ng. Por lo anterior, la cantidad de ABA reconocida por el anticuerpo aislado, está dentro de los rangos reportados, sin embargo la cantidad mínima de detección se puede pensar es aún más alta que lo encontrado por el tipo de prueba usada.

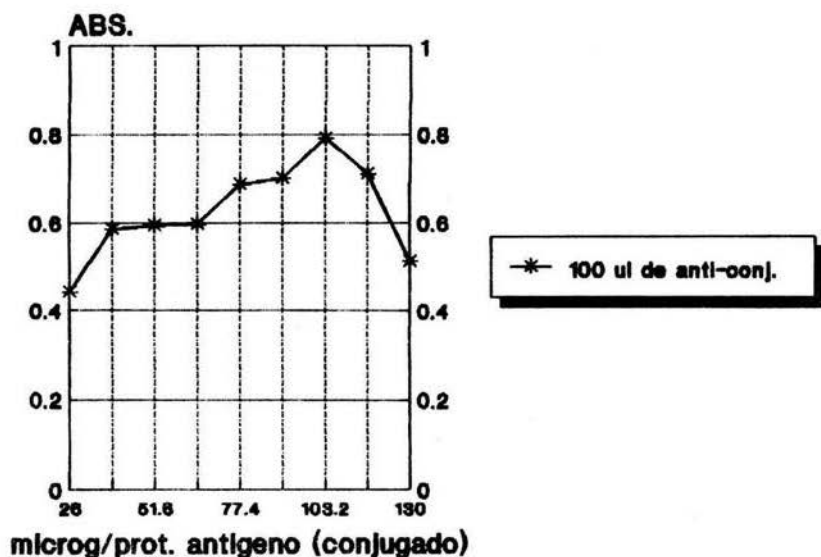


Figura 13.- Curva de Precipitación. Reacción de precipitación de anti-conjugado con HSA-ABA como antígeno. Antisero: gamaglobulinas totales, aisladas por precipitación con sulfato de Amonio.

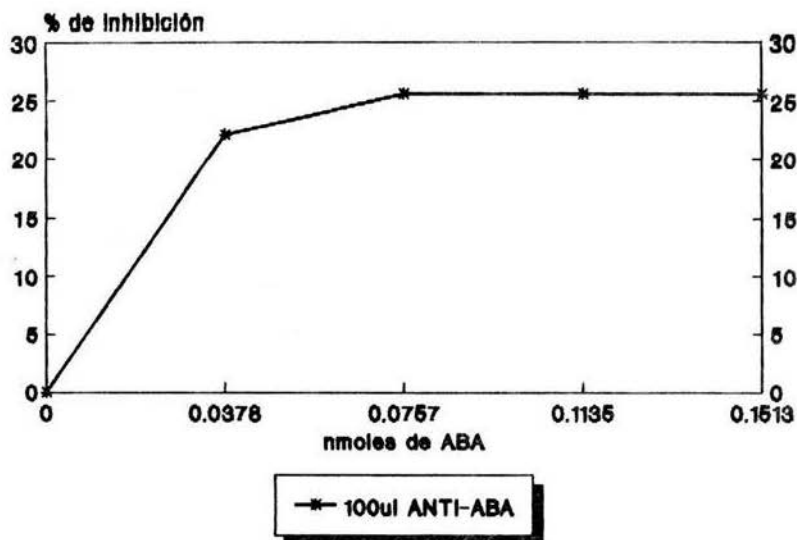


Figura 14.- Inhibición de la precipitación por Hapteno (ABA), en la reacción de anti-conjugado y el antígeno HSA-ABA.

Weiler (1979 y 1980) apunta que los anticuerpos generados por el acoplamiento de ABA a HSA via el carbono 1, no sólo reconocen a la molécula de ABA, sino a cualquier derivado de la misma, el cual haya solamente sufrido algún cambio en el carbono 1. De esta manera, los anticuerpos generados por medio del acoplamiento utilizado, reconocen en un 100% al enantiomero (+) de la molécula de ABA, al conjugado de ABA-Glucosa-ester y en menor cantidad, de un 40 a 60 %, al enantiomero (-) de ABA, por lo cual, Weiler en 1980, menciona que el acoplamiento via el C1 debe usarse cuando se pretende detectar ABA libre y ABA conjugada via su carboxilo, a diferencia del acoplamiento hecho en el carbono 4, el cual genera anticuerpos que exclusivamente reconocen ABA

libre. Por otro lado, cualquier otro compuesto de origen natural relacionado con la ruta de síntesis o degradación de ABA, en donde las modificaciones estén en cualquier otro sitio aparte del carbono 1 tienen una reacción cruzada muy baja con los anticuerpos generados por acoplamiento en C-1 (Walton, 1979; Weiler, 1979, 1980, 1982; Daie y Wyse, 1982); ejemplos de esto son: ácido fasético (0.16 %), ácido dihidroxifasético (0.12%), xanthoxina (0.0%), violaxantina (0.0%), farnesol (0.0%) y vomifoliol (0.0%) (Weiler, 1979) (ver figura 15).

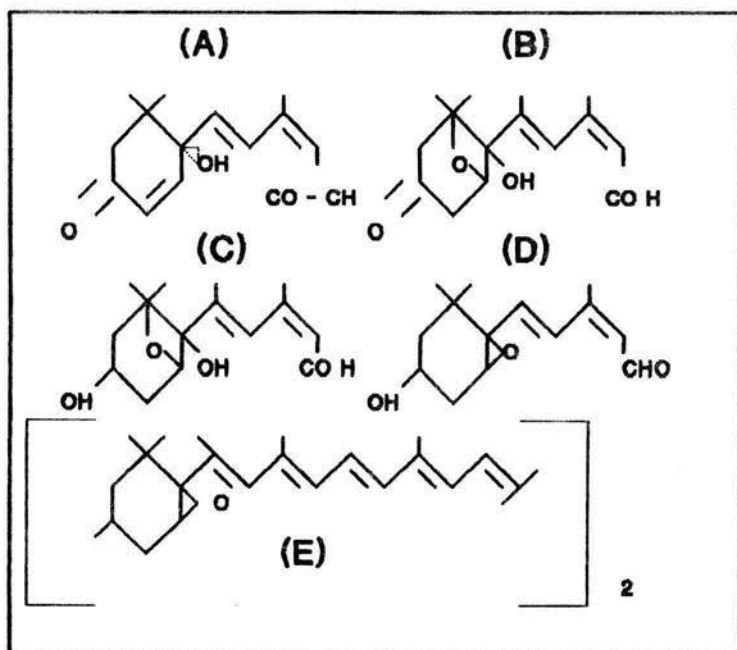


Figura 15.- Compuestos biosintéticamente relacionados con Acido Abscísico. (A) ABA-Metil ester (B) Acido Fasético (C) Acido Dihidroxifasético (D) Xanthoxina y (E) Violanxantina. (Tomado de Weiler, 1979).

C) LOCALIZACION CELULAR DEL ACIDO ABSCISICO.

1.- Preincubación con celulasa al 5%.

Como se mencionó en la metodología, los anticuerpos son incapaces de penetrar la pared celular (Roberts, 1986). La digestión ligera con celulasa ha sido utilizada para la obtención de protoplastos viables de células guarda de Vicia faba (Ken-Ichiro y Zeiger, 1985). Los resultados muestran que el uso de celulasa permite la penetración de los anticuerpos a la célula (figura 16), cuando se omitió el uso de celulasa, no se encontró marca positiva en los tratamientos de hojas estresadas (datos no mostrados). Cabe mencionar que los tiempos de digestión reportados en la metodología son los óptimos para la inmunolocalización en hojas de 4 a 5 semanas de emergidas; tiempos mayores de digestión, degradan excesivamente la pared, perdiéndose la viabilidad celular, lo cual se observa por una disgregación de los cloroplastos, y que Rogers en 1979 reporta como signo de pérdida de viabilidad; además de que la excesiva degradación de la epidermis hace prácticamente imposible su manipulación. Por otro lado, el uso de hojas de mayor tiempo de emergencia, modifica los tiempos de digestión de la epidermis, tal y como se reporta para la obtención de protoplastos de células guarda (Ken-ichiro y Zeiger, 1985).

El problema de auto-fluorescencia de la celulosa o la afinidad de la misma por el isocianato de fluoresceína libre, es casi totalmente eliminado por el uso de la digestión con celulasa, como lo han reportado Zemel y Gepstein en 1983.

2.- Preincubación con celulasa+ dimetil-aminopropil carbodimida (EDMC)

Sotta et al, en 1983, y Bertrand et al, en 1991, reportan el uso

de EMDC como fijador de la hormona en los sitios normales de localización en la célula, en cualquier condición; de esta manera, durante el procesamiento de la muestra, la pérdida o movimiento de la hormona sería el mínimo. Los resultados obtenidos, utilizando esta técnica, dieron lugar a falsos positivos, obteniéndose una fuerte tinción inespecífica del núcleo para todos los casos, tanto para el material estresado, como para el no estresado, así como para el control en donde se omitía el primer anticuerpo (anti-conjugado) (resultados no mostrados). El resultado de esta unión inespecífica se dio cuando se combinaba el EMDC+glutaraldehído y no cuando se omitía el EMDC. Desconocemos la razón de estos resultados. Para los casos bibliográficos mencionados, donde se utilizó EMDC+glutaraldehído+paraformaldehído, las técnicas de inmunolocalización, utilizaban cortes histológicos, donde el segundo anticuerpo estaba marcado con peroxidasa (Sotta et al, 1983) o con oro coloidal (Bertrand et al, 1991). Hernandez (1987), reporta que el uso de glutaraldehído o paraformaldehído puede dar falsos positivos, debido a que los fijadores modifican la estructura del tejido (en su caso de origen animal), y que la interacción se da más por carga que por afinidad del anticuerpo a su antígeno. Para nuestro caso desconocemos si los falsos positivos se deben a la unión inespecífica del segundo anticuerpo o a la modificación de proteínas o ácidos nucleicos, haciéndolos fluorescer en un rango de luz amarillo-verde, similar al de la fluoresceína.

Por lo anterior los resultados de la localización celular de ABA, estan dados utilizando solo células.

3.- CITOLocalIZACION DE ABA.

El ácido abscísico se distribuye en la célula de acuerdo a los pH de cada compartimento celular. En condiciones de turgencia celular y oscuridad, la mayor parte de ABA se encuentra en el cloroplasto (40.7%), y el resto distribuido en el citoplasma (32.4%), la vacuola (18.7%) y el apoplasto (8.2%) (Cowan et al, 1982, autor citado por Hartung et al, 1982). Harris et al, en 1988, encontraron que la cantidad de ABA en una célula guarda era de 70 attomoles, sin considerar el sitio de compartimentación. Behl y Hartung, en 1986, determinaron una cantidad de 45 attomoles por célula guarda de Valeriana locusa. Lo anterior se describe para señalar, que las cantidades de ABA por célula, en condiciones hídricas normales, es muy baja para la inmunodetección. Por otro lado, la clorofila es un pigmento que cuando se excita en un rango de luz actínica, es capaz de fluorescer en un pico de longitud de onda de 685nm (rojo). El problema que se presentó al examinar las células guarda de Vicia faba del grupo control, en el microscopio de epifluorescencia, usando una fuente luminosa de excitación de 100W y una longitud de onda de 482 (azul), fue que los cloroplastos fluorescían con una intensidad muy alta, como se observa en la figura 16, ya que la técnica de inmunodetección utilizada, permite que las células permanezcan viables hasta la observación de las muestras. De esta manera los cloroplastos de las células guarda fluorescieron tal y como lo hacen los cloroplastos del mesófilo (Zeiger, 1987). Por lo anterior, cualquier traza de ABA que pudiera localizarse en el citoplasma y el cloroplasto y que pudiera ser detectada por el anticuerpo marcado, sería fácilmente enmascarada por la autofluorescencia del cloroplasto, tal y como se observa en la figura 16.

Para el caso de las muestras estresadas hídricamente, se observó claramente una marca de fluorescencia distinta a la del grupo control (ver figuras 16, 17 y 18). La marca de fluorescencia, como se observa en la figura 17 y 18, se distribuye en la membrana celular, en la envoltura del núcleo y la envoltura del cloroplasto, sin embargo tampoco se encontró marca evidente en el citoplasma, esto último se puede explicar con lo siguiente: Como se mencionó en la metodología, las plantas fueron estresadas haciéndolas perder el 12% de su peso fresco, punto en el cual, el potencial de presión en las células del mesófilo y las células guarda es de cero (Harris et al., 1988 y Harris y Outlaw, 1991) . y en el cual se reporta, se da inicio a la síntesis de ABA en las células del mesófilo (Zeevaart, 1988 y Harris y Outlaw, 1991). Harris y Outlaw, en 1991, encontraron, que a este potencial de turgencia, las células guarda son también capaces de sintetizar ABA, antes de que esta llegue vía apoplástica desde el mesófilo y la raíz. Es óbvio pensar, que si la síntesis de ABA es citoplasmática (Hartung et al., 1982), parte de la marca debió localizarse en el citoplasma, sin embargo, si consideramos que una gran parte del ABA es liberado al apoplasto durante el estrés hídrico (Behl y Hartung, 1986) y por otro lado, la manipulación de la epidermis en medios líquidos, provoca que la hormona sea liberada poco a poco de la célula (Weiler et al., 1982 y Harris et al., 1988)., podríamos pensar que debido a esto, la cantidad de hormona en el citoplasma al final de la experiencia es prácticamente nula (Harris et al., 1988). Por lo anterior consideramos, que la hormona encontrada por inmunofluorescencia, es de una poza de hormona no libre, sino que se encuentra en interacción con las membranas antes mencionadas, lo cual impide su movilización, tal y

como lo describe Curvetto et al, 1986, para la inmunocitocalización de ABA en células de la epidermis de haba. La posible explicación de la localización de la la hormona en este experimento es la siguiente:

a) Localización a nivel de membrana plasmática.

Desde la descripción hecha por Fujino, en 1966, y Hsiao y Fisher, en 1967, de que el efecto de ABA en los niveles de potasio en el interior de la célula guarda era el mecanismo que explica la salida de agua, durante un cierre estomático, se consideró que el efecto de esta hormona repercutía en la permeabilidad de la membrana; a partir de esto, surgió la idea, de que la hormona podría interaccionar con algún receptor membranal (autores citados por Outlaw, 1983). Itai et al, en 1978, señalan que al inyectar ABA en el flujo transpiratorio, esta se acumulaba en todo el complejo estomático. Weyers y Hillman, en 1979, encuentran lo mismo, al flotar epidermis aisladas en una solución de ABA radioactiva. Sin embargo, estos dos acercamientos no describieron el lugar exacto de la acumulación o interacción de ABA. Heilman et al, en 1980, reportaron que ABA se distribuía libremente entre el citoplasma y el cloroplasto, de acuerdo al pH de cada compartimento. (autor citado por Kaiser y Hartung, 1981). Por otro lado, Kaiser y Hartung, en 1981, encontraron que la toma y liberación de ABA por las células de mesófilo dependía también del pH externo. Hartung, en 1983, considerando estos dos antecedentes, investigó la relación entre el cierre estomático y la toma de ABA dentro de la célula. Hartung encontró dos cosas: (1) No existe relación entre el efecto de ABA en la inducción del cierre y el

(1)

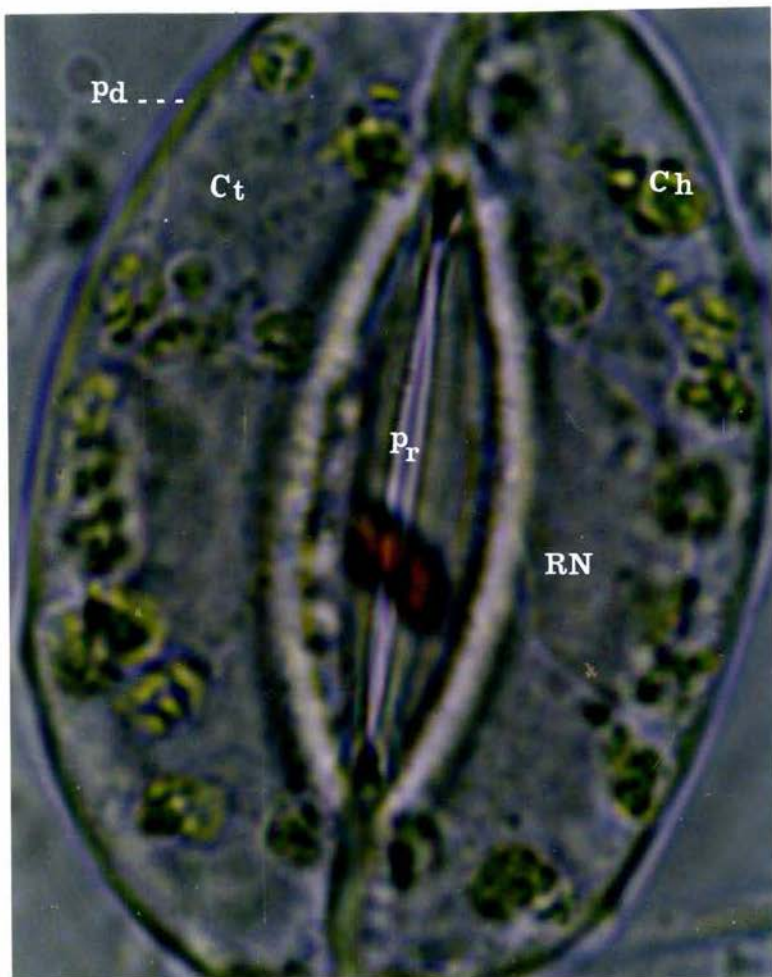


FIGURA 16.- LA FIGURA MUESTRA LAS CELULAS GUARDA DEL TRATAMIENTO CONTROL (1000X). SE OBSERVA EN LA FOTOGRAFIA A CAMPO CLARO (1), LOS CLOROPLASTOS DE LA CELULA Y UNA REGION NUCLEAR OPTICAMENTE MAS DENSA. Ch: CLOROPLASTOS; Ct: CITOPLASMA; Pr: PORO ESTOMATICO; RN: REGION NUCLEAR; Pd: PARED CELULAR.

(2)

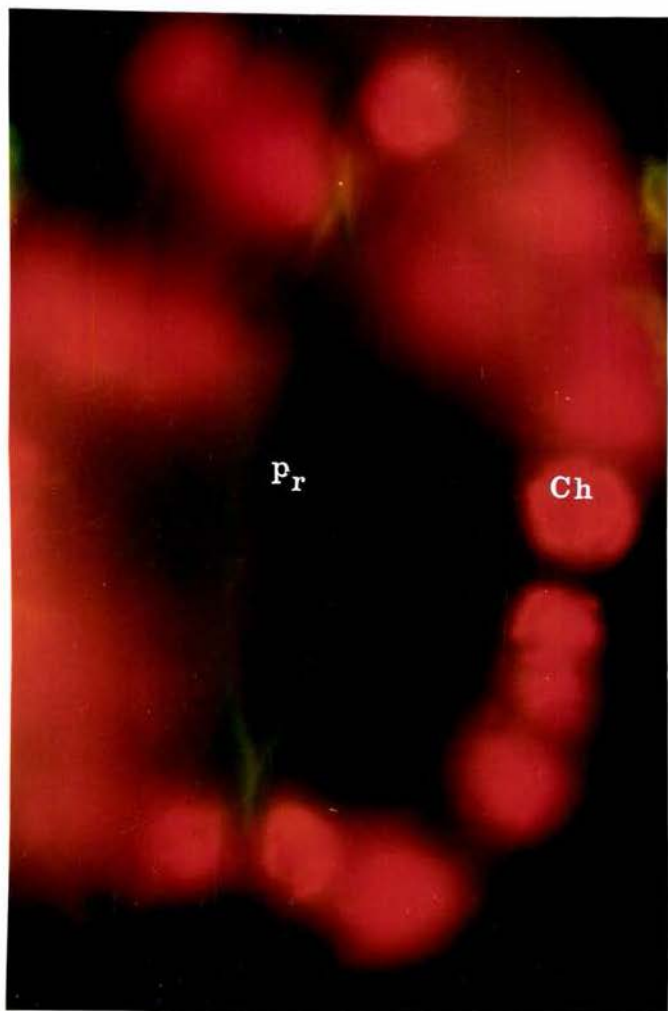
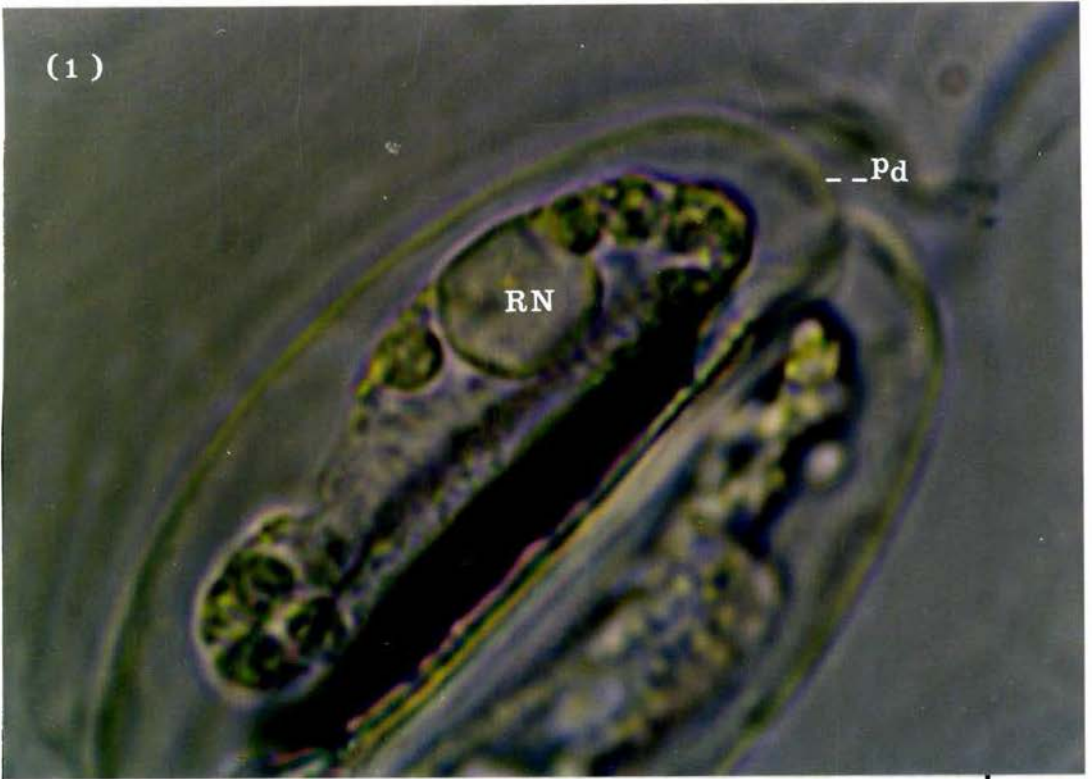


FIGURA 16(B).- LA FIGURA MUESTRA LA CELULAS GUARDA DEL TRATAMIENTO CONTROL (1000X). SE OBSERVA EN LA FOTOGRAFIA EN FLUORESCENCIA (2), LA AUTOFLUORESCENCIA DE LOS CLOROPLASTOS EN ROJO, NO SE OBSERVA MARCA POSITIVA. Ch: CLOROPLASTOS; Pr: PORO ESTOMATICO.

FIGURA 17.- LA FIGURA MUESTRA LAS CELULAS GUARDA DEL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (ESTRES HIDRICO, A 80% DE PESO FRESCO) (1000x). SE OBSERVA EN LA FOTOGRAFIA A CAMPO CLARO (1), QUE LAS CELULAS SE ENCUENTRAN PLASMOLIZADAS. LA FOTOGRAFIA EN EPIFLUORESCENCIA (2) MUESTRA UNA MARCA POSITIVA EN LA ENVOLTURA DE LOS CLOROPLASTOS Y EN LA MEMBRANA PLASMATICA. LA REGION NUCLEAR SE OBSERVA COMO UNA AREA OPTICAMENTE NEUTRAL. Ch: CLOROPLASTOS; Pd: PARED CELULAR; Nn: REGION NUCLEAR; Mp: MEMBRANA PLASMATICA.

(1)



(2)

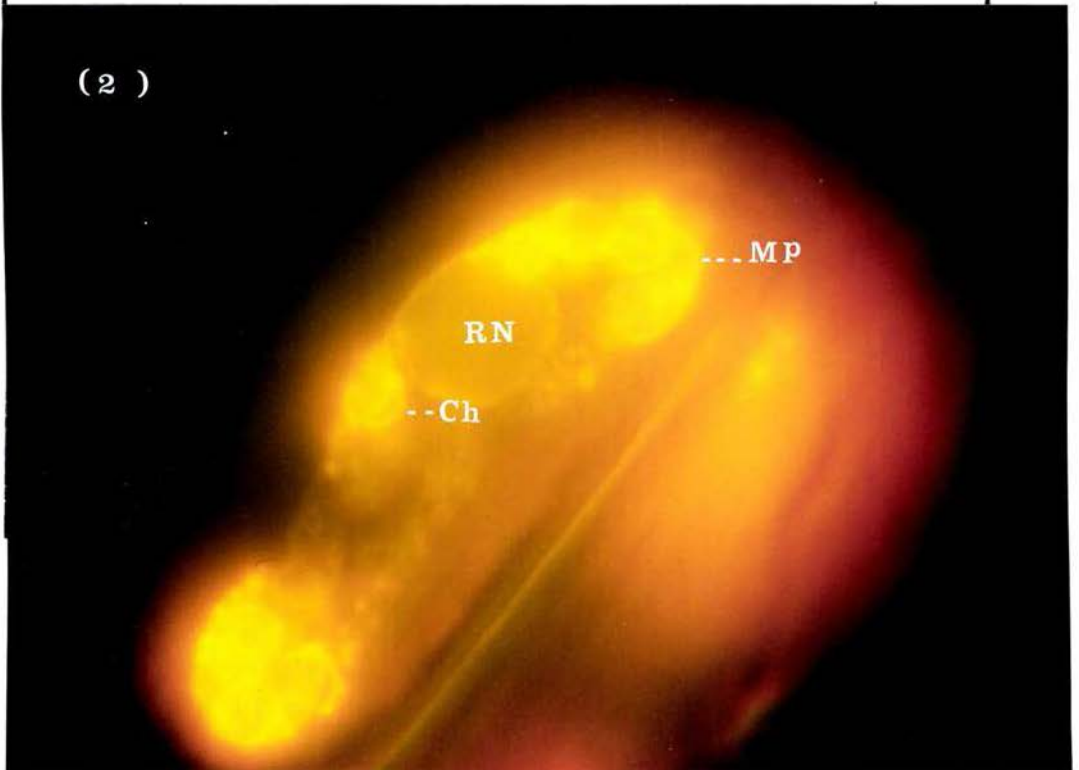
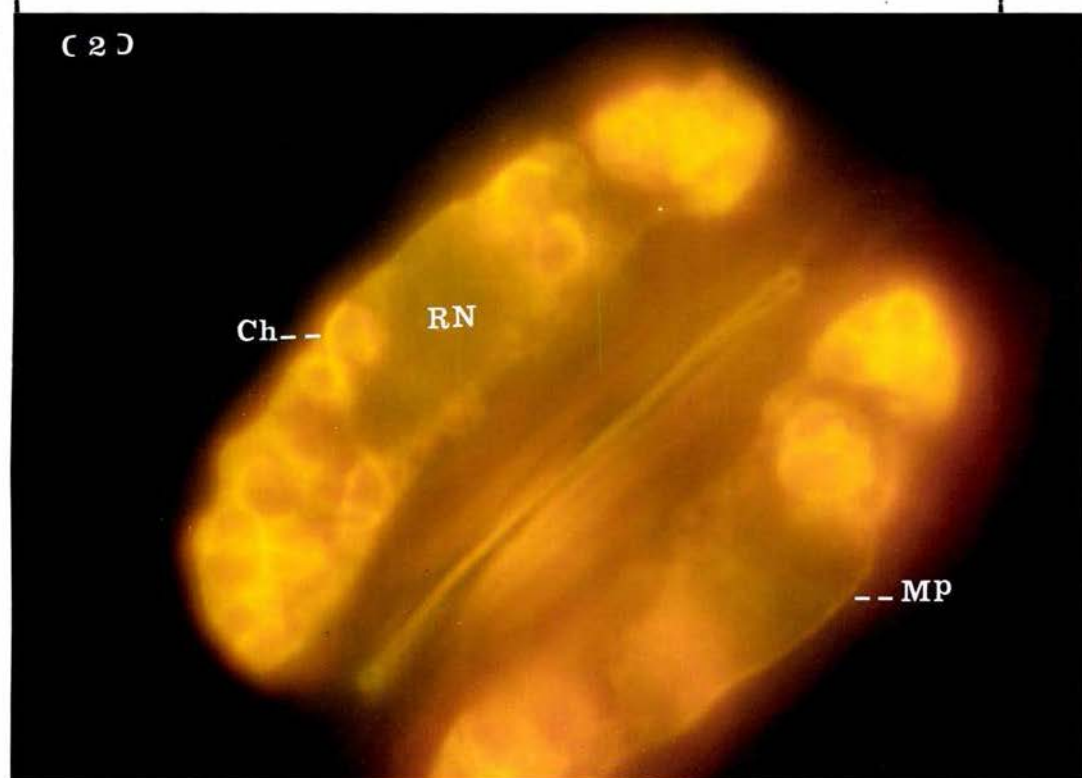


FIGURA 18.- LA FIGURA MUESTRA LAS CELULAS GUARDA DEL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (ESTRES HIDRICO, A 80% DE PESO FRESCO) (1999b). SE OBSERVA EN LA FOTOGRAFIA A CAMPO CLARO (1), QUE LAS CELULAS SE ENCUENTRAN PLASMOLIZADAS. LA FOTOGRAFIA EN EPIFLUORESCENCIA (2), MUESTRA UNA MARCA POSITIVA EN LA ENVOLTURA DE LOS CLOROPLASTOS Y EN LA MEMBRANA NUCLEAR. LA REGION NUCLEAR SE OBSERVA COMO UNA AREA OPTICAMENTE HIALINA. Ch: CLOROPLASTOS; Pd: PARED CELULAR; Rn: REGION NUCLEAR; Mp: MEMBRANA PLASMATICA.



pH del medio probado (5 a 8). (2) A pH de 8.0 en el medio externo, no hay incorporación de ABA dentro de la célula guarda, sin embargo, si existe un cierre estomático. En base a estos datos Hartung concluyó que las células guarda de Valeriana locusta, no necesitaban tomar el ABA, para que esta desarrollará su efecto de cierre estomático; por lo tanto, los datos indicaban que el sitio de recepción del estímulo por ABA en la célula guarda era el plasmalema, y obviamente localizado en la cara de la membrana dirigida hacia el apoplasto, o al menos alguna region accesible desde afuera. Esta fue la primera evidencia indirecta del sitio blanco de la hormona. En 1984, Hornberg y Weiler, utilizando la técnica de fotoafinidad y protoplasto de células guarda de Vicia faba, reportan sitios de unión para ABA en el plasmaléma de estas células. En su investigación, encuentran que la digestión suave con tripsina sin afectar la viabilidad celular, eliminaba completamente estos sitios de unión, lo cual demuestra que la unión de ABA con el plasmaléma, se da en parte, con proteínas, las cuales estan localizadas en la cara apoplástica del plasmaléma. La estimación que ellos hacen del número de sitios de unión es de 2,200/ μm^2 . Hornberg y Weiler (1984), encontraron también, por análisis electroforético de membranas solubilizadas con SDS, un grupo de 3 polipeptidos, de un peso de 20.2, 19.3, 14.3 Kd, que unian específicamente ABA(+), con respecto al enantiomero (-) y a otros compuestos relacionados con la ruta de síntesis y degradación de la hormona. Estos resultados indicaban que existen proteínas receptoras específicas para la unión del ABA a nivel del plasmaléma externo de las células guarda, ya que el análisis electroforético de membranas de células de mesófilo indicaban una expresión muy baja de estas proteínas. Curvetto et al.

en 1988, aislaron de un extracto de proteínas de células epidérmicas abaxiales de Vicia faba, un polipéptido de un peso molecular de 19.0 Kd, el cual se unía específicamente a una columna cargada con ABA (+). Las características de esta proteína son similares a las encontradas por Horbeng y Weiler (1984), quienes, como se mencionó, encontraron una molécula de peso molecular similar (19,300). Bertrand et al., en 1992, trabajando con las zonas de crecimiento de la raíz de tomate, encontró que el ácido abscísico se acumula, entre otras partes, en la membrana plasmática, y precisamente en la parte externa, que da hacia el apoplasto. Es un hecho que los mecanismos de acción de la hormona en las células guarda y en las radicales es completamente distinto, sin embargo se puede pensar que en ambas el primer receptor para ABA, podría estar localizado en el plasmalema, en su parte externa.

Stiwell et al. en 1989, trabajando con liposomas de doble membrana, encontraron que ABA modifica la permeabilidad de estos sistemas cuando su contenido varía en cuanto a las cabezas polares que conforman los fosfolípidos, así como las cadenas tipo acil de los mismos. Stiwell et al. (1989), reportaron también, que este cambio de la permeabilidad es específico para la forma (cis+) de la molécula y no para la (trans -), lo cual indica una cierta especificidad de la composición lipídica y la acción de la hormona. El mecanismo por medio del cual se modifica la permeabilidad, reportan los autores, no se debe a una desestabilización de la membrana (ABA es una molécula lipofílica), sino que la hormona al parecer actúa a nivel de los sitios donde las diferencias en cadenas y cabezas polares, impiden que la membrana se empalme o empaque correctamente.

Por lo anterior, podríamos pensar que la marca encontrada a nivel de la membrana plasmática, sea producto de la unión específica de ABA a una región lipídica, protéica o un dominio que comparta ambas composiciones (ver figura 19). La razón funcional de estas regiones de unión es completamente desconocida. El estudio que realizan Hornberg y Weiler, en 1984, solamente maneja aspectos de unión y no de función, aunque en el reporte, ellos manejan estos sitios protéicos de unión, como si fueran receptores blanco para la acción de la hormona sobre las células guarda. Existen otras posibilidades en cuanto a la funcionalidad de estos sitios de unión. Las proteínas encontradas podrían ser translocadores específicos de la hormona a nivel del plasmaléma de la célula guarda. Astle y Rubery, en 1980, reportaron un acarreador saturable para ABA en segmentos de raíz de frijol (Phaseolus coccineus). Para el caso de células guarda, Baier y Hartung, en 1988 (autores citados por Sloviki y Hartung, 1992), describen un acarreador específico para ABA en el tonoplasto, sin embargo para el caso de plasmaléma, no hay nada descrito. ¿Cual sería la funcionalidad de un acarreador a nivel del plasmaléma de las células guarda?, si ABA es una molécula lipofílica, la cual fluye libremente a través de las membranas, cuando se encuentra en su estado protonado (ABAH). La explicación puede ser que la célula guarda es capaz de sintetizar ABA citoplasmáticamente durante un estres (Harris y Outlaw, 1991); la hormona sintetizada, no es atrapada en el cloroplasto como normalmente sucede (Sloviki y Hartung, 1992), ya que durante un estres hídrico, el estroma del cloroplasto, que fisiológicamente es básico a la luz, se acidifica por la inhibición de la fotosíntesis (Berkowitz et al, 1983), lo cual permite la protonación

de la hormona y la liberación de la misma del organélo. El pH del citoplasma durante un estres hídrico, tiende también a disminuir, inicialmente por el incremento en la respiración y la acumulación de ácidos orgánicos y cuando el estres se vuelve más severo, por la inhibición de la respiración (Venekamp, 1989). Debido a que el transporte de protones/Potasio a nivel del plasmaléma es inhibido por el estres hídrico (Ibid), y en parte también por la acción directa de ABA, la región apoplástica se convierte en una trampa básica para ABA. Esto es, según el modelo propuesto por Slovikis y Hartung, (1992), ABAH permearía desde el cloroplasto y citoplasma, hasta el apoplasto, y entonces al tener este un pH básico, la hormona quedaría atrapada en esta región como ABA⁻. Baier et al, en 1990, sugieren que el transporte de ABA hacia el interior de la célula, es una parte importante en la respuesta de la célula guarda al estres hídrico. Sin embargo, bajo la condición antes mencionada, el transporte facilitado de ABA dentro de la célula guarda estaría dado por la protonación de la misma, según el pH del compartimento y del pK de la hormona (4.6) (Hartung et al, 1982). Considerando lo anterior, la función de un translocador específico para ABA sería el mantener los niveles óptimos de la hormona dentro de la célula, para que esta llevara a cabo su función fisiológica. Por otro lado, se sabe que los niveles de ABA durante y después de un estres, son regulados por la degradación de la misma, en ácido fasético y ácido dihidroxifasético; sin embargo, esta degradación es citoplasmática (Zeevaart, 1988), por lo cual un acarreador específico para ABA, podría ser útil para esta función.

Al parecer, la unión de ABA a lípidos en la membrana esta más relacionada con la modulación del cierre estomático (Stiwel et al).

Hetherington y Quantro, en 1991, mencionan que ABA provoca entre otras cosas, la apertura de canales no-específicos para calcio a nivel del plasmalema de las células guarda (ver figura 19). Stiwell et al (1989), mencionan que el efecto de la unión de ABA con los lípidos del plasmalema podría ser esta, pero que esta unión, no sería tan estable. Hocking et al, en 1978, reportaron dos sitios de unión para ABA en fracciones ricas en membrana plasmática de hojas de Vicia faba. Uno con una alta afinidad para la hormona, y con una constante de disociación de 3.5 nmol/lt., y el otro de baja afinidad y con una constante de disociación de 3.5 μ mol/lt. Es posible que los sitios con alta afinidad sean los proteicos, tal y como lo describieron Hornberg y Weiler (1984) por sus estudios con analogos de ácido abscísico y los de baja afinidad y alta disociación sean los lipídicos, los cuales, según Stiwell et al (1989), varían según el tipo de lípidos en la membrana.

En conclusión, la marca encontrada en la membrana plasmática de las células guarda de Vicia faba, según los antecedentes bibliográficos antes mencionados, pudiera tratarse de hormona unida a: (1) Un receptor específico para la hormona, de composición proteica o proteica-lipídica. (2) Un translocador específico, de composición similar. (3) Dominios de lípidos, que reconocen a ABA de manera específica.

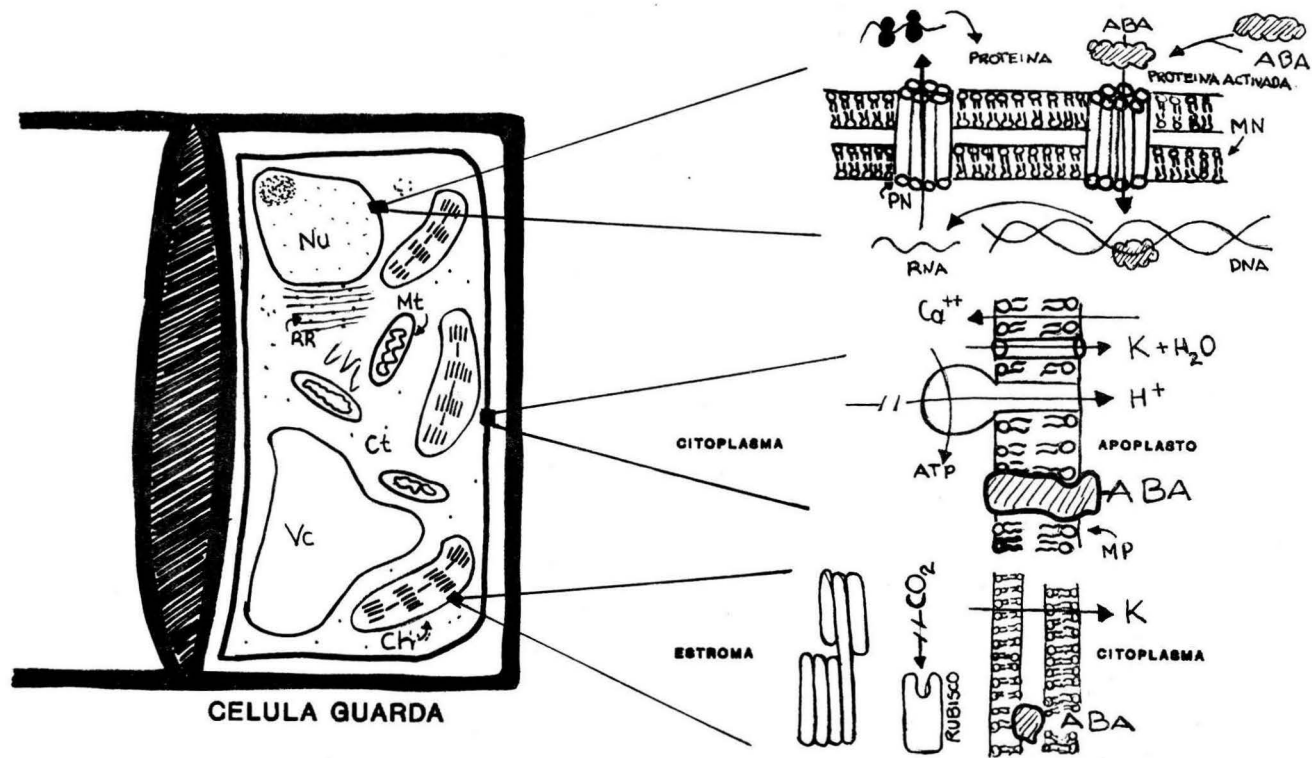


Fig. 19.- El modelo muestra los sitios de union encontrados para ABA en células guarda de Vicia faba y su posible relacion con los componentes de cada membrana. Pd: Pared celular MP: Membrana Plasmática; Vc: Vacuola; Ch: Cloroplasto; Mt: Mitochondria; RR: Reticulo Rugoso; Nu: Núcleo; MN: Membrana nuclear; Ct: Citoplasma; Pr: Estoma; PN: Poro nuclear.

b) Localización a nivel de cloroplasto.

Como se observa en la figura 17 y 18, parte de la marca del anticuerpo se encuentra a nivel del cloroplasto, al parecer ser localizada en la envoltura del cloroplasto y no en el estroma del mismo. Este patron de distribución, ya habia sido reportado por Sotta et al, en 1985, en cloroplastos de lámina foliar de Chenopodium polyspermum, la cuales habian sido estresadas hidricamente, sin embargo, no se dio ninguna explicación al resultado.

Los primeros reportes de la relación entre los cloroplastos y ABA fueron dados por Loveys, en 1977. Loveys encontró, que casi todo el ABA en las células del mesófilo se encontraba en el cloroplasto, y que en las células estresadas hidricamente, la hormona se liberaba, encontrandose por consiguiente menor cantidad de ABA en cloroplasto aislados de espinacas estresadas. Por otro lado, Loveys, observo que cuando se lizaba el cloroplasto, gran parte del ABA era retenido por el paquete de membranas y no era liberado al medio. Loveys (1977), concluyó con estos resultados, que ABA se encontraba unido a un especie de receptor. Curvetto et al, (1988), retoma esta evidencia y utilizando anticuerpos dirigidos contra ABA, realiza una serie de ensayos utilizando la técnica de aglutinación. Estos autores, encuentran que existen sitios de unión en la envoltura externa del cloroplasto de Vicia faba. Por otro lado, encuentran que al estresar las plantas hidricamente, el numero de estos sitios de unión, aumentan considerablemente (hasta 10 veces más). Hasta el momento no se sabe la función de estos sitios de unión, ni se ha estudiado más sobre el asunto.

La relación entre el cloroplasto y el ácido abscísico es aun

materia de estudio. Durante algun tiempo se penso, por la evidencia encontrada, que el lugar de síntesis de ABA, era el cloroplasto (Milborrow, 1974, Walton, 1980), sin embargo evidencias más recientes demuestran que el lugar de síntesis del ácido abscísico es el citoplasma y no el cloroplasto (Hartung et al, 1981; Hartung et al, 1982; Stewart et al, 1986; Guerrero y Mullet, 1986). De esta manera, el hecho de que la mayor cantidad de ABA en células no estresadas, se encontraba en el cloroplasto (Loveys, 1977), se descubrió que era más bien producto de la distribución de ABA según el pH de los compartimentos; esto es, la hormona difunde libremente al protonarse y queda atrapada como anión (Hartung et al, 1981, 1982). Zeevaart, 1988, concluye, que la ABA es secuestrada en el cloroplasto por su pH básico en condiciones de luminosidad, no llevabando a cabo su efecto fisiológico hasta que es liberada de este. Cummins et al (1971), encontraron que la disminución de la fotosíntesis por la aplicación de abscísico, era un resultado del cierre estomático, que a su vez disminuía los niveles de CO₂ intracelulares (C_i) (autor citado por Raschke y Hedrich, 1985). Este punto de vista se conservo durante mucho tiempo, sin embargo, los reportes posteriores a este indicaban resultados contradictorios. Raschke y Hendrich, en 1985, y Fischer et al, 1986 encontraron, en estudios hechos con plantas C-3 y C-4, que la variabilidad era producto de la historia de crecimiento de las plantas y las condiciones de ensayo. En estos dos reportes, se estudio el efecto de ABA bajo condiciones de equilibrio fotosintético, a diferentes C_i, teniendo como variables la tasa de asimilación, la conductancia estomática, el C_i, la poza de algunos metabolitos relacionados con la fijación de CO₂ y la actividad enzimática de la

ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco). Los resultados mostraron que ABA inhibe la fotosíntesis cuando se aplica al flujo transpiratorio de las hojas y no cuando se exponen cloroplastos aislados a la hormona. ABA disminuye la capacidad de carboxilación de la Rubisco in vivo y no in vitro. Se desconoce el mecanismo por medio del cual ABA inhibe la carboxilación.

Las células guarda de casi todas las plantas poseen cloroplastos funcionales, comparativamente con los cloroplastos de las células del mesófilo (Zeiger et al, 1987), y a pesar de que poseen menor cantidad de clorofila por célula, se ha encontrado que poseen todos los componentes estructurales del fotosistema I y II (Outlaw et al, 1981; Zemel et al, 1988), llevan a cabo fotofosforilación cíclica y no-cíclica (Shimazaki y Zeiger, 1985), poseen la enzima fijadora de CO₂ (Madhavan et al, 1982) y llevan a cabo fijación de CO₂ (Zeiger et al, 1987; Gotow, Taylor y Zeiger, 1988). Zeiger et al, (1987), menciona que la función fotosintética de los cloroplasto de las células guarda, no es de exportación de compuestos carbonados, sino más bien la función esta dada en la producción de energía y compuestos carbonados, involucrados en los mecanismos de apertura y cierre estomático.

Por lo anterior, podemos decir que lo encontrado en los cloroplastos de las células guarda de Vicia faba, podría ser comparado con lo que sucede en los cloroplastos de las células del mesófilo. Al igual que lo encontrado por Curvetto et al, en 1988, los sitios de unión para ABA en la membrana interna del cloroplasto se incrementarían durante un estrés hídrico, lo que directamente habla del número de moléculas de ABA asociadas a la membrana del cloroplasto. ¿Cuál podría ser la función de estas sitios de unión ?.

Si consideramos que las funciones del cloroplasto de la célula guarda es casi similar al de los de una célula del mesófilo, entonces podríamos decir que el efecto de ABA sobre estos sería el mismo. De esta manera, la inhibición de la fotosíntesis por ABA, producto de la inhibición de la carboxilación, podría ser equiparable al de los cloroplastos de las células guarda. Considerando esto, podríamos especular que los sitios de unión podrían estar involucrados en la acción de ABA. Estos sitios de unión en la membrana del cloroplasto, cabría la posibilidad de que estuvieran constituidos por un dominio proteico-lipídico, ya que, como se menciona antes, Stiwell et al, (1989), encuentran que la mayor asociación de ABA a lípidos se daba en combinaciones de lípidos con cadenas de tipo acil, y esta clase de cadenas son el mayor constituyente de fosfolípidos en las membranas de los cloroplastos (Mader y Barber, 1989). La proteína de este dominio se encontraría en la membrana interna del cloroplasto de manera extrínseca y de fácil liberación (ver figura 19). Esto concordaría, con los resultados de microscopía encontrados por Sotta et al en 1985 y Curvetto et al, en 1988. Por otro lado, no se ha encontrado ningún efecto inhibitorio de ABA en la fotosíntesis de cloroplasto aislado de células de mesófilo, la posible razón de esto, apuntan Fischer et al, en 1986, es que durante el aislamiento se pierde o elimina algún factor necesario para el efecto de la hormona. Este factor podría ser el sitio de unión proteico del que estamos hablando.

Por lo anterior, la inhibición de fotosíntesis por ABA estaría dada primeramente por la unión de esta a su receptor, en la membrana del cloroplasto (ver figura 19); cabe recordar que debido al estrés hídrico, ABA estaría siendo sintetizada activamente en el citoplasma,

aumentando su concentración. La unión de ABA a su receptor provocaría la salida de potasio del cloroplasto, de manera similar como sucede a nivel membrana. En condiciones de estres hídrico la salida de potasio en el estroma esta asociada a la inhibición de la fotosíntesis, producto de una acidificación del estroma, lo que conlleva a una disminución de la carboxilación (Weihua y Berkowitz, 1992), y que a su vez induciría la salida de ABA del cloroplasto (Hartung, 1981). La inhibición de la carboxilación, provocaría un aumento en la poza de NADPH, lo que desencadenaría un aumento del flujo electrónico cíclico, aumentando las pozas de ATP disponible (Melis, 1991). Esto ultimo, concordaría con el hecho de que el efecto de ABA sobre el cierre estomático es un fenomeno dependiente de energía metabólica (Weyers et al, 1982).

En conclusión, la marca encontrada en la envoltura del cloroplasto, podria estar relacionada con receptores involucrados en el efecto de ABA sobre la fotosíntesis de las células guarda.

b) Localización a nivel de la membrana nuclear.

Como se observa en las figuras 18, parte de la marca encontrada, esta dada en el núcleo de la célula guarda, que en este caso aparece como una estructura de tipo vacuolar en uno de los extremos de la célula. Se confirmó la naturaleza nuclear de dicha estructura por observaciones a microscopía de contraste de fases, donde se observó como una estructura ópticamente densa y no hialina, como en el caso de una vacuola. Por otro lado, en los ensayos realizados con anterioridad con acetocarmin, se habia localizado al núcleo en la parte media de la célula o ligeramente desplazado hacia algunos de los extremos, como en

este caso.

El hecho que moléculas de ABA se encuentre asociadas al núcleo, ya había sido reportado por Sotta *et al*, en 1985, en células del mesófilo de hojas de plantas de Chenopodium polyspermum estresadas hidricamente, encontrándose un patron de distribución similar al del presente estudio; no se dió ninguna explicación del hallazgo. Sossountzov, L. *et al*, (1986) trabajando con yemas foliares de plantas no estresadas, encontró que ABA se unia específicamente a la membrana nuclear, además de localizarse en gran proporción sobre la región nucleolar. Tampoco se dió una explicación ha este hecho, sin embargo, aun cuando son modelos distintos, podemos inferir, por estos resultados, que ABA de alguna manera esta interactuando con el núcleo, en la respuesta fisiológica específica requerida.

Se ha demostrado por técnicas moleculares, que uno de los intermediarios de la respuesta en cadena de muchas de las hormonas vegetales son los RNA mensajeros (RNAm) específicos, los cuales codifican productos génicos involucrados en la respuesta fisiológica particular. Aun cuando existen muchos reportes, donde se describe el incremento de RNAm como respuesta a la aplicación de ABA o al incremento natural de ABA, no se sabe como se lleva a cabo este control de la transcripción a nivel nuclear (Hetherington y Quantro, 1991).

Los estudios con hormonas animales, han definido dos mecanismos de control de las respuestas, ambos convergen a nivel de la modulación del gen, a través de la activación de proteínas reguladoras, las cuales se unen a las regiones del gen con función de regulación de la transcripción. Uno de los mecanismos involucra la directa activación,

por parte de la hormona, sobre la proteína reguladora. Este es el caso de las hormonas de tipo esteroide, donde recientemente se ha identificado un receptor citoplasmático, el cual resulta ser la proteína reguladora de la transcripción. El segundo mecanismo involucra la activación de las proteínas reguladoras por segundos mensajeros. Este caso es el de las hormonas de tipo peptídico. Se ha encontrado, que los principales mediadores en esta respuesta son, calcio, y el AMP cíclico, los cuales estimulan una cierta familia de proteínas cinasas, las cuales fosforilan la proteína reguladora y la activan. (Mundy,1990; Hetherington y Quantro,199).

En las plantas, como ya se ha mencionado, el incremento natural de ABA o la aplicación directa de esta a los tejidos, lleva a la expresión específica de algunos genes. Estos genes y sus productos se encuentran en su mayoría relacionados con la adaptación de la planta o semilla al estrés osmótico (Skriver y Mundy,1990).

Los genes que responden a la acumulación del ácido abscísico, son los de la familia denominada LEA (de las siglas en inglés " Late Embryo Abundant Proteins ") y los de la familia RAB (de las siglas en inglés " Responsive to ABA "). La mayoría de estos genes se ha encontrado que se activan cuando ABA se incrementa, durante la deshidratación de la semilla y la entrada en latencia del embrión. Sin embargo, en tejido vegetativo sometido a estrés hídrico u osmótico, se ha demostrado la acumulación de los RNAm de los genes LEA (Hetherington y Quantro, 1991). Además, recientemente, Renwick *et al* (1992), utilizando anticuerpos dirigidos contra varios productos de los genes LEA, encontraron los productos de estos genes en las células guarda de Commelina communis cuando se les aplicaba ABA.

El mecanismo por el medio del cual ABA regula la expresión de estos genes, se ha comprobado esta a nivel transcripcional. En estudios hechos con plantas transgénicas, donde se transformó insertando un gen quimérico con la región reguladora 5' del gen EM (familia LEA), un gen estructural reportero de la β -glucoronidasa (GUS) y la parte terminadora 3' del gen del virus del tabaco, se encontró que ABA es capaz de regular la expresión de dicho gen (Marcotte et al, 1988). La región reguladora 5' de 646 pares de bases (pb) del gen EM fue estudiada para determinar las secuencias responsables de la respuesta a ABA (Regiones ABRE, de las siglas en inglés " Abscisic Acid Response Elements "). Se encontró que la región comprendida entre -168 a + 92pb contenía las regiones de respuesta a ABA (Marcotte et al, 1989). El análisis de esta región demostró que existe un núcleo de respuesta común, el cual se repite con gran homología en las regiones promotoras 5' de los genes LEA y RAB. Este núcleo está constituido de 6 pb en el siguiente orden: CACGTG (Hetherington y Quantro, 1991).

El mecanismo por el cual estas regiones en cis son reguladas aún es desconocido. Guiltinan, en 1990, encontró una proteína que se unía específicamente a la región ABRE, cubriendo una secuencia de 8 pb. El análisis de esta proteína reveló que su estructura era del tipo de cierre de leucina, familia de proteínas involucradas en la regulación de la transcripción a nivel del gen (Autor citado por Hetherington y Quantro, 1991).

Considerando todo lo anterior, se puede especular, por la posición del ácido abscísico sobre la membrana nuclear (ver figura 19), que la regulación pudiera ser del tipo de las hormonas

esteroides, esto es, que ABA se uniría a la proteína reguladora y la activaría, transportandola directamente hasta el núcleo; en el núcleo ABA liberaría la proteína a nivel del complejo del poro nuclear, y entonces la proteína se uniría específicamente a las regiones reguladoras 5' y activaría o desactivaría la transcripción de los genes involucrados en la respuesta al estrés hídrico.

CONCLUSIONES

1.- Se realizó un acoplamiento entre ABA y HSA, obteniéndose un conjugado vía el carbono 1 de la hormona y los grupo amino de la proteína.

2.- Se estandarizó, en conejos, el protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos contra ABA libre, encontrándose que los mejores resultados están dados cuando las dos primeras inmunizaciones se realizan subcutáneamente y en sitios múltiples, y los refuerzos de forma intramuscular. El tiempo óptimo encontrado entre cada refuerzo fue de 10 días.

3.- A los cuarenta días del esquema de inmunización, se semipurificó un anticuerpo policlonal contra la mezcla racémica de ABA, por precipitación con sulfato de amonio. Se encontró, por pruebas de inhibición por hapténo, que 100µl del anticuerpo aislado, son capaces de unir 20 ng de ABA libre.

4.- El análisis de la posición de ABA en las células guarda abaxiales de hojas de Vicia faba en condiciones de turgencia o estrés hídrico (88% peso fresco), mostro lo siguiente:

a) En las células no estresadas, no se detectó hormona libre. Posiblemente en condiciones de no estrés, las cantidades son tan bajas que no son detectadas. Por otro lado, existe la posibilidad de que la hormona se liberé al medio de ensayo, disminuyendo aun más su concentración intracelular.

b) En condiciones de estrés hídrico (88% peso fresco), durante 12 horas, la hormona se encontró unida al plasmalema, la envoltura del cloroplasto y la envoltura nuclear.

5.- Según los antecedentes bibliográficos, existe la posibilidad de que:

a) ABA se encuentre unida a un receptor en el plasmalema, como parte del mecanismo de regulación de la permeabilidad de la membrana a los iones, durante el cierre estomático.

b) ABA se encuentre unida a un receptor en la envoltura del cloroplasto, el cual modifique la permeabilidad de la membrana y regule la actividad fotosintética.

c) ABA se encuentre unida a la envoltura nuclear, participando en la regulación de la expresión genética en condiciones de estrés hídrico.

BIBLIOGRAFIA.

ADDICOTT, F. T. AND CARNS, H.R. 1983. HISTORY AND INTRODUCTION. IN *ABSCISIC ACID*, ed ADDICOTT F.T., pp 1-22. NEW YORK. PRAEGER SPECIAL STUDIES. p 598.

ANDRADE, T.J. 1981. RESISTENCIA A SEQUIA II: EFECTO DE ANALOGOS DEL ACIDO SALICILICO SOBRE LA TRANSPIRACION DE EXPLANTES DE *Phaseolus vulgaris* L. TESIS DE LICENCIATURA. UNAM-E.N.E.P. IZTACALA, MEXICO.

BAIER, M. ET AL. 1990. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 224(41):351-358

BRADFORD, M.M. 1976. A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROQUANTITIES OF PROTEIN. ANNALS OF BIOCHEMISTRY. 72:248.

BLUM, A. 1989. BREEDING METHODS FOR DROUGHT RESISTANCE. EN PLANTS UNDER STRESS. Ed H.G.JONES, T.J. FLOWER Y M.B.JONES. ACADEMIC PRESS NEW YORK.

BRADFORD, K.J. Y HSHIAO, T.C. 1982. PHYSIOLOGICAL RESPONSES TO MODERATE WATER STRESS. EN PHYSIOLOGICAL PLANT ECOLOGY. EdS. O.L. LANGE, C.B. OSMOND Y H. ZIEGLER. SPRINGER-VERLAG. BERLIN. pp 263-324.

BEHL, R. Y W. HARTUNG. 1986 MOVEMENT AND COMPARTAMENTATION OF ABSCISIC ACID IN GUARD CELL OF *Valerianella locusta*: EFFECTS OF OSMOTIC STRESS, EXTERNAL H⁺ CONCENTRATION AND FUSICOCCIN. PLANTA. 168:360-368.

BRAY, E. Y J.A. ZEEVAART. 1985. THE COMPARTMENTATION OF ABSCISIC ACID AND BETA-D-GLUCOPYRANOSYL ABSCISATE IN MESOPHYLL CELL. PLANT PHYSIOLOGY. 79:719-722.

BEARDSSELL, M.F. Y COHEN D. 1975. RELATIONSHIP BETWEEN LEAF WATER STATUS, ABSCISIC ACID LEVELS, AND STOMATAL RESISTANCE IN MAIZE AND SORGHUM. PLANT PHYSIOLOGY 56:207-212.

BERKOWITZ, G. A. ET AL. 1983. STROMAL ACIDIFICATION MEDIATES IN VIVO WATER STRESS INHIBITIN OF NONSTOMATAL-CONTROLLED PHOTOSYNTHESIS. PLANT PHYSIOLOGY. 72:1123-1126.

BERTRAND, S. ET AL. 1991. INMUNOGOLD LOCALIZATION OF FREE ABSCISIC ACID IN TOMATO ROOTS CELL. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY. 70:1001-1011.

BRINCKMANN, E. ET AL. 1990. ABSCISIC ACID LEVELS OF INDIVIDUAL LEAF CELL. PHYSOLOGIA PLANTARUM. 80:51-54.

CATTY, D. 1988. ANTIBODIES VOLUMEN I: A PRACTICAL APPROACH. IRL PRESS, OXFORD. PP 19-80, 169-180.

CHAVEZ, M.M. 1991. EFFECTS OF WATER DEFICITS ON CARBON ASSIMILATION. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 734(42):1-16.

- CORNISH K. Y J. A. ZEEVAART. 1986. ABSCISIC ACID ACCUMULATION BY IN SITU AND ISOLATED GUARD CELL OF Pisum sativum AND Vicia faba L. IN RELATION TO WATER STRESS. PLANT PHYSIOLOGY. 81:1017-1021.
- CREELMAN, A.R. Y J.A.D. ZEEVART. 1985. ABSCISIC ACID ACUMULATION IN SPINACH LEAF SLICES IN THE PRESENCE OF PENETRATING AND NON-PENETRATING SOLUTES. PLANT PHYSIOLOGY. 77:25-28.
- COLIN, M.T. 1982. APUNTES PARA EL TEMA DE AGUA: DEPTO. DE FITOTECNIA. UACH MEXICO.
- CURVETTO, N.R. et al. 1986. EPIDERMAL LOCALIZATION OF ABA BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE. PHYTON 46:163-170.
- CURVETTO, N.R. ET AL. 1988. ABSCISIC ACID BINDING SITES ON CHLOROPLASTS OF Vicia faba. PHYTON 48(1/2):1-6.
- CURVETTO N. R. ET AL. 1988. AN ABSCISIC ACID BINDING PROTEIN FROM ABAXIAL EPIDERMIS OF Vicia faba ISOLATED BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY. PHYTON 48(1/2):7-11.
- DAIE, J. R. WYSE. 1982. ADAPTATION OF THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TO THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF ABSCISIC ACID. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 119:365-371.
- ERLANGER, B.F. 1980. THE PREPARATION OF ANTIGENIC HAPTEN-CARRIER CONJUGATES: A SURVEY. EN METHODS IN ENZYMOLOGY. VOL 70. ACADEMIC PRESS, NEW YORK. PP 85-97.
- ESSAU, M. 1981. ANATOMIA VEGETAL. Ed OMEGA. BARCELONA ESPAÑA.
- FISCHER, E. ET AL. 1986. EFFECTS OF ABSCISIC ACID ON THE PHOTOSYNTHESIS IN WHOLE LEAVES: CHANGES IN CO₂ ASSIMILATION, LEVELS OF CARBON-REDUCTION-CYCLE INTERMEDIATES, AND ACTIVITY OF RIBULOSE-1,5, BIPHOSPHATE CARBOXYLASE. PLANTA. 169:536-545.
- FUCHS, Y. AND SHIMON MAYAK. 1972. DETECTION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ABSCISIC ACID BY IMMUNOLOGICAL ASSAY. PLANTA 103:117-125.
- GRANTZ, D.A. ET AL. 1985. METABOLISM OF ABSCISIC ACID IN GUARD CELLS OF Vicia faba and Commelina communis. PLANT PHYSIOLOGY. 78:51-56.
- GARVEY S.J. et al. 1977. METHODS IN IMMUNOLOGY. 3rd Ed. BENJAMIN INC. LONDON. pp 40- 78.
- GONZALEZ, H.E.O. 1987. LOCALIZACION DE LA ATPasa (Na-K) CON ANTICUERPOS CONTRA OUBAINA. TESIS DE LICENCIATURA. UNAM. E.N.P. IZTACALA. MEXICO.
- GONZALEZ, S. Y I. PEÑALOZA. 1984. MANUAL DE BIOMOLECULAS. E.N.E.P. IZTACALA. UNAM. MEXICO.

GUERRERO, F. Y J.E. MULLET. 1986. INCREASED ABSCISIC BIOSYNTHESIS DURING PLANT DEHYDRATION REQUIRES TRANSCRIPTION. PLANT PHYSIOLOGY. 80:588-591.

HANKE, D. 1984. ANTIBODIES TO THE RESCUE. NATURE. 310:272-273.

HARRIS M.J. et al. 1988. WATER-STRESS-INDUCED CHANGES IN THE ABSCISIC ACID CONTENT OF GUARD CELLS AND OTHER OF Vicia faba L. LEAVES AS DETERMINED BY ENZYME-AMPLIFIED IMMUNOASSAY. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85:2584-2588.

HARRIS, M. Y OTULAW. W.H. 1991. RAPID ADJUSTMENT OF GUARD CELL ABSCISIC ACID LEVELS TO CURRENT LEAF WATER STATUS. PLANT PHYSIOLOGY. 95:1171-1173.

HARTUNG, W. ET AL. 1981. DO CHLOROPLAST PLAY A ROLE IN ABSCISIC ACID SYNTHESIS ?. PLANT SCIENCE LETTERS. 22: 235-242.

HARTUNG, W. ET AL. 1982. THE COMPARTAMENTATION OF ABSCISIC ACID (ABA), OF ABA-BIOSYNTHESIS, ABA-METABOLISM AND ABA CONJUGATION. IN PLANT GROWTH SUBSTANCES 1982. Ed BY WAREING P.F. ACADEMIC PRESS. LONDON. PP 325-333.

HETHERINGTON, M.A. Y R. QUANTRO. 1991. MECHANISMS OF ACTION OF ABSCISIC ACID AT CELLULAR LEVEL. TANSLEY REVIEW No. 31. NEW PHYTOLOGY. 119:9-32.

HOCKING, T.J. ET AL. 1978. ABSCISIC ACID BINDING TO SUBCELLAR FRACTIONS FROM LEAVES OF Vicia faba. PLANTA. 138:303-304.

HURN, B.A.L. Y S. M. CHANTLER. 1980. PRODUCTION OF REAGENT ANTIBODIES. EN METHODS IN ENZIMOLGY VOL. 70. ACADEMIC PRESS. NEW YORK. PP 104-123.

ITAI, C. ET AL. 1978. ABSCISIC ACID AND GUARD CELLS OF Commelina communis. NATURE. 271:652-653.

KAISER, M.W. Y W. HARTUNG. 1981. UPTAKE AND REALEASE OF ABSCISIC ACID BY ISOLATED PHOTOAUTOTROPHIC MESOPHYLL CELL, DEPENDING ON pH GRADIENTS. PLANT PHYSIOLOGY. 68:202- 206.

KANNANGARA, T. ET AL. 1989. IMMUNOAFFINITY COLUMMS FOR ISOLATION OF ABSCISIC ACID IN CONIFER SEEDLINGS. PHYSIOLOGIA PLANTARUM. 75:369-373.

LAHR W. Y K. RASCHKE. 1988. ABSCISIC ACID CONTENTS AND CONCENTRATION IN PROTOPLAST FROM GUARD CELLS AND MESOPHYLL CELLS OF Vicia faba L. PLANTA. 173:528-531.

LAMELLI, U. K. 1970. NATURE 227:680-684.

MADER, J.B. Y J. BARBER. 1989. THE MOLECULAR ANATOMY AND FUNCTION OF TILAKOID PROTEINS. PLANT CELL AND ENVIORMENT. 12:595-614.

- MADHAVAN, S. AND BRUCE N. SMITH. 1982. LOCALIZATION OF RIBULOSE BISPHOSPHAT CARBOXYLASE IN THE GUARD CELLS BY AN INDIRECT, IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE. PLANT PHYSIOLOGY. 69:273-277.
- MALDINEY, R. ET AL. 1986. A BIOTIN-AVIDIN-BASED ENZYME IMMUNOASSAY TO QUANTIFY THREE PHYTOHORMONES: AUXIN, ABSCISIC ACID, ZEATIN-RIBOSIDE. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 90:151-158.
- MANSFIELD T.A. Y W. J. DAVIES. 1981. RESPONSES OF STOMATA: THE PRYMARY MECHANISMS OF DROUGHT AVOIDANCE IN MESOPHYTES. EN PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE. Ed. D. ASPINALL Y L.G. PALEG. ACADEMIC PRESS. SYNDEY.
- MARCOTTE, W.R. ET AL. 1988. REGULATION OF A WHEAT PROMOTER BY ABSCISIC ACID IN RICE PROTOPLAST. NATURE (333):454-457.
- MARCOTTE, W.R. ET AL. 1989. ABSCISIC ACID-RESPONSIVE SEQUENCE FROM THE E_m GENE OF WHEAT. THE PLANT CELL. (1):969-976.
- MAYER, R.J. Y J.H, WALKER. 1987. IMMUNOLOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. ACADEMIC PRESS. LONDON PP 1-95.
- MEIDNER, H. 1986. HISTORICAL SKETCHES 13. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 137(174):135-137.
- MELIS, A. 1991. DYNAMIC OF PHOTOSYNTHESIS MEMBRANE COMPOSITION AND FUNCTION. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 1058:87-106.
- MILBORROW, B.V. 1974. THE CHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF ABSCISIC ACID. ANNUL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 25:529-307.
- MILBORROW, B.V. 1984. THE INHIBITORS. IN ADVANCED PLANT PHYSIOLOGY. ed WILKINS, B. M. PITMAN PUBLISHING INC. GREAT BRITAIN.
- OUTLAW JR, W.H. 1983. CURRENT CONCEPTS ON THE ROLE OF POTASIMUM IN STOMATAL MOVEMENTS. PHYSIOLOGIA PLANTARUM. 59:302-311.
- OWEN, J, H. 1988. ROLE OF ABSCISIC ACIDI IN A Ca²⁺ SECOND MESSENGER SYSTEM. PHYSIOLOGIA PLANTARUM 72:637-641.
- PEMASDA, M.A. 1981. PHOTOCONTROL OF STOMATAL MOVEMENTS. BIOLOGICAL REVIEW. 56(4):551-588.
- PIERCE, M. Y K. RASCHKE. 1980. CORRELATION BETWEEN LOST OF TURGOR AND ACCUMULATION OF ABSCISIC ACID IN DETACHED LEAVES. PLANTA. 148:174-182.
- RAGHAVENDRA, A.S. 1981. ENERGY SUPPLY FOR STOMATAL OPENING IN EPIDERMAL STRIPS OF *Commelina benghalensis*. PLANT PHYSIOLOGY. 67:385-387.
- RASCHKE, K. 1975 STOMATAL ACTION. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 26:309-340.

RASCHE, K. Y R. HEDRICH. 1985. SIMULTANEOUS AND INDEPENDT EFFECTS OF ABSCISIC ACID ON STOMATA AND PHOTOSYNTHETIC APPARATUS IN WHOLE LEAVES. PLANTA. 163:105-118.

RASCHKE, K. 1987. ACTION OF ABSCISIC ACID ON GUARD CELLS. IN STOMATAL FUNCTION, ed E. ZEIGER, G.D. FARQUHAR AND I.R. COWAN, pp 253-280. STANFORD, CALIFORNIA. STANFORD UNIVERSITY PRESS. p 503.

REALI, R.J. 1990. DESARROLLO DE UNA TECNICA INMUNOENZIMATICA PARA LA DETECCION DE ALFA-FETOPROTEINA EN SUERO. TESIS DE LICENCIATURA. UNAM. E.N.P. IZTACALA . MEXICO.

RENWICK, K.F. ET AL. 1992. ABA REGULATED GENE EXPRESSION IN STOMATAL GUARD CELLS OF Commelina communis. ABSTRACTS OF THE 1992 LANCASTER MEETING. #P10.64.

ROBERTS, H. 1986. ANTIBODY AND THE PLANT CELL SURFACES: PRACTICAL APPROACHES. EN IMMUNOLOGY IN PLANT SCIENCE. Ed T.L. WANG. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. LONDON.

RHODES, D. 1987 METABOLIC RESPONSES TO STRESS. EN BIOCHEMISTRY OF PLANT VOL 12. Ed P.K. STUMPF Y E.E. CONN. ACADEMIC PRESS. NEW YORK. pp 201-241.

ROGERS, C.A. et al. 1979. RELATIONSHIP OF TEMPERATURE TO STOMATAL APERTURE AND POTASIUUM ACUMULAION IN GUARD CELLS OF Vicia faba. PLANT PHYSIOLOGY. 63:388-391.

ROSHER, P.H. ET AL. 1985. VALIDATION OF A RADIOINMUNOASSAY FOR (+) ABSCISIC ACID IN EXTRACTS OF APPLE AND SWEET-PEPPER TISSUE USING HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND COMBINED GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. PLANTA. 165:91-99.

SHIMAZAKI, K. Y ZEIGER, E, 1985. CYCLIC AND NONCYCLIC PHOTOPHOSPHORYLATION IN ISOLATED GUARD CELL CHLOROPLASTS FROM Vicia faba. L. PLANT PHYSIOLOGY 78:211-214.

SINGH, B.N. ET AL. 1979. ABSCISIC ACID LEVELS AND METABOLISM IN THE LEAF EPIDERMAL TISSUE OF tulipa gesmeriana L. AND Commelina communis L. PLANTA. 146:135-138.

SKIVER, K Y S. MUNDY. 1990. GENE EXPRESION IN RESPONSE TO ABSCISIC ACID AND OSMOTIC STRESS. PLANT CELL. 2.503-512.

SOTTA, B. et al. 1983. ABSCISIC ACID LOCALIZATION BY LIGHT MICROSCOPIC IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN Chenopodium polyspermum L.: EFFECT OF WATER STRESS. THE JOURNAL OF HSITOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY. 33(3):201-208.

SOSSOUNTZOV, L. ET AL. 1986. INMUNOELECTRON-MICROSCOPY LOCALIZATION OF ABSCISIC ACID WITH COLLOIDAL GOLD ON LOWICRYL-EMBEDDED TISSUES OF Chenopodium polyspermum L. PLANTA. 168:47-481.

- SLOVIKS, Y. W. HARTUNG. 1992. COMPARTMENTAL DISTRIBUTION AND REDISTRIBUTION OF ABSCISIC ACID IN INTACT LEAVES: MATHEMATICAL FORMULATION I. PLANTA. 187:14-25.
- STEWART, C.R. ET AL. 1986. THE EFFECT OF BENZYLADENINE, CICLOHEXAMIDE, AND CORDYCEPIN, ON WILTING-INDUCED ABSCISIC ACID AND SALT-INDUCED PROLINE ACUMULATION IN BARLEY LEAVES. PLANT PHYSIOLOGY. 82:703-707.
- TALLMAN, G. et al. 1988. LIGHT QUALITY AND OSMOREGULATION IN *Vicia faba* GUARD CELLS. PLANT PHYSIOLOGY. 88:887-895.
- TREJO, L.C. 1981. RESISTENCIA A LA SEQUIA IV: EFECTO ANTITRANSPIRANTE DEL ACIDO SALICILICO SOBRE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.). TESIS DE LICENCIATURA. UNAM-E.N.E.P. IZTACALA, MEXICO.
- VANDERHOEF, L.N. Y T. KOSUGE. 1984. WORKSHOP SUMMARIES II, THE MOLECULAR BIOLOGY OF PLANT HORMONE ACTION: RESEARCH DIRECTION FOR THE FUTURE. A PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGY.
- VENEKAMP, J.H. 1989. REGULATION OF CYTOSOL ACIDITY IN PLANTS UNDER CONDITIONS OF DROUGHT. PHYSIOLOGIA PLANTARUM. 76:112-117.
- WALTON, D.C. 1980. BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF ABSCISIC ACID. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 31:453-489
- WALTON, D.C. et al 1979. A RADIOIMMUNOASSAY FOR ABSCISIC ACID. PLANTA 146:139-145.
- WEILER, E.W. 1979. RADIOIMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF FREE AND CONJUGATED ABSCISIC ACID. PLANTA. 144: 255-263.
- WEILER, E.W. 1980. RADIOIMMUNOASSAY FOR THE DIFFERENTIAL AND DIRECT ANALYSIS OF FREE AND CONJUGATED ABSCISIC ACID IN PLANT EXTRACTS. PLANTA. 148: 262-272.
- WEILER, W.E. ET AL. 1982. STRESS-RELATED LEVELS OF ABSCISIC ACID IN GUARD CELLS PROTOPLAST OF *Vicia faba* L. PLANTA. 154:24-28
- WEILER, E.W. 1982. AN ENZYME-IMMUNOASSAY FOR CIS-(+)-ABSCISIC ACID. PHYSIOLOGIA PLANTARUM. 54:510-514.
- WEILER, W. E. 1982. PLANT HORMONE IMMUNOASSAY. PHYSIOLOGIA PLANTARUM. 54:230-234.
- WEILER, W.E. 1984. IMMUNOASSAY OF PLANT GROWTH REGULATORS. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 35:85-95.
- WEYER, J.D.B. Y J.R. HILLMAN. 1979. UPTAKE AND DISTRIBUTION OF ABSCISIC ACID IN *Commelina* LEAF EPIDERMIS. PLANTA. 144:167-172.
- WEYERS, J.D.B. ET AL. 1982. METABOLIC INHIBITOR BLOCK ABA INDUCED STOMATAL CLOSURE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 137(33):1270-1278.

WEYERS, J.D.B. et al. 1987. RESPONSES OF *Commelina communis* STOMATA In Vitro. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 38(189):631-641.

WRIGHT, S.T. 1969. AN INCREASE IN THE " INHIBITOR BETA " CONTENT OF DETACHED WHEAT LEAVES FOLLOWING A PERIOD OF WILTING. PLANTA 86:10-20.

WRIGHT, S.T. Y R.W.P. HIRON. 1969 (+)-ABSCISIC ACID, THE GROWTH INHIBITOR INDUCED IN DETACHED WHEAT LEAVES BY A PERIOD OF WILTING. NATURE. 224:719-720

WRIGHT, S.T. 1977. THE RELATIONSHIP BETWEEN LEAF WATER POTENTIAL AND THE LEVELS OF ABSCISIC ACID AND ETHYLENE IN EXCISED WHEAT LEAVES. PLANTA. 134:183-189.

WILLMER, C.M. 1983. STOMATA. Ed. LONGMAN. LONDON, pp 133-140.

WILLMER, C.M. 1988. STOMATAL SENSING OF THE ENVIRONMENT. BIOLOGICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY. 34:205-217.

ZABADAL, T.J. 1974. A WATER POTENTIAL THRESHOLD FOR THE INCREASE OF ABSCISIC ACID IN LEAVES. PLANT PHYSIOLOGY. 53:125-127.

ZEEVAART, J. A. D. 1983. METABOLISM OF ABSCISIC ACID AND ITS REGULATION IN *Xanthium* LEAVES DURING AND AFTER WATER STRESS. PLANT PHYSIOLOGY. 7:477-481.

ZEEVART, J.A.D. 1988. METABOLISM AND PHYSIOLOGY OF ABA. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 39:

ZEIGER, E. et al. 1983. THE PHOTOBIOLOGY OF *Phapiopedilum* STOMATA: OPENING, UNDER BLUE BUT NOT RED LIGHT. PHOTOCHEMISTRY, PHOTOBIOLOGY. 37:627-630.

ZEIGER, E. 1983. THE BIOLOGY OF STOMATAL GUARD CELLS. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY. 34:441-475.

ZEIGER, E. et al. 1987. THE GUARD CELL CHLOROPLAST: PROPERTIES AND FUNCTION. PROGRESS IN PHOTOSYNTHESIS RESEARCH. VOL. IV: 273-280.

ZEIGER, E. 1987. INTRODUCTION. IN STOMATAL FUNCTION, ed E. ZEIGER, G.D. FARQUHAR AND I.R. COWAN, PP 1-20. STANFORD CALIFORNIA. STANFORD UNIVERSITY PRESS. p 503.

ZEMEL, E. AND GEPSTEIN, S. 1985. IMMUNOLOGICAL EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE IN GUARD CELL CHLOROPLAST. PLANT PHYSIOLOGY. 78:586-590.