

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL.
FACULTAD DE CIENCIAS.
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Gallardo, M. y Sánchez-Calle, I.M.

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA EN SEMILLAS TERMOINHIBIDAS DE
Cicer arietinum L.

RESUMEN

Se estudió el efecto de las temperaturas supraóptimas sobre el porcentaje de germinación, peso fresco de los ejes embrionarios y sobre la actividad ribonucleásica en ejes embrionarios y cotiledones de semillas de *Cicer arietinum*.

Las altas temperaturas retrasan la emergencia radicular y disminuyen, por tanto el peso fresco de los ejes. La actividad ribonucleásica es mucho mayor en los cotiledones que en los ejes y va incrementando a medida que avanza el periodo de germinación, estando afectada de forma negativa por el incremento de la temperatura.

SUMMARY

The effect of supraoptimal temperatures on germination percentage, fresh weight and ribonuclease activity in cotyledons and embryonic axes has been studied.

High temperatures delay the radicle emergence and then diminishing the fresh weight of embryonic axis. The ribonuclease activity is higher in the cotyledons than in the embryonic axes and it was going to increasing with the germination periods, being affecting negatively by the increasing of temperature.

INTRODUCCION

Las semillas germinan a una cierta temperatura óptima, por encima de la cual, la germinación puede ser retrasada o inhibida, un fenómeno conocido como termoinhibición (1, 5). La temperatura óptima para la germinación de semillas de *Cicer arietinum* es de 25°C. Temperaturas superiores a ésta, 30°C ó 35°C retrasan la emergencia radicular y la capacidad para el intercambio iónico en el eje embrionario (7). Las razones de esta termoinhibición son muy variadas, pero lo que parece evidente es que las temperaturas altas actúan sobre la velocidad de degradación del material de reserva presente en los cotiledones, lo que colaborará en un

menor crecimiento del eje embrionario. Durante los procesos de germinación, las sustancias de reserva son movilizadas hacia el eje embrionario, por medio de enzimas hidrolíticas. El desarrollo de la actividad enzimática en este período de tiempo depende de su activación o de su síntesis «de novo».

La ribonucleasa es una de estas enzimas, de la que se conocen sus formas (18), pero que su mecanismo de actuación no está todavía claro, aunque se ha demostrado que dicho enzima está sujeto a un control postraducciona (15, 13, 14, 3, 8).

En el presente trabajo, se estudia el porcentaje de germinación y el peso fresco de los ejes embrionarios, así como la actividad enzimática ribonucleasa en ejes y cotiledones de semillas de garbanzo, durante las primeras 36 horas de germinación, a la temperatura óptima y supraóptima.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal y germinación de las semillas

Para el presente trabajo se utilizaron semillas de *Cicer arietinum* cv Castellana obtenidas comercialmente y almacenadas a 4°C hasta el momento de su utilización.

Las semillas se lavaron en agua destilada estéril y se incubaron en lotes de 50 a 25°C, 30°C ó 35°C, durante un mínimo de 6 h y un máximo de 36 h, en bandejas de plástico que contenían 175 ml de agua destilada estéril. El porcentaje de germinación fue medido a todos los tiempos y temperaturas, tomando la emergencia de la radícula como criterio para saber cuando una semilla estaba germinada.

Una vez transcurrido el período de germinación, los ejes embrionarios y cotiledones fueron separados asépticamente, con objeto de medir la actividad ribonucleasa.

Valoración de la actividad ribonucleasa.

A los ejes embrionarios y cotiledones se les añadieron 2 volúmenes (p/v) de tampón Tris-ClH (50 mM) pH=7.5 y se homogeneizaron. El homogenado se centrifugó durante 15 min. a 30.000 g a una temperatura de 4°C, utilizándose el sobrenadante obtenido como enzima crudo.

La valoración de la actividad ribonucleasa se hizo según el método de Matilla y Nicolás (11). El volumen final de la reacción fue de 200 µl y estaba compuesto por:

Tampón fosfato sódico (200 mM) pH=	60 µl
Sobrenadante	50 µl
ARN altamente polimerizado (4 mg/ml)	10 µl
Agua estéril	90 µl

La mezcla de la reacción se incubó a 37°C durante 60 min., tras lo cual se paró la reacción con 50 µl de acetato de uranilo al 0.75% en ácido perclórico, dejándola

precipitar durante 1 h a 4°C. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min. a 10.000 g y el sobrenadante así obtenido se diluyó convenientemente y se midió la absorbancia a 260 nm. Para la valoración de proteínas, se siguió el método de Lowry et al. (9).

La actividad ribonucleasa se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento en la absorbancia de 0.1 a 260 nm, comparada con un control sin sustrato.

La actividad específica viene expresada como actividad por mg de proteína.

RESULTADOS

La temperatura óptima de germinación para semillas de *Cicer arietinum* es de 25°C (Fig. 1A), alcanzándose el 100% de emergencia radicular entre las 24 h y las 36 h; temperaturas débilmente superiores (30°C y 35°C) disminuyeron el porcentaje de germinación un 39% a 30°C y un 79% a 35°C a las 24 h, en relación con los valores obtenidos a la temperatura óptima.

Al observar el peso fresco de los ejes embrionarios (Fig. 1B) los resultados fueron similares a los anteriores pero más acusados. A las 12 h de germinación el peso de los ejes embrionarios no presentaba diferencias estadísticamente significativas en función de las diferentes temperaturas. Como era de esperar, el tamaño de los ejes embrionarios va incrementándose a medida que avanza el período germinativo, tanto a la temperatura óptima como a la temperatura de 30°C; sin embargo, a 35°C el peso de los ejes prácticamente no varió durante las primeras 24 h, aumentando posteriormente de forma débil. A pesar de observar el 100% de germinación a 25°C a las 36 h, el hecho de que el peso fresco por eje en estas condiciones se viera fuertemente incrementado entre las 24 h y las 36 h, nos hace suponer que realmente la totalidad de semillas germinadas se debió alcanzar poco después de las 24 h. Las temperaturas supraóptimas tuvieron más efecto sobre el peso fresco de los ejes que sobre la emergencia radicular, así mientras que a 36 h las temperaturas de 30°C y 35°C sólo redujeron la emergencia radicular 1.54 y 2.7 veces, disminuyeron el peso fresco del eje 3.47 y 3.9 veces, respectivamente.

Como se puede observar, uno de los efectos de las temperaturas supraóptimas sobre la germinación de las semillas del garbanzo es dificultar o impedir la emergencia radicular, pudiendo esto deberse a una mayor degradación del material de reserva presente en los cotiledones y así un menor crecimiento de los ejes embrionarios. Las ribonucleasas son un grupo de enzimas que ejercen un papel muy importante en la degradación del material de reserva de una semilla, aumentando su actividad a medida que avanza el proceso germinativo.

La actividad del enzima ribonucleasa (unidades totales) de los cotiledones y de los ejes embrionarios de las semillas de *Cicer arietinum* se muestra en la Figura 2. Los cotiledones presentaban mayor actividad ribonucleasa que los ejes embrionarios,

para todos los períodos de germinación y temperaturas ensayados. En los órganos de reserva esta actividad enzimática incrementa aproximadamente 4 veces desde las 12 h a las 24 h. Durante este espacio de tiempo el eje embrionario de la semilla de garbanzo empieza a realizar el metabolismo aerobio y presenta un crecimiento y desarrollo más intenso.

Las temperaturas supraóptimas disminuyen la actividad ribonucleasa tanto más cuanto mayor es la temperatura, tanto en los ejes embrionarios como en los cotiledones (Fig. 2), aunque el efecto de la temperatura fué más acusado en los órganos de reserva.

Cuando representamos la ribonucleasa en forma de actividad específica (Fig. 3), en los ejes embrionarios germinados a 25°C se observó un aumento de esta actividad enzimática entre las 24 h y las 36 h con respecto a los resultados obtenidos a las temperaturas supraóptimas, debido a que la cantidad de proteínas por unidad de peso fue bastante menor a 25°C.

DISCUSION

Durante el proceso de la germinación, las sustancias de reserva almacenadas en los cotiledones son movilizadas y transportadas hacia el eje embrionario. En este proceso están implicados diferentes enzimas hidrolíticos. El desarrollo de estas actividades enzimáticas en este período, depende de su activación o de su síntesis «de novo». La ribonucleasa, es uno de estos enzimas hidrolíticos cuya regulación génica no está totalmente esclarecida, cuestionándose si es a nivel de transcripción o de traducción (3, 8).

El desarrollo de la actividad ribonucleasa durante la germinación de las semillas ha sido estudiado en muchas plantas, tales como en *Pisum sativum* (4) y *Pisum arvense* (3). Durante el proceso de la germinación de las semillas la actividad ribonucleasa se incrementa tanto en los cotiledones como en los ejes embrionarios. En los cotiledones de *Pisum sativum* o *Pisum arvense* el alto contenido inicial de ARN está asociado con una baja actividad ribonucleasa (3). Por regla general, la actividad ribonucleasa está asociada con una disminución en el contenido de ARN, sugiriendo así una función de esta enzima en la degradación del ARN. Sin embargo, en los ejes embrionarios de semillas de guisante, el incremento con el tiempo de la actividad ribonucleasa viene acompañado por un incremento en el contenido de ARN (17) y esto mismo ocurre en los cotiledones de semillas de garbanzo, si bien, el proceso de degradación es mayor (10, 11).

Como parece lógico, la actividad ribonucleasa es mucho más elevada en los cotiledones que en los ejes embrionarios, ya que para el crecimiento y desarrollo del eje se necesitan nucleótidos para los procesos anabólicos y estos nucleótidos en gran parte serían transportados desde los cotiledones.

Las temperaturas supraóptimas (30°C y 35°C) retrasan la emergencia radicular en semillas de *Cicer arietinum*, afectando al intercambio iónico (7), así como a los

niveles de determinadas hormonas (citoquininas y ABA) (2, 16). La disminución observada en el porcentaje de emergencia radicular en presencia de las altas temperaturas está asociada con un descenso acusado en el peso fresco de los ejes. Por otra parte, nosotros hemos podido observar que la actividad ribonucleasa disminuye progresivamente al aumentar la temperatura, siendo este efecto más acusado en los cotiledones que en los ejes embrionarios (Figs. 2 y 3). Esto puede estar asociado con una disminución en el contenido de agua inducido por las altas temperaturas, ya que podemos observar que existe una correlación significativa entre la actividad ribonucleasa y el peso fresco de los ejes a dichas temperaturas. Esto nos hace suponer que la actividad ribonucleasa está afectada negativamente por un bajo contenido de agua inducido por las altas temperaturas, como ocurre con el ABA, fitohormona que presenta efectos similares al de las altas temperaturas sobre la germinación y el crecimiento del eje embrionario (6) y la actividad ribonucleasa (12).

BIBLIOGRAFIA

- (1) ABELES, F.B. (1986). Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv. «Grand rapids» seed germination. *Plant Physiol.* 81: 780-787.
- (2) BABIANO, J.M. (1987). Endogenous concentration and metabolism of ABA during germination of *Cicer arietinum* L. seeds. Ph. D. Thesis, Universidad de Salamanca.
- (3) BARKER, G.R., BRAY, C.M. y WALTER, T.J. (1974). The development of ribonuclease and acid phosphatase during germination of *Pisum arvense*. *Biochem. J.* 142: 211-219.
- (4) BRYANT, J.A. y GREENWAY, S.C. (1976). Development of nuclease activity in cotyledons of *Pisum sativum* L. *Planta* 130: 137-140.
- (5) GALLARDO, M., DELGADO, M.M., SANCHEZ-CALLE, I.M. y MATILLA, A.J. (1991). Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant Physiol.* 97: 122-127.
- (6) GALLARDO, M., MATILLA, A. y SANCHEZ-CALLE, I.M. (1992). Effects of spermine, abscisic acid and temperature upon ethylene production in *Cicer arietinum* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 30(1): 19-27.
- (7) HERNANDEZ-NISTAL, J., ALDASORO, J., RODRIGUEZ, D., MATILLA, A. y NICOLAS, G. (1983). Effect of thiourea on the ionic content and dark fixation of CO₂ in embryonic axes of *Cicer arietinum* L. seeds. *Physiol. Plant.* 86: 441-446.
- (8) SOLA, M.C. y FRANZONI, L. (1981). Changes in electroforetic pattern of ribonucleases during aging of potato tubers slices. *Z. Pflanzenphysiol.* 103: s. 227-283.
- (9) LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, H.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- (10) MATILLA, A., NICOLAS, G. y SIERRA, J.M. (1982). Changes in messenger RNA in *Cicer arietinum* L. cotyledons seeds during germination. *Plant Sci. Lett.* 25: 209-217.
- (11) MATILLA, A. y NICOLAS, G. (1983). Changes in ribonuclease activity in cotyledons of *Cicer arietinum* L. during the first hours of germination. *Acta Physiol. Plant.* 5(4): 219-226.
- (12) MERLO, E. y MATILLA, A. (1985). Decrease in ribonuclease activity in embryonic axes isolated from chick-pea (*Cicer arietinum* L.) induced by abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 36(172): 1780-1786.
- (13) PITT, D. (1974). Activation and de novo synthesis of ribonuclease following mechanical damage to leaves of *Solanum tuberosum* L. *Planta* 117: 43-55.
- (14) PITT, D. (1975). Changes in activity of lysosomal ribonuclease following mechanical damage to leaves of *Solanum tuberosum* L. *Planta* 123: 125-136.

- (15) PITT, D. y GALPIN, M. (1971). Increase in ribonuclease activity following mechanical damage to leaf and tuber tissue of *Solanum tuberosum* L. *Planta* 101: 317-332.
- (16) REVILLA, M.E., MARTIN, L. NICOLAS, G., LEGAZ, M.E. y VILLALOBOS, M. (1988). Effects of high temperatures on the variations and transport of endogenous cytokinins during the germination of chick-pea seeds. *J. Plant Physiol.* 132: 223-228.
- (17) TAKAIWA, F., y TANIFUJI, S. (1978). Development of RNase activity in embryonic axis of germinating pea seeds. *Plant & Cell Physiol.* 19(8): 1507-1518.
- (18) WILSON, C.M. (1975). Plant nucleases. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 187-206.

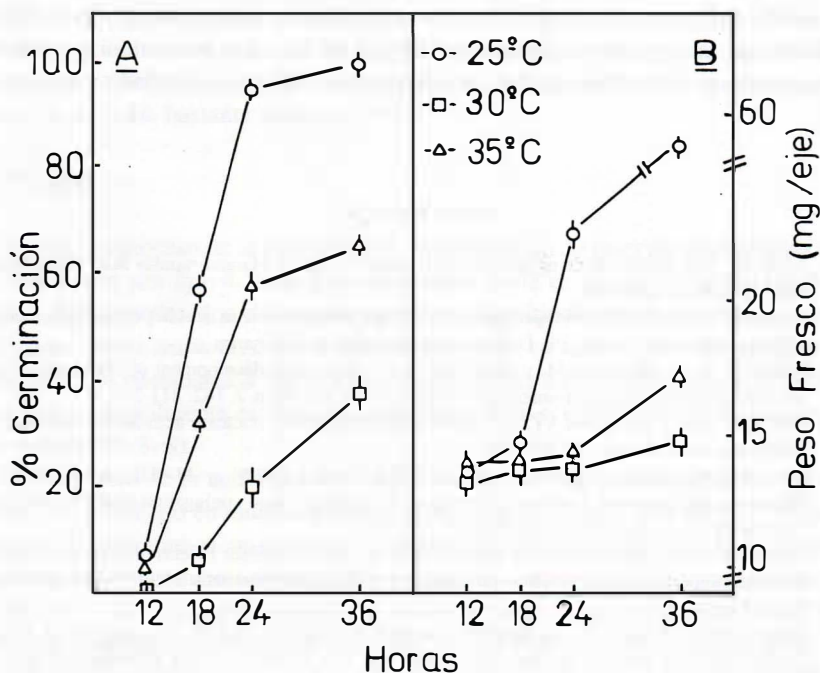


Fig. 1. Porcentaje de germinación (A) y peso fresco (B) de los ejes embrionarios de semillas de *Cicer arietinum* germinadas en agua durante las primeras 36 h a 25°C (o), 30°C (Δ) ó 35°C (◊). Cada punto es la media de tres repeticiones, las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

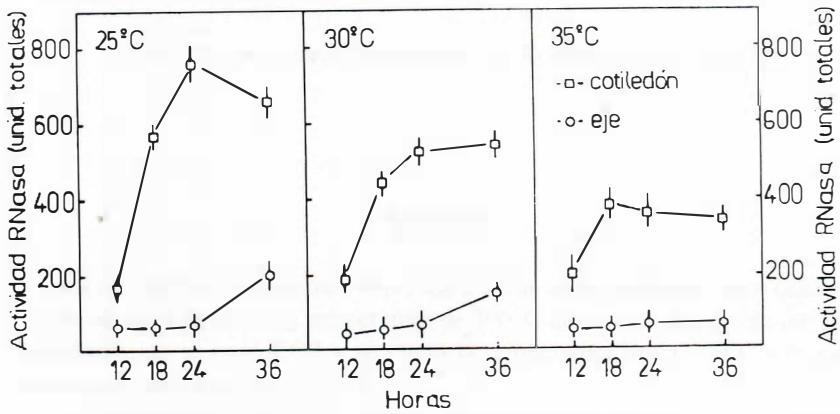


Fig. 2. Actividad ribonucleasa (unidades totales) en ejes (o) y cotiledones (•) de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 36 h a 25°C, 30°C ó 35°C. Cada punto es la media de tres repeticiones, las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

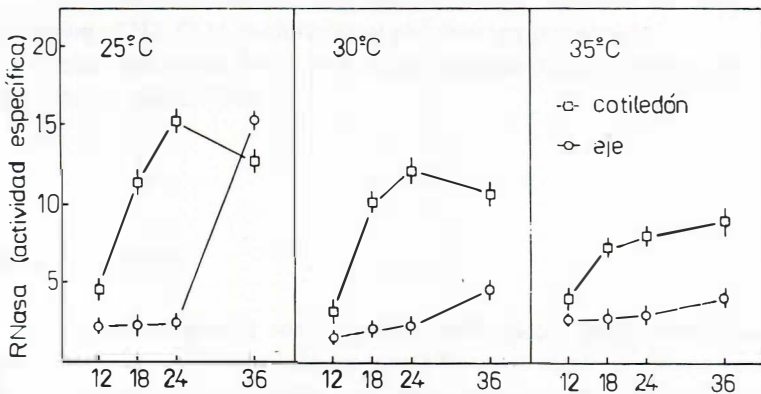


Fig. 3. Actividad ribonucleasa (actividad específica) en ejes (o) y cotiledones (•) de semillas de *Cicer arietinum* germinadas durante las primeras 36 h a 25°C, 30°C ó 35°C. Cada punto es la media de tres repeticiones, las barras verticales corresponden a la desviación estándar.