

## Intervención del sistema ascórbico oxidasa en el crecimiento de coleóptilo de la avena

LUIS RECALDE MARTINEZ Y RAFAEL GARCIA VILLANOVA

*I.—Acción del ácido ascórbico y su interacción con el ácido indolacético*

### INTRODUCCION

Hace quince años, en la primera edición de su libro "Plants and Vitamins", una autoridad en "Vitaminología", SCHOPFER (1949) (1) escribía lo siguiente sobre la función del ácido ascórbico en el crecimiento vegetal: "Ya hemos afirmado —decía— que es dudoso que el ácido ascórbico funcione como un verdadero factor de crecimiento". Sin embargo, ya entonces se sabía que la concentración del ácido ascórbico (o del Glutati6n) aumentaba considerablemente en los tejidos vegetales al iniciarse una etapa de activo crecimiento, como por ejemplo, la germinaci6n de las semillas. Bastante m6s tarde RAADTS (1948) (3) a6n admitía que no había sido estudiado suficientemente, si el ácido ascórbico, "que existe en cantidades relativamente grandes en los 6rganos vegetales en crecimiento", interviene o no en "el crecimiento por extensi6n" o elongaci6n. Es verdad, que repetidas veces se ha observado un cierto estímulos en el desarrollo de plantas con ácido ascórbico (AMLONG y HAUNDORF, 1938) (4), pero sólo CLARK (1937) (5), y RAADTS (1948) (3) han investigado el efecto del ácido ascórbico sobre el crecimiento por extensi6n.

CLARK (1937) (5) utilizó una solución de ácido ascórbico (pH 5 a 6) estabilizada con cisteína, para impedir su oxidación. Así tratado resultó completamente inactivo.

RAADTS (1948) (3) por el contrario, no empleó ningún medio de estabilización. Sus resultados fueron, no obstante, muy irregulares. Refiriéndose a los obtenidos con uno de los métodos que empleó el llamado "ensayo de curvatura" —dice— "En la mayor parte de los casos el efecto (del ácido ascórbico) fue pequeño o nulo, aunque en algunos aislados influyó de una forma totalmente decisiva en el crecimiento", y en relación a los conseguidos con el "ensayo de secciones", —afirma— "el ácido ascórbico puede intervenir, ya estimulando ya retrasando ocasionalmente el crecimiento, pero el efecto que aparece en las primeras dos horas y media desaparece en el curso del ensayo de modo que el final, el crecimiento total no difiere, o sólo difiere de modo insignificante, de los controles".

Una revisión cuidadosa del Chemical Abstracts y del Biological Abstracts, terminada en el primer trimestre de 1956, no añadió nuevas investigaciones a las que acabamos de reseñar sobre la actividad del ácido ascórbico en el crecimiento por extensión.

### Metabolismo del ácido ascórbico

a) *Acido ascórbico, y ácido dehidroascórbico*.—El metabolismo ascórbico, está en las plantas, íntimamente ligado al de los ácidos orgánicos y a su intervención en la respiración y en el crecimiento.

El ácido ascórbico se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico. Este último es muy inestable a pH superior a 5, de tal forma, que en solución neutra o alcalina se descompone en espacio de pocos minutos, dando el último término, ácido oxálico y trónico. Por el contrario, el ácido ascórbico es estable en solución pura o en jugos vegetales de pH inferior a 7, comportándose como un ácido fuerte.

Los investigadores coinciden en que casi todo el ácido ascórbico, se encuentra presente en las células normales como tal, es decir, en forma reducida. Es posible que su inestabilidad impida, al ácido dehidroascórbico, acumularse. Sin embargo, se encuentra en cantidad medible en muchos tejidos, y su proporción, con la forma reducida (el ácido ascórbico), varía por las circunstancias. Lo que viene a demostrar la rever-

sibilidad del sistema dentro de las células. Confirmada por la rápida reducción del ácido dehidroascórbico cuando se inyecta en hojas, observada por RUDRA (1943) (7).

Aunque el ácido ascórbico no es autooxidable, su oxidación (en presencia del aire) resulta fácilmente catalizada por los iones hidróxilo y por los metales di y trivalentes, especialmente por los de cobre. Es muy posible, en los tejidos, que la oxidación del ácido ascórbico transcurra catalizada, en parte, por iones  $\text{Cu}^{++}$  bien libres o bien ligados débilmente a proteínas no específicas. No obstante, se ha conseguido demostrar en ellos la presencia de hasta cuatro sistemas enzimáticos capaces de efectuar también dicha oxidación. La peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno (HUSZAK, 1937) (8), JAMES y GRACC (1943) (9), la polifenolasa, en presencia de polifenoles; el sistema citocromo (STOZ, HARRER, SCHULZ y KING, 1938) (10) y la ascórbico-oxidasa.

b) *Ascórbico-oxidasa*.—En presencia de otros sistemas resulta difícil demostrar la intervención de la ascórbico-oxidasa. Este fermento es particularmente abundante en algunas cucurbitáceas.

MEIKLEJOHN y STEWAR (1941) (11) lo obtuvieron de este origen, en preparaciones bastante puras que contenían siempre cobre. Encontraron, además, después de prolongadas diálisis en agua, que la cantidad de ácido ascórbico oxidado, enzimáticamente, era proporcional a la cantidad de cobre contenida en la preparación. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por POWERS, LEWIS y DAWON (1944) (12) con preparaciones de mayor actividad.

La susceptibilidad del enzima frente a los inhibidores refleja, del mismo modo, su dependencia del cobre. Así, la ascórbico-oxidasa es completa y reversiblemente inhibida por  $\text{CNH M}/1000$  y también por  $\text{SH}_2 \text{ M}/1000$ , siéndolo también intensamente por reactivos orgánicos del cobre capaces de formar complejos con este elemento; tales como la 8-hidroxiquinolina, el dietil-tiocarbamato sódico y el etil-xantado potásico.

La ascórbico-oxidasa tiene un pH óptimo de alrededor de 6. Catalizada la oxidación del ácido ascórbico por el oxígeno molecular (interviniendo un átomo de oxígeno por molécula de ácido). No parece que se forma  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la oxidación enzimática del ácido ascórbico (aunque puede formarse cuando se cataliza por iones libres de cobre).

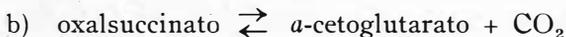
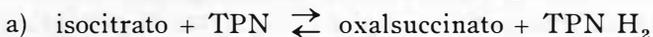
La ascórbico-oxidasa funciona, pues, como oxidasa terminal según el siguiente esquema :





va por los iones de Mg y también por los de Mn, aunque con menos eficiencia ( $5 \times 10^{-3}$  M. y  $2,5 \times 10^{-4}$  M., respectivamente). Cantidades superiores al óptimo de cualquiera de estos metales origina una rápida disminución de la actividad del fermento.

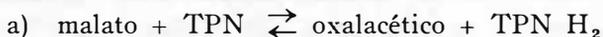
OCHOA (1945) (27) (1948 (28) y MAPSON y GODDARD (1951) (29) sostienen que la conversión del ácido isocítrico en ácido *a*-cetoglutárico y anhídrido carbónico transcurre en dos etapas :



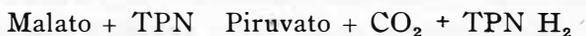
La primera a) consiste en la dehidrogenación del isocitrato, en ella interviene como coenzima la codehidrogenasa II o trifosfopiridinucleotido (Co. II o TPN), no pudiendo ser sustituido en esta función por la codehidrogenasa I o difosfopiridinucleotido (Co. I o DPN); y la segunda b), en la descarboxilación del oxalsuccinico formado en la primera.

La reacción a) está catalizada por la isocítrico-dehidrogenasa y la b) por la oxalsuccínico-decarboxilasa. Es en esta última en la que el Mg o el Mn intervienen como co-factor. Sin embargo, este punto de vista no es compartido por ADDLER, VON EULER, GUNTHER y PLASS (1939) (25), quienes afirman que es la primera reacción la activada por los metales.

e) *Málico-dehidrogenasa*.—La málico-dehidrogenasa parece estar siempre también presente en el coleóptilo de la avena según BERGER y AVERY (1943-1944) (24) (38). Para VENNESLAND y sus colaboradores (VENNESLAND, GOLLUB y SPEAK 1949) (31), VENNESLAND (1949) (32); CONN, VENNESLAND y KRAEMER (1949) (33), la dehidrogenación del ácido málico sigue análogo curso que la del isocítrico, por conversión, primero, en oxalacético y posterior descarboxilación de éste a pirúvico. El Co. II es necesario en la primera etapa y el manganeso (óptima concentración M/100) en la segunda,



Además de este enzima, OCHOA y sus colaboradores encontraron, en el hígado de paloma, otro que realizaba en una sola etapa la oxidación decarboxilante del ácido málico ;



CONN, WENNESLAND y KRAEMER (1949) (33) encontraron este nuevo e importante enzima en diversos materiales de origen vegetal (gérmenes



Es posible, por todo lo anterior, suponer relacionado al sistema ascórbico-oxidasa con la formación de ATP.

## P A R T E E X P E R I M E N T A L

### MATERIAL Y METODOS.

El número de métodos propuestos para determinar la actividad biológica de sustancias orgánicas capaces de, a débiles concentraciones, promover, inhibir o modificar cualitativamente el crecimiento, es considerable. Se puede afirmar que todas, o casi todas, las múltiples manifestaciones fisiológicas que en los vegetales provocan estas sustancias, han sido empleadas para su ensayo.

Así, se han utilizado, no solo fenómenos relativamente simples, debidos a la extensión y división celular (como el crecimiento longitudinal de coleótilos, hipocótilos, tallos y raíces) sino también las rizo y fructigenesis en que intervienen complejos fenómenos de diferenciación. Esto hace que las cifras obtenidas por varios métodos al medir la actividad de una misma sustancia no sean, con frecuencia, concordantes, y por ello, la elección del método adecuado en cada caso revista especial importancia.

En el nuestro, limitándonos a estudiar la acción del ácido ascórbico sobre una de las fases del crecimiento celular (la elongación) nos vimos en la necesidad de descartar todos aquellos métodos en que el crecimiento no dependía exclusivamente de ella, y elegir entre los que utilizan como material de ensayo, coleótilos o tallos de plántulas

Preferimos, entre ellos, el coleótilo de la avena, que por ser el material clásico de este tipo de investigaciones y haber sobre su comportamiento fisiológico y biológico una amplia bibliografía, que en su parte hemos resumido en páginas anteriores.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la respuesta, tanto en el método de WENT (1929) (37) y sus modificaciones (en que la actividad de la sustancia se mide por la intensidad de la curvatura que provoca en el coleótilo, al difundirse longitudinalmente desde un pequeño bloque de agar colocado asimétricamente en su ápice) como en los

de SCHEER (1937) (38) y WIENTRAUB (1938) (39) (en que se mide por el crecimiento rectilíneo que en el coleóptilo origina dicha difusión, cuando está simétricamente colocado el bloque) depende, no sólo de su efecto sobre la elongación celular, sino también y en primer lugar, de su velocidad de transporte polar a través del tejido.

En efecto, el crecimiento asimétrico del coleóptilo (curvatura) debajo del bloque de agar mide dos cosas: La actividad de la sustancia difundida, y su capacidad para difundirse descendiendo por el coleóptilo. Como después de 90 minutos se sabe que comienza una activa regeneración fisiológica del ápice amputado, es claro que sólo la respuesta que tiene lugar durante el mismo puede atribuirse a la sustancia ensayada, pero, por otro lado, dicho intervalo puede ser insuficiente para permitir su difusión comportándose entonces como aparentemente inactiva.

De todo lo anterior, resulta evidentemente que el estudio de problemas referentes exclusivamente a la elongación celular debe de hacerse con métodos que no implique el transporte de la sustancia ensayada, sino que solamente midan su actividad.

Tal requisito se cumple casi por completo cuando se mide el crecimiento de secciones aisladas de coleóptilo, flotando o parcialmente sumergidas en una solución acuosa de la sustancia ensayada. Comparado con el "de la curvatura" este tipo de métodos resulta, sin embargo, menos sensible en términos de la cantidad mínima absoluta que puede determinarse.

El llamado ensayo de "sección de coleóptilo" fue ideado por BONNER (1950) (40) (1949) (41) y ha sido empleado y parcialmente modificado por varios investigadores (SCHNEIDER, 1938) (42) THIMANN y SCHNEIDER (1938) (43) THIMANN y W. D. BONNER (1948) (44) PHOL (1948) (45) RIETSEMA (1949) (46) BENTLEY (1950) (47) BENTLEY y HOUSLEY (1954) (48).

A continuación hacemos un estudio crítico del mismo y describimos detalladamente la variante o modificación utilizada por nosotros.

a) *Sensibilidad y uniformidad del material.*—En todo ensayo biológico el material empleado debe ser, en el mayor grado posible, uniforme y sensible.

Seguidamente indicamos una serie de factores que como se ha demostrado experimentalmente condicionan la uniformidad o la sensibilidad de los coleóptilos.

b) *Influencia del genotipo de la avena empleada.*—Las diferentes razas o variedades de avena no suministran coleóptilos de la misma sensibilidad, de aquí, que aunque cierto número de variedades se hayan utilizado de manera regular por algunos investigadores, es la denominada *Victoria* la que generalmente se emplea y la que nosotros hemos usado. Sin embargo, esta variedad no posee una sensibilidad uniforme, como ha demostrado LARSEN (1938) (49) al aislar tres razas fisiológicas de una (considerada) línea pura de avena *Victoria*, que se distinguían entre sí por poseer diferentes sensibilidades medias. Por otro lado, se han observado también diferencias de sensibilidad relacionadas con el origen geográfico de la semilla que indudablemente dependen de las condiciones ambientales que presidieron el cultivo.

c) *Germinación.*—Las condiciones en que se realiza la germinación intervienen poderosamente en la sensibilidad y uniformidad de los coleóptilos obtenidos, por lo que los diferentes autores indican cuidadosamente la temperatura, humedad, luz, etc., bajo las que ésta se efectuó.

d) *Luz.*—Cuando la avena germina en presencia de la luz, los coleóptilos no crecen más que uno o dos centímetros, a diferencia de los cinco o seis que alcanzan en la oscuridad, por otra parte, la luz blanca afecta la distribución de la auxina en el coleóptilo originando las clásicas curvaturas fototrópicas, conviene por tanto que el crecimiento de las plántulas se realice siempre en la oscuridad. No obstante, algunos autores efectúan la inhibición de las semillas en la luz, y otros, con el fin de inhibir el crecimiento del mesocotilo, las iluminan durante un cierto período con luz roja o anaranjada de una determinada intensidad (550 m $\mu$ ).

e) *Humedad.*—Aunque una de las ventajas técnicas del método que estamos discutiendo sea precisamente el de poder prescindir de la cámara de humedad constante, bastando con unas cajas de Petri y una estufa seca provista de regulador de temperatura, lo cierto es, que sin su empleo, resulta difícil obtener coleóptilos suficientemente rectos y sensibles.

Con objeto de eliminar este inconveniente BENTLEY (1950) (47) ha propuesto el siguiente procedimiento:

Las semillas desprovistas de glumas se las hace germinar en cajas de Petri sobre papel de filtro húmedo durante 48 horas a 25° de temperatura y expuestas a la acción de la luz roja. Después, cuando ya tienen tamaño suficiente para poderlas manejar, se colocan en la boca

de pequeños tubos llenos de agua y se sitúan dentro de un cristizador que se tapa con objeto de asegurar una atmósfera saturada. El crecimiento continúa de esta forma a 25° en la oscuridad durante 24 horas más.

Cuando se dispone de una cámara de humedad constante, que nosotros hemos sustituido con éxito por una germinadora, no hay inconveniente en sembrar las semillas, con glumas, en arena gruesa (BENTLEY, 1950) (47), vermiculita (Mc RAE y BONNER, 1953) (49) o suelo (BOYSEN y JENSEN, 1935 (50), 1936 (51), 1941 (52), LARSEN (1944) (33).

f) *Temperatura*.—Aunque la temperatura óptima para el crecimiento del coleóptilo es de 30°, se suele usar la de 25° que permite un crecimiento más regular y origina coleóptilos más uniformes y sensibles.

g) *Tamaño del coleóptilo*.—WENT y THIMANN (1937) (54) demostraron que la sensibilidad de los coleóptilos (cuando crecen a 25° C, en la oscuridad y humedad del 84%) aumenta progresivamente para más tarde volver a disminuir, alcanzando el máximo 76 horas después de la siembra, cuando aquéllos tienen una longitud aproximada de 15 mm. Esta cuestión ha sido de nuevo investigada por BENTLEY (1950) (47), quien hace notar, en primer lugar, lo difícil que resulta el mantener el tamaño de la semilla y las condiciones de germinación tan uniformes que todas las plantas de una serie (sembradas al mismo tiempo) posean coleóptilos de la misma longitud; aún más difícil resulta todavía, tratándose de series diferentes sembradas en días distintos. Lo más que se consigue es que el tamaño de coleóptilos esté comprendido en un intervalo determinado (por ejemplo de 10 a 20 mm.). Se impone, pues, para dar uniformidad al material una rigurosa selección, que en nuestro caso nos llevaba a desechar más del 50% de las plántulas.

La importancia de la longitud más bien que la edad del coleóptilo en el estudio de problemas fisiológicos ha sido puesta de relieve por varios investigadores. PRESTON y CLARK (1944 (36) la consideran como la variable de mayor importancia fisiológica.

BENTLEY (1950) (47) al comparar tres tamaños de coleóptilos, corto (13 a 15 mm.), medio (de 15 a 20) y largo (de 20 a 25), encontró como más sensibles el corto; es decir, el mínimo tamaño posible, ya que usaba secciones de 10 mm. y amputaba el ápice en una longitud de 3 mm. El límite de sensibilidad encontrado por este autor fué aproximadamente de 0,01 mgs. por litro de ácido indolacético. Sin embargo,

reconoce "que el efecto de la longitud (del coleóptilo) depende más que de la serie utilizada (día) lo que sugiere que son las condiciones de la germinación, tales como la intensidad de la inhibición de agua y movilización de los enzimas las que en último término determinan el tipo de coleóptilo producido, y son por ello responsables las fluctuaciones en la respuesta de día a día. Por esto recomiendo "calibrar" las respuestas (obtenidas en cualquier ocasión) con las producidas por una determinada cantidad de ácido indolacético.

h) *Posición de las secciones en el coleóptilo.*—La mayoría de los investigadores emplean secciones de 3 mm. cortando tres o cuatro de cada coleóptilo, y miden el crecimiento medio de cierto número de ellas. Este modo de proceder tiene sin embargo el inconveniente que aumenta considerablemente la variabilidad en la respuesta individual de las secciones.

Como demostró SCHNEIDER (1938) (42), y comprobó BENTLEY (1950) (47) la sensibilidad de las secciones aumenta considerablemente desde la base al ápice, y como consecuencia el crecimiento medio se obtiene con menor error cortando una sola sección de cada coleóptilo.

i) *Tamaño de las secciones.*—La longitud de las secciones empleadas varía considerablemente. VAN SATEN (1938) (2) y RIETSEN (1949) (46) recomiendan secciones de 15 mm.; BONNER (1933) (3) de 3 mm.; MCRAE y BONNER (1953) (49) de 5 mm.; por fin BENTLEY (1950) (47) de 10 mm. El emplear secciones cortas (de 3 mm. por ejemplo) tiene la ventaja de que se pueden medir al microscopio con un micrómetro ocular, lo que no es practicable con secciones largas (10 mm.) y que la curvatura que el geotropismo provoca es débil o nula, y el inconveniente, según BENTLEY (1950) (47) de que la respuesta, expresada en porcentaje de la longitud inicial, es menor.

Para evitar la reacción geotrópica se ha propuesto por varios autores enhebrar los coleóptilos en un peine especialmente preparado de vidrio o plástico (BONNER, 1933) (34), SCHNEIDER, 1938) (42) o en tubos capilares cerrados por los extremos (BENTLEY, 1950) (47). Tiene la ventaja tal soporte de facilitar la flotación de las secciones y su medida. Sin embargo, BONNER (1949) (41) y BENTLEY y HOUSLEY (1950) (48) encontraron que el uso de soportes disminuye el crecimiento de las secciones, ya que, por otro lado, la presencia de la hoja primaria en el interior del coleóptilo tiene un ligero efecto estimulante sobre el crecimiento.

Por eso, últimamente BENTLEY y HOUSLEY (1954) (48) recomiendan no montar las secciones, midiendo exactamente su imagen proyectada sobre una pantalla y ampliada un número determinado de veces por medio de una regla flexible.

j) *Aireación*.—Dependiendo (como hemos visto en páginas anteriores) el crecimiento del coleóptilo de su metabolismo aeróbico, resulta lógico que la tensión de oxígeno del medio afecte su sensibilidad.

THIMANN y W. D. BONNER (1948) (44) y BENTLEY (1950) (47) encontraron que el crecimiento (producido por auxina) es mayor en las secciones flotantes que en las sumergidas, y menor su variabilidad. BONNER (1933) (34) y SCHNEIDER (1938) (42) no hallaron diferencia alguna. VAN SATEN (1938) (2) y RIETSEMA (1949 -a-b) (6) recomiendan el burbujeo de aire a través de la solución. BENTLEY y HOUSLEY (1954) (48), por último, demostraron que, aunque el crecimiento de las secciones es más rápido, la sensibilidad no cambia por la aireación.

k) *Crecimiento endógeno y auxina residual*.—Las secciones crecen con cierta intensidad (crecimiento endógeno) cuando flotan en agua destilada, lo que se debe a la auxina residual presente en las mismas. Se considera conveniente disminuir ésta en lo posible. Tal cosa puede hacerse bien decapitando los coleóptilos hora y media antes de cortar las secciones, bien colocando las secciones en solución de sacarosa o agua pura durante algunas horas antes del comienzo del ensayo. Según BENTLEY (1950) (47) y otros investigadores, ninguno de los dos procedimientos incrementa la sensibilidad ni la exactitud del ensayo. RIETSEMA (1949-a-b) (6) afirma que las secciones que permanecen en agua durante 6 horas, antes de pasarlas a la solución de auxina, crecen más que las sumergidas directamente en esta última. La mayor ventaja del pretratamiento, sin embargo, es, según este autor, que la velocidad de crecimiento de los controles se hace muy lenta, con lo que la sensibilidad aumenta, haciendo las medidas al cabo de 3 horas.

Deseminando las plántulas de avena 24 horas antes del seccionamiento del coleóptilo observó POHL (1949) (45) que se reduce el crecimiento de los controles, pero este investigador no determinó el efecto que tal tratamiento pudiera tener sobre la respuesta a la auxina adicionada.

1) *Duración del ensayo*.—Según BENTLEY (1950) (47) cuando las secciones crecen en agua a 25° se consigue la respuesta máxima entre las 20 y 24 horas del comienzo del ensayo. Frecuentemente hay un

considerable crecimiento adicional durante las 24 horas siguientes, en presencia de concentraciones óptimas de auxina, sacarosa, ión potásico, etc. No obstante, a menos que sea necesario para un fin determinado, no es aconsejable prolongar el ensayo más de un día, ya que entre otros inconvenientes, hay el riesgo de contaminación bacteriana.

2) *Adición de hidratos de carbono.*—La adición a la solución experimentada de (1 a 3%) glucosa o sacarosa ha sido recomendada con el fin de aumentar el crecimiento. Sin embargo, como al mismo tiempo la variabilidad también crece (BONNER, 1949 (41); BENTLEY, 1950 (47); y BENTLEY y HOUSLEY, 1954) (48) no parece representar ventaja alguna desde el punto de vista de la sensibilidad.

m) *Concentración de hidrogeniones.*—Se ha observado repetidamente por diversos investigadores que el crecimiento por extensión celular (elongación) de diversos órganos vegetales (coleóptilos, tallos, raíces, etc.) resulta mucho mayor en medio ácido que en neutro o alcalino, encontrándose usualmente el pH óptimo entre 4 y 5.

Teniendo en cuenta, por otro lado, que todas las auxinas conocidas son ácidos débiles, se ha explicado esta influencia del pH suponiendo que estas sustancias sólo son activas como moléculas sin disociar. En apoyo de tal hipótesis existe el hecho de que, dentro del error experimental, el crecimiento en las secciones de coleóptilos varía inversamente con el grado de disociación iónica de la auxina.

n) *Expresión de los resultados.*—La actividad de la sustancia ensayada se ha venido expresando de diferentes formas: a) Por la longitud final que las secciones alcanzan después de un determinado período de tratamiento. b) Por la diferencia entre la longitud final y la inicial. c) Por dicha diferencia pero expresada en tantos por ciento de la longitud inicial. d) Por comparación de cualquiera de las magnitudes anteriores, obtenidas de secciones que crecen en agua (o solución control), con las conseguidas en la sustancia ensayada.

ñ) *Descripción del método empleado.*—Granos de avena (var. Victoria), desprovistos de glumas, se les sumergía durante 4 horas en cantidad suficiente de agua destilada para permitir su inhibición. Después se les disponía sobre papel de filtro humedecido en cajas Petri (de 10 cm. de diámetro) colocadas, a su vez, dentro de una germinadora Jacobson regulada a 25°, donde permanecían 72 horas más. Aunque la germinación proporcionaba a las plántulas un ambiente de elevada humedad, con objeto de suplir cualquier deficiencia de agua en aquéllas, se añadía, cada 24 horas, 5 c. c. de agua por caja. El cristal

incolore de la germinadora se substituyó por otro de color rojo, con objeto de inhibir el crecimiento del mesocotilo.

A las 76 horas de comenzada la experiencia se sacaban las cajas de la germinadora y se seleccionaban las plántulas con coleóptilos rectos y de tamaño apropiado (aproximadamente 20 mm.); de éstos se obtenían secciones (de 5 mm. de longitud) empleando un dispositivo en el que dos cuchillas de afeitar se encontraban exactamente separadas por esta distancia. Un tope situado a tres milímetros de una de las cuchillas permitía eliminar el ápice del coleóptilo y cortar todas las secciones a igual distancia del mismo.

Las secciones cortadas de los coleóptilos se las colocaba flotando en 20 c. c. de la solución a ensayar (contenida en una caja Petri), en donde el crecimiento continuaba durante 24 horas, en la oscuridad a 25° C de temperatura. En todas las soluciones ensayadas se ajustó el pH a 6,5-6.8 añadiendo la cantidad necesaria de solución de sosa diluída.

El número de secciones empleado fué el de 30 por caja, repitiéndose tres cajas por tratamiento; y a su vez, tal experiencia (serie de tratamientos diferentes) se repitió otras tres en días distintos. Cada cifra es pues la medida de 90 medidas individuales de secciones de coleóptilos.

Para medir la longitud de las secciones se empleó el siguiente dispositivo:

Una placa fotográfica sobre la que se había impresionado la imagen (reducida a la mitad) de una hoja de papel milimetrado; una lámpara eléctrica colocada debajo de la placa, que permitía iluminar por transparencia y una lupa para observar cómodamente el retículo y los coleóptilos colocados sobre ella durante la medición.

Todas las operaciones se efectuaron sobre luz roja.

(Continuará)