REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 43, (1), 87-94, 1987

Quinetina y capacidad germinativa de semillas de *Lupinus multilupa*

C. Morales*, R. M.ª Cusido y M. Serrano

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
08028 Barcelona

(Recibido el 13 de marzo de 1986)

C. MORALES, R. M.ª CUSIDO and M. SERRANO. *Kinetin and Germinative Capacity of* Lupinus multilupa *Seeds*. Rev. esp. Fisiol., 43 (1), 87-94, 1987.

The effect of kinetin (10^{-6} M and 10^{-4} M) on the germinating capacity and incorporation of 8-C^{14} adenine into DNA, RNA and RNA Poly A^+ of embryos and cotyledons from *Lupinus multilupa* L. seeds have been studied. Kinetin enhanced the germinative capacity of the seeds and the incorporation of 8-C^{14} adenine into DNA, RNA and Poly A^+ of embryos and cotyledons. However, there seems to be no close relationship between the DNA and RNA biosynthesis of embryos and cotyledons and the ability of the seeds to germinate and their embryos to continue growing.

Key words: Kinetin, Germinative capacity, DNA and RNA synthesis.

La germinación es un proceso aparentemente sencillo sobre el que aún quedan por aclarar importantes aspectos en relación con las causas de la pérdida de la viabilidad de las semillas, de los factores que las inducen a iniciar la germinación y las bases por las cuales semillas aparentemente iguales muestran diferencias en su crecimiento. Varios autores atribuyen estos hechos a los cambios metabólicos experimentados por las semillas durante su estado de reposo y la germinación.

BRAY (3) observó que durante el crecimiento del embrión (primer efecto visible de la germinación), se producía síntesis de RNA y proteínas, y WOŻNY y GWOŻDZ (19) observaron un aumento de polirribosomas en cotiledones de *Cucumis sativus*. Estos mismos autores (8) hallaron que la quinetina mejoraba la afinidad de los polirribosomas por el RNAm. DALE-SMITH y BRAY (7), al investigar los niveles de RNA poli A^+ en embriones, hallaron que las semillas de alto vigor mostraban más altos niveles de RNA poli A^+ que las de bajo vigor, después de 24 horas de imbibición.

Se ha descrito un marcado estímulo de la germinación y aumento en los niveles de RNA al tratar con fitohormonas semillas embebidas en agua (16), así como aumento de DNA en embriones de trigo, durante la germinación, aunque retrasado con respecto al aumento de RNA (17).

Se ha propuesto que la quinetina actúa neutralizando el efecto de las sustancias inhibidoras que podían haberse acumu-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

lado durante el estado de reposo y la imbibición (10) ya que diluciones de 20 a 50 μM activaban la germinación (11) en distintos grados.

En este trabajo se estudia el efecto de la quinetina en concentraciones de 10^{-4} y 10^{-6} M sobre la capacidad germinativa y la síntesis de DNA y RNA en *Lupinus multilupa* L.

Material y Métodos

Los experimentos se han realizado con semillas de *Lupinus multilupa* L. de cosecha reciente (1984), con objeto de estudiar su capacidad germinativa natural. Para obtener una población homogénea de semillas, se han seleccionado individualmente las de 0,35 ± 0,003 g de peso.

Se esteriliza la superficie de las semillas sumergiéndolas durante 5 min en una solución de hipoclorito sódico 1% (p/v), y seguidamente se lavan tres veces con agua desionizada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito sódico.

Capacidad germinativa. — Se siembran 1.000 semillas en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar, en cápsulas de germinación de 10 cm de diámetro con algodón cubierto de papel Whatman n.° 1 en el fondo; las cápsulas con su sustrato habían sido esterilizadas previamente en autoclave.

El algodón de las cápsulas se humedece con 60 ml de uno de los tres medios utilizados: agua, solución de quinetina 10^{-4} M ó 10^{-6} M.

Las semillas se ponen a germinar en una cámara de germinación a 25°C en la oscuridad. Cada día se cuentan las semillas germinadas y se resiembran en otras cápsulas en las mismas condiciones para observar su crecimiento.

Condiciones de marcaje radioactivo. — Las semillas se ponen en placas de petri de 10 cm de diámetro y se embeben durante 4 h a 25°C, en la oscuridad, con agua desionizada estéril o quinetina 10^{-4} ó 10^{-6} M, a las que se había añadido 50 μg/ml de estreptomicina y 50 μg/ml de penicilina, para evitar el crecimiento bacteriano durante el marcaje, y 10 μCi/ml de adenina 8-C^{14} (New England Nuclear), para marcar en DNA, RNA y RNA poli A^+. A continuación, se lavan con agua desionizada estéril y se dejan germinar en las condiciones anteriormente descritas.

Extracción y separación de DNA y RNA. — Los cotiledones y los embriones se analizan por separado. Se pesan y se trituran individualmente en mortero de vidrio situado en un baño de hielo. La homogeneización y extracción se realiza según BYRNE y SETTEFIELD (6), con un medio de extracción que contiene 0,1 M Tris, 0,1 M Na acetato, 0,1 mM EDTA y 1% SDS, pH 9. El extracto se mezcla con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se centrifuga a 20.000 *g* durante 15 min. Se separan las dos fases, y la fenólica se vuelve a extraer con el mismo tampón durante 5 min y se centrifuga 15 min a 20.000 *g*. Las dos fases acuosas se reúnen y se vuelven a extraer con un volumen igual de fenol-cloroformo. A la fase acuosa final se le añade NaCl, hasta obtener una concentración del 1%, y se precipitan los ácidos nucleicos añadiendo 2,5 volúmenes de etanol, dejando la mezcla a una temperatura de —20°C durante 20 horas. Los ácidos nucleicos se separan por centrifugación y se lavan con etanol. Se añade al precipitado LiCl 2 M para disolver el DNA (18) y se centrifuga a 20.000 *g* durante 20 min. El RNA queda en el residuo y el DNA en la solución (fracción a).

El residuo se lava con etanol, se deseca en estufa de vacío, y, a continuación, se disuelve en solución tampón (0,33 M NaCl, 10 mM Tris acetato, pH 7,6 y 0,5% SDS). El RNA total se determina en una parte alícuota (fracción b); en otra

se determina el RNA poli.A+, por cromatografía en columna de dT celulosa (Sigma) (1). La columna se lava con la solución tampón utilizada para disolver el RNA, y el filtrado contiene el RNA poli A+; seguidamente se pasa por la columna solución de Tris acetato 10 mM a pH 7,6. A continuación, a la solución de RNA poli A+ se le añade *K acetato* hasta una concentración del 2%, y se precipita dicho RNA con 2,5 volúmenes de etanol a —20°C durante 20 horas. Se recoge el precipitado por centrifugación a 20.000 *g* durante 10 min y se diluye en 0,5 ml de agua (fracción c).

Determinación del DNA. — Se realiza por el método de MAYER y POLJAKOFF-MAYBER (13). La fracción c se deseca en estufa de vacío y se hidroliza con 2 ml de HO_4Cl 2 N a 70°C durante 1 hora. El DNA se determina espectrofotométricamente por el método de SCHNEIDER modificado por BURTON (5). A 1 ml del extracto que contiene el DNA se le añaden 2 ml de reactivo de Burton (ácido acético glacial 100 ml, difenilamina 2 g), se calienta a 37°C durante 24 h y se lee la absorción a 600 nm, comparando siempre con una curva de calibración.

Determinación del RNA. — A la fracción b se le añade KOH hasta 0,4 N y se deja a 37°C durante 24 h. Después de neutralizada la fracción con HO_4Cl 0,5 N se centrifuga a 20.000 *g* durante 10 min. En el sobrenadante se determina el RNA por lectura espectrofotométrica a 260 nm, comparando los valores con una curva de calibración.

Determinación de la radiactividad. — La radiactividad, en dpm, del DNA, RNA y RNA poli A+ se mide en 0,5 ml de las fracciones a, b, y c, respectivamente; se añaden 4,5 ml de *cocktail* 22 Scharlau y se lee en un contador de centelleo líquido Rock-Beta LKB-1217.

Resultados y Discusión

Aunque la capacidad germinativa de las semillas utilizadas era muy alta, las soluciones de quinetina 10^{-6} ó 10^{-4} M estimularon de modo observable la germinación, a partir del segundo y tercer día de cultivo, respectivamente (tabla I). Estos resultados son concordantes con los hallados por KHAN (10). Sin embargo, las semillas que germinaron el cuarto día en cualquiera de los medios utilizados, no desarrollaron embriones con capacidad para proseguir su crecimiento.

Los cotiledones de las semillas control germinantes tenían niveles de DNA inferiores a los de las semillas en reposo y, a su vez, eran tanto menores cuanto mayor era el retardo en la germinación. Por el contrario, los niveles de DNA de los cotiledones de las semillas que germinaron en las soluciones de quinetina 10^{-6} ó 10^{-4} M eran siempre significativamente superiores a los de los cotiledones de las semillas en reposo y de las control germinantes, aunque estos valores eran también tanto menores cuanto mayor era el retardo en la germinación (tabla II).

La incorporación de adenina 8-C^{14} al DNA de los cotiledones era muy alta en

Tabla I. *Influencia de la quinetina sobre la capacidad germinativa de semillas* Lupinus multilupa. La germinación tiene lugar sobre lecho de algodón cubierto por papel whatman 1, humedecido con agua o solución de quinetina en cápsula de 10 cm Ø. El ensayo se ha realizado con 1.000 semillas.

Días de germinación	Número de semillas germinadas		
	Agua (Control)	Quinetina	
		(10^{-4} M)	(10^{-6} M)
1.°	5	5	10
2.°	790	725	930
3.°	120	210	35
4.°	25	10	5
No germinadas	60	50	20
Capacidad germinativa %	94	95	98

Tabla II. *Valores de DNA (μg por cotiledones o embrión/semilla) y RNA (mg por cotiledones o embrión/semilla) de semillas de* Lupinus multilupa.
La germinación se realizó sobre lecho de algodón cubierto con papel Whatman 1 humedecido con agua o con solución de quinetina 10^{-4} M ó 10^{-6} M (Control, Q 10^{-4} M y Q 10^{-6} M respectivamente). Cada valor es la media de 15 determinaciones ± ES. 0 = Semillas en reposo; 1, 2, 3 y 4 = Días de germinación. En negrita se dan los valores de embrión/semilla.

	DNA			RNA		
Días	Control	Q 10^{-4} M	Q 10^{-6} M	Control	Q 10^{-4} M	Q 10^{-6} M
0	50,06 ± 5,40 **28,14 ± 0,81**	50,06 ± 5,40 **28, 14 ± 0,81**	50,06 ± 5,40 **28,14 ± 0,81**	1,572 ± 0,135 **0,701 ± 0,026**	1,572 ± 0,135 **0,701 ± 0,026**	1,572 ± 0,135 **0,701 ± 0,026**
1	38,31 ± 3,39 **33,09 ± 1,98**	130,06 ± 6,02 **46,81 ± 1,83**	144,97 ± 2,75 **60,84 ± 2,64**	1,748 ± 0,129 **1,062 ± 0,026**	4,623 ± 0,034 **3,346 ± 0,298**	5,150 ± 0,053 **3,745 ± 0,108**
2	34,95 ± 3,51 **28,56 ± 0,72**	116,10 ± 6,76 **45,22 ± 1,52**	138,30 ± 6,00 **54,53 ± 2,15**	1,888 ± 0,154 **0,959 ± 0,013**	4,185 ± 0,075 **3,070 ± 0,038**	4,070 ± 0,119 **3,132 ± 0,030**
3	28,10 ± 5,14 **25,88 ± 1,43**	105,80 ± 6,21 **40,81 ± 1,39**	112,70 ± 9,72 **46,88 ± 2,08**	2,095 ± 0,202 **0,944 ± 0,048**	3,952 ± 0,113 **2,025 ± 0,150**	3,415 ± 0,110 **2,200 ± 0,085**
4	21,10 ± 3,50 **20,60 ± 1,36**	90,40 ± 4,71 **40,30 ± 2,59**	93,80 ± 5,41 **41,50 ± 3,13**	1,882 ± 0,246 **0,926 ± 0,029**	3,487 ± 0,187 **1,609 ± 0,072**	2,950 ± 0,127 **1,884 ± 0,101**

las semillas control que germinaron el primer día, incrementando significativamente en las que germinaron el segundo y disminuyendo en las germinadas los tercero y cuarto días, aunque se mantenía superior que la incorporación registrada el día primero de germinación (figura 1). Estos resultados sólo pueden explicarse si se ha producido una degradación de DNA seguido de una síntesis *de novo*. POLAYES y SCHUBERT (15) hallaron en cotiledones de soja, capacidad no sólo para degradar los ácidos nucleicos sino también para su síntesis.

Los cotiledones de las semillas tratadas con soluciones de quinetina 10^{-6} y 10^{-4} M incorporaron adenina 8-C^{14} a su DNA en una proporción significativamente mayor que la encontrada en los cotiledones de las plantas control, pero se observó que la incorporación de radiactividad era tanto menor cuanto mayor era el retardo de la germinación (figura 1). También RASUMOVA *et al.* (16) observaron, en semillas de trigo, que los tratamientos hormonales tenían menor acción sobre las semillas con deficiente capacidad germinativa.

Los niveles de RNA eran siempre superiores en los cotiledones de las semillas

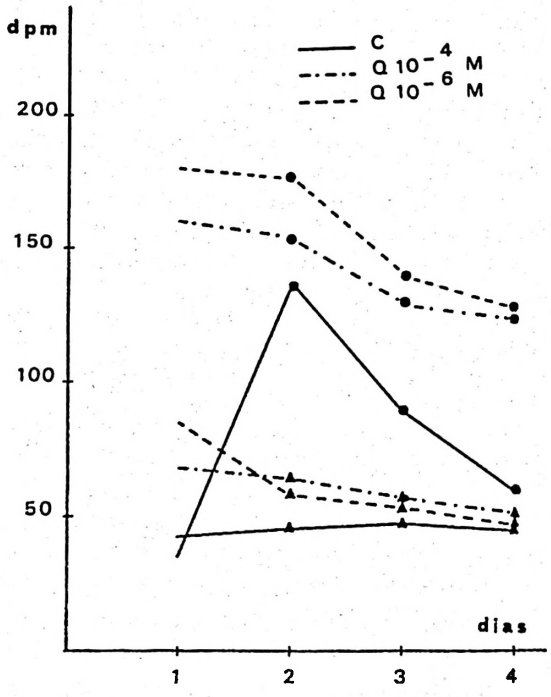

Fig. 1. *Incorporación de adenina 8-C^{14} (dpm) en el DNA (●) y en el RNA (▲), por cotiledones/semilla en semillas de* Lupinus multilupa.
La germinación tiene lugar sobre lecho de algodón cubierto por papel Whatman 1 humedecido con agua, o solución de Quinetina 10^{-4} ó 10^{-6} M.

Tabla III. *Incorporación de adenina 8-C^{14} en RNA poli A$^+$ por embrión o cotiledones/semilla.* Los valores dpm para las muestras del ensayo control están representados en paréntesis. Los resultados para los ensayos con quinetina 10^{-4} ó 10^{-6} M se expresan como porcentajes de la proporción de incorporación con respecto a los control.

Días de germinación	Embriones			Cotiledones		
	Agua (Control)	Quinetina		Agua (Control)	Quinetina	
		10^{-4} M	10^{-6} M		10^{-4} M	10^{-6} M
1.°	100 (310)	947	1.438	100 (3.231)	389	499
2.°	100 (296)	716	1.278	100 (3.512)	335	341
3.°	100 (258)	545	1.006	100 (3.622)	293	318
4.°	100 (251)	530	909	100 (3.734)	267	285

control germinantes que los encontrados en los cotiledones de las semillas en reposo. Estos resultados confirman los hallados por BRAY y DALE-SMITH (4). Este mismo hecho se podía observar, aunque más acusadamente, en los cotiledones de las semillas germinadas en solución de quinetina 10^{-6} ó 10^{-4} M. Debe destacarse que los niveles de RNA eran menos elevados en las semillas que germinaron retrasadas. BLOWERS *et al.* (2) obtuvieron resultados similares en semillas de trigo, y relacionaron la proporción de síntesis de RNA con el vigor de las semillas.

Se registró una clara incorporación de adenina 8-C^{14} en los cotiledones de las semillas que germinaron el primer día, en las condiciones control, incorporación débilmente superior a la encontrada en los cotiledones de las semillas que germinaron con retardo. Las semillas embebidas de soluciones de quinetina 10^{-6} ó 10^{-4} M, que germinaron los días 1 y 2 incorporaron adenina 8-C^{14} al RNA de sus cotiledones de manera más activa que las que germinaron en los días siguientes (figura 1). MATTHYSSEZ y ABRAMS (14), observaron que la citoquinina aumentaba la síntesis de RNA en cotiledones de guisante. Destacar el que los cotiledones de las semillas tratadas incorporaron mayor proporción de radiactividad en la fracción RNA poli A$^+$ que los de las semillas control, y que cuanto más retrasadamente se producía la germinación menor era la incorporación de la adenina marcada (tabla III). Otros autores (4) también encontraron que existía un metabolismo alterado del RNA poli A$^+$ en las semillas que germinaban con retraso.

Los niveles de DNA en los embriones de las semillas control germinantes los días 1 y 2 eran superiores que los hallados en los embriones en reposo, mientras que

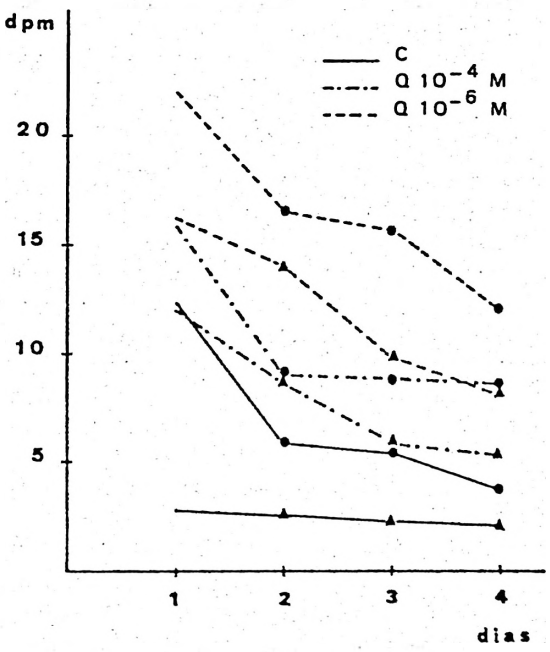

Fig. 2. Incorporación de adenina 8-C^{14} (dpm) en el DNA (●) y en el RNA (▲) por embrión/semilla en semillas de *Lupinus multilupa*.
La germinación tiene lugar sobre lecho de algodón cubierto por papel Whatman 1, humedecido con agua, o solución de Quinetina 10^{-4} ó 10^{-6} M.

en los que germinaron el tercero y cuarto día eran inferiores. Estos resultados indican que durante el período de retardo se produce una degradación de DNA (tabla II). Los niveles de DNA en los embriones germinantes de las semillas tratadas con quinetina 10^{-4} M eran significativamente superiores que en los control, y todavía mayores en los de las semillas tratadas con quinetina 10^{-6} M. Se ha descrito que bajas dosis de quinetina tenían efectos superiores a las altas sobre la síntesis de ácidos nucleicos (10), y que la bencil-adenina producía efectos más acusados sobre la síntesis de ácidos nucleicos cuando se aplicaba a bajas concentraciones (9). En todos los casos, los niveles de DNA eran tanto menores cuanto mayor era el retardo con que se producía la germinación (tabla II).

Los embriones de semillas que germinaron el primer día incorporaron adenina 8-C^{14} muy activamente en su DNA, mientras que los embriones que germinaron retrasados incorporaron una proporción muy inferior (figura 2). Este hecho indica, probablemente, una disminución en la capacidad de síntesis de DNA en los embriones de las semillas que germinaron retrasadas, aunque no se puede deducir que sea ésta la causa de la pérdida de capacidad de los embriones para proseguir su crecimiento, puesto que los embriones de semillas tratadas con solución de quinetina 10^{-6} ó 10^{-4} M mantenían niveles de DNA superiores que los existentes en los embriones de semillas control con capacidad para germinar y proseguir su crecimiento (figura 2).

La incorporación de adenina 8-C^{14} al RNA de los embriones de las semillas control era relativamente baja, mientras que los embriones germinados en quinetina 10^{-4} M la incorporaron muy activamente, siendo aún mayor en los embriones germinados en quinetina 10^{-6} M (figura 2). Cuanto mayor era el retardo en la germinación, tanto menor era la incorporación.

Es de destacar que el RNA poli A^+, es la fracción de RNA que resulta proporcionalmente más marcada (tabla III), aunque el marcaje es tanto menor cuanto mayor es el retardo de la germinación, resultados similares hallados por LAKHANI y SACHAR (12) en embriones de trigo utilizando como activador la giberelina.

De los resultados obtenidos, se puede deducir que los embriones de las semillas tratadas con solución de quinetina, activan la síntesis de DNA y RNA, principalmente de la fracción RNA poli A^+, pero no parece existir una relación directa entre estos hechos y la capacidad de las semillas para germinar y desarrollar plantas.

Resumen

Se estudia el efecto de la quinetina sobre la capacidad germinativa y la incorporación de adenina 8-C^{14} en DNA, RNA y RNA Poli A^+ en embriones y cotiledones de semillas de *Lupinus multilupa* L. La quinetina mejora la capacidad germinativa de las semillas y la incorporación de adenina 8-C^{14} en DNA, RNA y RNA Poli A^+ de embriones y cotiledones. No parece existir una relación directa entre la biosíntesis de DNA y RNA de embriones y cotiledones de las semillas para germinar y de sus embriones para continuar creciendo.

Palabras clave: Quinetina, Capacidad germinativa, Síntesis de DNA y RNA.

Bibliografía

1. Aviv, H. y Leder, P.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* (USA), 69, 600-612, 1972.
2. Blowers, L. E., Stormonth, D. A. y Bray, C. M.: *Planta*, 150, 19-25, 1980.
3. Bray, C. M.: En «Recent Advances in the Biochemistry of Cereals» (Laidmon, D. L. y Wyn Jones, R. G., eds.). Academic Press, Nueva York, 1979, pp. 147-173.
4. Bray, C. M. y Dale-Smith, C. A.: *Plant. Sci.*, 38, 71-79, 1985.

5. Burton, K.: *Biochem. J.*, 62, 3-5, 1956.
6. Byrne, H. y Settefield, G.: *Planta*, 136, 203-210, 1977.
7. Dale-Smith, C. A. y Bray, C. M.: *Plant. Sci. Lett.*, 34, 335-343, 1984.
8. Gwoždz, E. A. y Wožny, A.: *Physiol. Plant.*, 59, 103-110, 1983.
9. Jouanneau, J. P., Teyssendier, B. y Peaud-Lenoël, C.: *Plant Physiol.*, 74, 663-668, 1984.
10. Khan, A. A.: *Science*, 171, 853-859, 1971.
11. Khan, A. A. y Tao, K.: En «Phytohormones and related compounds. A comprensive treatise». Vol. 2 (Letham, D. S., Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V., eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, pp. 371-422.
12. Lakhani, S. y Sachar, R. C.: *Plant Sci.*, 42, 191-200, 1985.
13. Mayer, A. M. y Poljakoff-Mayber, A.: *Physiol. Plant*, 15, 283-291, 1962.
14. Matthysse, A. G. y Abrams, M.: *Biochem. Biophys. Acta*, 199, 511-518, 1970.
15. Polayes, D. A. y Schubert, K. R.: *Plant Physiol.*, 75, 1104-1110, 1984.
16. Rasumova, M. V., Nikolaeva, M. G. y Daletsakaya, T. V.: En «Phytohormones and related compounds. A comprensive treatise». Vol. 2 (Letham, D. S., Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V., eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, pp. 371-422.
17. Strugala, K. y Buchowicz, J.: *Plant Sci. Lett.*, 34, 17-24, 1984.
18. Van der Walle, C. y Bernier, G.: *Plant Physiol.*, 57, 632-639, 1975.
19. Wožny, A. y Gwoždz, E. A.: *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 168, 196-209, 1980.