



Fitocromo(s) y cierre nictimístico foliar: Intermediarios y sistemas efectores implicados

Esther Llambrich Moreno

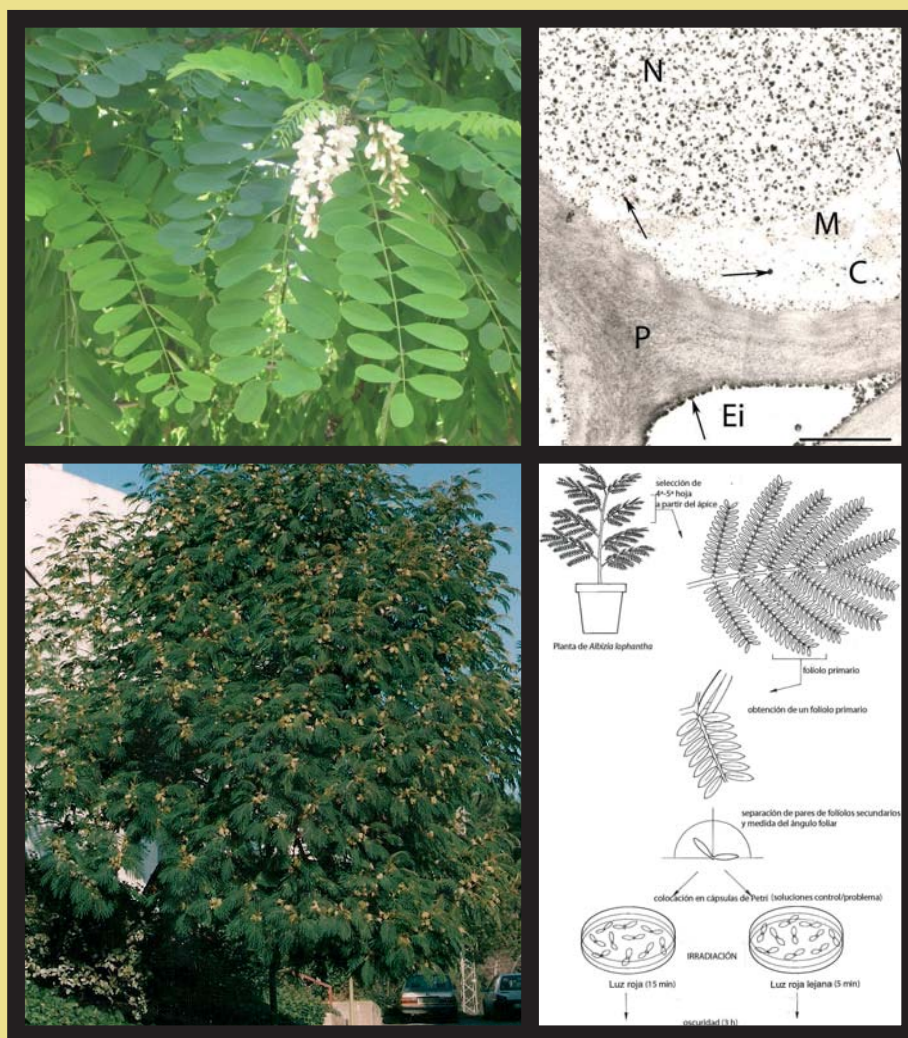
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FITOCROMO(S) Y CIERRE NICTINÁSTICO FOLIAR: INTERMEDIARIOS Y SISTEMAS EFECTORES IMPLICADOS

TESIS DOCTORAL



Esther Llambrich Moreno
2012

Universidad de Barcelona

FITOCROMO(S) Y CIERRE NICTINÁSTICO FOLIAR:
INTERMEDIARIOS Y SISTEMAS EFECTORES
IMPLICADOS.

Programa de Doctorado: *“La fisiología de les plantes i l’ambient”*

Bienio: 92/94

Memoria presentada por Esther Llambrich Moreno para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona

Directora de tesis:

Directora de tesis:

Dra. Esther Simón Martínez

Dra. M^a Luisa Moysset Agustí

Doctoranda:

Esther Llambrich Moreno

2012

Facultad de Biología

Departamento de Biología Vegetal

*A la Dra. Esther Simón i a la Dra. M^a Luisa Moysset
per confiar en mi.*

*Al Francesc, al Joan, a l'Anna i als meus pares,
per la seva comprensió i paciència.*

INDICE

Agradecimientos	11
Abreviaciones	15
1.- Introducción	19
1.1.- Movimientos foliares rítmicos y nictinásticos.....	21
1.1.1.- Pulvínulos: morfología, estructura y ultraestructura.....	24
1.1.2.- Fisiología del movimiento foliar.....	26
1.1.2.1.- Cambios de turgencia de las células motoras.....	26
1.1.2.2.- Potencial de membrana.....	28
1.1.2.3.- Transportadores localizados en plasmalema.....	29
1.1.2.3.1.- ATPasas-H ⁺	29
1.1.2.3.2.- Sistemas de transporte iónico.....	31
1.1.2.3.3.- Acuaporinas.....	33
1.1.2.4.- Transportadores localizados en tonoplasto.....	33
1.2.- Control de los movimientos foliares.....	34
1.2.1.- Control vía reloj endógeno.....	34
1.2.2.- Fotocontrol.....	35
1.3.- Fitocromos.....	37
1.3.1.- Tipos de fitocromos de plantas.....	37
1.3.2.- Estructura molecular.....	38
1.3.3.- Fototransformaciones y transformaciones independientes de la luz.....	40
1.3.4.- Tipos de respuesta.....	41
1.3.5.- Localización intracelular.....	42
1.3.6.- Transducción de las señales luminosas captadas por los fitocromos.....	43
1.3.6.1.- El Ca ²⁺ como segundo mensajero.....	46
1.3.6.2.- La sacarosa como potencial molécula de señalización.....	49
2.- Objetivos	51
3.- Material y métodos	55
3.1.- Material vegetal. Germinación y condiciones de cultivo.....	57

3.2.- Características de las fuentes de luz.....	61
3.3.- Metodología para investigar la fisiología del cierre nictinástico foliar de <i>Albizia lophantha</i>	62
3.3.1.- Protocolo experimental.....	62
3.3.2.- Compuestos químicos utilizados.....	64
3.3.3.- Presentación de los resultados y tratamiento estadístico.....	64
3.4.- Metodología para investigar la incorporación y distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en los pulvínulos secundarios de <i>Robinia pseudoacacia</i> durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).....	66
3.4.1.- Preparación de sacarosa- ³ H 50mM y manitol- ³ H 50 mM.....	68
3.4.2.- Toma de muestras y aplicación de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H.....	69
3.4.3.- Determinación de la incorporación de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H.....	72
3.4.4.- Determinación de la distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H.....	73
3.4.4.1.- Preparación del material para estudios estructurales y ultraestructurales.....	74
3.4.4.1.1.- Fijación, deshidratación e inclusión.....	74
3.4.4.1.2.- Obtención, tinción / contrastado y observación de las secciones..	75
3.4.4.2.- Preparación del material para la localización por autorradiografía de sustancias solubles.....	75
3.4.4.2.1.- Criotécnicas.....	76
3.4.4.2.2.- Obtención y tinción / contrastado de las secciones.....	79
3.4.4.3.- Autorradiografía para microscopía óptica.....	79
3.4.4.4.- Autorradiografía de alta resolución para microscopía electrónica de transmisión.....	80
3.4.4.5.- Análisis de los autorradiogramas y tratamientos estadísticos.....	82
3.5.- Metodología para la detección citoquímica de Ca ²⁺ en los pulvínulos secundarios de <i>Robinia pseudoacacia</i> durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).....	83
3.5.1.- Toma de muestras.....	84
3.5.2.- Preparación del material vegetal.....	86
3.5.2.1.- Fijación, deshidratación e inclusión.....	86

3.5.2.1.1- Preparación de soluciones de fijación con piroantimoniato potásico.....	88
3.5.2.2.- Obtención, tinción/contrastado de las secciones y observación.....	89
3.5.3.- Microanálisis de Rayos X de los precipitados.....	89
3.5.4.- Estima de la distribución de precipitados de Ca ²⁺ . Tratamiento estadístico.....	93
4.- Resultados.....	95
4.1.- Cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de <i>Albizia lophantha</i>	97
4.1.1.- Efecto de la fusicoccina.....	97
4.1.2.- Efecto de la sacarosa <i>per se</i> y su interacción con la fusicoccina.....	99
4.1.3.- Efecto de azúcares-alcohol <i>per se</i> y su interacción con la fusicoccina.....	104
4.1.4.- Efecto del polietilenglicol 6000 <i>per se</i> y su interacción con la fusicoccina.....	110
4.2.- Incorporación y distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en los pulvínulos secundarios de <i>Robinia pseudoacacia</i> durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).....	112
4.2.1.- Incorporación de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en los pulvínulos secundarios.....	114
4.2.2.- Distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en los pulvínulos secundarios..	114
4.2.2.1.- Preservación estructural y ultraestructural de las células motoras.....	115
4.2.2.2.- Autorradiografía: movilización de sustancias solubles y selección del tiempo de exposición.....	119
4.2.2.3.- Distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en secciones pulvinulares..	122
4.2.2.4.- Efecto de la luz R y de la luz FR en la distribución de sacarosa- ³ H y manitol- ³ H en las zonas extensoras y flexoras.....	126
4.3.- Distribución de Ca ²⁺ en los pulvínulos secundarios de <i>Robinia pseudoacacia</i> ..	130
4.3.1.- Optimización del método de fijación y composición de los precipitados...	130
4.3.2.- Distribución de precipitados de Ca ²⁺ en los pulvínulos secundarios durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).....	140

5.- Discusión	149
5.1.- Optimización de la metodología.....	151
5.1.1.- Preparación de material vegetal para la localización de azúcares solubles por autorradiografía – microscopía óptica y electrónica.....	151
5.1.2.- Preparación de material vegetal para la localización de Ca ²⁺ mediante precipitación con piroantimoniato potásico. Validez del método.....	153
5.2.- Control del cierre nictinástico foliar por fitocromo(s) en <i>Albizia lophantha</i> .	156
5.3.- Implicación de ATPasas-H ⁺ en el cierre nictinástico dependiente de fitocromo(s) de los folíolos de <i>Albizia lophantha</i>	157
5.3.1.- Fusicoccina y ATPasas-H ⁺	157
5.3.2.- Los polioles como moduladores de la actividad ATPasa-H ⁺	159
5.4.- La sacarosa como fuente de energía, molécula osmóticamente activa y/o de señalización en el cierre nictinástico foliar dependiente de fitocromo(s) de <i>Albizia lophantha</i>	163
5.5.- El Ca ²⁺ como segundo mensajero de fitocromo(s) en el cierre nictinástico foliar de <i>Robinia pseudoacacia</i>	167
5.5.1.- Distribución de precipitados de Ca ²⁺ en los pulvínulos.....	167
5.5.2.- El Ca ²⁺ como señal osmorreguladora.....	170
6.- Conclusiones	177
7.- Bibliografía	183

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo, realizado en un marco de rigor científico, confianza, afecto y respeto mutuo, en cuyo contexto quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis Directoras de Tesis, la Dra. Esther Simón y la Dra. M^a Luisa Moysset, por brindarme la oportunidad de poder formar parte de su equipo investigador y compartir sus conocimientos científicos durante este periodo. Los valiosos consejos, correcciones y apoyo incondicional que he recibido durante estos años han sido francamente importantes en esta etapa de mi vida.

A la Dra. Carmen López-Iglesias por su entusiasmo contagioso en la puesta a punto de los criométodos, que tan buenos resultados nos han aportado, y las múltiples enseñanzas sobre autorradiografía.

Al Dr. Remesar por sus consejos sobre la utilización de sustancias radioactivas, instalaciones y el contador de centelleo líquido.

A la Dra. Nuria Cortadellas mi gratitud por el interés y sugerencias en la aplicación de técnicas de citoquímica. A la vez, agradecer a David Bellido, Gemma Martínez y Almudena García su inestimable ayuda en la preparación de muestras, obtención y contrastado de secciones y observación microscópica. A Juan Mendoza y Lluís Yedra por su cooperación durante la aplicación del microanálisis. También a Marisol Cuñarro por su colaboración en el análisis de las imágenes.

Al Servicio de los Campos Experimentales de la Universidad de Barcelona y, en especial al Sr. Josep Matas por participar en el cultivo y cuidado de las plantas objeto de estudio en los invernaderos.

A todos los profesores, especialmente a las Dras. Dolors Vidal, Leonor Alegre y Carmen Bergareche que me introdujeron en el campo de la Fisiología Vegetal. También a todos los compañeros del Departamento de Biología Vegetal, de modo especial al Dr. Santi Fernández por su colaboración en la preparación de gráficas con Sigma Plot, a la Dra. Marta

Pintó por su generosa y desinteresada ayuda en el análisis estadístico de los resultados y al Dr. Pere Rovira por los dibujos y esquemas con los que he podido ilustrar los distintos protocolos experimentales, y del mismo modo a los Doctores Rafa Piñol, Alicia Pastor, M^a José Utrillas, Salvador Nogues, Jordi Bort, Ana Febrero y Núria Roca con los que he compartido muchas horas de trabajo.

Y a todas aquellas personas del Departamento de Biología Vegetal que me brindaron su amistad y colaboración, principalmente a Carmen Cañueto por su predisposición a ayudar siempre y por los buenos momentos compartidos.

A mi marido Francesc y a mis hijos Joan y Anna por su tolerancia y cariño, y a mis padres y hermanos por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

Finalmente, a la Facultad de Biología y a los Servicios Científico Técnico, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

A vosotros os la dedico sinceramente

ABREVIACIONES

A	amiloplasto
B	luz azul
C	citoplasma
Ca ²⁺	calcio iónico
[Ca ²⁺] _c	concentración de Ca ²⁺ iónico citosólico
CaM	calmodulina
canales K _D	canales de salida de K ⁺
canales K _H	canales de entrada de K ⁺
CBL	calcineurina B
CC	cilindro central
CDPKs	quinasas de proteína dependientes de Ca ²⁺
Cl	cloroplasto
CM	células corticales motoras
CME	células corticales motoras externas
CMI	células corticales motoras internas
CO	colénquima
crys	criptocromos
Cu	cutícula
DAG	1, 2 diacilglicerol
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
E	epidermis
Ei	espacio intercelular
FC	fusicoccina
FP	foliolo primario
FR	luz roja lejana
FS	foliolo secundario
GA	glutaraldehido
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
h	horas
HIR	respuestas de alta irradiancia
IFl	interior vaso floemático
IP ₃	inositol 1, 4, 5-trifosfato

KPA	piroantimoniato potásico
LFR	respuestas de flujo bajo
min	minutos
MO	microscopio óptico
N	núcleo
NO	óxido nítrico
OsO ₄	osmio
P	pared
PEG	polietilenglicol
PF	paraformaldehido
Pfr	fitocromo activo
PFr	peso fresco
PIP ₂	fosfatidilinositol 4, 5 difosfato
phys	fitocromos
PIFs	factores de interacción con fitocromos
PKC	quinasa de proteína C
PP	pulvínulo primario
Pr	fitocromo inactivo
PS	pulvínulo secundario
PT	pulvínulo terciario
R	luz roja
Ra	raquis
s	segundos
SE	error estándar
Tc	tubo criboso
TEM	microscopio electrónico de transmisión
V	vacuola
VLFR	respuestas de flujo muy bajo
VT	vacuola de tanino
W	luz blanca
X	vaso xilemático

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Movimientos foliares rítmicos y nictinásticos.

Las hojas y/o folíolos de muchas *Leguminosae* cambian su posición en el espacio de tal forma que se disponen horizontales (posición de abertura, Figs. 1.1a-d) en presencia de luz y verticales (posición de cierre o de sueño, Figs. 1.2a-d) en la oscuridad.

La primera descripción detallada de estos movimientos foliares de “plantas sensibles” la realizó de Mairan en 1729, probablemente en *Mimosa pudica*. Observó el cierre foliar al pasar las hojas de la luz a la oscuridad y también que el movimiento de abertura y cierre continuaba cuando las hojas se mantenían en condiciones de oscuridad. Estos movimientos de abertura y cierre, descritos minuciosamente por Darwin (1880), Pfeffer (1881) y Sachs (1887), están controlados por señales exógenas (luz y oscuridad) y un oscilador endógeno y son inducidos por transiciones luz – oscuridad (**movimientos násticos**) y continúan manifestándose de forma rítmica (**movimientos rítmicos circadianos**) en condiciones constantes ya sea de luz o de oscuridad con un periodo próximo a 24 h. El cierre inducido por la transición luz – oscuridad se denomina movimiento o **cierre nictinástico** (Pfeffer, 1881) y, por extensión, las especies que lo presentan se conocen como plantas nictinásticas (Satter, 1979; Satter y Galston, 1981).

Los movimientos násticos y circadianos están relacionados. En condiciones naturales, las posiciones de abertura y cierre foliar coinciden con el día y la noche respectivamente y las transiciones luz – oscuridad, al alba y al crepúsculo, sincronizan el oscilador endógeno con el tiempo solar (Satter 1979). Es obvio que las hojas en posición horizontal durante el día pueden interceptar más radiación fotosintética activa. Sin embargo, la importancia del cierre ha sido y continúa siendo objeto de discusión. Se ha considerado efectivo para reducir las pérdidas de calor y de agua durante la noche (Darwin, 1880) y para aumentar la supervivencia de algunas especies, como *Arachis hipogea*, en condiciones de superpoblación (Karve y col., 1984).

Estos movimientos, totalmente reversibles, son muy complejos puesto que son el resultado del desplazamiento y torsión de las hojas y/o folíolos. Según las especies, el cierre se produce al aproximarse las hojas y/o los folíolos por el haz (*Albizia lophantha* Benth.

(Fig. 1.2a), *Albizia julibrissin* Durraz. (Fig. 1.2b), *Samanea saman* Merrill. (Fig. 1.2d), y *M. pudica* L.) o por el envés (*Robinia pseudoacacia* L. (Fig. 1.2c), *Phaseolus coccineus* L. y *Phaseolus vulgaris* L.). Además, las hojas de algunas especies nictinásticas, como *M. pudica* y *Cassia fasciculata* Michx., manifiestan gravitropismo y rápidos movimientos seismonásticos en respuesta a estímulos mecánicos y eléctricos (Roblin, 1979; Fleurat-Lessard, 1981).

En la mayoría de plantas nictinásticas, los movimientos foliares dependen de la curvatura de los pulvínulos, órganos motores que se encuentran horizontales en presencia de luz (día) y se curvan en la oscuridad (noche). Los pulvínulos se localizan en la base de los

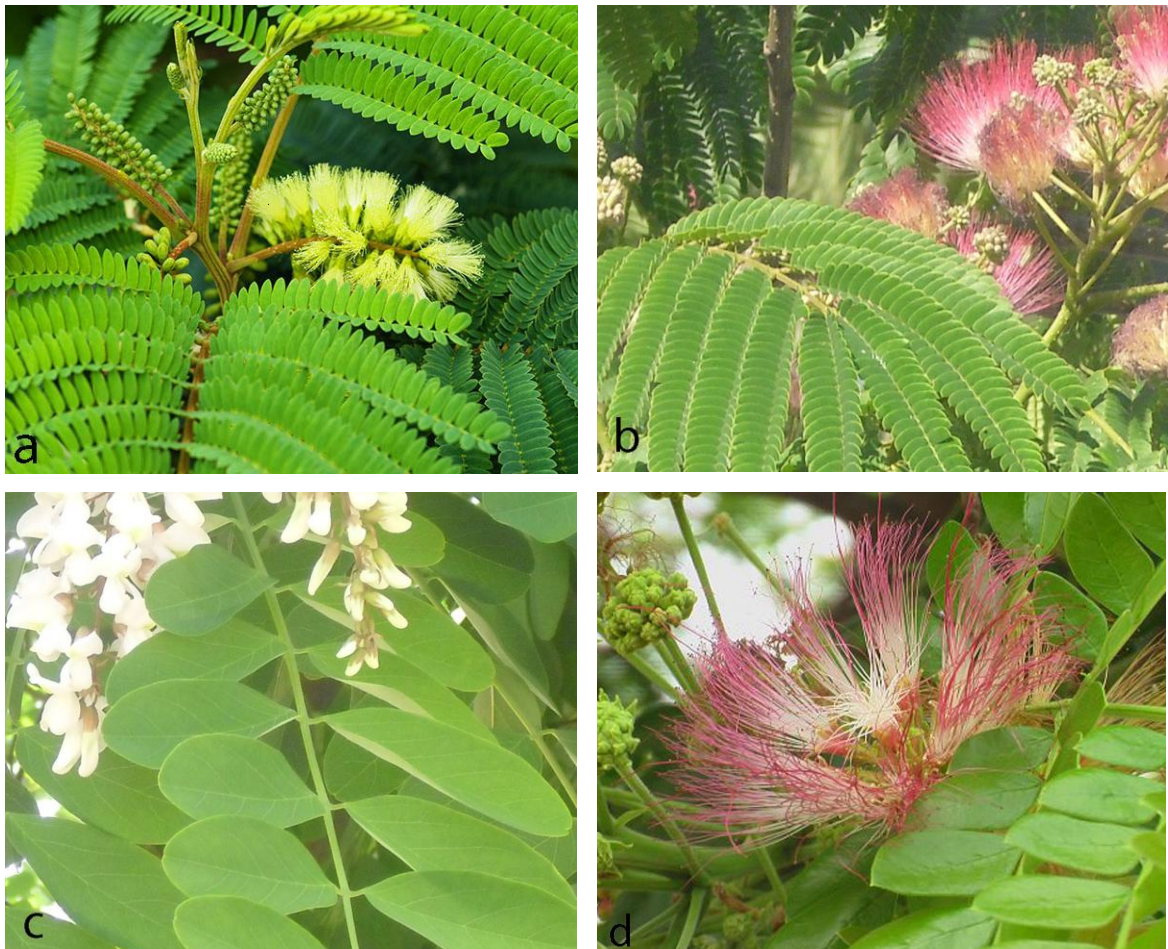


Figura 1.1- Hojas de *Albizia lophantha* (a), *Albizia julibrissin* (b), *Robinia pseudoacacia* (c) y *Samanea saman* (d) con los folíolos en posición de **abertura** (posición horizontal).

pecíolos y/o de los limbos foliares y se denominan primarios, secundarios o terciarios según controlen el movimiento de la hoja, los folíolos primarios o los folíolos secundarios. En general, el movimiento de los folíolos secundarios supera al de los folíolos primarios y hoja entera (Satter, 1979). Han sido descritos los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Moysset y Simón, 1991a) y *S. saman* (Morse y Satter, 1979), los pulvínulos terciarios de *A. julibrissin* (Satter y col., 1970a, 1977; Campbell y Garber, 1980) y los pulvínulos primarios, secundarios y terciarios de *M. pudica* (Toriyama, 1954a y b; Roblin, 1979; Fleurat-Lessard y Bonnemain, 1978; Fleurat-Lessard, 1981; Fleurat-Lessard y Roblin, 1982).



Figura 1.2- Hojas de *Albizia lophantha* (a), *Albizia julibrissin* (b), *Robinia pseudoacacia* (c) y *Samanea saman* (d) con los folíolos en posición de **cierre** (posición vertical). Los folíolos se aproximan por el haz (a, b, d) o por el envés (c).

1.1.1.- Pulvínulos: morfología, estructura y ultraestructura.

Los pulvínulos son cilindros flexibles de tamaño variable que oscila entre 0,5 mm de longitud y 0,4 mm de diámetro (pulvínulos terciarios de *A. julibrissin*, Satter y col., 1970a) y 6 mm de longitud y 2 mm de diámetro (pulvínulos secundarios de *S. saman*, Morse y Satter, 1979). En el caso de los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* el tamaño oscila entre 2-3,5 mm de longitud y 0,6-1,8 mm de diámetro (Moysset y Simón, 1991a).

Estos órganos motores (Fig. 1.3) están formados por un cilindro central con los tejidos conductores, que está rodeado por una zona cortical (corteza motora) de células parenquimáticas estrechamente adosadas entre sí y dispuestas de forma desordenada, excepto en los pulvínulos de *P. coccineus* donde se ordenan formando hileras paralelas al eje longitudinal del pulvínulo (Mayer y col., 1985a). El cilindro central y la zona cortical están separados por 3-4 capas de células de colénquima. Las células corticales y las células del colénquima tienen paredes con puntuaciones con plasmodesmos, lo que permite una continuidad simplástica entre el cilindro central y la corteza motora. Externamente hay una capa de células epidérmicas.

La zona cortical tiene un grosor variable, entre 8-9 y 25-30 capas de células en los pulvínulos terciarios de *A. julibrissin* (Satter y col., 1970a) y los pulvínulos secundarios de *S. saman* (Morse y Satter, 1979) respectivamente. Se divide en dos (*R. pseudoacacia*) – tres (*S. saman*) zonas concéntricas atendiendo al tamaño, ultraestructura y funcionalidad celular. En general, las células corticales más internas no varían de tamaño y forma durante el movimiento foliar y, en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* se caracterizan por la presencia de cristales de oxalato cálcico o de amiloplastos (Moysset y Simón, 1991a). En cambio, las células de posición intermedia y externa varían considerablemente de forma, tamaño y turgencia durante el movimiento foliar y se denominan **células motoras**. En los pulvínulos de *M. pudica* (Fleurat-Lessard y Millet, 1984) y *R. pseudoacacia* (Moysset y Simón, 1991a) las células motoras contienen dos tipos de vacuolas: *vacuolas de taninos* muy electrodensas que podrían actuar como reservorio iónico (Ca^{2+} y K^+) (Toriyama y Jaffe, 1972, Campbell y Garber 1980, Moysset y Simón, 1991a) y *vacuolas sin taninos, acuosas o coloidales* que varían de tamaño y forma durante el movimiento foliar.

La curvatura de los pulvínulos depende de cambios de turgencia coordinados de células motoras que se encuentran en zonas opuestas de la corteza motora. Estas zonas, funcionalmente diferentes, se denominan **extensora** y **flexora**. Las **células extensoras** aumentan de turgencia durante la abertura y disminuyen de turgencia (se vuelven flácidas) durante el cierre. Las **células flexoras** disminuyen de turgencia (se vuelven flácidas) durante la abertura y aumentan de turgencia durante el cierre. En los pulvínulos secundarios de *S. saman* (Morse y Satter, 1979) y *R. pseudoacacia* (Moysset y col., 1991a) los cambios de turgencia son más acusados en la zona extensora que en la flexora y van asociados a cambios en el compartimento vacuolar. Las células turgentes son univacuoladas y las flácidas multivacuoladas (Morse y Satter, 1979; Moysset y Simón, 1991a).

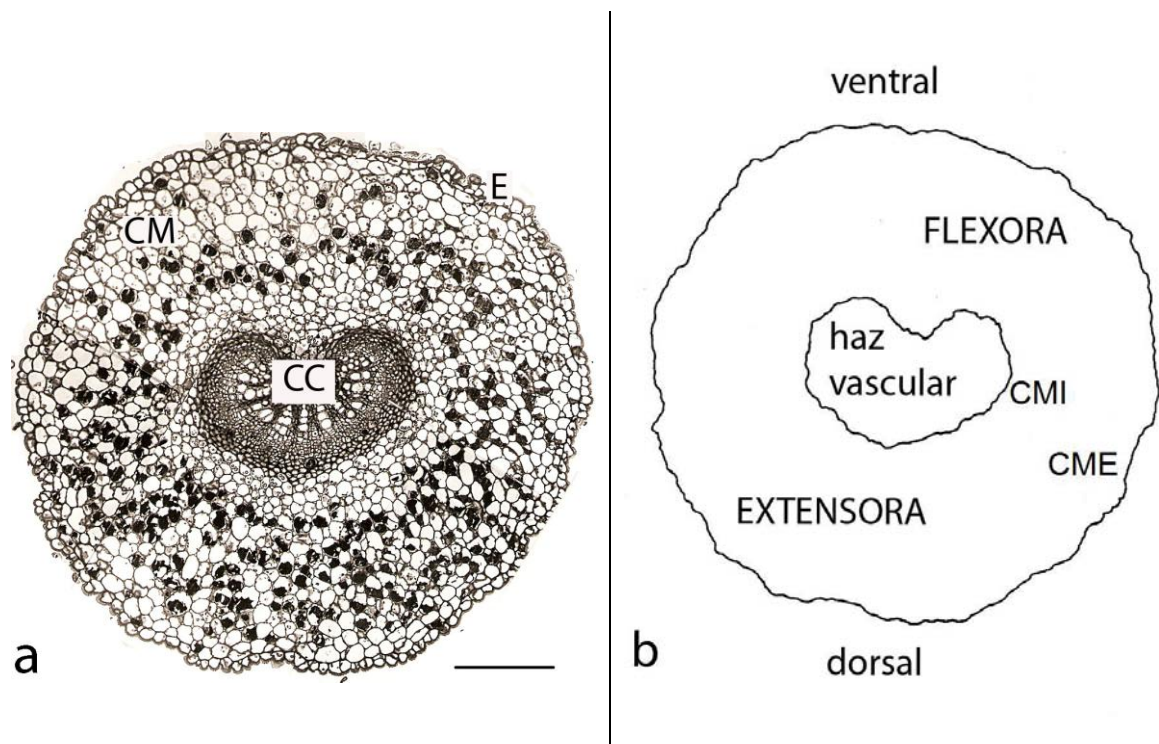


Figura 1.3- Sección transversal (a) de un **pulvínulo secundario** de *Robinia pseudoacacia* L. El pulvínulo tiene un haz vascular central (CC) de morfología reniforme rodeado por varias capas de células colenquimáticas, que están rodeadas a su vez por varias capas de células corticales motoras (CM) y una epidermis (E). Las células motoras cambian de forma y tamaño durante el movimiento foliar. Barra: 0,13 mm (Moysset y Simón, 1991a). Representación esquemática (b) de una sección transversal de un pulvínulo secundario de *Robinia pseudoacacia* L. mostrando la localización de las zonas ventral (corresponde al haz foliar) y dorsal (corresponde al envés foliar), la corteza motora interna (CMI) y externa (CME) así como las zonas extensora y flexora. El cilindro central agrupa los vasos xilemáticos y los floemáticos.

Los pulvínulos continúan curvándose de forma circadiana y en respuesta a transiciones luz-oscuridad si se aíslan del resto de la planta, al igual que fragmentos de las zonas extensora y flexora e incluso protoplastos extensores y flexores continúan aumentando/disminuyendo de turgencia de forma rítmica y en respuesta a cambios de iluminación. Consecuentemente, cada célula motora tiene su propio oscilador endógeno (Satter y Morse, 1990).

1.1.2.- Fisiología del movimiento foliar.

Los movimientos foliares resultan de cambios de turgencia coordinados, reversibles, sincronizados y opuestos entre las células motoras extensoras y flexoras. Estos cambios dependen de migraciones iónicas, que se deben, a su vez, a la actividad de ATPasas de H⁺, cambios en el potencial de membrana, y abertura y cierre de canales iónicos.

1.1.2.1.- Cambios de turgencia de las células motoras.

Los cambios de turgencia de las células motoras se deben a flujos de agua, por difusión a través de la bicapa lipídica y también vía acuaporinas (Fleurat-Lessard y col., 1997a y b; Moshelion y col., 2002a) dependientes de migraciones iónicas, principalmente de K⁺ y Cl⁻.

El catión más abundante en los pulvínulos es el K⁺ (200 – 500 mM en las células motoras, Satter y Galston, 1981) y es también el principal osmorregulador. Su trasiego está asociado a un flujo de Cl⁻ pero la estequiometría K⁺ : Cl⁻ varía según la especie, entre distintas plantas de la misma especie e incluso entre distintas partes del mismo pulvínulo. Así, el flujo de Cl⁻ contrarresta el 40 – 80 %, 75 % y 40 % del flujo de K⁺ en *S. saman*, *A. julibrissin* y *P. vulgaris* respectivamente (Satter y Galston, 1981). En la osmorregulación pueden participar otros aniones, como el NO₃⁻ y malato (Kiyosawa, 1979; Bialczyk y Lechowski, 1986, 1989).

Durante el movimiento circadiano y el nástico la redistribución de K⁺ y Cl⁻ entre las

zonas extensora y flexora está relacionada con el ángulo foliar. En los pulvínulos secundarios de *S. saman* (Campbell y col., 1981) y de *R. pseudoacacia* (Moysset y col., 1991b) el contenido de ambos iones es elevado en los protoplastos extensores y bajo en los flexores cuando los folíolos están en posición horizontal. En cambio, en posición de cierre, la situación se invierte. El intercambio de iones entre estas dos zonas podría darse en dirección radial y vía simplasto y/o apoplasto actuando las paredes y/o el cilindro central como reservorio de iones (Campbell y col., 1981; Fromm y Eschrich, 1988; Moysset y col., 1991b).

Los mecanismos que provocan los cambios de turgencia de las células motoras son similares a los que determinan las variaciones de turgencia de las células oclusivas de los estomas (Gorton, 1990). Los dos sistemas son comparables aunque el sistema pulvinular es mucho más complejo porque una misma señal induce cambios opuestos según actúe en la zona flexora o extensora y los flujos de agua y solutos podrían realizarse vía plasmodesmos en las células motoras pulvinulares (Morse y Satter, 1979; Satter y col., 1982).

A partir de un modelo inicial propuesto por Satter y Galston (1981) y de diversos estudios de tipo farmacológico y electrofisiológico efectuados en pulvínulos de *S. saman* (Satter y Morse, 1990; Lee 1990; Moran y col., 1990, 1996; Moshelion y Moran, 2000; Suh y col. 2000) Moran (2007) ha propuesto el siguiente modelo para explicar los cambios de turgencia de las células motoras:

1. El aumento de turgencia se inicia con la activación de ATPasas- H^+ que hiperpolariza el plasmalema, genera un gradiente de H^+ y acidificación del apoplasto. La hiperpolarización provoca la abertura de canales de entrada de K^+ (canales K_H activados por hiperpolarización) y este catión entra en las células a favor de un gradiente electroquímico. La entrada de Cl^- probablemente tiene lugar mediante cotransporte con H^+ . Eventualmente, el K^+ y el Cl^- se acumulan en la vacuola. En ausencia de Cl^- externo, el contenido de malato aumenta en tejidos turgentes. A consecuencia del incremento de la concentración intracelular de compuestos osmóticamente activos, el agua entra por difusión y vía acuaporinas de membrana y las células aumentan de turgencia.

2. Durante la disminución de turgencia las ATPasa-H⁺ están inactivas y la membrana se despolariza posiblemente a causa de una entrada pasiva de Ca²⁺ y una salida pasiva de Cl⁻. Los canales K_H cierran y el gradiente electroquímico favorece la salida de K⁺. La pérdida de K⁺ y Cl⁻ provoca una salida de agua y, en consecuencia, disminuye la turgencia celular.

1.1.2.2.- Potencial de membrana.

Los movimientos foliares de varias especies nictinásticas (*Trifolium repens* (Scott y col., 1977), *S. saman* (Racusen y Satter, 1975), *P. vulgaris* (Nishizaki, 1986) y *Desmodium motorium* (Antkowiak y col., 1991) van asociados a cambios en el potencial de membrana de las células motoras. Pero problemas metodológicos, como la utilización de pulvínulos enteros o de fragmentos de las zonas extensoras y flexoras sumergidos y la dificultad de separar las zonas extensoras y flexoras y de insertar los electrodos correctamente entre otros, pueden ser la causa de que los resultados obtenidos sean contradictorios.

En *S. saman* los potenciales de las membranas de las células extensoras y flexoras pulvinulares oscilan con un ritmo circadiano y con un desfase aproximado de 8 h cuando están en condiciones de oscuridad continua (Racusen y Satter, 1975; Satter y Galston, 1981). El movimiento foliar está en fase con el potencial de membrana de las células flexoras que alcanzan la hiperpolarización máxima cuando su contenido de K⁺ es mínimo. En cambio, las células extensoras empiezan a hiperpolarizarse unas horas antes de que se inicie la entrada de este ión y la hiperpolarización máxima coincide con el acúmulo masivo de este catión. Racusen y Galston (1977) observaron que estos potenciales de membrana son rítmicamente sensibles a la aplicación de sacarosa. La sacarosa, cuando es efectiva, provoca despolarización del potencial de membrana y un ligero incremento del pH de la solución externa, prueba a favor de su absorción mediante un cotransporte con H⁺ (Racusen y Galston, 1977; Satter y Galston, 1981).

En los pulvínulos de *D. motorium* (Antkowiak y col., 1991) que oscilan con un período ultradiano y en los pulvínulos de *P. vulgaris* (Nishizaki, 1986) el movimiento de

cierre va precedido y acompañado por una elevada despolarización y el movimiento de apertura por hiperpolarización de las células extensoras.

1.1.2.3.- Transportadores localizados en plasmalema.

Solo se han caracterizado parcialmente algunos transportadores localizados en el plasmalema de las células pulvinulares (Moran, 2007) que se detallan a continuación:

1.1.2.3.1.- ATPasas-H⁺.

La traslocación electrogénica de H⁺ es un transporte activo primario a través de las membranas de las células vegetales (Spanswick, 1981) y determina la intensidad del intercambio H⁺/K⁺ (Zeiger, 1983). La intervención de ATPasas-H⁺ en los movimientos foliares se ha puesto de manifiesto: **a)** investigando el efecto de compuestos que activan (fusicoccina (FC), polioles) o inhiben (dietilstilbestrol, mersalil) su actividad y, **b)** determinando flujos de H⁺ y cambios de pH apoplástico en pulvínulos enteros, fragmentos de zonas extensoras y flexoras y suspensiones de protoplastos extensores y flexores, y **c)** inmunolocalización. Con esta última metodología Fleurat-Lessard y col. (1997a) han puesto de manifiesto ATPasas-H⁺ en el plasmalema de las células motoras de pulvínulos de *M. pudica* cuya actividad podría generar gradientes electroquímicos que inducen los rápidos flujos de iones responsables de los cambios de turgencia celular.

La FC es una toxina fúngica producida por *Fusicoccum amygdale* que **activa** ATPasas-H⁺ (revisado por Marrè, 1979). Este compuesto inhibe el cierre nictinástico e induce la reapertura de los foliolos secundarios de *A. lophantha* al mismo tiempo que disminuye el pH y el contenido de K⁺ de la solución externa. La aplicación de inhibidores de ATPasas-H⁺ (dietilstilbestrol 100 µM o mersalil 20 µM) durante el cierre nictinástico estabiliza el ángulo foliar e inhibe la reapertura foliar inducida por la FC (Moysset, 1981). De forma similar, la FC induce la apertura de foliolos de *M. pudica* en la oscuridad (Bonnemain y col., 1978) y aumenta la secreción de H⁺ de pulvínulos aislados en la

oscuridad (Roblin y Fleurat-Lessard, 1983; Otsiogo-Oyabi y Roblin, 1984); también estimula la ATPasa- H^+ del plasmalema y promueve el intercambio H^+/K^+ en segmentos de raíz de *Zea mays* entre otros (revisado por Marrè, 1979). En células estomáticas, la FC inhibe el cierre inducido por la oscuridad y estimula la reabertura en estomas de *Vicia faba* (She y col., 2010a), reproduce el efecto de la luz azul en la abertura de estomas de *Arabidopsis thaliana* (Harada y Shimazaki, 2009) e induce la abertura estomática y la liberación de H^+ en epidermis de *Adiantum capillus-veneris* (Doi y col., 2006).

En pulvínulos de *S. saman*, mediante la aplicación de microelectrodos, se ha demostrado que la transición luz - oscuridad aumenta el pH del apoplasto de las células extensoras (de 6,2 a 7,2) y disminuye el de las flexoras (de 5,5 a 4,9). Una posterior irradiación con luz blanca produce cambios opuestos (Lee y Satter, 1989). Esta acidificación del medio es anulada por inhibidores metabólicos e inhibidores de ATPasas- H^+ (Iglesias y Satter, 1983a y b; Lee y Satter, 1987; Satter y col., 1987). Starrach y Mayer (1989) obtuvieron resultados similares durante los movimientos circadianos de pulvínulos de *P. vulgaris* correlacionando la disminución y aumento de turgencia de las células extensoras con un incremento y disminución del pH del apoplasto respectivamente.

En otros sistemas vegetales, como granos de polen y suspensiones celulares, se ha demostrado que la presión osmótica, alterada por la adición de sorbitol o manitol, modula la actividad ATPasa- H^+ (Marrè y col., 1973; Curti y col., 1993; Pertl y col., 2010). Por ello, se ha sugerido que la ATPasa- H^+ de plasmalema presenta sensibilidad a la turgencia y podría tener un papel clave en el mecanismo de adaptación osmótica (Reinhold y col., 1984; Reuveni y col., 1987; Curti y col., 1993). En estomas de *V. faba*, la actividad ATPasa- H^+ de plasmalema está regulada por Ca^{2+} citoplasmático, inhibiéndose cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} (Kinoshita y col., 1995).

Finalmente, el gradiente de H^+ generado con la actividad de la ATPasa- H^+ del plasmalema podría activar el cotransporte azúcares/ H^+ (Komor y Tanner, 1980). Se han caracterizado en plantas cotransportadores sacarosa/ H^+ (Kühn y Grof, 2010) y manitol/ H^+ (Juchaux-Cachau y col., 2007).

1.1.2.3.2.- Sistemas de transporte iónico.

La aplicación de la técnica de patch-clamp a membranas plasmáticas de células motoras de pulvínulos secundarios de *S. saman* ha permitido averiguar el mecanismo de transporte de los iones implicados en la osmorregulación. Se han identificado distintos tipos de canales que se citan y describen a continuación (revisado por Moran, 2007). De entre ellos los canales K_D y los K_H son los más estudiados:

1. Canales de salida de K^+ activados por despolarización (“outward-rectifying K^+ channel”, canales K_D , canales K_{out}).
2. Canales de entrada de K^+ activados por hiperpolarización (“inward-rectifying K^+ channel”, canales K_H , canales K_{in}).
3. Simporte H^+/Cl^- .
4. Canales aniónicos.
5. Canales de Ca^{2+} .
6. Canales activados por fuerza mecánica.

Los **canales K_D** de los protoplastos extensores y flexores de *S. saman* se activan por despolarización (potencial de membrana por encima de -40 mV) y no difieren en su conductancia que oscila entre 15-40 pS cuando la concentración de K^+ externa oscila entre 5-125 mM y la concentración de K^+ interna es superior a 100 mM (Moran y col., 1988). Sin embargo, los K_D extensores son más sensibles al voltaje y menos selectivos al K^+ que los K_D flexores (Moshelion y Moran, 2000). La actividad de estos canales requiere fosforilación (Moran y col., 1996), no requiere Ca^{2+} (Moshelion y Moran, 2000), es bloqueada por quinina y tetraetilamonio (TEA) (Moran y col., 1988), por Cs^+ y Ba^{2+} de forma dependiente de voltaje y por Cd^{2+} y Gd^{3+} (bloqueadores de canales de Ca^{2+}) de forma independiente de voltaje (Moran y col., 1990). En contraste, en *M. pudica* la actividad de los canales K_D se bloquea también por Ba^{2+} y TEA de forma dependiente de voltaje (Stoeckel y Takeda, 1993) pero es atenuada severamente por tratamientos que presumiblemente incrementan la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) (Stoeckel y Takeda, 1995).

En las células extensoras y flexoras la entrada de K^+ tiene lugar a través de **canales K_H** activados por hiperpolarización (Moran y col., 1990) y de canales selectivos de cationes

que son independientes de voltaje, insensibles a cambios de pH y bloqueados por Cs⁺ pero no por TEA (Yu y col., 2001). Los K_H de las células motoras difieren de los K_H de las células estomáticas al ser inhibidos por acidificación del medio extracelular (paso de pH 7,8 a 5). El efecto inhibitor del pH produce una disminución reversible de la conductancia máxima y un cambio irreversible de la dependencia de voltaje para la abertura del canal. Los canales selectivos de K⁺ activados por hiperpolarización se han descrito también en protoplastos extensores de pulvínulos de *P. vulgaris* (Jaensch y Findlay, 1998).

En pulvínulos de *S. saman*, se han aislado y clonado dos genes que codifican canales K_D: *SPOCK1* (*SAMANEA PULVINI OUTWARD-RECTIFYING CHANNEL FOR K⁺ No. 1*) y *SPORK1* (*SAMANEA PULVINI OUTWARD-RECTIFYING K CHANNEL No. 1*) y, dos genes que codifican canales K_H: *SPICK1* y *SPICK2* (*SAMANEA PULVINI INWARD-RECTIFYING CHANNEL FOR K⁺ No. 1 y No. 2*) (Moshelion y col., 2002b).

El Cl⁻ se acumula en las células en contra de su gradiente electroquímico y probablemente se absorbe a través de simporte con H⁺ tipo (Satter y col., 1987). En protoplastos flexores de pulvínulos secundarios de *S. saman* se ha detectado la presencia de canales de salida de Cl⁻ activados por altas [Ca²⁺]_c (Moran, 1990).

Respecto a los canales de Ca²⁺ hay datos de la existencia de:

- a) **canales no selectivos permeables a Ca²⁺ y K⁺** en el plasmalema de las células extensoras, pero no en el de las flexoras, de *S. saman* (Moran y Satter, 1989) que se activan por despolarización y no son bloqueados por bloqueadores de canales de K⁺.
- b) **canales selectivos de Ca²⁺** en protoplastos de células extensoras de pulvínulos de *P. coccineus* (Mayer y col., 1997) y en protoplastos de pulvínulos de *M. pudica*. Estos últimos se activan por hiperpolarización (Stoeckel y Takeda, 1995).

La función de los **canales activados por fuerza mecánica**, activos en las células turgentes, independientes de voltaje, es desconocida pero se ha sugerido que podrían actuar como canales de Cl⁻ o como canales de entrada de Ca²⁺ (Moran, 1990; Moran y col., 1996).

1.1.2.3.3.- Acuaporinas.

Las acuaporinas son una familia de pequeñas proteínas (24-30 kDa) integrantes de las membranas que se encuentran formando poros; proporcionan una vía para el trasiego del agua (Preston y col., 1992; Quigley y col., 2001), algunos pequeños solutos neutros (Biela y col., 1999; Gerbeau y col., 1999) y gases (Uehlein y col., 2003; Jahn y col., 2004; Holm y col., 2005; Endeward y col., 2006).

Estos poros son canales por los que podría fluir agua a través de las membranas de las células motoras pulvinulares (Fleurat-Lessard y col., 1997b; Moshelion y col., 2002a) y, por tanto, tendrían un papel importante en los movimientos foliares (Uehlein y Kaldenhoff, 2008). En los pulvínulos de *S. saman* se han aislado y clonado dos genes (*SsAQP1* y *SsAQP2*) que codifican acuaporinas localizadas en plasmalema de las células flexoras y extensoras (Moshelion y col., 2002a).

1.1.2.4.- Transportadores localizados en tonoplasto.

Actualmente, solo hay datos sobre la existencia de ATPasas- H^+ y posiblemente de acuaporinas en el tonoplasto de las vacuolas acuosas de las células corticales motoras de pulvínulos primarios de *M. pudica* (revisado por Moran, 2007).

Respecto a las ATPasas- H^+ , Fleurat-Lessard y col. (1997b) inmunolocalizaron la subunidad- α catalítica de una ATPasa- H^+ observando que su abundancia aumenta durante el proceso de maduración del pulvínulo, es decir, en tanto adquiere la capacidad de responder rápidamente a estímulos externos. La presencia de ATPasas- H^+ está pues asociada a la capacidad de generar gradientes electroquímicos que inducen rápidos flujos de iones a través del tonoplasto.

También la presencia de acuaporinas (γ -TIP) se ha demostrado mediante ensayos inmunocitoquímicos. El desarrollo de los pulvínulos va acompañado por un incremento (superior a 3x) en la abundancia de acuaporinas, paralelamente al desarrollo de la capacidad

de respuesta rápida a estímulos externos (Fleurat-Lessard y col., 1997b). El gen *TIP1;1* que codifica la acuaporina γ -TIP se ha aislado y clonado a partir de ADN de *M. pudica*, pero falta verificar su expresión en los pulvínulos.

1.2.- Control de los movimientos foliares.

Los movimientos foliares rítmicos y nictinásticos están controlados por un reloj endógeno y la luz absorbida por fitocromos (phys) y unos fotorreceptores de luz B/UV-A que presumiblemente son de tipo criptocromos (crys). El oscilador y los fotorreceptores están localizados en los pulvínulos y controlan el movimiento foliar regulando el trasiego iónico a través del plasmalema (Satter, 1979).

1.2.1.- Control vía reloj endógeno.

Los folíolos de *A. lophantha* y *R. pseudoacacia* L presentan movimientos rítmicos circadianos dependientes de un reloj endógeno (Gómez, 1993). En *S. saman*, el movimiento foliar rítmico circadiano está relacionado con cambios rítmicos en el potencial de membrana (Racusen y Satter, 1975) y en el pH del apoplasto de las células flexoras y extensoras pulvinulares, probablemente provocados por cambios rítmicos en la actividad de ATPasas- H^+ (Iglesias y Satter, 1983b).

En *S. saman* la transcripción de los genes que codifican canales K_H (*SPICK1* y *SPICK2*), canales K_D (*SPORK1*) y acuaporinas (*SsAQP1* y *SsAQP2*) sigue un ritmo diario y circadiano que se relaciona con el movimiento foliar rítmico (Moshelion y col., 2002a y b). En las células motoras extensoras y flexoras la transcripción de *SPORK1* es máxima por la mañana (ciclos luz - oscuridad) o durante la mañana subjetiva (oscuridad absoluta). Por tanto, los ritmos de transcripción coinciden con la función del canal en las células flexoras o se anticipan en las células extensoras. Los ritmos de transcripción de *SPICK1* y *SsAQP2* están en fase y se correlacionan con fluctuaciones del ángulo foliar.

1.2.2.- Fotocontrol.

La luz afecta los movimientos foliares tanto rítmicos como nictinásticos. En estos últimos la calidad de la luz afecta a la magnitud de la abertura o el cierre. En el caso de los movimientos rítmicos puede cambiar la fase del ritmo actuando sobre el oscilador o reloj endógeno que controla el movimiento. Así, la luz sincroniza los movimientos foliares con los ciclos luz/oscuridad y los ajusta a la longitud relativa del día y la noche (Satter, 1979).

Los **movimientos foliares rítmicos** continúan en constante oscuridad tanto en plantas enteras como en ramas y en hojas aisladas. La fase del ritmo puede ser alterada por señales exógenas, tales como la luz roja (R) y azul (B) en *S. saman* y *A. julibrissin* (Simón y col., 1976; Satter y Galston, 1981). La sensibilidad del ritmo a la luz es circadiana porque la magnitud del cambio de fase depende del tiempo (hora) del ciclo en que se aplique el tratamiento luminoso (Simón y col., 1976b; Satter y Galston, 1981). Así, pulsos de luz R (15 min) provocan avances o retrasos de la fase del movimiento de los folíolos de *R. pseudoacacia* según se apliquen durante la noche o el día subjetivo; el efecto de la luz R se revierte con luz roja lejana (FR, 5 min) (Gómez y Simón, 1995). Los fotorreceptores implicados en estos cambios de fase provocados por pulsos de luz R son los phys a través de una respuesta reversible de bajo flujo fotónico (apartado 1.2.2.1.4; Simón y col., 1976; Gómez y Simón, 1995). Pulsos de 2 h de luz B también cambian la fase del ritmo obteniéndose los máximos avances en la mitad del día subjetivo y los máximos retrasos en la transición del día a la noche subjetiva (Gómez y col., 1999).

En relación a los **movimientos násticos**, la luz B provoca la abertura de los folíolos cerrados (Satter y Galston, 1981) y la luz R seguida de oscuridad incrementa el cierre nictinástico de los folíolos de *A. lophantha* (Moysset y Simón, 1989), *A. julibrissin* (Satter y Galston, 1971), *S. saman* (Satter y col., 1974) y *R. pseudoacacia* (Gómez, 1993). Este movimiento de cierre es rápido (se detecta a los 20-30 min) y está bajo control de phys a través de una respuesta de flujo bajo porque el efecto de la luz R revierte por la luz FR. La velocidad y magnitud del cierre nictinástico depende de la temperatura y de la longitud del periodo de luz que precede a la oscuridad (Satter, 1979).

En suspensiones de protoplastos pulvinulares de *S. saman*, mantenidas en ciclos 16 h luz – 8 h oscuridad, pulsos de luz blanca (W) y B - aplicados 4-8 h después del inicio de la fase oscura - hiperpolarizan transitoriamente tanto los protoplastos extensores como los flexores. Esta hiperpolarización va seguida de despolarización. La adición de 200 mM de K^+ estimula la despolarización de los protoplastos extensores, no de los flexores. El efecto de la luz puede ser debido a la activación de una ATPasa- H^+ porque la hiperpolarización es inhibida por vanadato y dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) (Kim y col., 1992). Los efectos de las irradiaciones W y B disminuyendo la concentración de K^+ y el pH del apoplasto extensor en pulvínulos de *S. saman* son también pruebas indirectas de un fotocontrol de la actividad ATPasa- H^+ (Lee y Satter, 1989; Lowen y Satter, 1989).

El efecto de la luz R varía considerablemente según el momento de aplicación. Un pulso de R - aplicado a las 4-8 horas de la fase oscura - no afecta el potencial de membrana de los protoplastos extensores y flexores de *S. saman*; la adición de 200 mM de K^+ al medio despolariza rápidamente las células flexoras y no afecta a las extensoras (Kim y col., 1992). En cambio, una breve irradiación R - aplicada a las 2 h del fotoperiodo y seguida de oscuridad – hiperpolariza las células flexoras; efecto revertido por una posterior irradiación con luz FR (Racusen y Satter, 1975). También, un pulso de luz R – aplicado a las 5 h del fotoperiodo y seguido de oscuridad - acidifica el apoplasto flexor y alcaliniza el extensor (Lee y Satter, 1989). Estos resultados se interpretan a favor de un fotocontrol - vía phys - de la actividad ATPasa- H^+ en las células motoras pulvinulares.

Respecto al flujo de iones, en los pulvínulos intactos de *S. saman*, un pulso de luz R seguido de oscuridad aumenta transitoriamente el contenido de K^+ del apoplasto extensor (indicando una liberación de este catión) y disminuye el del flexor (indicando una absorción de este catión) (Lowen y Satter, 1989). Los flujos de K^+ son inferiores en la zona flexora en concordancia con los cambios de tamaño, forma y turgencia, más bajos en las células flexoras que en las extensoras (Satter y col., 1974). Trabajos posteriores, han puesto de manifiesto que la abertura de los canales K_H varía rítmicamente en oscuridad continua con un desfase aproximado de 8 h entre los protoplastos extensores y flexores de *S. saman* (Kim y col., 1993). Además han demostrado que una irradiación R seguida de oscuridad provoca la abertura de los canales K_H de las células flexoras siendo este efecto revertido por una

irradiación con FR. En cambio, una irradiación R no afecta la actividad de los canales K_H de las células extensoras, que cierran en respuesta a una transición luz-oscuridad independientemente del estado de fotoequilibrio de los phys (Kim y col., 1993). Respecto a los canales K_D , una irradiación R seguida de oscuridad disminuye su actividad en protoplastos flexores (Suh y col., 2000).

1.3.- Fitocromos.

Los **phys** son una familia de fotorreceptores de luz R y luz FR que modulan muchas respuestas de crecimiento y desarrollo de las plantas. Se descubrieron en angiospermas, al estudiar fotorrespuestas como la germinación y la floración (Borthwick y col., 1952; Sage, 1992), aunque posteriormente se han encontrado en gimnospermas, helechos, musgos, algas y bacterias entre otros. Karniol y col. (2005), basándose en estudios bioquímicos, genéticos y filogenéticos, los han clasificado en: phys de plantas (**phys**), bacteriofitocromos (BphPs), phys de cianobacterias (Cphs), phys de hongos (Fphs) y moléculas similares a phys. En esta introducción se tratará exclusivamente de los phys de plantas.

1.3.1.- Tipos de fitocromos de plantas.

Las investigaciones fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas permitieron definir dos tipos de fotorreceptores: **tipo I** o phys de tejido etiolado fácilmente degradable a la luz y el **tipo II** o phys de tejidos verdes y fotoestable a la luz (revisado por Furuya, 1993).

Estudios genéticos y de biología molecular pusieron de manifiesto que los phys estaban codificados por una familia de genes divergentes. En *A. thaliana* esta familia consta de 5 miembros denominados *PHYA*, *B*, *C*, *D* y *E* que codifican para las apoproteínas de los phys A, B, C, D y E respectivamente (Sharrock y Quail, 1989; Clack y col., 1994) y se expresan diferencialmente en los tejidos y en las diferentes etapas del desarrollo de la planta (Whitelam y Devlin, 1997). La caracterización posterior de estos phys ha permitido identificar al phyA como tipo I y los restantes como tipo II (Sharrock y Clack, 2002). En

general, el phyA es el más abundante en plantas etioladas y junto con el phyB han sido los más estudiados.

Nuestro grupo, ha aislado y caracterizado el gen *PHYA* (Fernández, 2007; Salla, 2007) y parcialmente el gen *PHYB* de *R. pseudoacacia* (Garre, 2010, 2011) así como fragmentos de los genes *PHYA*, *PHYB* y *PHYE* de *A. lophantha* (Viader y col., 2005; Medina, 2008; Garre, 2011). También, ha detectado inmunolocalizando phyA en las células extensoras y flexoras de los pulvínulos de *R. pseudoacacia* (Moysset y col., 2001a).

1.3.2.- Estructura molecular.

Los phys son cromoproteínas diméricas solubles. En general, se consideran homodímeros pero recientemente se ha demostrado que los phyC y phyE de *A. thaliana* no homodimerizan sino que forman heterodímeros con phyB y phyD (Clack y col., 2009). Cada monómero consta de una apoproteína, cuya masa oscila entre 116-127 kDa según el tipo de phy y la especie vegetal, que está unida a un cromóforo, bilina tetrapirrólica de cadena abierta denominada fitocromobilina. La unión se produce a través de un enlace tioéter (-C-S-C-) con una Cys altamente conservada (Fig. 1.4a). Todos los phys de plantas tienen el mismo cromóforo y se diferencian por la apoproteína (revisado por Li y col., 2011).

La apoproteína (revisado por Li y col., 2011) consta de un dominio N-terminal (≈ 70 kDa) con actividad fotosensora, bilinliasa y básico para la fotorreversibilidad de los phys y un dominio C-terminal (≈ 55 kDa) implicado en la dimerización y transducción de las señales luminosas. Los 2 dominios se unen a través de una región bisagra. La posibilidad de que los phys sean quinasas de proteína reguladas por la luz ha sido objeto de un intenso debate. Yeh y Lagarias (1998) demostraron que los phys de eucariotas son quinasas de proteína (histidina) con especificidad serina/treonina que se autofosforilan y son fosforilados por otras quinasas de proteína en residuos de serina y no de histidina. En el caso del phyA, la autofosforilación sería importante regulando la estabilidad de la apoproteína. La forma fosforilada se degrada más rápidamente (Han y col., 2010)

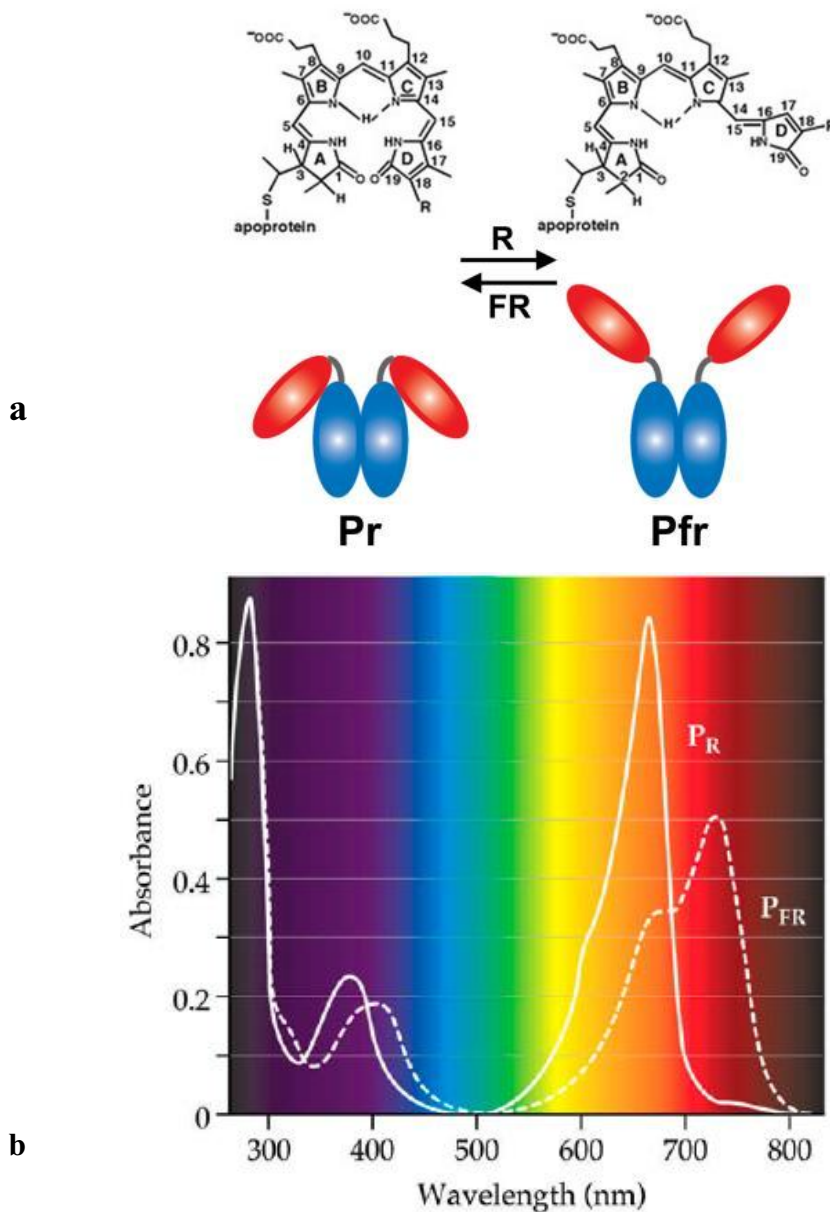


Figura 1.4.- a) Representación esquemática de la fototransformación ($Pr \leftrightarrow Pfr$) de una molécula de fitocromo. El cromóforo “fitocromobilina” (parte superior) está unido a la apoproteína (parte inferior) a través de un enlace tioéter. La apoproteína consta de un dominio N-terminal (rojo en el esquema) al que se une el cromóforo y un dominio C-terminal (azul en el esquema). Una irradiación R provoca una isomerización cis-trans del cromóforo, concretamente en el doble enlace C15-C16 entre los anillos C y D (esquema superior) y simultáneamente se produce un cambio de conformación de la apoproteína (parte inferior) así como de la orientación cromóforo-apoproteína (no está representado en la Figura). Estos cambios revierten por una irradiación FR (adaptado de Li y col., 2011).

b) Espectro de absorción de las dos formas P_r ($\lambda_{m\acute{a}x}$. 660 nm) y P_{fr} ($\lambda_{m\acute{a}x}$. 730 nm) de los fitocromos (adaptado de Shinkle, 2008).

1.3.3.- Fototransformaciones y transformaciones independientes de la luz.

Los phys existen en dos formas fotoconvertibles, **Pr** y **Pfr**, por irradiaciones con luz R y luz FR (Fig. 1.4a). El cromóforo de las formas Pr y Pfr difiere principalmente en el doble enlace entre C15 y C16. La fototransformación de los phys reside en que la luz induce una isomerización en este doble enlace pasando de la forma *cis* a la forma *trans* como respuesta a la luz R y revierte con FR. Hay datos en Cphs que el primer eslabón en la fototransformación de Pfr a Pr es la rotación del anillo pirrólico A y no el D (Ulijasz y col., 2010).

Se sintetiza en la forma Pr con un máximo de absorción en la región roja del espectro ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$; Fig. 1.4b) y después de una irradiación R, se convierte en la forma Pfr con un máximo de absorción en la región del rojo lejano ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$; Fig. 1.4b). Las dos formas del phy tienen un amplio espectro de absorción en el visible desde el azul al rojo lejano superponiéndose en gran parte (Fig. 1.4b), por ello se establece un equilibrio dinámico entre ambas, a una determinada longitud de onda, que se conoce con el nombre de estado de fotoequilibrio ($\phi = \text{Pfr}/\text{Ptotal}$). Debido a que la luz R (640-690 nm) es absorbida por ambos Pr y Pfr, no se genera una forma de Pfr puro sino que se obtiene un estado de fotoequilibrio con alrededor de un 85 % de Pfr y 15 % de Pr. Del mismo modo, la luz FR (710-750 nm) no convierte todo el phy a Pr, sino que genera un fotoequilibrio con alrededor de 97 % de Pr y 3 % de Pfr. En el laboratorio pueden obtenerse estados fotoestacionarios variables, cambiando la proporción de luz R y FR, para estudiar las respuestas de las plantas (Mancinelli, 1994).

Respecto a transformaciones independientes de la luz (revisado por Li y col., 2011):

- **Biosíntesis:** Los phys se sintetizan en la forma Pr. La fitocromobilina se sintetiza en los plastos a partir del ácido 5-aminolevulínico y se une a la apoproteína en el citoplasma. La unión de dos monómeros da lugar a un fotorreceptor funcional.

- **Reversión:** La forma Pfr de los phys puede revertir a Pr a través de un proceso térmico, no fotoquímico. El mecanismo de esta reversión es desconocido pero es importante para finalizar la señalización.

- **Degradación:** Este proceso afecta principalmente a la forma Pfr, se produce vía ubiquitina – proteasoma y también es de crucial importancia para finalizar la señalización.

1.3.4.- Tipos de respuesta.

Las respuestas fotomorfogénicas controladas por phys pueden clasificarse en 4 tipos según Mancinelli (1994):

1. Respuestas de flujo muy bajo (“very low fluence responses”, VLFR): se inducen con flujos de fotones de 10^{-4} a $10^{-1} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con pulsos cortos (segundos-minutos). Son respuestas muy sensibles a Pfr que no presentan reversibilidad R-FR. Se han descrito en semillas imbibidas en oscuridad y plántulas mantenidas en oscuridad absoluta.
2. Respuestas de flujo bajo (“low fluence responses”, LFR): se inducen con flujos de fotones comprendidos entre 1 y $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con pulsos cortos. Se desencadenan por luz R y revierten por FR, hecho que permitió el descubrimiento de los phys. La máxima efectividad de estas respuestas corresponde a la luz R (660 nm) y la máxima reversión a la luz FR (720 nm). Incluye las respuestas típicas de phys relacionadas con el desarrollo (crecimiento de tallos, expansión foliar, germinación de semillas, inducción de floración) y otras respuestas que no afectan propiamente al desarrollo (movimientos foliares, movimiento de los cloroplastos, flujo de iones). Respecto a los movimientos foliares, el pulso de R se aplica para obtener un alto nivel de Pfr que estimula el cierre pulvinular (Sweet y Hillman, 1969; Satter, 1979) y la fotoconversión de phy controla los flujos de K^+ y Cl^- (Satter y Galston, 1981; Satter y col., 1990).
3. Respuestas de alta irradiancia (“high irradiance responses”, HIR): requieren flujos de fotones $>1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y exposiciones prolongadas de luz (horas). La máxima efectividad correspondería a una FR-HIR (710 nm). No son reversibles. Algunas de estas respuestas serían la elongación de los tallos, la

expansión foliar o la síntesis de antocianos.

4. Respuestas proporcionales a la relación R:FR: la magnitud depende de la relación entre el flujo de fotones de R y el de FR. Son las respuestas al sombreado de la vegetación, acentuadas en plantas capaces de evitar la sombra.

Se han realizado estudios genéticos con mutantes y con plantas que sobreexpresan alguno de los diferentes phy atribuyéndose a cada uno de ellos algunas de las respuestas controladas por phy. De modo general al phyA, que es el más abundante en plantas etioladas, se le atribuyen las respuestas tipo VLFR (Botto y col., 1996; Shinomura y col., 1996; Yanovsky y col., 1997) y HIR (Whitelam y col., 1993; Yanovsky y col., 1997), aunque recientemente distintos informes implican al phyA en respuestas tipo LFR (Long y Iino, 2001; Stowe-Evans y col., 2001; Takano y col., 2005; Shen y col., 2009). El phyB, que se encuentra en mayor cantidad en plantas verdes, es bien conocido por mediar en las respuestas tipo LFR y en las HIR (Shinomura y col., 1996).

La acción de los diferentes phys se solapa. Así en *A. thaliana* el phyA y el phyB están implicados en el proceso de desetiación y germinación de semillas (Yanovsky y col., 1995; Franklin y Whitelam, 2006), el phyC en la desetiación y expansión de las hojas primarias como respuesta a la luz R y regulación del tiempo de floración (Franklin y col., 2003; Balasubramanian y col., 2006), el phyD y el phyE promueven la desetiación y suprimen las respuestas de evitar la sombra (Devlin y col., 1998, Devlin y col., 1999) y, finalmente el phyE también se ha implicado en la regulación de la germinación de las semillas a través de respuestas de tipo LFR y FR-HIR (Henning y col., 2002). Así, los phys comparten funciones similares (Franklin y Quail, 2010) pero se han diversificado para adoptar distintos papeles independientemente de su origen filogenético (Bae y Choi, 2008).

1.3.5.- Localización intracelular.

La localización intracelular de los phys varía de forma dinámica y es de gran importancia para explicar su mecanismo de acción que es objeto de una intensa investigación y se

comentará en el apartado siguiente. En *A. thaliana*, todos los phys (Pr phyA-E) se encuentran en el citoplasma cuando la planta permanece en la oscuridad y, después de convertirse en la forma Pfr, una fracción de los mismos se transloca al núcleo donde pueden interactuar con factores de transcripción y regular la expresión génica. La velocidad del transporte depende de las características de la irradiación y del tipo de phy (Gil y col., 2000). En el núcleo, los phys no se distribuyen de forma homogénea sino que se acumulan en unos pequeños cuerpos nucleares (*nuclear bodies* o *speckles*) cuyo significado fisiológico es objeto de debate (van Buskirk y col., 2012). En cualquier caso, siempre queda en el citosol una fracción de moléculas de Pfr (aproximadamente del 70 % en el caso del phyB) con funciones citoplasmáticas (Nagy y Schäfer, 2002).

En pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*, se ha inmunolocalizado el phyA en el citoplasma, núcleo, cloroplastos y mitocondrias de las células extensoras y flexoras. La distribución es independiente del estado del phy (Moysset y col., 2001a).

1.3.6.- Transducción de las señales luminosas captadas por los fitocromos.

La fotoactivación de los phys desencadena una compleja, ordenada, flexible y dinámica red de transducción que provoca distintos tipos de respuestas (apartado 1.3.4). Algunas respuestas (por ejemplo, los flujos iónicos) son muy rápidas, se manifiestan antes del trasiego de algunas moléculas de Pfr al núcleo y no se atribuyen a cambios de expresión génica. En cambio, otras respuestas como la desetiolación y la inducción de la floración son más lentas y resultan de cambios coordinados en la expresión génica (Smith, 2000). Así pues, la red de transducción consta de varias vías de señalización que se localizan en distintos compartimentos celulares (citoplasma y núcleo), interactúan y convergen.

Ensayos fisiológicos y de microinyección, han demostrado que las proteínas G heterotriméricas, el GMPc (guanosina monofosfato cíclico), el complejo calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) y los fosfoinositoles actúan como mensajeros secundarios en distintos procesos regulados por los phys tales como la expresión del gen *CHS* (codifica calcona sintasa) y la síntesis de antocianinas, la expresión de los genes *CAB* (codifican los complejos de proteína

que se asocian a clorofila a y b) y *RBCS* (codifica la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) y la formación de cloroplastos funcionales (Neuhaus y col., 1993; Bowler y col., 1994a), la fotoinhibición de la elongación del hipocótilo (Okamoto y col., 2001), la germinación de esporas (Wayne y Hepler, 1985) y los movimientos foliares rítmicos y nictinásticos (Morse y col., 1987; Moysset y Simón, 1989).

A través de estudios genéticos y moleculares, mayoritariamente en plantas mutantes de *A. thaliana* con alteraciones fenotípicas cuando se cultivan en la oscuridad o en respuesta a irradiaciones con luz R y luz FR, se han identificado un número relativamente elevado (>20) de proteínas implicadas en la transducción. Estas proteínas actúan de forma jerárquica y se localizan en el núcleo, el citoplasma y los plastos. Algunas son exclusivas de las vías de transducción del phyA, otras solo participan en la transducción del phyB y otras son comunes a ambas vías de señalización. Se desconoce la función de muchos intermediarios así como su relación funcional. Muchos intermediarios, como los factores de interacción con phys (PIFs, PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS) (revisado por Leivar y Quail, 2011), son factores de transcripción, otros son coactivadores transcripcionales, modificadores post-traduccionales, proteínas que intervienen en la proteólisis selectiva de otros intermediarios y de los propios phys, y enzimas. Además, algunos intermediarios interactúan directamente con los phys, otros interactúan entre sí y su actividad varía por fosforilación/desfosforilación. Finalmente, varios intermediarios también participan en vías de transducción hormonal, otros intervienen en las vías de transducción de los crys y otros son factores que regulan la actividad del reloj endógeno. Estas interacciones indican que las señales luminosas percibidas por distintos fotorreceptores (phys y crys) están integradas, relacionadas con vías de transducción hormonal y con el reloj endógeno. Esta integración permite a las plantas auto coordinar su propia actividad, coordinarla con el ambiente y adaptarse continuamente a los cambios ambientales (revisado por Kreslavski y col. 2009).

La complejidad de la transducción se pone de manifiesto en el modelo propuesto por Kreslavski y col. (2009) (Fig. 1.5) que incluye algunos (no todos) de los aspectos considerados en los párrafos anteriores, en concreto:

- La fotoactivación de los phys inicia la transducción en el núcleo y en el citoplasma.
- El Ca^{2+} y el GMP_C pueden actuar como segundos mensajeros.

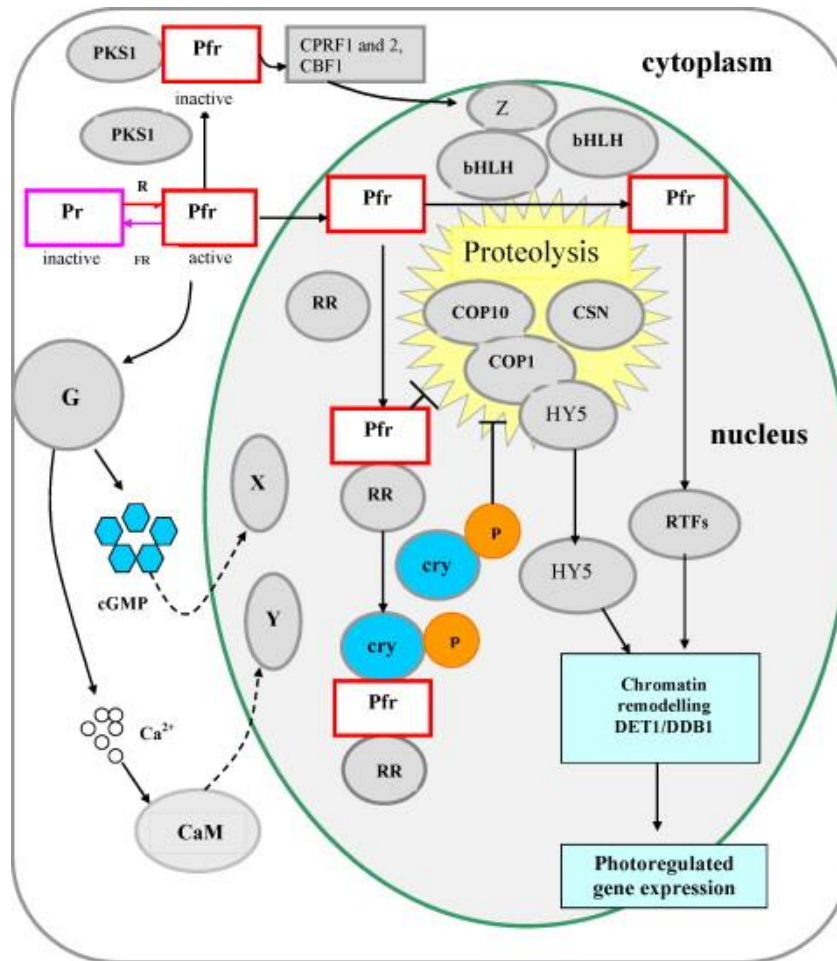


Figura 1.5- Modelo de transducción de señales, vía fitocromo. La forma Pr se transforma en Pfr al absorber luz roja (R). Parte de las moléculas de Pfr se desplazan al núcleo donde actúan regulando la expresión génica por distintas vías y otras permanecen en el citoplasma. En el núcleo los phys (Pfr) interactúan con factores de transcripción tipo hélice-bucle-hélice (bHLH) como la familia PIFs y regulan la expresión génica. También pueden interactuar con elementos reguladores de respuesta (RR), esta interacción estabiliza la forma Pfr que puede interactuar con los criptocromos (crys) y asimismo activar la expresión génica inhibiendo la proteólisis del factor de transcripción HY5 que depende de COP1, COP10 y CSN. En todos los casos, la fotorregulación de la expresión génica requiere la remodelación de la cromatina mediada por el complejo nucleosómico DET1/DDB1. En el citoplasma, Pfr puede interactuar con PKS1 y con factores de transcripción (CPRF1, CPRF2 y GBF1). Pfr también activa a proteínas G que, por un mecanismo desconocido, generan cambios en el contenido citoplasmático de GMPc y Ca²⁺ con calmodulina (CaM). Tanto por la vía del GMPc como la del Ca²⁺-CaM pueden controlarse la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción (X e Y). COP1-10, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1-10; CSN, COP9 SIGNALOSOME COMPLEX; CPRF, COMMON PLANT REGULATORY FACTORS; DDB1, DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1; DET1, DE-ETIOLATED-1; HY5, ELONGATED HYPOCOTYL 5; PIF, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR; PKS1, PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1. Modelo propuesto por Kreslavski y col. (2009).

- La forma Pfr nuclear interacciona con factores de transcripción tipo bHLH (hélice-bucle-hélice) - como los PIFs - y rápidamente activa la transcripción.
- El factor de transcripción HY5 interviene en el fotocontrol de la transcripción génica y es punto de convergencia de distintas vías de señalización.
- La remodelación de la cromatina constituye una vía epigenética de control de la expresión génica.

1.3.6.1.- El Ca^{2+} como segundo mensajero.

El Ca^{2+} libre citosólico es un componente fundamental y punto de convergencia de las vías de transducción implicadas en las respuestas de las plantas a señales del desarrollo y ambientales (estímulos bióticos y abióticos) entre las que se encuentra la luz.

La concentración de Ca^{2+} libre citosólico es del orden de 100-200 nM (Day y Reddy, 2011). En equilibrio dinámico con este Ca^{2+} libre está el Ca^{2+} ligeramente ligado o intercambiable que se encuentra a concentraciones superiores a 1 μM y se localiza principalmente en la pared y distintos orgánulos celulares (Wick y Hepler, 1982). Las células vegetales, para mantener los niveles de Ca^{2+} citosólico bajos y evitar su toxicidad, consumen importantes recursos energéticos (Geisler y col., 2000; Hirschi, 2001). El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, por entrada de Ca^{2+} del apoplasto o por liberación de reservorios internos (principalmente vacuolas y retículo endoplasmático), es una señal que puede controlar numerosas actividades celulares y, en consecuencia, dar lugar a diversas respuestas. El Ca^{2+} citosólico actúa solo o uniéndose a proteínas sensoras como la CaM, proteínas relacionadas con la CaM (CMLs), proteínas tipo-calcineurina (CBL) y quinasas de proteína dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) enzimas que, además de sensoras actúan como efectoras de Ca^{2+} (revisado por DeFalco y col., 2010). Este incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es transitorio puesto que el mismo Ca^{2+} intracelular estimula la actividad de ATPasas- Ca^{2+} (Bonza y De Michelis, 2011) que, junto con los sistemas de intercambio $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, permiten la salida de Ca^{2+} al apoplasto o su acumulación en orgánulos celulares para mantener la concentración citoplasmática adecuada (revisado por McAinsh y Pittman, 2009).

El Ca^{2+} , además, puede generar otros segundos mensajeros como el inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) y 1, 2 diacilglicerol (DAG). Estos compuestos resultan de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5 difosfato (PIP_2), reacción catalizada por una fosfolipasa C dependiente de Ca^{2+} . El IP_3 se libera al citoplasma y provoca la abertura de canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 de reservorios intracelulares. El DAG permanece en la membrana estimulando la actividad de una quinasa de proteína C (PKC) al aumentar su afinidad hacia el Ca^{2+} (revisado por Gillapsy, 2011).

Un aspecto clave en la señalización del Ca^{2+} radica en que la perturbación de Ca^{2+} (*calcium signature*) desencadenada por una señal es única y genera una determinada respuesta fisiológica. Esto puede explicarse por la localización subcelular, magnitud y cinética del cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que puede darse con un pico o elevación inicial seguida de un descenso, o mediante oscilaciones de amplitud y frecuencia variable. En este marco, debe considerarse que la entrada de Ca^{2+} en el citosol, ya sea a partir del apoplasto o de reservorios internos, tiene lugar a través de distintos tipos de canales cuyas características (por ejemplo, dependientes o independientes de voltaje, activados por IP_3 o ADPRc (ADP-ribosa cíclico)), localización y abundancia determinan la magnitud y las características espaciales de la perturbación, es decir, donde se producirá el cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Asimismo debe considerarse: **a)** el tipo de proteínas sensoras que enlazan al Ca^{2+} , sus afinidades, abundancia y localización, **b)** la presencia de los otros componentes de la vía de señalización e incluso, **c)** el requerimiento de cambios adicionales simultáneos a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Puesto que la difusión de Ca^{2+} en el citosol es baja y la capacidad de asociación de este catión a proteínas es alta, la abertura de canales de Ca^{2+} produce un aumento local (microdominio) de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se disipa rápidamente después del cierre del canal. Esta organización en microdominios es una vía de aumentar la versatilidad del Ca^{2+} como segundo mensajero pues permite a las células regular procesos en zonas muy concretas del citoplasma. Por otra parte, la generación de otros segundos mensajeros, como IP_3 , que difunde rápidamente en el citosol permite la activación de canales de Ca^{2+} espacialmente separados. De este modo, el incremento local de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ podría extenderse a todo el citosol (revisado por McAinsh y Pittman, 2009). La participación de mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y núcleo en la vía de señalización del Ca^{2+} citosólico es objeto de intensa

investigación (Stael y col., 2012).

El Ca^{2+} es esencial en muchos procesos regulados por phys, como la rotación del cloroplasto de *Mougeotia* (Serlin y Roux, 1984), la germinación de esporas de *Onoclea* (Wayne y Hepler, 1985), los cambios de volumen de protoplastos de *A. thaliana* (Wang y Iino, 1998; Molchan y col, 2001) así como en los movimientos foliares rítmicos y nictinásticos entre otros. En relación a estos movimientos, destacan los resultados obtenidos por nuestro grupo.

En el caso del cierre nictinástico de *A. lophantha*, la participación del Ca^{2+} intracelular en la acción de los phys queda de manifiesto por los efectos opuestos de un agonista (A23187, ionóforo de Ca^{2+}) y un antagonista (TMB8) intracelular del Ca^{2+} . La aplicación de Ca^{2+} (en forma de cloruro) 1-100 mM y de A23187 1-10 μM incrementando el movimiento de cierre reproduce el efecto estimulador de una irradiación R y contrarresta el efecto inhibitor de una irradiación FR. Al contrario, la aplicación de TMB8 10-100 μM inhibe el efecto de una irradiación R sin afectar el movimiento de los folíolos irradiados con FR (Moysset y Simón, 1989). La intervención de la CaM en este proceso es cuestionable porque la aplicación de antagonistas de esta proteína, como la clorpromazina y trifluorerazina (10-100 μM) inhibe el cierre nictinástico sin alterar el efecto diferencial de las irradiaciones R y FR (Moysset, 1981).

Por otro lado, los efectos de un quelante (EGTA) y un bloqueador de canales de Ca^{2+} (La^{3+}) sugieren la participación del Ca^{2+} externo en el mecanismo de acción de los phys. El EGTA 1-5mM inhibe de forma reversible el cierre nictinástico y disminuye el efecto fitocromo (Moysset y Simón, 1990). El La^{3+} 10-20 mM también inhibe el cierre nictinástico principalmente de los folíolos irradiados con R y, a la concentración 20 mM, anula completamente el efecto estimulador del cierre de esta irradiación (Moysset y col., 1994a).

En el caso de los movimientos foliares rítmicos de *R. pseudoacacia*, la aplicación de pulsos de 2 h de CaCl_2 10 mM o de A23187 10-50 μM provoca cambios de fase de hasta 10-12 h con curvas fase-respuesta idénticas a las obtenidas aplicando pulsos (15 min) de luz R (Gómez y Simón, 1995). Al contrario, pulsos de 2 h de EGTA 5 mM o de La^{3+} 1-10-50 mM

no provocan cambios de fase pero atenúan el ritmo o lo anulan totalmente (Gómez y col., 1999). El efecto del Ca^{2+} tiene lugar a través de la CaM y los fosfoinositoles (Moysset y col., 2001b), puesto que la aplicación de pulsos de 2 h de antagonistas de la CaM también provoca cambios de fase, pero las curvas fase-respuesta son opuestas a las obtenidas con luz R y Ca^{2+} . Estos resultados indican que los phys puede controlar el oscilador endógeno incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Gómez y Simón, 1995; Gómez y col., 1999).

1.3.6.2.- La sacarosa como potencial molécula de señalización.

Los azúcares, como la glucosa, la sacarosa y la trealosa 6-fosfato entre otros, pueden actuar como moléculas señalizadoras prácticamente en todas las etapas del ciclo vital (revisado por Smeekens y col., 2010; Wind y col., 2010).

Esta función señalizadora de la sacarosa es difícil de estudiar porque: **a)** se desconoce la identidad de su sensor/receptor, **b)** la vía de señalización y, **c)** este disacárido se hidroliza fácilmente a glucosa y fructosa, que también son moléculas señalizadoras (Wind y col., 2010). Sin embargo, a pesar de esto, se ha demostrado que la sacarosa inhibe la expresión del gen *BvSUT1* que codifica transportadores de sacarosa en remolacha (Chiou y Bush, 1998) y del gen *PC* (codifica plastocianina) en *A. thaliana* (Dijkwel y col., 1996) entre otros. También contribuye al efecto de la luz estimulando la brotación de yemas, la expresión de los genes *VII* y *VI2* (codifican dos invertasas vacuolares) y la actividad invertasa vacuolar en *Rosa sp.* (Rabot y col., 2012).

La interacción sacarosa-luz es compleja pues actúan de forma opuesta regulando la expresión de genes que codifican compuestos implicados en la fotosíntesis, por ejemplo *CAB* y *RCBS* y, en cambio, de forma sinérgica en la acumulación de antocianinas (revisado por Sheen, 1999).

Estudios con plantas de *A. thaliana* deficientes en phyA (mutantes *phyA*) o bien defectivas en la regulación de la expresión génica por la sacarosa (mutantes *sun*, *sucrose*

uncoupled) apoyan una interacción phyA-sacarosa en una respuesta FR-HIR (Barnes y col., 1996; Dijkwel y col., 1997). La luz FR aplicada de forma continua inhibe la elongación del hipocotilo, estimula la abertura de los cotiledones pero inhibe su enverdecimiento, la expresión de los genes *POR* (codifican NADPH protoclorofilida oxidoreductasa) y, además, altera irreversiblemente el desarrollo de los cloroplastos (no se forman cuerpos prolamelares y se acumulan vesículas en el estroma proplastidial). La aplicación de sacarosa exógena anula estos efectos lo que indica que la sacarosa probablemente actúa (regulador negativo) en la vía de señalización del phyA; sin embargo, no puede excluirse que la transducción de estas señales (luz y sacarosa) proceda por distintas vías que interaccionan entre sí (Barnes y col., 1996; Dijkwel y col., 1997). Por otra parte, la sobreexpresión del phyB anula el efecto del phyA inhibiendo la elongación del hipocotilo a través de una FR-HIR. Este efecto depende de la tasa de flujo fotónico y del suministro de sacarosa, sugiriendo que la sacarosa modula la interacción phyA-phyB (Short, 1999). Trabajos recientes (Stewart y col. 2011; Liu y col., 2011) han puesto de manifiesto que este disacárido modula el crecimiento regulando la transcripción de los PIFs, familia de factores de transcripción claves en la vía de transducción de los phys (apartado 1.3.6).

Respecto a los movimientos foliares, sacarosa y Pfr son claves para mantener las oscilaciones rítmicas en la oscuridad. La sacarosa 50 mM es imprescindible para mantener el movimiento rítmico foliar de *A. julibrissin* y *S. saman* en la oscuridad y, en estas condiciones, este disacárido estimula el cierre, disminuye el mesor y la amplitud de la oscilación. En cambio, la aplicación diaria de una irradiación R en presencia de sacarosa mantiene el ritmo y la amplitud de la oscilación (Simón y col., 1976a y b; Satter y col., 1976).

2.-OBJETIVOS

Este trabajo forma parte de una de las líneas de investigación de la Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona que estudia el fotocontrol, vía phys, de los movimientos foliares rítmicos y nictinásticos de *A. lophantha* y *R. pseudoacacia*. Ambas especies son adecuadas para investigar la fisiología del cierre nictinástico, si bien los ensayos se efectúan preferentemente en *A. lophantha* pues el menor tamaño de sus folíolos secundarios facilita su manipulación. En cambio, para estudiar el movimiento rítmico, *R. pseudoacacia* es óptima ya que irradiaciones con luz R provocan cambios de fase acusados. El movimiento rítmico de los folíolos de *A. lophantha* es muy marcado y difícil de alterar. También los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* son adecuados para estudios estructurales y ultraestructurales ya que pueden separarse de los folíolos y manipularse con facilidad, manipulación imposible de realizar con los diminutos pulvínulos terciarios de *A. lophantha*.

El movimiento foliar se debe a cambios de turgencia opuestos de las células motoras flexoras y extensoras, siendo más acusados en la zona extensora en pulvínulos de *R. pseudoacacia* al igual que en los órganos motores de *A. julibrissin* (Satter y col., 1970a) y *S. saman* (Morse y Satter, 1979). Estos cambios de turgencia son debidos a migraciones iónicas, principalmente K^+ y Cl^- , relacionadas con cambios en la actividad de ATPasas- H^+ , cambios de potencial de membrana, y abertura y cierre de canales iónicos. Estudios previos, comentados detalladamente en la introducción, demostraron que los phys y el Ca^{2+} *per se* estaban implicados en la regulación del cierre nictinástico y el movimiento rítmico circadiano de los folíolos de *A. lophantha* y *R. pseudoacacia*. También, ensayos farmacológicos demostraron que el Ca^{2+} podría actuar como segundo mensajero de los phys. En este contexto, se consideró de sumo interés investigar la implicación de sistemas efectores en el cierre nictinástico foliar inducido por phys y profundizar en el papel del Ca^{2+} como segundo mensajero de los phys. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Investigar el efecto de la fusicoccina, activadora de ATPasas- H^+ , y de varios polioles sobre el cierre nictinástico dependiente de los phys de los folíolos de *A. lophantha*.

- 2.- Investigar el papel de la sacarosa en el cierre nictinástico dependiente de phys evaluando:
 - a) el efecto de la sacarosa exógena en el cierre foliar de *A. lophantha* y, b) la incorporación y distribución de sacarosa-³H en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*.
- 3.- Determinar la implicación del Ca²⁺ como segundo mensajero de los phys durante el cierre nictinástico de los folíolos de *R. pseudoacacia* mediante la localización citoquímica de Ca²⁺ intercambiable en secciones de pulvínulos secundarios.

El desarrollo del objetivo 1 y parte del objetivo 2 se efectuó según la metodología usada en trabajos anteriores, es decir, dejando flotar pares de folíolos en soluciones control y problema. El desarrollo del objetivo 3 y parte del 2 precisó la puesta a punto de las metodologías adecuadas, aspecto dificultoso por la compacta estructura de los pulvínulos y las condiciones de trabajo (manipulación en cámara oscura). De este modo, se ensayaron distintos criométodos con la finalidad de inmovilizar sustancias solubles y evitar su redistribución y pérdida. También se optimizó el protocolo para la precipitación de Ca²⁺ con piroantimoniato potásico.

El trabajo experimental se ha realizado en su mayor parte en la Unidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, si bien la ejecución de las criotécnicas así como las observaciones del material mediante microscopía electrónica se han llevado a cabo en los Servicios Científico-Técnicos, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

Gran parte de los resultados de los objetivos 1 y 2 han sido objeto de 2 trabajos publicados respectivamente en *Physiologia Plantarum* (Moysset y col., 1994) y *Protoplasma* (Moysset y col., 2006).

El trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación concedidos por: a) DGICYT (ref. PB91-0229) y b) Ministerio de Ciencia e Innovación (ref. CGL2011-26310) y dentro del grupo 2009SGR1016 (AGAUR, Generalitat de Catalunya).

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal. Germinación y condiciones de cultivo.

En este trabajo se han utilizado plantas de *Albizia lophantha* (Willd.) Benth. y *Robinia pseudoacacia* L., cultivadas en los Campos Experimentales de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona a partir de semillas de origen local cedidas por "Serveis de Parcs i Jardins" del Ayuntamiento de Barcelona.

Albizia lophantha (Willd.) Benth (albizia amarilla, acacia plumosa) es una especie de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Mimosoideae*, oriunda de Australia y perfectamente aclimatada a Europa donde se cultiva como planta ornamental. El nombre del género *Albizia* alude a Filippo de Albizzi, noble italiano del siglo XVIII aficionado a las plantas, y el nombre de la especie *lophantha* proviene del griego (*lophos* : mechón, *anthos* : flor) y se refiere a la disposición de las flores.



Figura 3.1- *Albizia lophantha* (Willd.) Benth. (a). Inflorescencias amarillentas en forma de espiga (b). Frutos en forma de legumbre recta aplanada (c).

Se trata de un arbusto o árbol (Fig. 3.1a) de 1,8-7 m de altura, perenne con las ramas jóvenes pubescentes, que se tornan glabrescentes con el tiempo.

Esta especie florece en diciembre-febrero. Sus inflorescencias (Fig. 3.1b) son de color verde-amarillento en forma de espiga, axilares, solitarias o en pares, de 4-8 cm de largo, sobre pedúnculos pubescentes de hasta 1,5 cm de longitud. Sus flores son amarillentas, actinomorfas y pentámeras. Los estambres son numerosos y más largos que los pétalos, están unidos escasamente en la base formando un tubo que no excede o supera ligeramente a la corola. Sus frutos (Fig. 3.1c) son legumbres rectas, aplanadas, de color castaño claro, que se abren por dos valvas de 6-8,5 cm de largo.

Las hojas son alternas, compuestas, bipinnadas, de 10-20 cm de largo, y constan de 8-12 folíolos primarios de 5-14 cm de longitud, que, a su vez, están formados por 15-30 pares de folíolos secundarios que poseen movimientos rítmicos y nictinásticos. Durante el día o en presencia de luz, los folíolos secundarios se encuentran en posición horizontal (estado de abertura) (Fig. 3.2a). Durante la noche o en condiciones de oscuridad, los folíolos

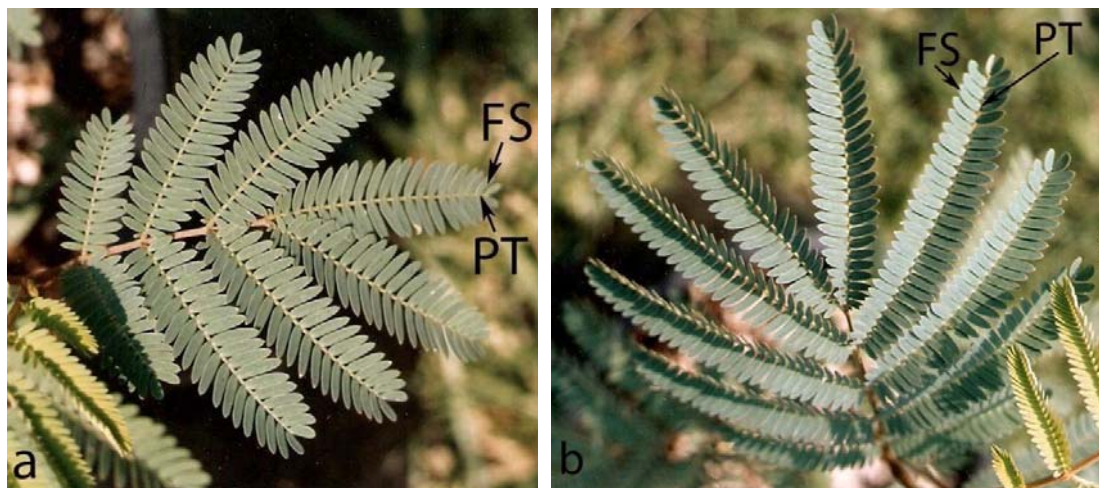


Figura 3.2- Aspecto general de una hoja de *Albizia lophantha* (Willd.) Benth. Durante el día (a) los folíolos secundarios se encuentran en posición horizontal (estado de abertura). Durante la noche (b) los folíolos secundarios se aproximan por el haz al mismo tiempo que se torsionan hacia el ápice foliar (estado de cierre). FS, folíolo secundario; PT, pulvínulo terciario.

secundarios se aproximan por el haz al mismo tiempo que se torsionan hacia el ápice foliar (estado de cierre) (Fig. 3.2b). Así los ángulos entre pares de folíolos secundarios pueden oscilar entre 0° y 180°.

Robinia pseudoacacia L. (robinia, falsa acacia; acacia de flor blanca, entre otros), es una especie de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae* (Mabberley, 1987), caducifolia, oriunda de las regiones orientales y centrales de América del Norte y perfectamente aclimatada a Europa donde se cultiva como árbol ornamental llegando a alcanzar unos 20 m de altura. El nombre del género *Robinia* alude a Jean Robin, jardinero de Enrique IV, quien la introdujo en Europa.

Esta especie florece entre mayo y junio, con flores blancas muy olorosas, en racimos colgantes de 10-20 cm de longitud (Fig. 3.3b). Sus flores son zigomorfas y pentámeras, con 5 sépalos soldados, 5 pétalos libres, 10 estambres y un ovario súpero formado por un solo carpelo. La corola de color blanco tiene una forma similar a la de una mariposa. Los frutos

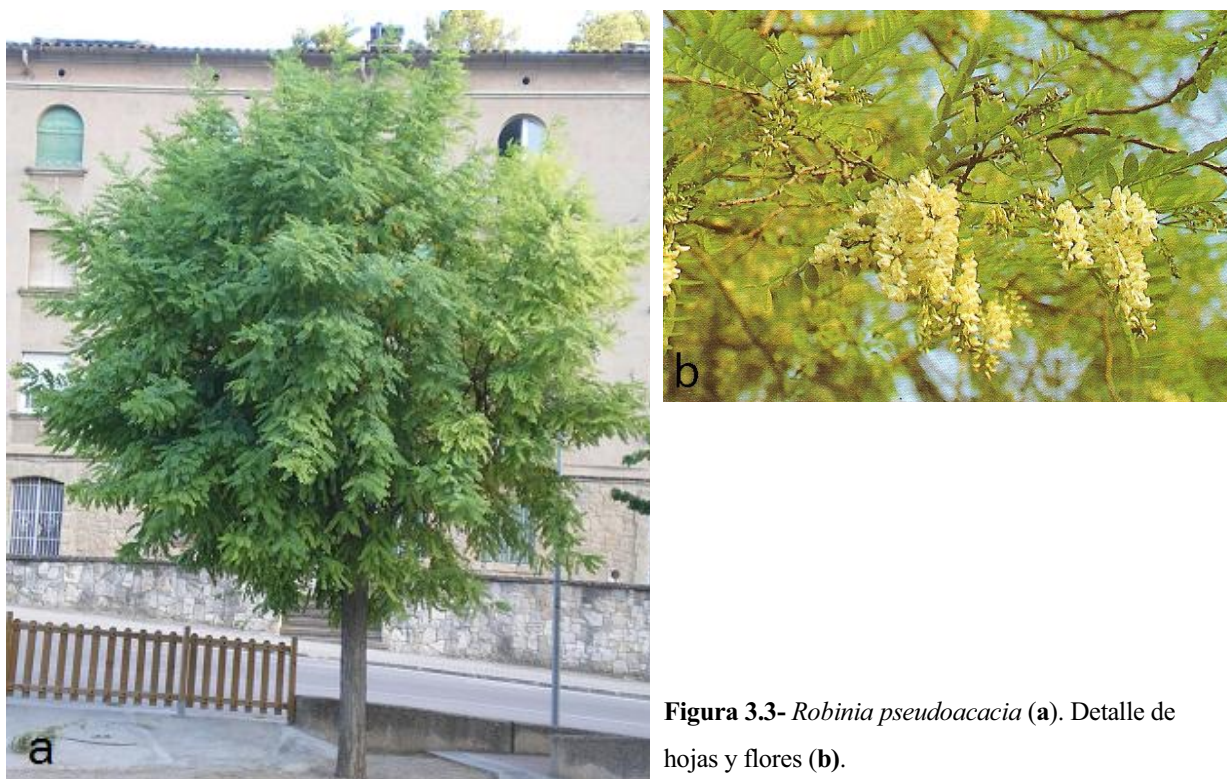


Figura 3.3- *Robinia pseudoacacia* (a). Detalle de hojas y flores (b).

son legumbres de 5-10 cm de longitud, aplanadas, marrones cuando maduran.

Posee hojas alternas e imparipinnadas, de 15-30 cm de longitud, que constan de 11-21 folíolos elípticos, de 3-4 cm de longitud y 1,5-2 cm de anchura, de color verde intenso en el haz y algo grisáceo en el envés. Estos folíolos poseen movimientos rítmicos y nictinásticos. Durante el día o en presencia de luz (Fig. 3.4a) adoptan una posición horizontal (posición de abertura). En condiciones naturales, al aumentar la intensidad de la radiación incidente, adoptan una posición casi vertical aproximándose por el haz. Por la noche o en la oscuridad (Fig. 3.4b) los folíolos se aproximan por el envés (posición de cierre). Así, el ángulo entre pares de folíolos puede oscilar entre 0 ° (posición de cierre) y 360 ° (máxima abertura).

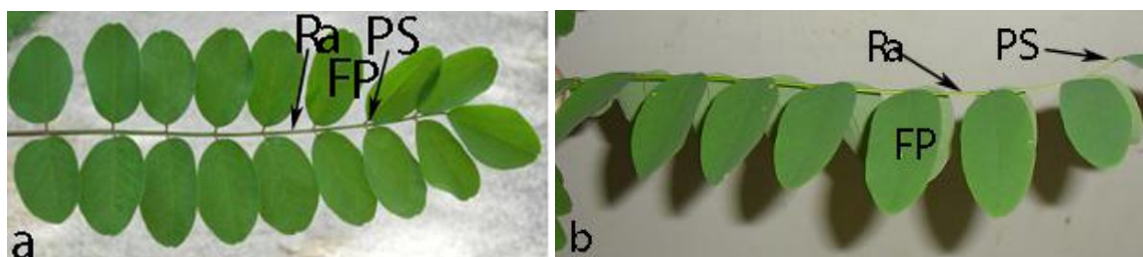


Figura 3.4- Aspecto general de una hoja de *Robinia pseudoacacia* L. Durante el día, los folíolos están en posición horizontal (estado de abertura) (a). Durante la noche, los folíolos se aproximan por el envés y simultáneamente se torsionan hacia el ápice foliar (estado de cierre) (b). FP, foliolo primario; PS, pulvínulo secundario; Ra, raquis.

La **germinación de las semillas** de ambas especies precisa escarificación para romper el reposo impuesto por la testa (Bewley y Black, 1982). Con este fin, las semillas se sumergieron en agua destilada a 90 °C y se dejaron imbibir en el agua que se enfriaba hasta temperatura ambiente durante un total de 24-48 h (Bailey, 1942). A continuación, se sembraron en un sustrato de turba:perlita:tierra (1:1:1) contenido en macetas de 13 cm de diámetro por 10,5 cm de profundidad. La siembra se efectuó principalmente en primavera y la germinación tuvo lugar, al aire libre, entre 1 y 4 semanas más tarde.

Las plantas se **cultivaron** al aire libre en los Campos Experimentales de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona abonándose mensualmente con N:P:K

(nitrógeno total 15 % (nitrato 6,9 % y amoniacal 8,1 %) : P₂O₅ 8,1 % : K₂O 15 %) y se regaron periódicamente con agua corriente. Cuando las plantas alcanzaron 25-35 cm de altura (4-6 meses después de la siembra) se transplantaron a macetas de mayor tamaño (25 cm de diámetro por 25 cm de profundidad) con un sustrato idéntico.

Se usaron plantas de 1-2 años de edad. Antes de los experimentos, estas plantas se mantuvieron (mínimo 7 días) en la cámara de cultivo en ciclos de 16 h luz / 8 h oscuridad oscilando la temperatura entre 24-28 °C. En estas condiciones, los folíolos de ambas especies continuaron presentando movimientos foliares rítmicos y nictinásticos.

3.2.- Características de las fuentes de luz

En la **cámara de cultivo** la fuente de luz estaba formada por 6 tubos fluorescentes (Osram-L Fluora 65W/77R) que proporcionaban 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medidos con un fotómetro Li-Cor 188B (Lincoln, NE) con un sensor Li-190 SB) a nivel de hojas superiores.

La **fente de luz roja (R)** estaba formada por ocho tubos fluorescentes GroLux (Sylvania F15/T8/GRO) de 15W, cada uno recubierto por 3 capas de filtro de color rojo No. 27 Rosco Supergel (Sydenham, London). Presentaba un máximo de transmisión a 660 nm y proporcionaba un flujo fotónico de 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido con un fotómetro Li-Cor 188B (Lincoln, NE) con un sensor Li-190 SB) a una distancia de 50 cm donde se encontraban los folíolos.

La **fente de luz roja lejana (FR)** constaba de 5 lámparas incandescentes (Sylvania BRS) de 150 W, cuya irradiación pasaba a través de un depósito de metacrilato transparente de 10 cm de profundidad lleno de agua destilada, una capa de filtro de color azul No. 20 Cinemoid (Rank Strands Electric Ltd, London) y otra de filtro de color naranja No. 5 A Cinemoid. Presentaba un máximo de transmisión a 730 nm y proporcionaba un flujo fotónico de 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido con un fotómetro Li-Cor 188 B (Lincoln, NE) con un sensor Li-220 SB) a una distancia de 50 cm donde estaban situados los folíolos.

La **fente de luz verde** estaba formada por un tubo fluorescente Sylvania (15 W) recubierto con 3 capas de filtro de color verde No. 39 Cinemoid y proporcionaba $0,07 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 10 cm de distancia. Todas las manipulaciones en oscuridad se realizaron bajo iluminación verde difusa de seguridad.

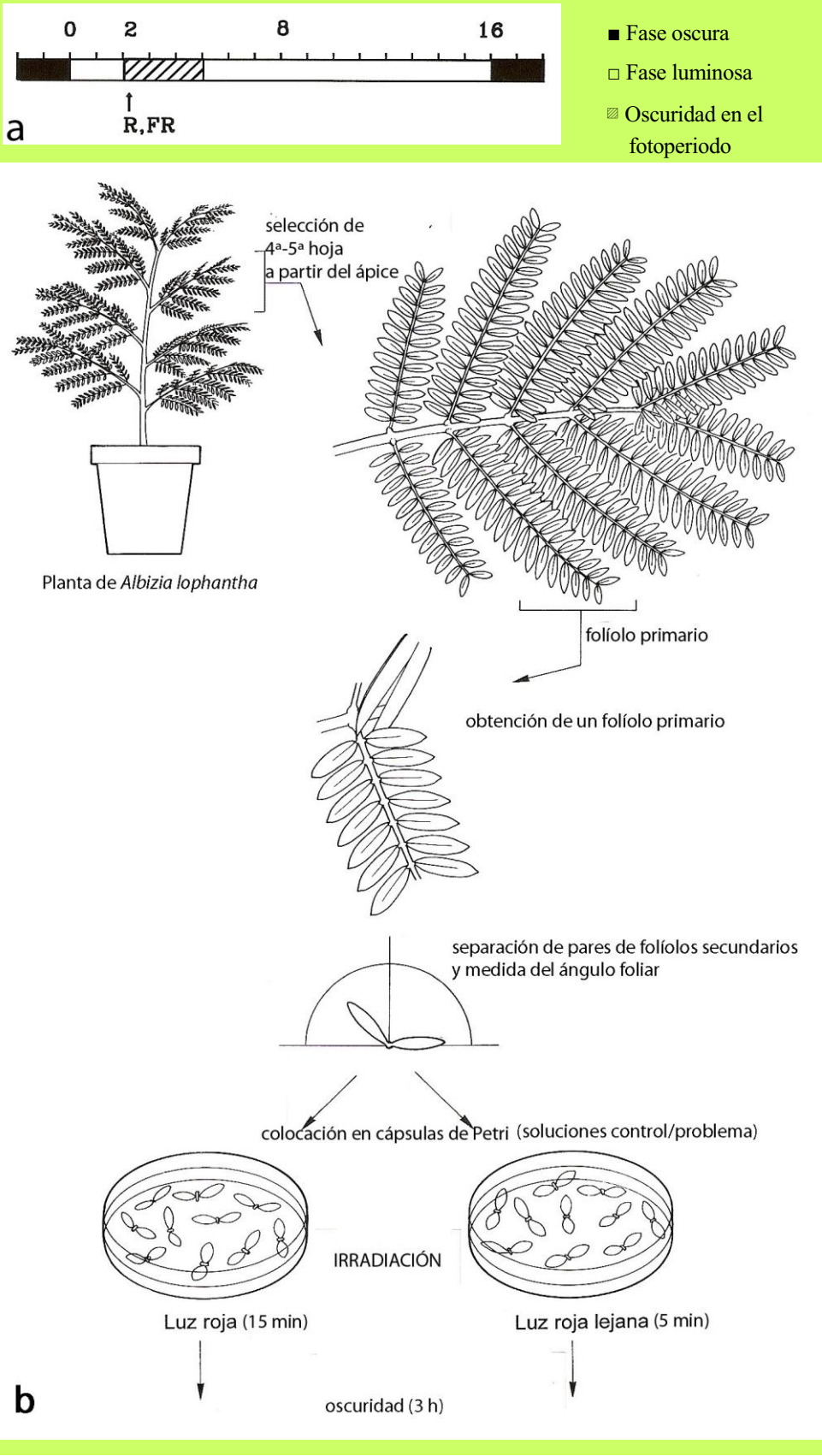
3.3.- Metodología para investigar la fisiología del cierre nictinástico foliar de *Albizia lophantha*.

3.3.1.- Protocolo experimental.

Los experimentos se realizaron con pares de foliolos secundarios de hojas maduras (4^a-5^a a partir del ápice) de plantas adaptadas a ciclos de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. De forma general, se adoptó la metodología de Satter y col. (1970b) iniciando los ensayos a las 2 h del fotoperiodo cuando la sensibilidad del cierre nictinástico al estado de *phys* es muy acusada. Algunos ensayos se realizaron a la mitad del fotoperiodo adaptando la metodología de Roblin y Bonmort (1984a).

La Figura 3.5 representa un esquema del procedimiento experimental. A las 2 h (o 8 h excepcionalmente) del fotoperiodo (Fig. 3.5a) se aislaron pares de foliolos secundarios a ser posible de la misma hoja (Fig. 3.5b), se determinó el ángulo que formaban entre sí

Figura 3.5- Protocolo experimental seguido para estudiar el cierre nictinástico foliar de *Albizia lophantha* dependiente de fitocromo(s). Las plantas se mantuvieron previamente en ciclos de 16 h luz - 8 h oscuridad (**a**). A las 2 h del fotoperiodo se seleccionó la 4^a-5^a hoja a partir del ápice; mediante unas tijeras, se aisló un folíolo primario y cuidadosamente, se separaron los pares de foliolos secundarios al mismo tiempo que se midió el ángulo que forman entre sí. Se descartaron los dos pares de foliolos más apicales y basales. Inmediatamente, los pares de foliolos se repartieron, de forma aleatoria, en cápsulas de Petri con las distintas soluciones control o problema. Los foliolos se dejaron flotar sobre el envés. Este procedimiento se repitió hasta conseguir 10 pares de foliolos / cápsula Petri. Los pares de foliolos se irradiaron con luz roja (R, 15 min) o roja lejana (FR, 5 min) y se trasladaron a la oscuridad manteniéndose en estas condiciones durante 3 h (**b**).



(ángulo foliar) mediante un semicírculo graduado y se repartieron - rápida y aleatoriamente - en cápsulas de Petri (6 cm diámetro) que contenían 10 ml de las soluciones control o problema. Se distribuyeron 10 pares de foliolos por cápsula. En la selección se excluyeron los dos pares de foliolos basales y apicales por diferir en el grado de abertura y haber sido manipulados durante la toma de muestras (Hillman y Koukkari, 1967). Esta recolección y distribución del material no superó los 20 min de duración y se efectuó manteniendo los foliolos en las condiciones de iluminación de la cámara de cultivo. A continuación, los pares de foliolos se irradiaron con **R (15 min)** o con **FR (5 min)** y se trasladaron inmediatamente a la oscuridad donde se mantuvieron durante 3 h. A partir del inicio de la oscuridad y periódicamente cada 30 min, se midieron los ángulos foliares con la ayuda de un semicírculo graduado. Todas las medidas se efectuaron en presencia de luz verde de seguridad para no alterar ningún proceso bajo control de phys (Pratt, 1984).

3.3.2.- Compuestos químicos utilizados.

La fusicoccina (FC) fue cedida por los Prof. Drs. A. Ballio (Roma, Italia) y R. Colombo (Milán, Italia) o bien se obtuvo de Sigma (St. Louis, Mo., USA). A partir de una solución stock de FC 1 mM en etanol 0,6% (conservada a 4 °C) se prepararon soluciones 1-100 µM inmediatamente antes de iniciarse las experiencias. A las concentraciones utilizadas en los experimentos, el etanol no tiene efecto en el movimiento foliar.

Las soluciones de sacarosa (Sigma) 25-100 µM, sorbitol (Sigma) 25-100 µM, manitol (Sigma) 25-100 µM y polietilenglicol (PEG 6000, Fluka) 12,4 % y 25,2 % se prepararon inmediatamente antes de iniciarse las experiencias.

3.3.3.- Presentación de los resultados y tratamiento estadístico.

En todos los ensayos realizados se calculó el ángulo foliar medio \pm error standard ($X \pm SE$) de los ángulos de los 10 pares de foliolos sometidos a un determinado tratamiento químico y

luminoso, tanto al inicio del experimento (X_0) como a los 30 (X_{30}), 60 (X_{60}), 90(X_{90}), 120 (X_{120}), 150 (X_{150}) y 180 (X_{180}) min de oscuridad. En general, los valores X presentaron una variabilidad considerable (llegando a ser excepcionalmente de 15 °) desde el inicio del experimento aún cuando se extremaron las precauciones para obtener una muestra homogénea. A partir de estos valores X se calculó: a) la **magnitud de cierre foliar** y, b) el **efecto fitocromo**.

La **magnitud de cierre foliar** se determinó calculando la diferencia entre el ángulo foliar inicial (X_0) en presencia de luz (antes de las irradiaciones R y FR) y los ángulos foliares a los 30 (X_{30}), 60 (X_{60}), 90 (X_{90}), 120 (X_{120}), 150 (X_{150}) y 180 (X_{180}) min de oscuridad ($X_0 - X_n$).

Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces para comprobar su repetitividad (Satter y col., 1970b; Bonnemain y col., 1978). En las Figuras se representa la variación del ángulo foliar en el tiempo y los datos corresponden a la media aritmética \pm error estándar de los tres ensayos efectuados.

El **efecto fitocromo** se determinó a las 3 h de oscuridad calculando la diferencia entre los grados de cierre de los foliolos irradiados con R y FR ($X_R - X_{FR}$) sometidos a un determinado tratamiento químico.

El **análisis estadístico** se realizó con el programa SPSS para Windows v. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Se compararon las diferencias que sobre el efecto fitocromo provocaban los distintos tratamientos químicos ensayados, aplicando el análisis ANOVA mediante el test Post hoc Duncan. El grado de significación estadística fue de $P < 0,05$, aunque excepcionalmente se utilizó $P < 0,1$ y n osciló entre 2 y 10.

3.4.- Metodología para investigar la incorporación y distribución de sacarosa-³H y manitol-³H en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).

El uso de moléculas en las que se ha sustituido uno o más de sus átomos estables por sus correspondientes radioisótopos permite aproximaciones experimentales de elevada sensibilidad y tiene múltiples aplicaciones en el campo de la biología vegetal (Moysset y col., 2006; Meena y col., 2008; Stepinski, 2008). Estas aplicaciones se basan en la posibilidad de detectar fácilmente la radiación emitida por una cantidad muy pequeña del isótopo radiactivo que se incorpora al material junto al isótopo inerte del mismo elemento. De este modo, es posible llevar a cabo un seguimiento de la molécula a analizar, determinar su situación y cuantificarla.

En este trabajo se ha usado esta aproximación experimental para estudiar la incorporación y distribución de sacarosa y manitol en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*. Ambos compuestos estaban marcados con tritio (³H), radioisótopo emisor de partículas β (electrones) de baja energía (18,6 keV) con un período de semidesintegración de 12,3 años (Lucas y Unterweger, 2000) y ampliamente usado en estudios biológicos (Moysset y col., 2006; Stepinski, 2008). La detección de la radiactividad total incorporada a las muestras se efectuó mediante la técnica de recuento por **centelleo en líquido** y su distribución en secciones pulvinulares mediante **autorradiografía – microscopía óptica y electrónica**.

El **contaje por centelleo líquido** (Annunziata y Kesler, 2003) se basa en la conversión de la radiación emitida por el radionucleido en impulsos luminosos que inciden sobre el fotocátodo del detector produciendo una avalancha de electrones que genera una descarga eléctrica la cual es amplificada en un tubo fotomultiplicador y detectada como un impulso eléctrico (cuenta) por el contador. La radiactividad de la muestra biológica se expresa por el número de cuentas producidas en un tiempo conocido (cpm).

Un problema importante, en el contaje de la radiación β de baja energía, es la competencia e interferencia producida por el ruido de los electrones térmicos del tubo

fotomultiplicador. Por ello, en general, los contadores de centelleo líquido tienen dos fotomultiplicadores conectados por un circuito de coincidencia de tal forma que solo se procesan aquellos impulsos recibidos simultáneamente en ambos fotocátodos con la consiguiente reducción del ruido de fondo procedente del ruido electrónico, generalmente debido al efecto termoiónico del fotocátodo.

Las muestras se disuelven o suspenden en un *cocktail de centelleo* que contiene un solvente orgánico y pequeñas cantidades de un compuesto centelleador primario (1-10 g.l⁻¹) y, a veces, de un centelleador secundario (unos 0,1 g.l⁻¹) (Thomson, 2003). Como solventes orgánicos se utilizan compuestos aromáticos, capaces de aceptar y transferir energía, como el tolueno, el xileno, el 1, 2, 4-trimetilbenzeno, la mezcla dioxano y naftaleno o el diisopropilidennaftaleno (miscibles en agua, exceptuando los dos primeros). El soluto centelleador primario está formado por compuestos orgánicos fluorescentes como el PPO, el PBD, el PMP, el P-terfenilo o el Butil-PBD (P, fenilo; O, oxazol; B, difenilo; D, oxidiazol; M, metilo). A veces, se añade como soluto centelleador secundario el p-di 2 (feniloxazolil) benzeno (POPOP) o el dimetil-POPOP (más soluble). Las partículas β emitidas por el radionucleido transfieren energía a las moléculas del solvente y éstas, a su vez, la transfieren a las moléculas del centelleador primario que se excitan y al volver a su estado basal emiten energía en forma de fotones. Las moléculas del centelleador secundario absorberán la luz procedente de las moléculas del centelleador primario y al volver a su estado basal emitirán fotones de distinta longitud de onda que se convertirán en impulsos eléctricos.

En un sistema ideal la cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la energía de la partícula inicial; sin embargo, hay muchas variables (color de las muestras, autoabsorción, etc.) que interfieren en esta proporcionalidad. Esta interferencia *quenching* debe corregirse mediante la preparación de las muestras o corrección de datos (Thomson, 2003).

La **autorradiografía** es una técnica que permite la localización a nivel estructural y/o ultraestructural de radionucleidos en secciones de órganos/tejidos gracias a su capacidad de interactuar con los cristales de haluro de plata en las emulsiones fotográficas (Baker, 1989).

En este método los órganos/tejidos se incuban durante un determinado período de tiempo con el compuesto radiactivo para permitir la incorporación del mismo y, seguidamente se fijan y procesan para microscopía óptica o electrónica. Posteriormente, cada preparación se recubre, con una fina película de una emulsión fotográfica formada por cristales de haluro de plata en una suspensión gelatinosa, y se coloca en la oscuridad durante un cierto tiempo (días-meses). Cuando las partículas β pasan a través de la emulsión, los iones de plata se convierten en átomos de plata formándose una imagen latente que se transforma en una imagen visible durante el proceso de revelado, sistema de amplificación en el cual los átomos de plata se reducen a plata metálica. El proceso de fijación elimina los cristales de haluro de plata no expuestos y genera una imagen autorradiográfica con la distribución de la radiactividad de la muestra original.

3.4.1.- Preparación de sacarosa- ^3H 50 mM y manitol- ^3H 50mM.

Se utilizaron 2 dosis radioactivas: $4 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $50 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$. La dosis $4 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ se empleó para investigar la incorporación de sacarosa y manitol en los pulvínulos secundarios. Para estudiar la distribución intracelular de estos compuestos por autorradiografía se aumentó la dosis a $50 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ con el fin de asegurar la presencia de marcaje. Como soluciones control se utilizaron sacarosa 50 mM y D-manitol 50 mM recién preparadas.

Las soluciones de sacarosa- ^3H 50 mM ($4 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$; $8,88\cdot 10^6 \text{ dpm}\cdot\text{ml}^{-1}$) y manitol- ^3H 50 mM ($4 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$; $8,88\cdot 10^6 \text{ dpm}\cdot\text{ml}^{-1}$) se obtuvieron añadiendo 40 μl de [fructosa-1- $^3\text{H}(\text{N})$]-sacarosa (actividad específica $11,9 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$, Du Pont, Alemania) ó D-[1- $^3\text{H}(\text{N})$]-manitol (actividad específica $30,0 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$, Du Pont, Alemania) a 10 ml de las soluciones de sacarosa 50 mM o manitol 50 mM (Sigma, St. Louis, Mo., USA) recién preparadas.

Las soluciones de sacarosa- ^3H 50 mM ($50 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) y manitol- ^3H 50 mM ($50 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) se obtuvieron al añadir 25 μl de [fructosa-1- $^3\text{H}(\text{N})$]-sacarosa (actividad específica $11,9 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) ó D-[1- $^3\text{H}(\text{N})$]-manitol (actividad específica $30,0 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) a 0,5 ml de las soluciones de sacarosa 50 mM o manitol 50 mM recién preparadas.

3.4.2.- Toma de muestras y aplicación de sacarosa-³H y manitol-³H.

La Figura 3.6 representa de forma esquemática la toma de muestras y la aplicación de sacarosa-³H 50 mM y manitol-³H 50 mM al material vegetal. Se trabajó con hojas maduras (4^a-6^a a partir del ápice) de *R. pseudoacacia* obtenidas de plantas mantenidas en ciclos de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. El proceso se efectuó en la cámara de cultivo y no superó los 10 min. A las 2 h del inicio del fotoperiodo se seleccionó una hoja madura y se separó cada par de folíolos unido a un segmento de raquis. Rápidamente, se midió el ángulo que formaban entre sí los dos folíolos (ángulo foliar) mediante un semicírculo graduado y, a continuación, la parte basal del raquis de cada fragmento se sumergió en 0,5-1 ml de las soluciones problema (sacarosa-³H 50 mM, manitol-³H 50 mM) o control (sacarosa 50 mM, manitol 50 mM) contenidas en un tubo Eppendorf. El proceso se repitió, con otras hojas maduras de la misma planta y/o de otras plantas hasta obtener el número de pares de folíolos necesarios para cada tratamiento químico.

Posteriormente, el material vegetal se irradió con R (15 min) ó FR (5 min) y se trasladó a la oscuridad donde permaneció durante 3 h. A continuación, se midieron los ángulos foliares mediante un semicírculo graduado y se procedió a aislar los pulvínulos secundarios para evaluar: **a)** la radioactividad incorporada mediante espectrometría de centelleo líquido y, **b)** investigar la distribución de sacarosa-³H 50 mM y manitol-³H 50 mM mediante autorradiografía.

Para determinar la incorporación de radioactividad por **espectrometría de centelleo líquido** se efectuaron tres tomas de muestras. En cada toma se seleccionaron 24 pares de folíolos (obtenidos de 6 hojas distintas) de *R. pseudoacacia* y, a cada tres pares de folíolos (6 pulvínulos secundarios) se aplicaron los tratamientos químicos y luminosos descritos anteriormente y recopilados en la Tabla 3.1.

Para investigar la distribución de sacarosa-³H 50 mM por **autorradiografía** se efectuaron dos tomas de muestras. En la primera (Tabla 3.2), se seleccionaron 19 pares de folíolos (obtenidos de 5 hojas distintas) y, a cada 5-4 pares de folíolos se les aplicó sacarosa-³H 50 mM o sacarosa 50 mM y los tratamientos luminosos descritos anteriormente.

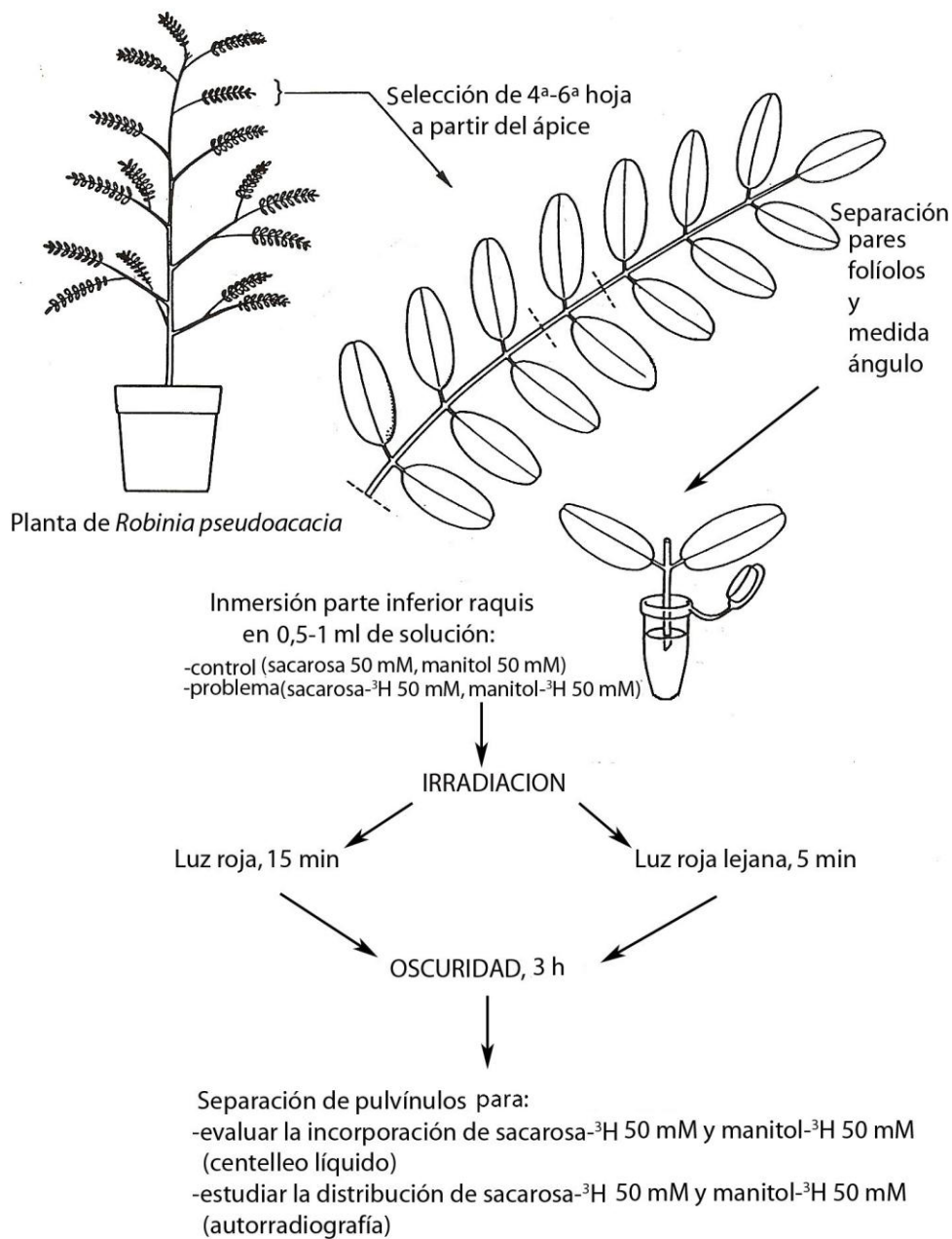


Figura 3.6- Protocolo experimental seguido para la aplicación de sacarosa-³H 50 mM y manitol-³H 50 mM en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*. Las plantas se mantuvieron previamente en ciclos 16 h luz - 8 h oscuridad. A las 2 h del fotoperiodo se seleccionó una hoja madura, 4^a-6^a a partir del ápice. Se separaron pares de folíolos unidos al raquis y se midió el ángulo que forman entre sí; inmediatamente se sumergió la parte inferior del raquis en 0,5-1 ml de las soluciones problema (sacarosa-³H 50 mM, manitol-³H 50 mM) o control (sacarosa 50 mM, manitol 50 mM). Los pares de folíolos se irradiaron con luz roja (R, 15 min) ó roja lejana (FR, 5 min) y se trasladaron a la oscuridad manteniéndose en estas condiciones durante 3 h, momento en el que se midió el ángulo foliar y se separaron los pulvínulos para evaluar la incorporación y la distribución de sacarosa-³H 50 mM y manitol-³H 50 mM.

Tabla 3.1.- Tratamientos químicos y luminosos aplicados a pares de folíolos de *Robinia pseudoacacia* para determinar la incorporación de sacarosa-³H 50 mM, manitol-³H 50 mM en los pulvínulos secundarios por centelleo. Cada tratamiento químico se aplicó a 6 pares de folíolos (Fig. 3.6) inmediatamente antes de aplicar las irradiaciones con luz roja (R) y roja lejana (FR) y la incorporación de radiactividad en los pulvínulos se determinó a las 3 h de oscuridad.

Tratamiento químico	Tratamiento luminoso	Pares de folíolos	Pulvínulos secundarios	Peso total (mgr)
Sacarosa-³H 50 mM	R (15 min)	3	6	1,8
	FR (5 min)	3	6	3,5
Sacarosa 50 mM control	R (15 min)	3	6	2,0
	FR (5 min)	3	6	1,7
Manitol-³H 50 mM	R (15 min)	3	6	2,6
	FR (5 min)	3	6	3,2
Manitol 50 mM control	R (15 min)	3	6	3,2
	FR (5 min)	3	6	2,9

Tabla 3.2. Número de pares de folíolos - tratados con sacarosa-³H 50 mM y con sacarosa 50 mM e irradiados con luz roja (R) o roja lejana (FR) - recolectados para investigar la distribución de sacarosa-³H en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*. Se indica el número de pulvínulos enteros procesados según protocolo estándar y el número de secciones pulvinulares (de unos 0,5 mm de grosor) procesados mediante criotécnicas (protocolos 1 a 4, apartado 3.4.4.2). Más explicación en el texto.

Tratamiento químico	Tratamiento luminoso	Pares de folíolos	Pulvínulos Secciones pulvinulares (núm)	Protocolo
Sacarosa-³H 50 mM	R (15 min)	5	6-10 sec. pulvinulares	1
			6-10 sec. pulvinulares	2
			6-10 sec. pulvinulares	3
			6-10 sec. pulvinulares	4
Sacarosa 50 mM	R (15 min)	4	6-8 pulvínulos enteros	standard
Sacarosa-³H 50 mM	FR (5 min)	5	6-10 sec. pulvinulares	1
			6-10 sec. pulvinulares	2
			6-10 sec. pulvinulares	3
			6-10 sec. pulvinulares	4
Sacarosa 50 mM	FR (5 min)	4	6-8 pulvínulos enteros	standard

Protocolo standard: fijación química e inclusión en Spurr

Protocolo 1: criofijación en propano y crioinclusión en HM20

Protocolo 2: criofijación en propano e inclusión en Spurr

Protocolo 3: criofijación por impacto en bloque de cobre (He) y crioinclusión en HM20

Protocolo 4: criofijación por impacto en bloque de cobre (He) e inclusión en Spurr

Los pulvínulos tratados con sacarosa 50 mM se procesaron según un protocolo standard (apartado 3.4.4.1) para evaluar posibles alteraciones ultraestructurales (plasmólisis) causadas por este compuesto durante el período de incubación. En cambio, los pulvínulos tratados con sacarosa-³H 50 mM se cortaron transversalmente en secciones de unos 0,5 mm de grosor y se procesaron siguiendo 4 protocolos (criotécnicas, apartado 3.4.4.2.1) para seleccionar un protocolo que aunara óptima preservación estructural y ultraestructural e inmovilización de sustancias solubles. En el segundo muestreo, se omitió el tratamiento con sacarosa 50 mM.

Para investigar la distribución de manitol-³H 50 mM por autorradiografía, la toma de muestras fue idéntica a la descrita en el párrafo anterior para la sacarosa-³H 50 mM.

3.4.3.- Determinación de la incorporación de sacarosa-³H y manitol-³H.

A las 3 h de oscuridad, los pulvínulos secundarios se separaron de los folíolos y del raquis por medio de un bisturí. Dado el bajo peso de cada pulvínulo, los 6 pulvínulos que habían recibido el mismo tratamiento químico y luminoso (Tabla 3.1) se pesaron conjuntamente e inmediatamente cada pulvínulo se colocó en un vial de centelleo líquido con 4 ml de líquido de centelleo (Dupont, fórmula 989, NEF-989G). Antes de realizar esta operación, cada pulvínulo (3-4 mm de longitud) se cortó transversalmente en 3-4 secciones. Esta manipulación del material se efectuó en la oscuridad, en presencia de luz verde de seguridad, para no alterar ningún proceso bajo control de *phys* (Pratt, 1984).

La radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 1500, USA), perteneciente a la instalación radioactiva de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. La corrección del ruido de fondo y el *quenching* se efectuó automáticamente con el programa del contador al realizar la conversión de cpm a dpm. El *quenching* osciló entre 13 y 18 dpm (desintegraciones por min).

En el apartado de resultados, los valores de la cantidad de sacarosa-³H 50 mM y manitol-³H 50 mM incorporada corresponden a la media \pm SE de los 6 pulvínulos sometidos

al mismo tratamiento y se expresan en $\text{dpm}\cdot\text{mg}^{-1}$ peso fresco (PFr) de pulvínulo y en μmoles de radiactividad incorporada por g de PFr pulvinular y h ($\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}\text{ PFr pulvinular}\cdot\text{h}^{-1}$). Este último valor se calculó considerando la cantidad de radiactividad de las soluciones iniciales ($12,5\ \mu\text{moles}\cdot\mu\text{Ci}^{-1}$) y la equivalencia entre dpm y μCi ($2,2\cdot 10^6$ dpm equivalen a 1 μCi). Al efectuar este cálculo se eliminaron las dpm del material incubado en las soluciones control sin marcaje radiactivo.

3.4.4.- Determinación de la distribución de sacarosa- ^3H y manitol- ^3H .

Antes de abordar la investigación de la distribución de sacarosa- ^3H 50 mM y manitol- ^3H 50 mM mediante autorradiografía en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*, fue necesaria la puesta a punto de criométodos adecuados para inmovilizar estas sustancias solubles, puesto que los métodos convencionales de procesamiento de material vegetal para su observación mediante microscopía no evitan la redistribución y pérdida de compuestos solubles. Este problema puede solventarse o reducirse mediante criotécnicas, es decir, efectuando todo el proceso o parte del mismo a baja temperatura. Por ello, en primer lugar se procedió a ensayar cuatro protocolos, que se describen a continuación (apartado 3.4.4.2.1), para evaluar su idoneidad en la resolución de este problema y en la preservación de la estructura y ultraestructura de las células motoras pulvinulares. Previamente, se procesaron pulvínulos incubados en sacarosa 50 mM y manitol 50 mM según protocolo standard (apartado 3.4.4.1, Moysset y Simón 1991a) para investigar si estos compuestos provocaban cambios estructurales y ultraestructurales. A continuación se describe este protocolo standard y seguidamente las distintas criotécnicas ensayadas.

Tras 3 h de oscuridad, los pulvínulos secundarios sometidos a los distintos tratamientos químicos y luminosos (Tabla 3.2) se separaron, con un bisturí, del raquis y del folíolo aunque se dejó el extremo basal del limbo foliar para discriminar entre los extremos proximal y distal del pulvínulo. Seguidamente se procedió a su fijación química o criofijación. En la fijación química (apartado 3.4.4.1.1) se usaron pulvínulos enteros. Para la criofijación (apartado 3.4.4.2.1), los pulvínulos (3-4 mm de longitud) se seccionaron transversalmente con un bisturí obteniéndose 6-7 secciones transversales de unos 0,5 mm de

grosor por pulvínulo. Estas secciones se adhirieron, mediante agar 8 %, sobre discos de papel de color con la finalidad de identificar los distintos pulvínulos y tratamientos químicos y luminosos durante su posterior procesado. Al mismo tiempo, el papel sirvió para identificar la cara de la sección pulvinular con una fijación óptima. Todas las manipulaciones se efectuaron en presencia de luz verde de seguridad, para no alterar ningún proceso bajo control de phys (Pratt, 1984).

3.4.4.1.- Preparación del material para estudios estructurales y ultraestructurales.

3.4.4.1.1.- Fijación, deshidratación e inclusión.

La **fijación** (20 °C, 5 h en oscuridad) de los pulvínulos enteros, incubados en sacarosa 50 mM o manitol 50 mM durante 3 h en la oscuridad, se efectuó según Karnowsky (1965) en paraformaldehído 2 % - glutaraldehído 2,5 % en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Para facilitar la incorporación del fijador se efectuó un ligero vacío durante los primeros 30-40 min de la fijación. Después de varios lavados en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), las muestras se post-fijaron (4 °C, 14-16 h) en OsO₄ 1% en el mismo tampón y, seguidamente se lavaron (3 x 20 min) en agua destilada.

La **deshidratación** se realizó a temperatura ambiente a través de una serie de acetonas: 50 % (1 x 30 min), 70 % (1 x 30 min), 80 % (1 x 30 min), 90 % (1 x 30 min), 96 % (1 x 30 min) y 100 % (3 x 20 min).

La **inclusión** se efectuó en Spurr, resina epoxi de baja viscosidad (Spurr, 1969). La infiltración se efectuó a temperatura ambiente por inmersión en mezclas de acetona 100 %: Spurr en proporciones 3:1 (15 h), 2:2 (24 h), 1:3 (24 h) y, finalmente, en resina pura (48 h + 2 h). La infiltración se realizó en agitación (5 rpm) para favorecer la penetración de la resina. La polimerización de la resina que contenía las muestras se efectuó en moldes de silicona a 60 °C durante 48 h.

3.4.4.1.2.- Obtención, tinción / contrastado y observación de las secciones.

Las secciones transversales semifinas (1µm de grosor) y ultrafinas (70 nm de grosor) se obtuvieron con un ultramicrotomo Ultracut (Reichert-Jung, Viena, Austria) provisto de cuchilla de vidrio y un diamante respectivamente. Las secciones semifinas se usaron para controlar el estado del material y seleccionar las zonas (extensoras y flexoras) de interés para estudiar la ultraestructura.

Las **secciones semifinas** se recogieron sobre portaobjetos, se adhirieron a los mismos por calor (placa calefactora a 90 °C) y se tiñeron con azul de metileno 0,5-1 % tamponado con Bórax 1 % (90 °C, 15 -30 s). Después de un abundante lavado con agua destilada, se dejaron secar por calor. Estas secciones se observaron con un microscopio óptico binocular LEITZ con sistema de microfotografía Wild, perteneciente al actual Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Las **secciones ultrafinas** se depositaron sobre rejillas de cobre recubiertas de una fina membrana de Formwar (polivinil formol) 0,25 %, se contrastaron (30 min) con acetato de uranilo 2 % a temperatura ambiente, se lavaron en agua destilada (4 x 5 min) y se dejaron secar (20 min) sobre un papel de filtro Whatman a 37 °C. A continuación, se contrastaron (5 min) con citrato de plomo (Reynolds, 1963), se lavaron en agua destilada (4 x 5 min) y dejaron secar sobre papel de filtro a 37 °C. El material se observó en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Philips 301 (tensión de aceleración de 80 kV) de los Servicios Científico Técnico, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

3.4.4.2.- Preparación del material para la localización por autorradiografía de sustancias solubles.

La puesta a punto de los criométodos resultó muy laboriosa por las dificultades técnicas que implican (congelación del material, evitar su descongelación, etc), las características

estructurales y ultraestructurales del material objeto de estudio (Moysset y Simón, 1991a), el trabajar con material radiactivo y, además, en presencia de luz verde de seguridad.

3.4.4.2.1.- Criotécnicas.

Los 4 protocolos ensayados (Tabla 3.3) comparten las mismas etapas pero difieren por el método de criofijación, los fluidos de sustitución y la crioinclusión en resina acrílica (Lowicryl HM20) a -50 °C o inclusión en resina epoxi Spurr (Spurr, 1969) a temperatura ambiente. Todos los protocolos se realizaron en los Servicios Científico-Técnicos, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

Criofijación. Las secciones (de unos 0,5 mm de grosor) de los pulvínulos sometidos a los distintos tratamientos químicos y luminosos (Tabla 3.3) se criofijaron por: **a)** inmersión en un líquido criogénico (propano) y, **b)** por impacto contra un bloque pulido de cobre y enfriado con helio líquido.

Tabla 3.3- Criométodos utilizados para procesar los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* para la localización por autorradiografía de sustancias solubles.

Etapas	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
Criofijación	propano (LN ₂)	propano (LN ₂)	bloque cobre (He)	bloque cobre (He)
Criosustitución	metanol ± OsO ₄ 2% -90 °C, 3 días	acetona -GA 3% -90 °C, 3 días	metanol 100% -90 °C, 3 días	acetona -GA 3% -90 °C, 3 días
Infiltración	metanol -HM20, -50 °C	acetona -Spurr, TA	metanol -HM20, -50°C	acetona -Spurr, TA
Inclusión	HM20, -50 °C	Spurr, TA	HM20, -50 °C	Spurr, TA
Polimerización	-50 °C, 48 h, UV	60 °C, 48 h	-50 °C, 48 h, UV	60 °C, 48 h

GA, glutaraldehído; He, helio líquido; LN₂, nitrógeno líquido; TA, temperatura ambiente; UV, ultravioleta

Para efectuar la inmersión en propano (**protocolos 1 y 2**), las secciones se sujetaron en un inyector y se proyectaron a gran velocidad (aproximadamente 3 m.s^{-1}) en propano líquido ($-190 \text{ }^\circ\text{C}$) enfriado con nitrógeno líquido (LN_2) (Halpern y Quintana, 1989).

En la criofijación por impacto (**protocolos 3 y 4**), los pulvínulos se congelaron por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido ($-260 \text{ }^\circ\text{C}$) (Escaig, 1982) en un "cryovacuum block" (Reichert-Jung, Leica) (Fig. 3.7a) dentro de una cámara de humedad controlada (humedad relativa del 40 – 50 %).

Después de la criofijación, los pulvínulos se introdujeron en unas cestillas de acero inoxidable sumergidas en nitrógeno líquido (a $-196 \text{ }^\circ\text{C}$) y se mantuvieron en estas condiciones hasta el inicio de la criosustitución.

Criosustitución. Se emplearon dos solventes orgánicos (acetona 100 % y metanol 100 %) y dos fijadores químicos (O_5O_4 2 %, glutaraldehído 3%), a partir ensayos previos efectuados por otros investigadores (Droz, 1976; Bendayan, 1984; Puvion-Dutilleul, 1987; López-Iglesias y col., 1988; Testillano y col., 1992). En concreto, se usaron 2 mezclas (Tabla 3.3): metanol \pm O_5O_4 2 %, acetona - glutaraldehído 3 % y, también metanol 100 %. La criosustitución se realizó a $-90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 días en un congelador Cryosystem (RUA) (Quintana, 1994) (Fig. 3.7b).

Finalizada la criosustitución, la temperatura de la mezcla de criosustitución con el material vegetal se incrementó, a razón de $5 \text{ }^\circ\text{C.h}^{-1}$, hasta alcanzar $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ (muestras para crioinclusión en Lowycril) ó $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (muestras para inclusión en Spurr).

Crioinclusión. Se efectuó en resina acrílica Lowicryl HM20 a $-50 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes de la infiltración con Lowicryl las muestras se lavaron con metanol 100 % a $-50 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 4 h. A continuación, se sumergieron en distintas mezclas de metanol 100% y Lowicryl HM20 en proporciones 1:1, (24 h) y 1:2 (24 h) y, por último, en resina pura (8 h + 12 h). La polimerización se llevó a cabo con luz ultravioleta (UV) durante 48 h. Todo el proceso se realizó a $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ en el Cryosystem (RUA) en agitación (Fig. 3.7b).

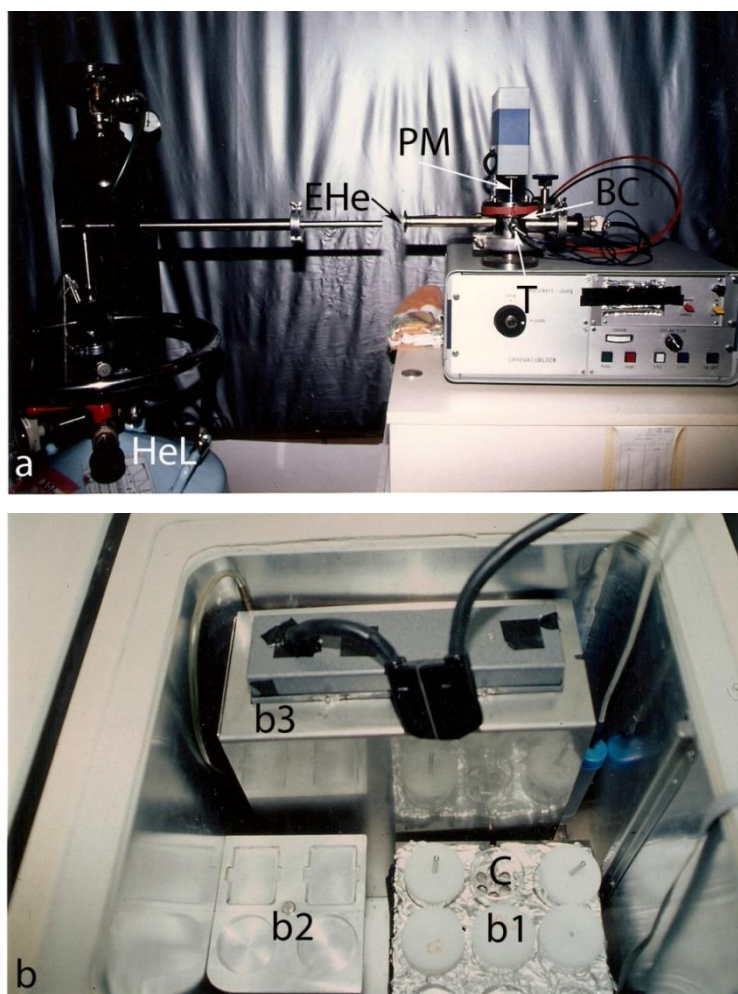


Figura 3.7- a) Cryovacublock utilizado para criofijar los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* por proyección de los mismos contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido a $-260\text{ }^{\circ}\text{C}$. El enfriamiento se realiza a través de un serpentín que rodea al recinto donde se encuentra el bloque de cobre en vacío. La abertura del recinto donde se halla el bloque y la proyección de la muestra accionada por una válvula electro neumática están perfectamente sincronizados. Un termopar permite medir la temperatura del bloque de cobre en cada momento. En los experimentos realizados, la cabina donde está instalado el equipo cuya humedad está controlada (40-50 % de humedad), se mantuvo en condiciones de oscuridad y se trabajó en presencia de luz verde difusa. HeL: dewar helio líquido; EHe: entrada helio líquido; PM: proyector de la muestra; BC: cámara del bloque de cobre; T: termopar. **b) Cryosystem RUA**, congelador que enfría hasta $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para efectuar criosustitución y crioinclusión, y que contiene 3 módulos. Un módulo de criosustitución y crioinfiltración (**b1**) provisto de un sistema de agitación, construido por el equipo investigador y técnico de los Servicios Científico Técnico, que consiste en un balancín a base de bobinas electromagnéticas que funciona perfectamente desde $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta temperatura ambiente. Las muestras se colocan en un sistema de cestillas (C) para facilitar su transporte. Otro módulo de crioinclusión (**b2**) para confeccionar los bloques y un módulo de polimerización (**b3**) con una lámpara ultravioleta (UV) y una entrada de N_2 enfriado que permite polimerizar resinas acrílicas en ausencia de oxígeno y con luz UV.

Inclusión. Se llevó a cabo en resina Spurr (Spurr, 1969) a temperatura ambiente. Previo a la infiltración con la epoxi resina, el material se lavó (4 °C, 3 x 20 min) con acetona 100 % y luego se mantuvo (20 °C, 4 h) en acetona 100 %. La infiltración se efectuó a 20 °C y en agitación (rotación lenta, 5 rpm) para favorecer la penetración de la resina. Las muestras se sumergieron en distintas mezclas de acetona 100 % - Spurr en proporción 3:1 (15 h), 2:2 (24 h) y 1:3 (24 h) y, por último, en resina pura (48 h + 2 h). La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 60 °C durante 48 h.

3.4.4.2.2.- Obtención y tinción / contrastado de las secciones.

Las secciones transversales semifinas (1µm de grosor) y ultrafinas (70 nm de grosor) de los pulvínulos se obtuvieron como se ha descrito anteriormente (apartado 3.4.4.1.2).

Para evaluar la preservación de la estructura y ultraestructura, algunas secciones semifinas y ultrafinas se tiñeron y contrastaron respectivamente tal como se ha descrito en el apartado 3.4.4.1.2. Las secciones semifinas se usaron para controlar el estado del material y seleccionar las zonas (extensoras y flexoras) de interés para estudiar la ultraestructura.

Las secciones semifinas y ultrafinas destinadas a ser procesadas mediante autorradiografía se depositaron sobre portaobjetos y rejillas de cobre, no se tiñeron ni contrastaron y se procesaron como se detalla en los apartados 3.4.4.3 y 3.4.4.4.

3.4.4.3.- Autorradiografía para microscopía óptica.

El proceso se llevó a cabo en una cámara oscura en presencia de luz verde de seguridad (15W con 2 filtros Kodak GBX2). Según el **método dipping** (Boyenval y Fischer, 1976) los portaobjetos con las secciones pulvínulares se sumergieron en la emulsión líquida Ilford K5 diluida 1:1 (v/v) en agua destilada y conservada a 45 °C. A continuación, se dejaron secar (mínimo 3 h) en un ambiente seco y luego se colocaron en el interior de cajas negras con gel de sílice como desecante. Las cajas se envolvieron con papel de aluminio para protegerlas de

la luz y se conservaron a 4 °C durante un **tiempo de exposición** de 2, 5 y 8 meses. El revelado se realizó con Kodak D 19 diluido 1:1 (v/v) en agua destilada (4 min, 19 °C). Tras un lavado en agua destilada y ácido acético 0,2 % (19 °C, 30 s, fijación con tiosulfato de sodio 30 % (21 °C, 10 min,) y lavado en agua corriente (18-20 °C, 15 min), los portaobjetos se dejaron secar al aire libre en ambiente seco. Los cortes se tiñeron con azul de metileno 0,5 % tamponado con borax 1 % (5 s) como se ha descrito en el apartado 3.4.4.1.

De cada tiempo de exposición considerado (2, 5 y 8 meses), se seleccionaron 2 pulvínulos sometidos a los distintos tratamientos químicos, luminosos y procesados con los diferentes protocolos y, de cada uno de ellos se observaron de 3-5 secciones semifinas. La observación preliminar del estado de las muestras y la obtención de fotografías se llevaron a cabo en un microscopio binocular LEITZ con sistema de microfotografía Wild, perteneciente al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

3.4.4.4.- Autorradiografía de alta resolución para microscopía electrónica de transmisión.

El proceso de autorradiografía en secciones pulvínulares ultrafinas se efectuó según el **método Ligop** (Bouteille, 1976) que combina el recubrimiento individual de cada rejilla con la emulsión nuclear, revelado con fenidon e intensificación de la imagen latente con tiocianato de oro. Se llevó a cabo en una cámara oscura en presencia de luz verde difusa de seguridad (15W con 2 filtros Kodak GBX2), sin corrientes de aire, a 25-28 °C y con 55-60 % de humedad.

Las rejillas de cobre con las secciones pulvínulares se recubrieron con una fina capa de emulsión nuclear comercial Ilford L4 diluida 1:4 (v/v) con agua destilada. Para realizar esta operación: 1) las rejillas se colocaron sobre unos soportes (pivotes cilíndricos metálicos con un diámetro idéntico al de las rejillas y dispuestos verticalmente sobre una base de metacrilato), 2) un asa de tungsteno se introdujo en la emulsión nuclear obteniéndose, al sacarla, una fina película de emulsión en su interior, 3) el asa se sujetó en posición vertical,

se esperó a que la fina película presentase un color de interferencia gris (signo indicativo de la obtención de una capa monogranular de emulsión) y finalmente, 4) la película se aplicó sobre una rejilla. Se repitió este proceso para cada rejilla. Una vez recubiertas todas las rejillas, éstas se unieron a una cinta biadhesiva pegada sobre un portaobjetos y se guardaron en cajas negras con gel de sílice como desecante. Las cajas se envolvieron con papel de aluminio para evitar la luz y se mantuvieron a 4 °C durante un **tiempo de exposición** de 7 y 10 meses.

El revelado se llevó a cabo en un baño maría a 17,5 °C donde se encontraban, en cristalizadores, la solución de tiocianato de oro, el revelador fenidon y el fijador tiosulfato sódico 30 %. Para el revelado, los portaobjetos con las rejillas adheridas se sumergieron sucesivamente en la solución de tiocianato de oro (5 min), en agua destilada (30 s), en el revelador fenidon (1 min), en fijador (15 s), en fijador (4-5 min), en agua destilada (2 min), en agua corriente (10 min) y en agua destilada (2 lavados rápidos) y, luego, se dejaron secar a temperatura ambiente.

Finalmente, las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963) como se ha descrito en el apartado 3.4.4.1.1 y se observaron mediante un TEM Philips 301 (tensión de aceleración de 80 kV).

De cada tiempo de exposición considerado (7 y 10 meses), se observaron y analizaron secciones ultrafinas (3-5 rejillas) de las zonas extensoras y flexoras de 2 pulvínulos sometidos a los distintos tratamientos químicos y luminosos y procesados con los diferentes protocolos.

La **preparación de las soluciones** necesarias para el desarrollo de este apartado fue:

- **Emulsión nuclear.**- La emulsión nuclear comercial Ilford L4 se diluyó 1:4 con agua destilada. La mezcla se agitó lentamente, con una varilla de vidrio, durante 1 h (agitando cada 10-15 min) manteniéndola a 45 °C en un baño maría y, una vez disuelta, se guardó a 4 °C en la oscuridad. Antes de su uso, la emulsión se licuó de nuevo calentándola (30 min) a 45 °C y dejándola enfriar durante 3 h en la cámara oscura a 20-22 °C y 50-60 % de humedad.
- **Revelador Fenidon.**- La solución se preparó en agitación continua añadiendo 12 g de

ácido ascórbico, 2 g de fenidom, 4,8 g de bromuro de potasio, 10,4 g de carbonato de sodio, 80 g de sulfito de sodio anhidro y 48 g de tiocinato de potasio a 600 ml de agua destilada. Los compuestos se añadieron uno a uno y, a intervalos, de 30 min. La solución se enrasó a 800 ml con agua destilada y se filtró a través de 2 hojas de papel de filtro.

- **Fijador.**- Se preparó una solución de tiosulfato de sodio 30 %. La solución se filtró a través de 2 hojas de papel de filtro antes de su uso.

- **Tiocinato de oro** ("gold latensification").- La solución se preparó con agua destilada hervida y dejada enfriar a temperatura ambiente. Se mezclaron 2 ml de cloruro de oro (HAuCl₄) 2 % con 200 ml de agua destilada y se ajustó el pH entre 9-9,5 (NaOH 0,1-1 N). Cuando el pH descendió a 7, se añadieron 500 mg de tiocianato de potasio (KCNS) y la solución viró de color pasando de amarillo a marrón y, por último, quedó incolora. Finalmente, se añadieron 600 mg de bromuro de potasio (pH final 3,8) y la solución se enrasó a 1 l con agua destilada previamente hervida y dejada enfriar.

3.4.4.5.- Análisis de los autorradiogramas y tratamiento estadístico.

Los autorradiogramas de las secciones pulvulares semifinas se observaron en un microscopio óptico (Olympus BH2-UMA), captándose las imágenes en una cámara de vídeo (JVC TK-1270) conectada a un ordenador mediante la tarjeta comet (Matrox) obteniéndose imágenes de 502 x 635 píxeles. Estas imágenes fueron tratadas por binarización (imagen únicamente en blanco y negro, de manera que los precipitados a medir se diferenciaron del resto por su tonalidad) con el programa IMAT. Se trabajó con el objetivo de 50 aumentos, que permitía distinguir perfectamente los precipitados (de igual tamaño y forma). De cada tratamiento químico y luminoso se analizaron 10 células corticales (externas o internas) de las zonas flexoras o extensoras. En el apartado de resultados, los valores del número de precipitados / área celular corresponden a la media del número de precipitados de las 10 células de cada zona pulvular \pm SE. Este análisis se realizó en los Servicios Científico Técnico, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

El análisis de la varianza se realizó con el programa SPSS para Windows v. 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Se utilizó el test ANOVA Post Hoc de Duncan para comparar el

contenido de sacarosa y manitol en células flexoras y extensoras irradiadas con R o FR. El grado de significación estadística fue de $P < 0,001$. El número de réplicas fue de 10.

3.5.- Metodología para la detección citoquímica de Ca^{2+} en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).

Para estudiar la distribución inter e intracelular de Ca^{2+} en los pulvínulos y su posible alteración durante el movimiento foliar se ha utilizado el método de **precipitación de cationes con piroantimoniato potásico (KPA)** (Klein y col., 1972; Hayat, 1993). Este método se basa en la capacidad de unión del KPA, una sal doble con enlaces inestables, a cationes mono-, di- y trivalentes generando unos precipitados insolubles densos a los electrones. Cada catión y cada tejido exigen distintos protocolos para llevar a cabo la reacción, que depende de la sustitución de potasio por cationes del tejido cuando la molécula de KPA está disuelta en el fijador (Simson y Spicer, 1975).

Este método fue desarrollado por Komnick (1962) para localizar Na^+ a nivel subcelular y posteriormente se ha utilizado para la localización de otros cationes como Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} y, de forma muy específica, **Ca^{2+} intercambiable** o ligeramente ligado tanto en animales como en vegetales (Wick y Hepler, 1982; Slocum y Roux, 1982; Jaunin y col., 1991; Lazzaro y Thomson, 1992; Musetti y Favali, 2003; Li y col, 2007). Ensayos *in vitro* demuestran que la eficiencia de la precipitación varía según el catión, la concentración de KPA, el tiempo y la temperatura de incubación así como por la concentración relativa de cationes del medio. Según Klein y col. (1972) la concentración mínima a la cual precipitan eficientemente Ca^{2+} ($\approx 100\%$), Mg^{2+} ($\approx 70\%$) y Na^+ , en KPA 2% (pH 7,8; no tamponado) durante 1 h a 4 °C, es respectivamente de 1, 10 y 10^4 μM ; aumentando la formación de precipitados con la concentración (Ca^{2+} 10-100 μM ; Mg^{2+} 0,05-0,3 mM y Na^+ 10-30 mM). Slocum y Roux (1982) estiman que el KPA 0,75% (2 h, 21 °C) precipita eficientemente ($> 80\%$) Ca^{2+} en un rango de concentración de 20 μM -1 mM. La precipitación aumenta linealmente con la concentración y es independiente de la adición de tampón Tris 20 mM (pH 7,6) y KCl 0,1 M a la solución. Así pues, la afinidad del KPA por el Ca^{2+} supera a la del Mg^{2+} y del Na^+ y mediante una cuidadosa selección de

los parámetros de la reacción el método es específico para la localización *in situ* de Ca^{2+} (Hayat, 1993). En cualquier caso, la especificidad de la reacción puede controlarse determinando la composición de los precipitados por microanálisis de Rayos X (Wick y Hepler, 1982) o utilizando quelantes, como el ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)-N,N'-tetraacético (EGTA) o el ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), que evitan la formación de precipitados o disuelven los precipitados de piroantimoniato cálcico (Wick y Hepler, 1980; Qin y col., 2005).

Una limitación inherente a este método es la posible redistribución y pérdida de cationes durante la manipulación y procesamiento del material. La fijación es una etapa crítica del proceso pero los precipitados de antimonio también pueden disolverse y/o redistribuirse durante la deshidratación, inclusión y contrastado (Klein y col., 1972).

En este contexto, antes de proceder a la localización *in situ* de Ca^{2+} en los pulvínulos durante el cierre nictinástico, se optimizó la metodología ensayando varios protocolos de fijación para evaluar la preservación estructural, ultraestructural y la precipitación de Ca^{2+} .

3.5.1.- Toma de muestras.

Los pulvínulos secundarios se obtuvieron de hojas maduras (4^a-6^a a partir del ápice) de plantas de *R. pseudoacacia* mantenidas en ciclos de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Con la finalidad de inmovilizar los compuestos solubles y establecer su distribución *in vivo*, la recolección de los pulvínulos y su inmediata fijación se realizaron con la mayor rapidez posible. Por ello, cada pulvínulo se sumergió, inmediatamente después de su obtención, en la solución de fijación. Al efectuar el muestreo se descartó el pulvínulo secundario del foliolo apical. Al separar los pulvínulos se conservó la parte basal de los limbos foliares para identificar la parte del pulvínulo más próxima al limbo de la situada junto al raquis (Fig. 3.8).

Para la optimización del método el muestreo se efectuó a las 2 h del fotoperiodo. Se seleccionó una hoja madura, se depositó sobre una superficie de vidrio y se añadieron gotas

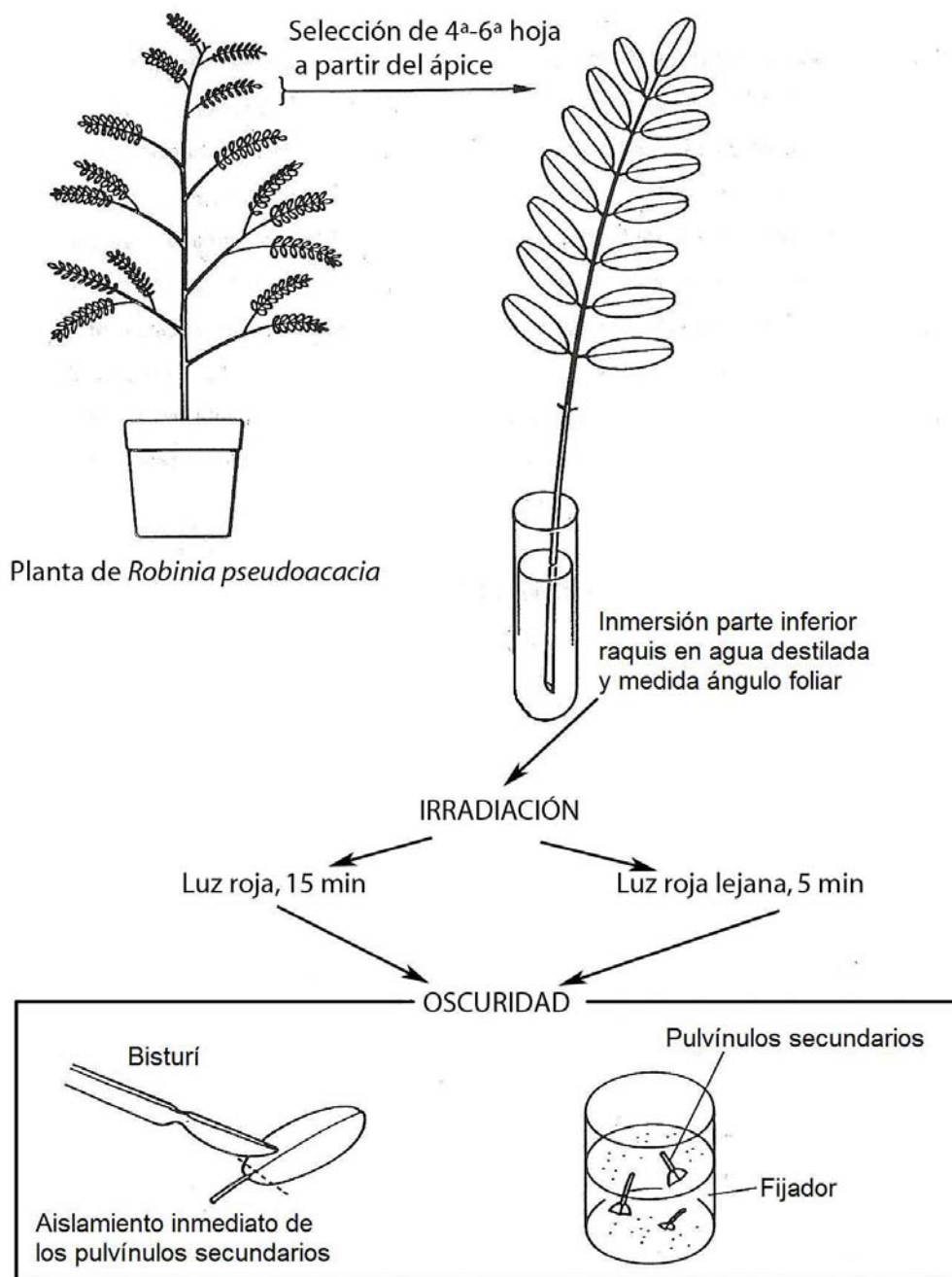


Figura 3.8- Recolección de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* para investigar la distribución de Ca^{2+} por precipitación con KPA durante el cierre nictinástico foliar controlado por fitocromo(s). A las 2 h del inicio del fotoperiodo se seleccionaron hojas (4^a-6^a hoja a partir del ápice) y se sumergió la parte inferior del pecíolo en agua destilada. Al inicio del periodo oscuro y a los 30 min de oscuridad se midió el ángulo que forman entre sí los pares de folíolos. Las hojas se irradiaron con luz roja (R, 15min) ó roja lejana (FR, 5min) y se trasladaron a la oscuridad. Inmediatamente y a los 30 min de oscuridad se separaron los pulvínulos para sumergirlos en el fijador.

de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,8) de tal forma que los pulvínulos quedaron completamente sumergidos en esta solución. Seguidamente, con un bisturí, un pulvínulo se separó del raquis y, después de eliminar parte del limbo foliar, se sumergió inmediatamente en la solución de fijación. Esta operación se repitió hasta obtener 8 pulvínulos secundarios que se repartieron aleatoriamente entre 7 soluciones de fijación (Tabla 3.4, protocolos A a G). El proceso se repitió con otras 7 hojas obteniéndose 56 pulvínulos (8 pulvínulos/protocolo).

El muestreo para la localización *in situ* de Ca^{2+} en los pulvínulos secundarios durante el cierre nictinástico foliar dependiente de phy(s) está representado en la Fig. 3.8. A las 2 h del fotoperiodo se seleccionaron 4 hojas maduras y la parte basal de los pecíolos se sumergió en agua destilada contenida en un tubo de ensayo. Al inicio del período oscuro, y 30 min más tarde, se midió el ángulo que formaban cada par de folíolos (ángulos foliar) mediante un semicírculo graduado. A continuación, 2 hojas se irradiaron con R (15 min) y 2 con FR (5 min) e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Inmediatamente y después de 30 min de oscuridad se aislaron los pulvínulos, como se ha comentado en el párrafo anterior, y se sumergieron rápidamente en el fijador – protocolo E (Tabla 4.3). De cada tratamiento luminoso se procesaron 8 pulvínulos al inicio del período oscuro y 8 pulvínulos a los 30 min de oscuridad. La recolección del material se realizó en la oscuridad, en presencia de luz verde de seguridad. Se efectuaron dos muestreos.

3.5.2.- Preparación del material.

Se ensayaron 7 protocolos (Tabla 3.4) que difieren por la composición de la solución de fijación y postfijación con OsO_4 .

3.5.2.1.- Fijación, deshidratación e inclusión.

La **fijación** se efectuó según Mentré y Escaig (1988) en soluciones con KPA 4%, paraformaldehído 2 % ± fenol 1%; pero se modificó la concentración de glutaraldehído para

Tabla 3.4.- Métodos utilizados para procesar los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*.

Etapas	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D	Protocolo E	Protocolo F	Protocolo G
Fijación	GA 2,5 % - PF 2 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	GA 2,5 % - PF 2 % - fenol 1 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	GA 2,5 % - PF 2 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	GA 2,5 % - PF 2 % - fenol 1 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	GA 2,5 % - PF 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	GA 1 % - PF 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas	PF 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % TF 0,1 M (pH 7,8) 20°C, 5horas
Lavado	TF 0,1 M (pH 7,4) 20°C, 3 x 20 min	TF 0,1 M (pH 7,4) 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min
Postfijación	OsO ₄ 2% TF 0,1 M (pH 7,4) 4 °C, 3 horas	OsO ₄ 2% TF 0,1 M (pH 7,4) 4 °C, 3 horas	_____	_____	_____	_____	_____
Lavado	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	agua destilada 20°C, 3 x 20 min	_____	_____	_____	_____	_____
Deshidratación	acetona; TA	acetona; TA	acetona; TA	acetona; TA	acetona; TA	acetona; TA	acetona; TA
Inclusión	Spurr, TA	Spurr, TA	Spurr, TA	Spurr, TA	Spurr, TA	Spurr, TA	Spurr, TA
Polymerización	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h	60 °C, 48 h

GA, glutaraldehído; PF, paraformaldehído; TA, temperatura ambiente; TF, tampón fosfato

mejorar la preservación ultraestructural (Tabla 4.3). Todas las soluciones de fijación se prepararon en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,8).

Los pulvínulos enteros se fijaron (20 °C, 5 h) en glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % (**protocolos A y C**), glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % (**protocolo B y D**), glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % (**protocolo E**), glutaraldehído 1 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % (**protocolo F**) y paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % (**protocolo G**). Para facilitar la incorporación del fijador se efectuó un ligero vacío durante los primeros 30-40 min de la fijación.

Finalizada la fijación todos los pulvínulos se lavaron (20 °C, 3 x 20 min) en agua destilada desionizada (Tabla 3.4) excepto los procesados según los **protocolos A y B** que se lavaron (20 °C, 3 x 20 min) con tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,4) y se postfijaron (4 °C, 3 h) en OsO₄ 2 % en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,4). Finalmente, este material también se lavó (20 °C, 3 x 20 min) en agua destilada desionizada.

El ensayo de optimización del método de fijación se realizó en presencia de luz. En los ensayos de detección de Ca²⁺ durante el cierre nictinástico la fijación y lavados se efectuaron en la oscuridad. El material se manipuló en presencia de luz verde de seguridad.

La **deshidratación** de los pulvínulos (osmificados y no osmificados) y su **inclusión** en resina Spurr (Spurr, 1969) se realizaron como se ha descrito en el apartado 3.4.4.1.1.

3.5.2.1.1- Preparación de soluciones de fijación con piroantimoniato potásico.

- **Solución KPA 10%:** Se preparó inmediatamente antes de su uso, disolviendo 2 gr de piroantimoniato potásico en 50 ml de agua destilada desionizada, en agitación (500 rpm) a 200 °C durante 1 hora. En estas condiciones, el volumen de la solución disminuyó a 20 ml. La solución resultante se dejó enfriar, en agitación, a temperatura ambiente presentando un aspecto transparente, indicador de la buena disolución del KPA.

- **Soluciones de fijación:** Se prepararon tres soluciones de fijación: **1)** glutaraldehído 5 % - paraformaldehído 4 %, **2)** glutaraldehído 2% - paraformaldehído 4 %, y, **3)** paraformaldehído 4% en tampón fosfato potásico 0,2 M (pH 7,8).

- **Soluciones de fijación con KPA 4%:** Se preparó una solución de KPA 8 % por dilución de la solución de KPA 10% con agua destilada desionizada. Antes de su uso, se mezclaron a partes iguales (v/v) esta solución de KPA 8 % con cada una de las soluciones de fijación (1, 2 o 3) y, finalmente se añadió fenol (concentración final 1 %). De esta forma se obtuvieron soluciones de fijación sobresaturadas de KPA 4 %, concentración favorable para la precipitación de cationes (Mentré y Escaig, 1988).

3.5.2.2.- Obtención, tinción/contrastado de las secciones y observación.

La obtención de secciones transversales semifinas (0,5-1 μm de grosor) y ultrafinas (70 nm de grosor) así como su tinción/contrastado se efectuaron como se ha descrito en el apartado 3.4.4.2.2. Las secciones semifinas se usaron para controlar el estado del material y seleccionar las zonas (extensoras y flexoras) de interés para estudiar la ultraestructura. Las secciones destinadas a microanálisis de Rayos X no se contrastaron puesto que el acetato de uranilo puede disminuir el tamaño o disolver los precipitados de antimonio (Hayat, 1993).

Se observaron de 3 a 5 secciones semifinas de 2-3 pulvínulos procesados según los protocolos A-G y de pulvínulos irradiados con R o FR (protocolo E) en un microscopio binocular LEITZ perteneciente al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. También se observaron de 3-5 rejillas con secciones ultrafinas del mismo material con un TEM Philips 301 de los Servicios Científico Técnico, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona.

3.5.3.- Microanálisis de Rayos X de los precipitados.

La composición elemental de los precipitados se determinó por microanálisis de Rayos X.

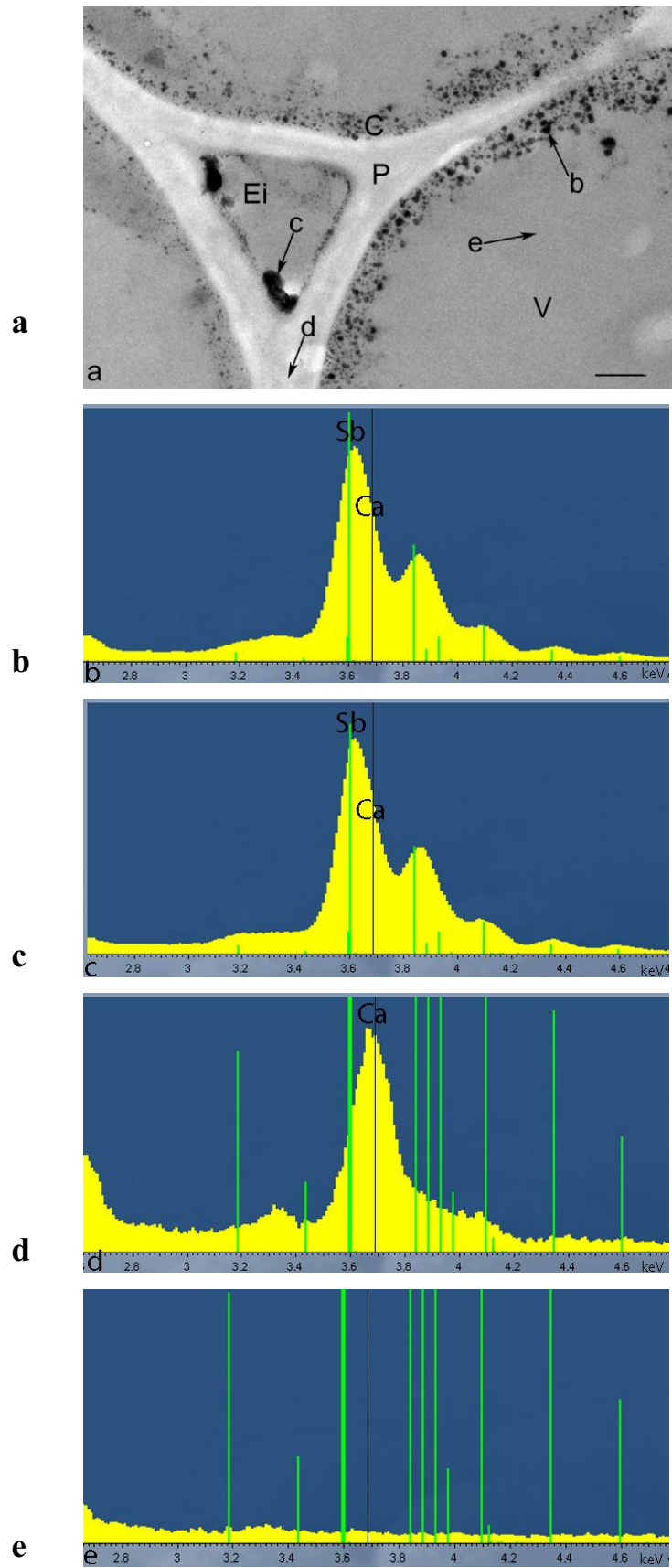


Figura 3.9- a) Microfotografía de células corticales motoras de una sección transversal de pulvínulo de *Robinia pseudoacacia* procesado para la localización citoquímica de Ca^{2+} por precipitación con piroantimoniato potásico, según el protocolo E (Material y Métodos, Tabla 3.4). En **a** se señalan (mediante flechas) las zonas donde se obtuvieron los espectros de energía dispersiva de Rayos X de precipitados citoplasmáticos (**b**) y de los espacios intercelulares (**c**), así como de la pared celular (**d**) y de las vacuolas acuosas (**e**) que carecen de precipitados. En los espectros **b** y **c** se observan cuatro picos de **Sb** [$\text{L}\alpha^a$ (3,604 keV), $\text{L}\beta^1$ (3,843 keV), $\text{L}\beta^2$ (4,1 keV) y $\text{L}\gamma^1$ (4,347 keV); líneas verdes], el primero de ellos deformado por la presencia de **Ca** [$\text{K}\alpha^1$ (3,690 keV); línea negra]. C, citoplasma; Ei, espacio intercelular; P, pared; V, vacuola. Barra: 0,2 μm .

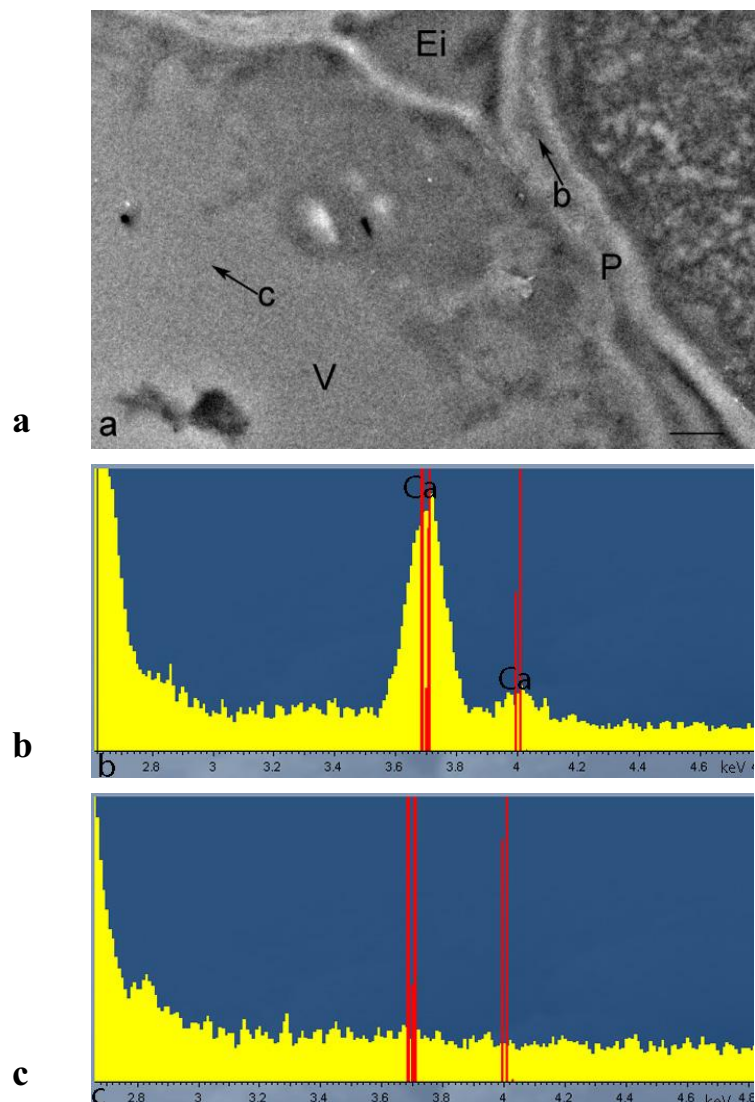


Figura 3.10- a) Microfotografía de células corticales motoras de una sección transversal de pulvínulo de *Robinia pseudoacacia* procesado sin KPA según el protocolo D (Material y Métodos, Tabla 3.4). En **a** se señalan (mediante flechas) las zonas donde se obtuvieron los espectros de energía dispersiva de Rayos X de la pared celular (**b**) y de las vacuolas (**c**). En los espectros se indican, con línea roja, los picos correspondientes a **Ca** [$\text{K}\alpha^1$ (3,690 keV) y $\text{K}\beta^1$ (4,012 keV)]. Ei, espacio intercelular; P, pared; V, vacuola. Barra: 0,2 μm .

El análisis se llevó a cabo en secciones de 200 nm de grosor (Figs. 3.9a y 3.10a) depositadas sobre rejillas de cobre (elemento que no interfiere en la detección de los picos estudiados ($K\alpha$ y $K\beta$) de Ca) recubiertas de una fina membrana de Formvar. Las secciones, sin contrastar, se recubrieron con una fina película de carbón (5 nm) en un evaporador de alto vacío (Edwards, modelo 12E/1266) para proporcionar estabilidad bajo el haz de electrones. Se realizaron determinaciones microanalíticas de precipitados de distintos compartimentos de células extensoras y flexoras de diferentes pulvínulos (Fig. 3.9). También se analizó la composición elemental de la resina Spurr, la membrana de Formvar y de compartimentos celulares sin precipitados (Fig. 3.9). Como control negativo se usó material procesado según el protocolo D (Material y Métodos, Tabla 3.4).

En una primera etapa las determinaciones microanalíticas se realizaron en un microscopio electrónico Hitachi H-800-MT, con un detector de energía dispersiva de Rayos X (Kevex EDX, Valencia, CA) y un procesador de pulsos (Kevex-4460). El equipo trabajó con un voltaje de 100 kV y sondas de 50 nm de diámetro. Los análisis se efectuaron a 100.000 x. El tiempo de adquisición de los espectros fue de 100 s. Los espectros se procesaron teniendo en consideración los picos de escape (en el área real de cálculo de Ca se ha integrado el pequeño pico de escape de Ca), efectuándose también la sustracción del ruido de fondo. Los distintos elementos se identificaron por sus picos característicos del espectro de energía dispersiva de Rayos X: **Ca** [$K\alpha^1$ (3,690 keV) y $K\beta^1$ (4,012 keV)], **K** [$K\alpha^1$ (3,312 keV) y $K\beta^1$ (3,589 keV)] y **Sb** [$L\alpha^1$ (3,05 keV), $L\alpha^a$ (3,604 keV), $L\beta^1$ (3,843 keV), $L\beta^2$ (4,1 keV) y $L\gamma^1$ (4,347 keV)]. Los picos en que se encontraban solapados Sb ($L\alpha^a$ y $L\beta^2$) y Ca ($K\alpha^1$ y $K\beta^1$) se separaron estadísticamente por deconvolución gaussiana (Slocum y Roux, 1982; Poenie y Epel, 1987; Trillas-Gay y Araus, 1993) mediante el programa informático Quantex-6 (Kevex); en este caso se utiliza un patrón teórico que separa matemáticamente los picos por intensidades (cuentas. s^{-1}).

En una segunda etapa las determinaciones microanalíticas se realizaron en un microscopio electrónico Jeol J2100 provisto de un detector INCA X-sight Oxford Instruments. El equipo trabajó con un voltaje de 200 kV y sondas de 50 nm de diámetro. Los análisis se efectuaron a 2.000 x. El tiempo de adquisición de los espectros fue de 1 min. En este caso, la identificación elemental de Ca y Sb se realizó marcando el centroide de los

picos característicos, del espectro de energía dispersiva de Rayos X, de estos 2 elementos (Figs. 3.9b-e, 3.10b-c).

3.5.4.- Estima de la distribución de precipitados de Ca^{2+} . Tratamiento estadístico.

La distribución de los precipitados se estimó mediante 2 aproximaciones:

1.- Contaje del número de precipitados (Klein y col., 1972; Qin y col., 2005). Se realizó en microfotografías de secciones ultrafinas a 14.630 x para diferenciar claramente los precipitados de distinto tamaño. Se seleccionaron 4 microfotografías de células corticales extensoras y flexoras de pulvínulos irradiados con R y FR. De cada una de ellas se calculó el número de precipitados por μm^2 en diferentes compartimentos celulares. En el apartado de resultados se presentan los valores medios del número de precipitados por $\mu\text{m}^2 \pm \text{SE}$.

2.- Cálculo del área ocupada por los precipitados citoplasmáticos (Thureson-Klein y Klein, 1971). Se efectuó en secciones ultrafinas (20.000 x) observadas en un microscopio electrónico Hitachi 600-AB. Las imágenes se captaron mediante una cámara digital CCD de 24,6 x 24,6 mm Bioscan (Gatan) y se procesaron mediante el programa Digital Micrograph obteniéndose imágenes de 1024 x 1024 pixeles que fueron tratadas por binarización con el programa IMAT de los Servicios Científico Técnicos, actualmente *Centres Científics i Tecnològics*, de la Universidad de Barcelona. De cada tratamiento luminoso se seleccionaron 4 imágenes correspondientes a células motoras flexoras y extensoras de un mismo pulvínulo. De cada imagen, se seleccionaron aleatoriamente 10 zonas (incluyendo pared y citoplasma) de $20,4 \mu\text{m}^2$ de superficie y de cada una de ellas se calculó el área ocupada por los precipitados, el área del citoplasma y la relación entre ambas. En los resultados se presentan los valores medios obtenidos $\pm \text{SE}$. También se determinó la relación entre el área de precipitados por μm^2 de citoplasma y el número de precipitados por μm^2 de citoplasma $\pm \text{SE}$.

Los **análisis estadísticos** se realizaron con el programa SPSS para Windows v. 14.0

(SPSS Inc., Chicago, IL). Se utilizó el test ANOVA Post Hoc de Duncan para comparar las áreas de precipitados de Ca^{2+} citoplasmáticos en células flexoras y extensoras de pulvínulos irradiados con R o FR al inicio y después de 30 min de oscuridad. El grado de significación estadística fue de $P < 0,05$.

4.-RESULTADOS

4.1.- Cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*.

Los folíolos secundarios de *A. lophantha* cerraron cuando se trasladaron de la luz a la oscuridad a las 2 h y 8 h del fotoperiodo. El grado de cierre se modificaba si en el momento de la transición los folíolos se irradiaban con R o FR. De modo general, la magnitud de cierre de los folíolos irradiados con R superaba a la de los irradiados con FR después de 3 h de oscuridad (Figs. 4.1 a 4.3 y 4.5 a 4.10). Sin embargo, la pauta del movimiento foliar varió considerablemente dependiendo del tiempo de inicio de los ensayos de tal forma que:

a) a las 2 h del fotoperiodo, los folíolos irradiados con R cerraron durante 1-2 h y luego: i) se mantuvieron en esta posición (Figs. 4.3a, 4.5 y 4.6) o, ii) iniciaron su reabertura (Figs. 4.1, 4.2a, 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10). En cambio, los irradiados con FR cerraron a los 30 min de oscuridad y, a continuación iniciaron su reabertura (Figs. 4.1, 4.2a, 4.3a, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10).

b) a la mitad del fotoperiodo, los folíolos irradiados con R continuaron cerrando durante las 3 h de oscuridad (Figs. 4.2b y 4.3b). Los folíolos irradiados con FR también continuaron con el movimiento de cierre (Fig. 4.3b) o bien iniciaron una lenta reabertura a los 30 min de oscuridad (Fig. 4.2b).

El efecto fitocromo (diferencia en grados de cierre entre los ángulos de los folíolos irradiados con R o FR) calculado a las 3 h de oscuridad aumentó significativamente a las 8 h del fotoperiodo, respecto al valor obtenido a las 2 h del fotoperiodo (Tabla 4.2).

4.1.1.-Efecto de la fusicoccina.

La **fusicoccina** (FC 1-100 μ M) inhibió el cierre nictinástico inducido a las 2 h y 8 h del fotoperiodo y, en general, estimuló la reabertura foliar. La magnitud y duración de ambos efectos variaron según el estado del/los phy(s) (Pfr o Pr), la concentración de FC usada y, además, entre los distintos ensayos efectuados.

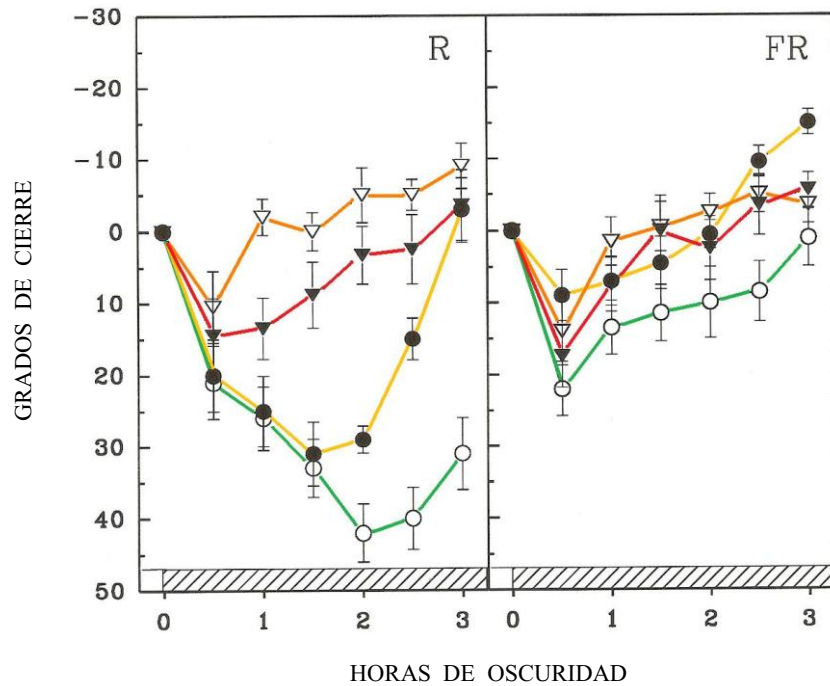


Figura 4.1- Efecto de la **fusicoccina** (FC) sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h del fotoperiodo**. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), 1 (●, —), 10 (▽, —) ó 100 (▼, —) μM de FC, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

Tabla 4.1.- Modificación del **efecto fitocromo** ($X_R - X_{FR}$) por la fusicoccina (FC) a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las **2 h del fotoperiodo**, se dejaron flotar en las soluciones control (agua destilada) o problema (FC 1, 10 y 100 μM), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia, en grados de cierre, entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

Fusicoccina (μM)	$X_R - X_{FR}$
0	$23,1 \pm 2,4^a$
1	$12,3 \pm 2,0^b$
10	$5,8 \pm 1,3^{bc}$
100	$1,0 \pm 5,3^c$

En un primer ensayo, a las 2 h del fotoperiodo, la FC a concentraciones 1 a 100 μM , inhibió el cierre nictinástico y estimuló la reapertura de los folíolos irradiados con R (Fig. 4.1). El efecto inhibitor se detectó a los 30 min (FC 10 μM), 1 h (FC 100 μM) y 2 h (FC 1 μM) de oscuridad. La reapertura se manifestó al cabo de 1 h (FC 10 μM), 1,5 h (FC 100 μM) y 2,5 h (FC 1 μM) de oscuridad y continuó hasta el final del experimento. Los folíolos tratados con FC 1 μM mostraron la máxima tasa de reapertura. A las 3 h de oscuridad, la magnitud de inhibición del cierre fue similar para las tres concentraciones de FC ensayadas, obteniéndose valores prácticamente iguales a los detectados al inicio del experimento, mientras que los controles sin FC mantenían una magnitud de cierre de 30 °. La FC 10 μM fue el tratamiento inhibitor más efectivo en el intervalo 30 min - 2,5 h de oscuridad y, por ello, se seleccionó para experimentos posteriores.

En los folíolos irradiados con FR (Fig. 4.1), la FC también inhibió el cierre y estimuló la reapertura aunque de forma mucho menos acusada y sin alterar la pauta del movimiento foliar, es decir, cierre a los 30 min seguido por reapertura. A las 3 h de oscuridad, los folíolos tratados con FC 1 μM estaban más abiertos que los controles y los tratados con FC 10 y 100 μM no diferían entre sí. En ensayos posteriores, la FC 10 μM no alteró el movimiento foliar (Figs. 4.8, 4.9 y 4.10) e incluso potenció puntualmente el cierre (Fig. 4.6) sin que se detectaran diferencias, respecto a los controles, al final del experimento.

En las condiciones ensayadas, a las 3 h de oscuridad, la FC disminuyó significativamente el efecto fitocromo de forma dependiente de la concentración. (Tabla 4.1). Al aumentar la concentración de FC de 1 a 100 μM disminuyó el efecto fitocromo. La concentración de FC 100 μM prácticamente anuló el efecto fitocromo.

4.1.2.-Efecto de la sacarosa *per se* y su interacción con la fusicoccina.

La **sacarosa** (25 a 100 mM) estimuló el cierre nictinástico inducido a las 2 h y 8 h del fotoperiodo si bien, la magnitud de este efecto y su duración variaron con la concentración de sacarosa aplicada y el tiempo de inicio de los ensayos (Fig. 4.2).

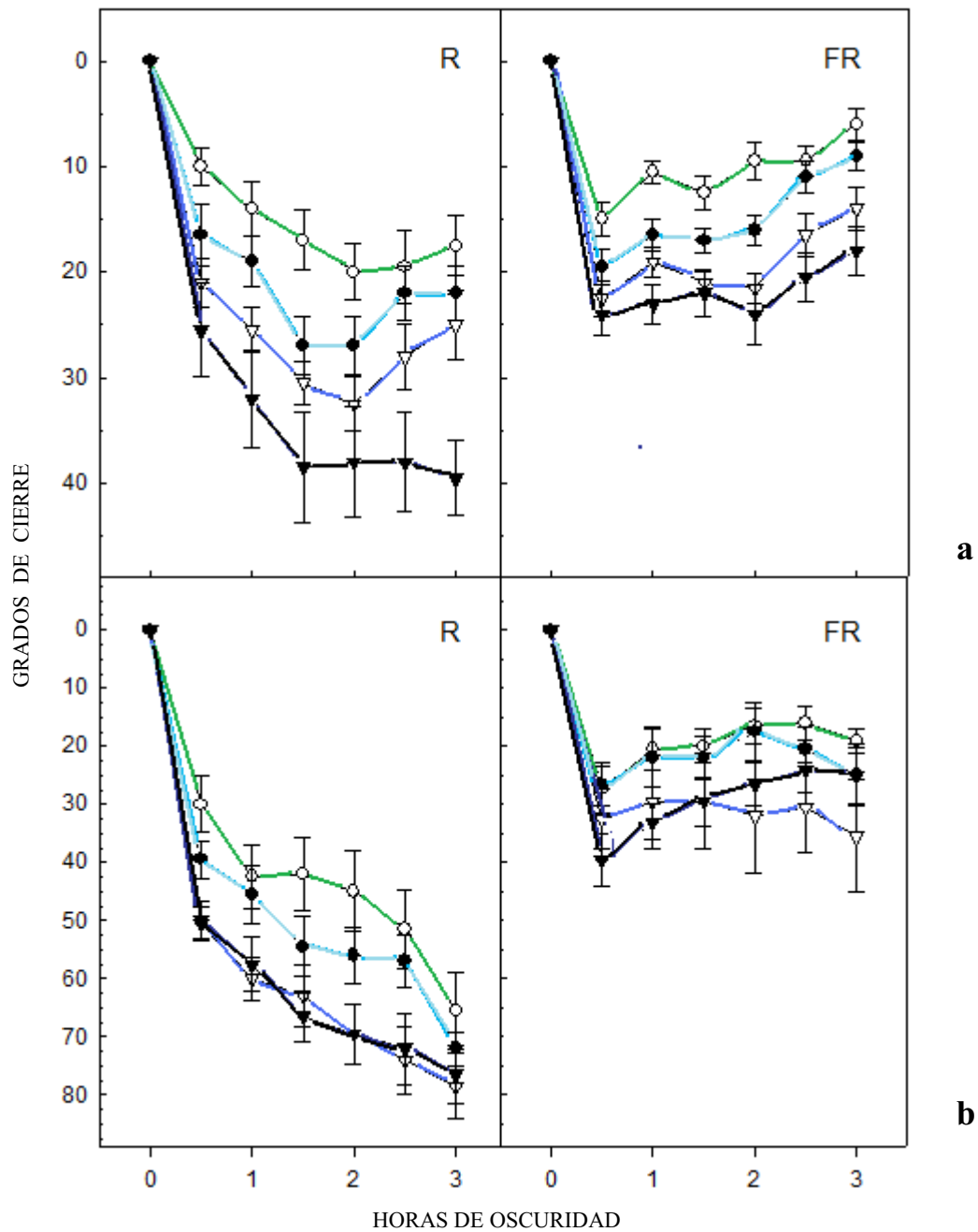


Figura 4.2- Efecto de la **sacarosa** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h (a)** o a las **8 h (b)** del fotoperíodo. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), 25 (●, —), 50 (▽, —) ó 100 (▼, —) mM de sacarosa, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media ± SE de tres experimentos.

La sacarosa (25-100 mM) aplicada a las 2 h del fotoperiodo (Fig. 4.2a) estimuló el cierre nictinástico de los folíolos irradiados con R o FR. La estimulación del cierre se detectó a los 30 min de oscuridad y aumentó al incrementar la concentración de sacarosa. A las 3 h de oscuridad, el cierre de los folíolos tratados con sacarosa 100 mM superaba - de forma más acusada en presencia de Pfr que de Pr - al de los tratados con sacarosa 50 mM. En cambio, la magnitud de cierre de los folíolos incubados en sacarosa 25 mM e irradiados con R o FR no difería de la de los controles correspondientes. En estas condiciones, la sacarosa no modificó el efecto fitocromo calculado a las 3 h de oscuridad (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Modificación del **efecto fitocromo** ($X_R - X_{FR}$) por la sacarosa a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las **2 h y 8 h del fotoperiodo**, se dejaron flotar en las soluciones control (agua destilada) o problema (sacarosa 25, 50 y 100 mM), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia, en grados de cierre, entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

Sacarosa (mM)	$X_R - X_{FR}$	$X_R - X_{FR}$
	2 h fotoperiodo	8 h fotoperiodo
0	23,1 \pm 2,4 ^a	41 \pm 6,5 ^b
25	23,6 \pm 10,6 ^a	47 \pm 3 ^b
50	23,8 \pm 3,5 ^a	39 \pm 6 ^b
100	31,3 \pm 10,3 ^a	48 \pm 1 ^b

Cuando los ensayos se efectuaron a la mitad del fotoperiodo (Fig. 4.2b), la sacarosa 25 mM también estimuló transitoriamente (intervalo 30 min - 2 h de oscuridad) el cierre de los folíolos irradiados con R pero no afectó el movimiento de los irradiados con FR. En cambio, la sacarosa 50 y 100 mM mostraron la misma efectividad estimulando el cierre tanto en presencia de Pfr como de Pr en el intervalo 30 min - 2,5 h de oscuridad. En estas condiciones la sacarosa tampoco alteró el efecto fitocromo calculado a las 3 h de oscuridad (Tabla 4.2).

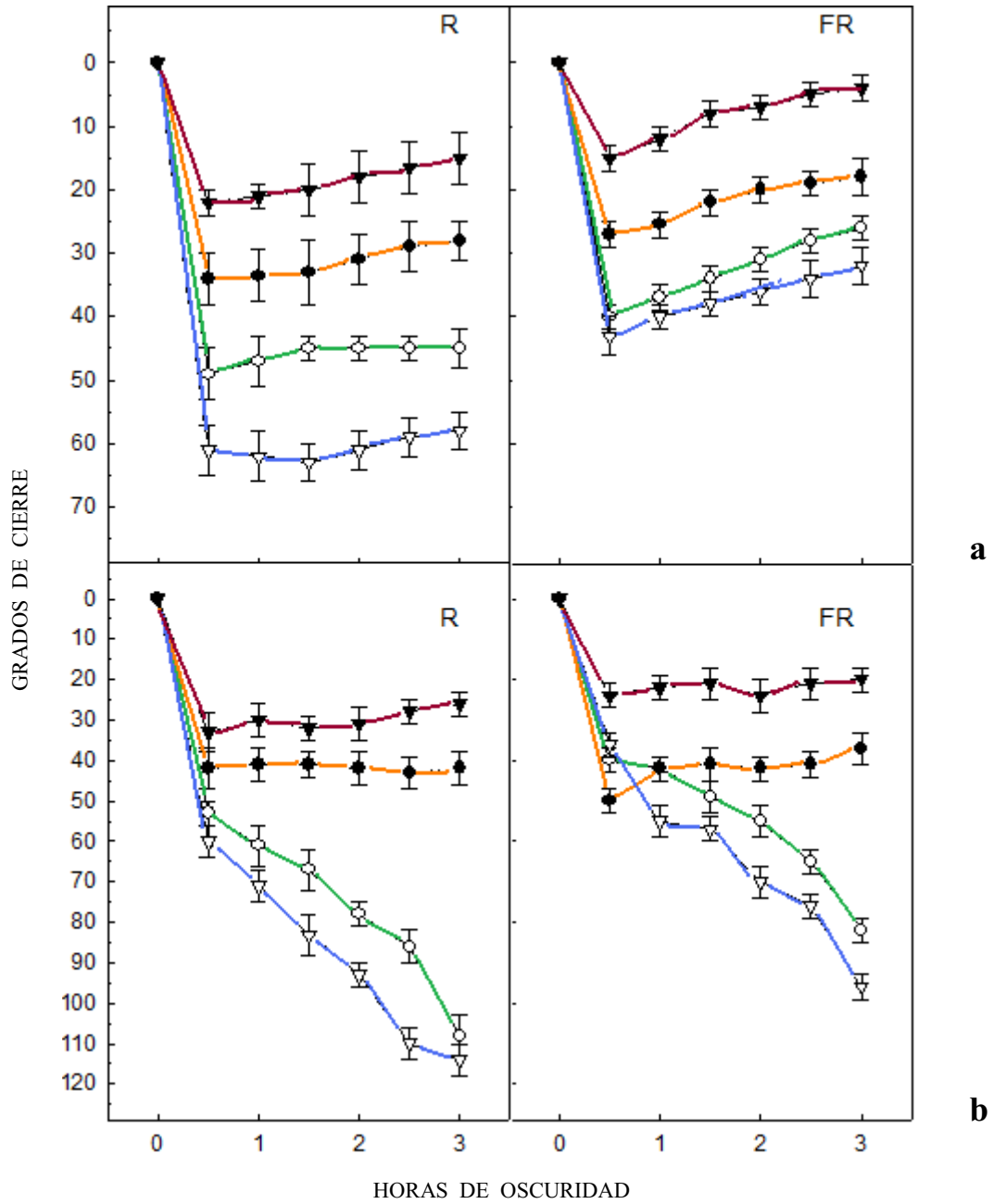


Figura 4.3- Efecto del tratamiento simultáneo de **sacarosa 50 mM** y **fusicoccina 10 μM** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los foliolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h (a)** y **8 h (b)** del fotoperiodo. Los pares de foliolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), fusicoccina 10 μM (●, —), sacarosa 50 mM (▽, —) ó sacarosa 50 mM y fusicoccina 10 μM (▼, —), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media ± SE de tres experimentos.

Tabla 4.3.- Modificación del **efecto fitocromo** ($X_R - X_{FR}$) por la sacarosa y la fusicoccina (FC) a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las **2 h y 8 h del fotoperiodo**, se dejaron flotar en las soluciones control (agua destilada) o problema (FC 10 μ M, sacarosa 50 mM o ambas), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia, en grados de cierre, entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

Tratamiento químico	$X_R - X_{FR}$	$X_R - X_{FR}$
	2 h fotoperiodo	8 h fotoperiodo
Agua destilada (control)	23,1 \pm 2,4 ^a	41 \pm 6,5 ^d
FC 10 μ M	5,8 \pm 1,3 ^b	10,5 \pm 5,5 ^e
Sacarosa 50 mM	23,8 \pm 3,5 ^a	39 \pm 6 ^d
Sacarosa 50 mM + FC 10 μ M	-4 \pm 4,7 ^c	11 \pm 1 ^e

La **aplicación simultánea** de **sacarosa 50 mM** y **FC 10 μ M**, antes de inducir el cierre nictinástico a las 2 h (Fig. 4.3a) y 8 h (Fig. 4.3b) del fotoperiodo, inhibió el cierre foliar superando el efecto inhibitor de la FC 10 μ M tanto en los folíolos irradiados con R como en los irradiados con FR. Así pues, la sacarosa 50 mM aplicada simultáneamente con FC 10 μ M no realizaba su efecto típico de estimular el cierre sino lo contrario, potenciaba el efecto inhibitor del cierre de la FC.

A las 2 h del fotoperiodo, el **tratamiento simultáneo** de sacarosa 50 mM y FC 10 μ M provocó una disminución significativa del efecto fitocromo respecto a la provocada por la FC 10 μ M después de 3 h de oscuridad (Tabla 4.3). Este efecto no se observó a las 8 h del fotoperiodo.

Resultados similares se obtuvieron con **tratamientos secuenciales** de sacarosa 50 mM y FC 10 μ M durante el cierre nictinástico *per se* inducido a las 2 h del fotoperiodo (Fig. 4.4):

a) FC 10 μ M - sacarosa 50 mM (Fig. 4.4a). La FC 10 μ M, aplicada a los 10 min de oscuridad, inhibió el cierre y estimuló la reabertura a partir de las 1,5 h de oscuridad. Este

efecto aumentó al añadir sacarosa 50 mM.

b) sacarosa 50 mM - FC 10 μ M (Fig. 4.4b). La sacarosa 50 mM, añadida a los 10 min de oscuridad, estimuló el cierre y la posterior adición de FC 10 μ M estimuló la reabertura. A las 3 h de oscuridad, el ángulo de los folíolos tratados secuencialmente con sacarosa 50 mM y FC 10 μ M no difería del de los tratados solamente con FC 10 μ M (comparar Figs. 4.4a y b).

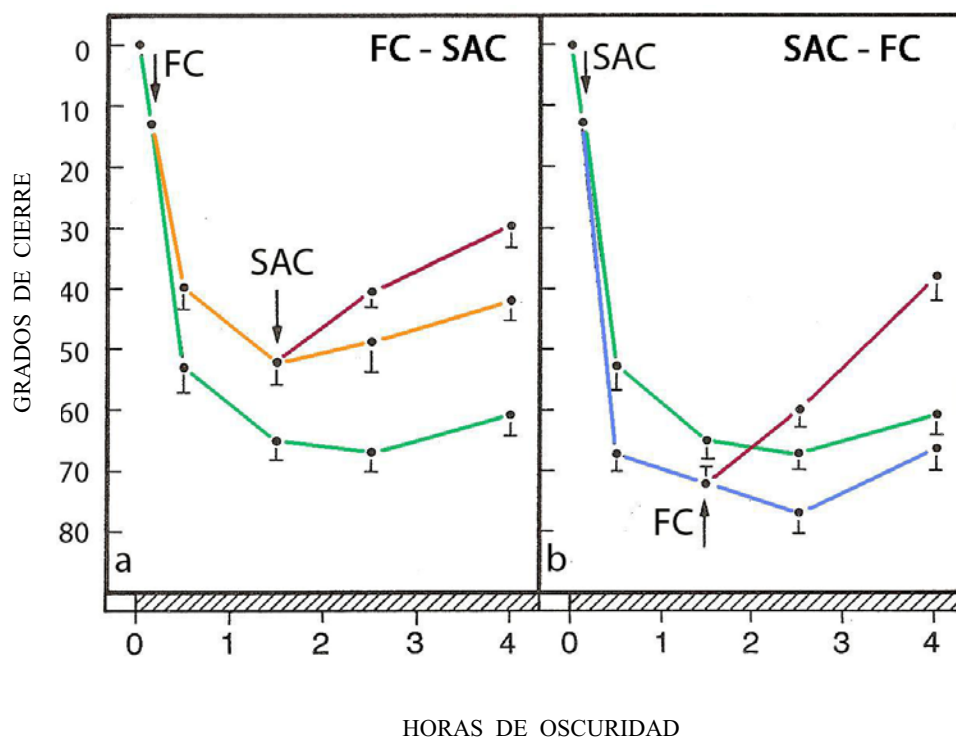


Figura 4.4- Efecto del **tratamiento secuencial de fusicoccina (FC) 10 μ M - sacarosa (SAC) 50 mM (a) y sacarosa 50 mM - fusicoccina 10 μ M (b)** sobre el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las 2 h del fotoperiodo. Movimiento de los folíolos flotando en agua destilada (—), FC 10 μ M (—), SAC 50 mM (—) y FC 10 μ M + SAC 50 mM (—). Las flechas indican el tiempo de adición de la FC y la SAC. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

4.1.3.- Efecto de azúcares-alcohol *per se* y su interacción con la fusicoccina.

El **sorbitol** (25-100 mM) aplicado a las 2 h del fotoperiodo, inmediatamente antes de inducir

el cierre nictinástico, estimuló el cierre de los folíolos irradiados con R (Fig. 4.5). El efecto se observó a los 30 min de oscuridad y persistió hasta las 2 h (25 y 100 mM) o 2 h 30 min (50 mM), iniciándose a continuación la reapertura de los folíolos. La promoción del cierre aumentó al incrementar la concentración de 25 a 50 o 100 mM (no se detectaron diferencias entre las concentraciones 50 y 100 mM). A las 3 h de oscuridad, los folíolos incubados en sorbitol 50 o 100 mM estaban más cerrados que los folíolos control y los incubados en sorbitol 25 mM que no diferían entre sí.

En los folíolos irradiados con FR, el sorbitol inhibió la reapertura foliar de forma independiente de la concentración. A las 3 h de oscuridad, el cierre de los folíolos incubados en sorbitol (25-100 mM) e irradiados con FR no difería del de los controles irradiados con R. Así pues, a las concentraciones ensayadas el sorbitol contrarrestó el efecto de una irradiación FR y no alteró significativamente el efecto fitocromo (Tabla 4.4a).

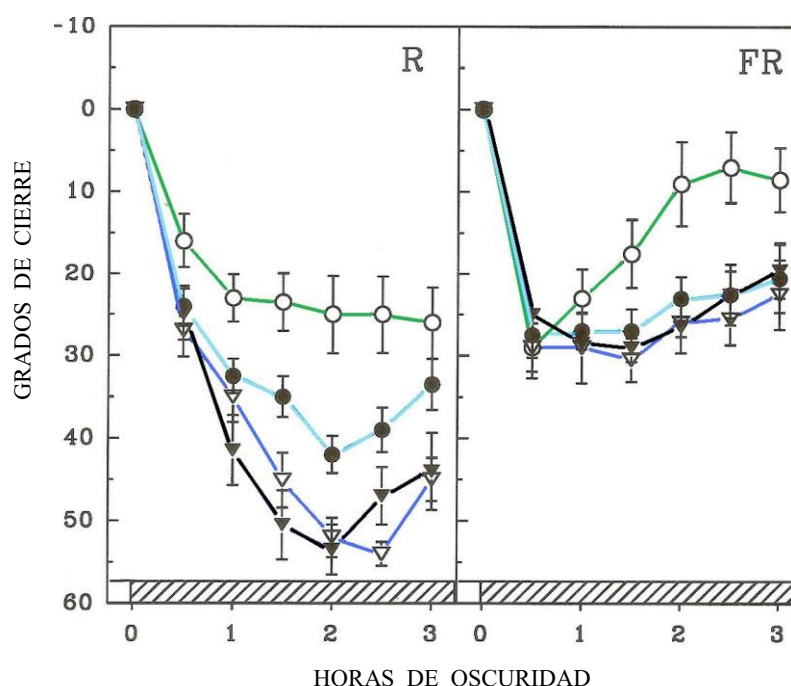


Figura 4.5- Efecto del **sorbitol** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las 2 h del fotoperíodo. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), 25 (●, —), 50 (▽, —) ó 100 (▼, —) mM de sorbitol, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

La aplicación simultánea de **sorbitol 50 mM** y **FC 10 μ M** anuló el efecto del sorbitol 50 mM tanto en presencia de Pfr como de Pr (Fig. 4.6). Este tratamiento antes de irradiar con R: **a)** superó la acción de la FC 10 μ M inhibiendo el cierre y, **b)** estimuló la reapertura de los folíolos que a las 3 h de oscuridad llegaron a superar el ángulo de inicio del experimento. Así, la adición simultánea de sorbitol 50 mM y FC 10 μ M producía el mismo efecto potenciador de la acción de la FC 10 μ M que el detectado aplicando sacarosa 50 mM y FC 10 μ M (Fig. 4.6). En cambio, en los folíolos irradiados con FR, la adición de ambos compuestos inhibió transitoriamente el cierre - superando el efecto de la FC 10 μ M - pero no estimuló la reapertura. A las 3 h de oscuridad, la magnitud de cierre de los folíolos incubados en sorbitol 50 mM y FC 10 μ M no difería del de los folíolos control ni del de los incubados en FC 10 μ M. La aplicación de sorbitol 50 mM y FC 10 μ M disminuyó significativamente el efecto fitocromo superando la disminución provocada por la FC 10 μ M (Tabla 4.4b).

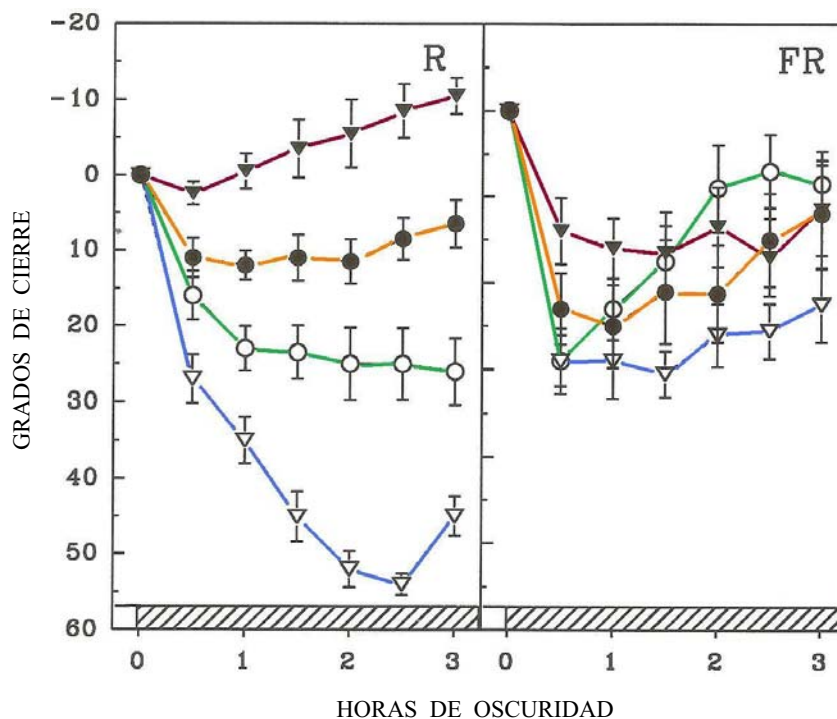


Figura 4.6- Efecto del tratamiento simultáneo de **sorbitol 50 mM** y **fusicoccina 10 μ M** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h del fotoperíodo**. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), fusicoccina 10 μ M (●, —), sorbitol 50 mM (▽, —) ó sorbitol 50 mM y fusicoccina 10 μ M (▼, —), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

Tabla 4.4.- Modificación del efecto fitocromo ($X_R - X_{FR}$) por el sorbitol (a) y la aplicación simultánea de sorbitol y fusicoccina (FC) (b) a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las 2 h del fotoperiodo, se dejaron flotar en soluciones de sorbitol 0, 25, 50 y 100 mM; FC 10 μ M; sorbitol 50 mM y FC 10 μ M, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia, en grados de cierre, entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

a)		b)	
Sorbitol (mM)	$X_R - X_{FR}$	Tratamiento químico	$X_R - X_{FR}$
0	$23,1 \pm 2,4^a$	Agua destilada (control)	$23,1 \pm 2,4^a$
25	18 ± 4^a	FC 10 μ M	$5,8 \pm 1,3^b$
50	$21 \pm 4,7^a$	Sorbitol 50 mM	$21 \pm 4,7^a$
100	26 ± 1^a	Sorbitol 50 mM + FC 10 μ M	$-7,4 \pm 3,2^c$

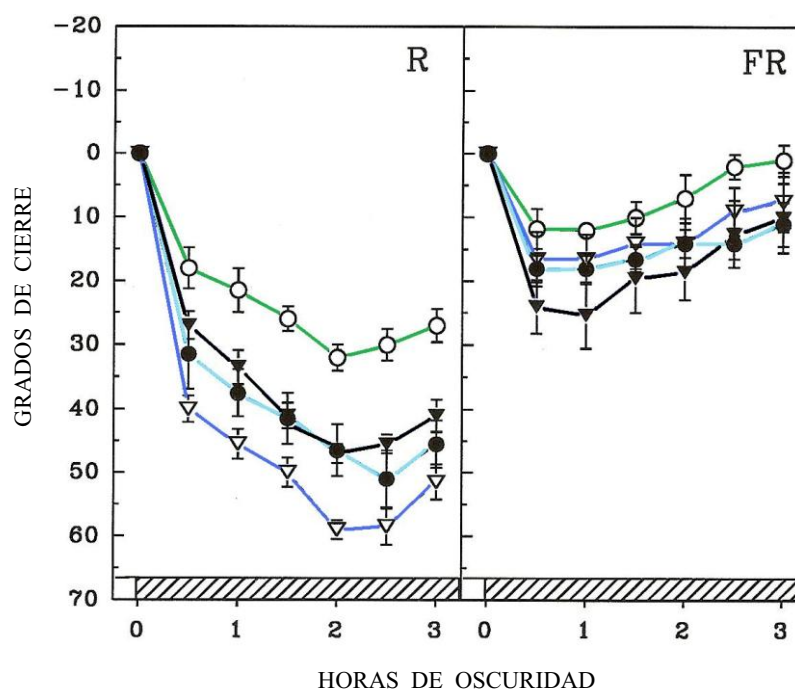


Figura 4.7- Efecto del manitol sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las 2 h del fotoperiodo. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), 25 (●, —), 50 (▽, —) ó 100 (▼, —) mM de manitol, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

En las mismas condiciones experimentales, la aplicación de **manitol** (25-100 mM) también estimuló el cierre de los folíolos irradiados con R o con FR siendo el efecto más acusado en los primeros que en los segundos (Fig. 4.7). En los folíolos irradiados con R, la concentración 50 mM fue la más efectiva en estimular el cierre entre los 30 min y 2 h de oscuridad, luego en la mayoría de los ensayos los folíolos iniciaron la reapertura a las 2 h (50 y 100 mM) o 2 h 30 min (25 mM) de oscuridad. A las 3 h de oscuridad, el cierre de los folíolos incubados en manitol 50 mM no difería del de los incubados en manitol 25 mM, y superaba al de los tratados con manitol 100 mM que, a su vez, era superior al de los folíolos control irradiados con R. A las 3 h de oscuridad, el manitol 50 y 100mM aumentó - independientemente de la concentración - el efecto fitocromo respecto a los controles (Tabla 4.5).

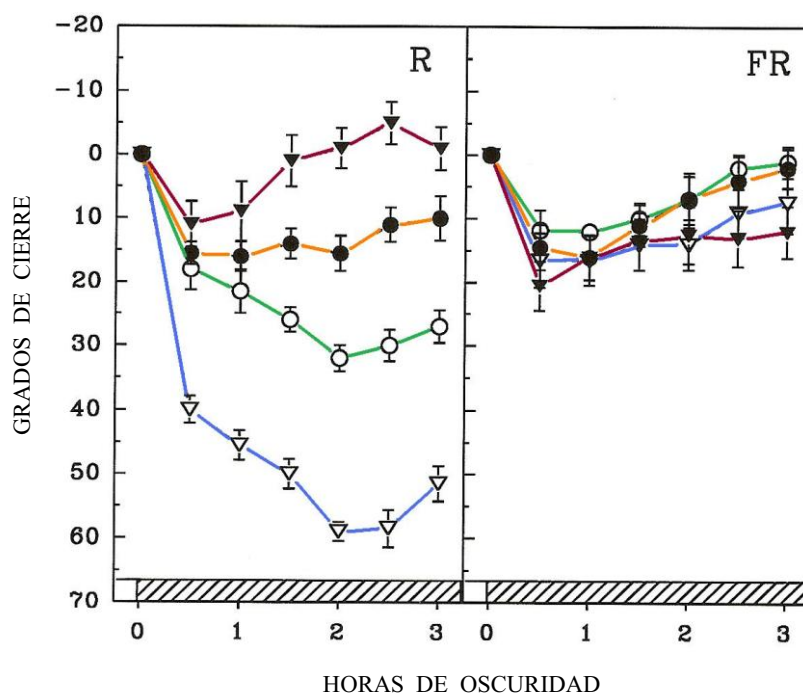


Figura 4.8- Efecto del tratamiento simultáneo de **manitol 50 mM** y **fusicoccina 10 µM** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h del fotoperíodo**. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (○, —), fusicoccina 10 µM (●, —), manitol 50 mM (▽, —) ó manitol 50 mM y fusicoccina 10 µM (▼, —), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media ± SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

El tratamiento simultáneo de **manitol 50 mM** y **FC 10 μM** anuló el efecto del manitol solamente en los folíolos irradiados con R (Fig. 4.8). Además, potenció el efecto de la FC 10 μM inhibiendo el cierre a los 30 min de oscuridad y estimuló la reabertura foliar. Así, a las 3 h de oscuridad, los folíolos tratados con manitol 50 mM y FC 10 μM estaban más abiertos que los incubados solamente con FC 10 μM. Por tanto, la aplicación de manitol 50 mM simultáneamente con FC 10 μM potenciaba la acción de la FC en concordancia con los resultados obtenidos de aplicación simultánea de sacarosa 50 mM y FC 10 μM (Fig. 4. 3) y sorbitol 50 mM y FC 10 μM (Fig. 4. 6). En cambio, en los folíolos irradiados con FR (Fig. 4.8), la aplicación simultánea de estos compuestos no alteró el movimiento respecto a los incubados con manitol 50 mM. En estas condiciones experimentales, el tratamiento manitol 50 mM y FC 10 μM disminuyó significativamente el efecto fitocromo superando la disminución provocada por la FC 10 μM (Tabla 4.5).

Tabla 4.5.- Modificación del **efecto fitocromo** ($X_R - X_{FR}$) por el manitol (**a**) y la aplicación simultánea de manitol y fusicoccina (FC) (**b**) a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las **2 h del fotoperiodo**, se dejaron flotar en las soluciones de manitol 0, 25, 50 y 100 mM; FC 10 μM; manitol 50 mM y FC 10 μM, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia, en grados de cierre, entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

a)		b)	
Manitol (mM)	$X_R - X_{FR}$	Tratamiento químico	$X_R - X_{FR}$
0	$23,1 \pm 2,4^a$	Agua destilada (control)	$23,1 \pm 2,4^a$
25	$33,5 \pm 0,5^{ab}$	FC 10 μM	$5,8 \pm 1,3^b$
50	$36,6 \pm 4,3^b$	Manitol 50 mM	$36,6 \pm 4,3^c$
100	$35,5 \pm 4,5^b$	Manitol 50 mM + FC 10 μM	$-7,2 \pm 4,2^d$

4.1.4. Efecto del polietilenglicol 6000 *per se* y su interacción con la fusicoccina.

El **polietilenglicol** (PEG) 6000, aplicado inmediatamente antes de inducir el cierre nictinástico a las 2 h del fotoperiodo, estimuló el cierre de los folíolos irradiados con R. De forma general, este efecto aumentó al incrementar la concentración de PEG 6000 de 12,4 a 25,2 % y se observó a los 30 min de oscuridad (Figs. 4.9 y 4.10). En los folíolos irradiados con FR el PEG estimuló el cierre nictinástico (Figs. 4.9 y 4.10) a los 30 min de oscuridad aumentando este efecto al incrementar la concentración de PEG; tras 30 min de oscuridad el PEG provocó una ligera reabertura de los folíolos (Figs. 4.9 y 4.10). A las 3 h de oscuridad, el PEG 6000 25,2 % provocó un incremento significativo del efecto fitocromo respecto a los controles (Tabla 4.6).

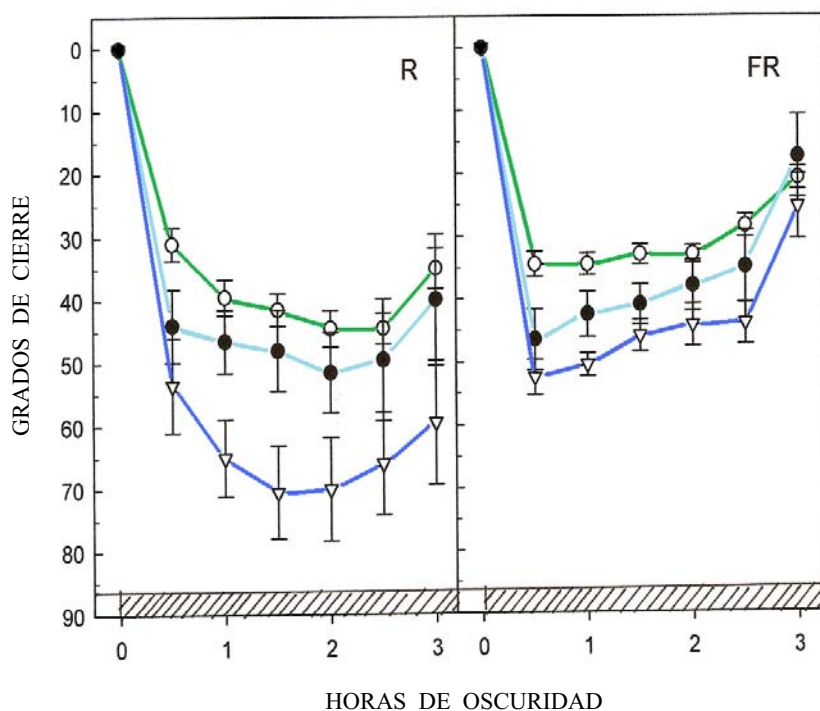


Figura 4.9- Efecto del **PEG 6000** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h del fotoperiodo**. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), 12,4 % (●, —), 25,2 % (▽, —) de PEG 6000, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

En las mismas condiciones experimentales, la aplicación simultánea de **PEG 6000 25,2 % y FC 10 μM** estimuló el cierre nictinástico de los folíolos a los 30 min de oscuridad, tanto en presencia de Pfr como de Pr (Fig. 4.10), incrementándose el efecto estimulador del cierre provocado por el PEG en presencia de Pfr. Así pues, en los folíolos irradiados con R o FR, la aplicación de PEG 6000 25,2 % simultáneamente a la FC 10 μM no potenció el efecto inhibitor del cierre de la FC 10 μM en discrepancia con los resultados obtenidos de aplicación simultánea de sacarosa 50 mM o azúcares-alcohol con la FC 10 μM (Figs. 4.3, 4.6 y 4.8). Además, este tratamiento simultáneo anuló significativamente el incremento del efecto fitocromo provocado por el PEG 6000 25,2 % recuperándose el valor obtenido en los controles (Tabla 4.6).

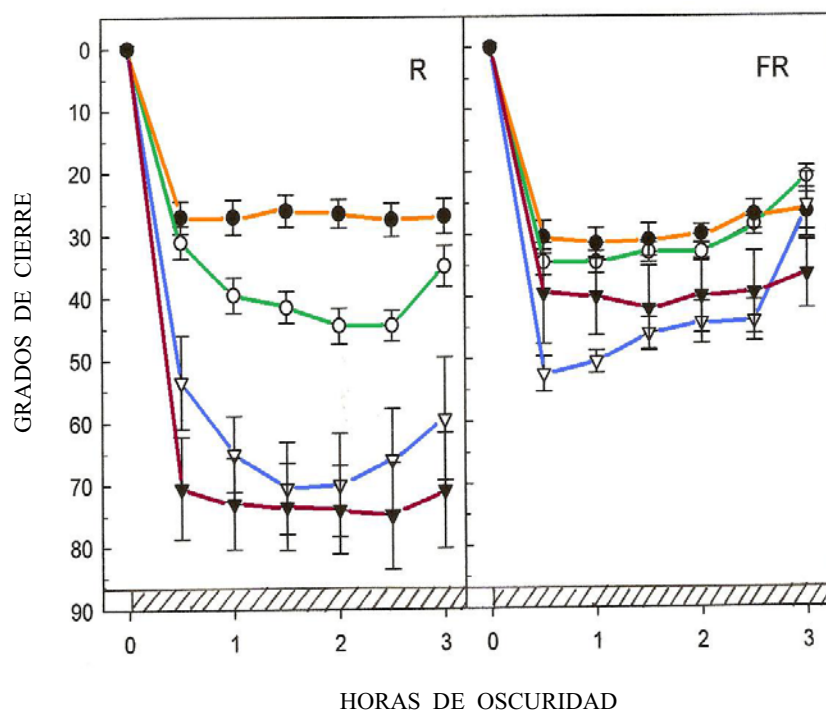


Figura 4.10- Efecto del tratamiento simultáneo de **PEG 6000 25,2 % y fusicoccina 10 μM** sobre el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s) de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha* a las **2 h del fotoperiodo**. Los pares de folíolos se dejaron flotar en agua destilada (o, —), fusicoccina 10 μM (●, —), PEG 6000 25,2 % (▽, —) ó PEG 6000 25,2 % y fusicoccina 10 μM (▼, —), se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron 3 h en oscuridad. Los datos corresponden a la media \pm SE de tres experimentos. ▨, oscuridad durante la fotofase.

Tabla 4.6.- Modificación del **efecto fitocromo** ($X_R - X_{FR}$) por el polietilenglicol (PEG) 6000 (a) y la aplicación de PEG 6000 y fusicoccina (FC) (b) a las 3 h de inducir el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *Albizia lophantha*. Los folíolos se aislaron a las 2 h del fotoperiodo, se dejaron flotar en las soluciones de PEG 6000 0, 12,4 y 25,2 %; FC 10 μ M; PEG 6000 25,2 % y FC 10 μ M, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se dejaron en la oscuridad durante 3 h. El efecto fitocromo se determinó por la diferencia en grados de cierre entre los ángulos de los folíolos irradiados con R y FR (Material y Métodos, apartado 3.3.3). Los valores corresponden a la media \pm SE, n osciló entre 3 y 10. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) mediante el test Post hoc Duncan.

a)		b)	
PEG 6000 (%)	$X_R - X_{FR}$	Tratamiento químico	$X_R - X_{FR}$
0	23,1 \pm 2,4 ^a	Agua destilada (control)	23,1 \pm 2,4 ^a
12,4	33 \pm 10 ^{ab}	FC 10 μ M	5,8 \pm 1,3 ^b
25,2	42,8 \pm 7 ^b	PEG 6000 25,2 %	42,8 \pm 7 ^c
		PEG 6000 25,2 % + FC 10 μ M	25,8 \pm 3,8 ^a

4.2.- Incorporación y distribución de sacarosa-³H y manitol-³H en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).

Los efectos de la sacarosa y del manitol *per se* y su interacción con la FC durante el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *A. lophantha* descritos en el apartado anterior llevaron a considerar de sumo interés determinar la incorporación y distribución de estos azúcares en los pulvínulos terciarios de *A. lophantha*, es decir, en los órganos motores que controlan el movimiento de los folíolos secundarios de esta especie (Material y Métodos, apartado 3.1). No obstante, dada la dificultad de aislar y manipular estos pulvínulos por su diminuto tamaño, estos ensayos se realizaron en un sistema alternativo, los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Material y Métodos, apartado 3.1), de mayor tamaño y fácil manipulación.

Tabla 4.7.- Incorporación de sacarosa 50 mM, sacarosa-³H 50 mM (8,88·10⁶ dpm·ml⁻¹), manitol 50 mM y manitol-³H 50 mM (8,88·10⁶ dpm·ml⁻¹) en pulvínulos escindidos de *Robinia pseudoacacia* y cierre nictinástico de los folíolos tratados con sacarosa 50 mM o manitol 50 mM. Los pulvínulos y los pares de folíolos se recolectaron a las 2 h del fotoperíodo, se trataron con sacarosa o manitol, se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) y se trasladaron a la oscuridad durante 3 h (Material y Métodos, apartado 3.4.2). La incorporación, expresada en dpm·mg⁻¹ de peso fresco (PFR) ± error estándar (SE) y en $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$ (PFR)·h⁻¹ ± SE (n = 6 pulvínulos), y los grados de cierre ± SE (n = 12-14 pares de folíolos) se determinaron a las 3 h de oscuridad.

Tratamiento químico	Grados de cierre		Incorporación de sacarosa / manitol			
	R	FR	dpm·mg ⁻¹ PFR	R	$\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$ (PFR)·h ⁻¹	FR
Sacarosa 50 mM	87 ± 8,2	16 ± 2,3	56,73 ± 6,58		50,28 ± 2,32	
Sacarosa- ³ H 50 mM			2324 ± 220,4	4,16 ± 0,40	2270,84 ± 198	4,18 ± 0,37
Manitol 50 mM	127 ± 10,4	22 ± 2,6	31,92 ± 2,43		30,43 ± 4,24	
Manitol- ³ H 50 mM			1223,14 ± 146,7	2,25 ± 0,27	1128,12 ± 69,64	2,06 ± 0,12

4.2.1.- Incorporación de sacarosa-³H y manitol-³H en los pulvínulos secundarios.

La cantidad de sacarosa-³H 50 mM incorporada en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* fue independiente del estado del/los phy(s) a las 3 h de la inducción del cierre nictinástico (Tabla 4.7). En cambio, el cierre nictinástico, inducido a las 2 h del fotoperíodo, de los folíolos de *R. pseudoacacia* tratados con sacarosa 50 mM varió según el estado del/los phy(s). A las 3 h de oscuridad, los folíolos irradiados con R estaban 5,43 veces más cerrados que los irradiados con FR (Tabla 4.7).

De forma similar, la cantidad de manitol-³H 50 mM incorporada en los pulvínulos secundarios, a las 3 h de inducir el cierre nictinástico, también resultó ser independiente del estado del/los phy(s) (Tabla 4.7) aunque el cierre nictinástico de los folíolos tratados con manitol 50 mM también fue 5,77 veces más elevado en presencia de Pfr que de Pr (Tabla 4.7).

En estas condiciones experimentales, los pulvínulos incorporaron una cantidad de sacarosa-³H 50 mM superior, aproximadamente el doble, a la de manitol-³H 50 mM independientemente del tratamiento luminoso recibido (R o FR). A las 3 h del cierre, los pulvínulos irradiados con R y FR habían absorbido respectivamente el 0,263 ‰ y el 0,256 ‰ de sacarosa-³H 50 mM y el 0,13 ‰ y 0,12 ‰ de manitol-³H 50 mM.

4.2.2.- Distribución de sacarosa-³H y manitol-³H en los pulvínulos secundarios.

Antes de realizar los ensayos de autorradiografía para investigar la distribución de sacarosa-³H y manitol-³H se:

- determinó si estos compuestos provocaban plasmólisis.
- ensayaron varios criométodos para evaluar: **a)** la preservación de la estructura y ultraestructura de las células motoras pulvinulares y, **b)** posibles alteraciones en la distribución de sacarosa-³H y manitol-³H.
- seleccionó el tiempo de exposición.

4.2.2.1.- Preservación estructural y ultraestructural de las células motoras.

En las condiciones ensayadas (Material y Métodos, apartado 3.4.4.1), la incubación de los pulvínulos en **sacarosa 50 mM** o en **manitol 50 mM** durante 3 h en la oscuridad no alteró la estructura ni en la ultraestructura de las células que forman estos órganos motores. En la Fig. 4.11 a y b se observa la ausencia de plasmólisis en las células

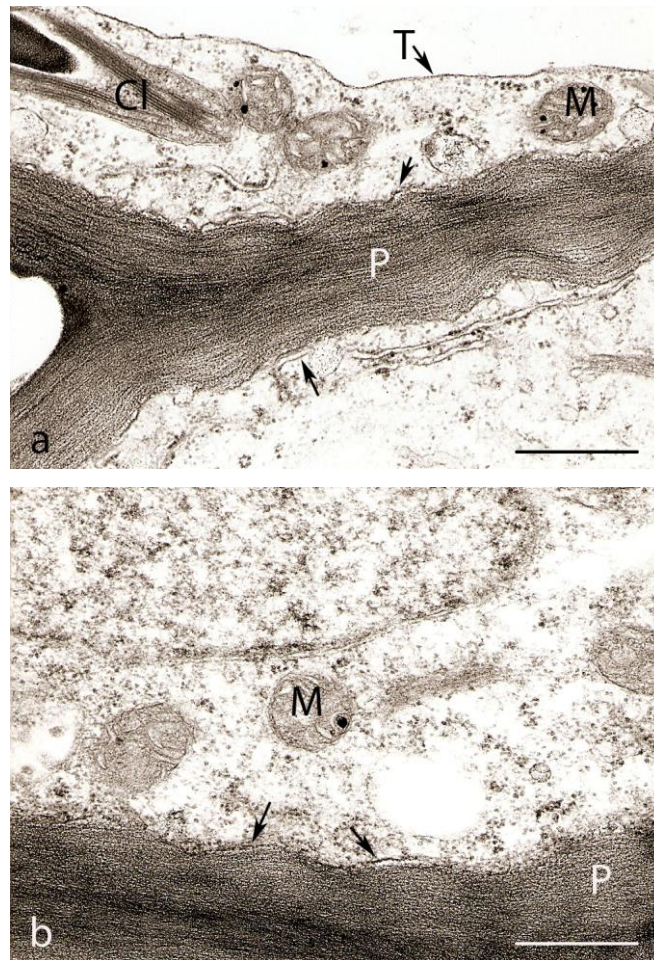


Figura 4.11- Detalle ultraestructural de células corticales extensoras de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* tratados con **sacarosa 50 mM** (a) y **manitol 50 mM** (b) durante 3 h en oscuridad. Los pares de folíolos se recolectaron a las 2 h del fotoperiodo, se dejaron flotar en sacarosa 50 mM o manitol 50 mM y se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se aislaron 3 h más tarde, se fijaron en paraformaldehído 2 % - glutaraldehído 2,5 % en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) y se incluyeron en resina Spurr. La membrana plasmática de ambas células (flecha) está adherida a la pared celular (P). Cl, cloroplasto; M, mitocondria; T, tonoplasto. Barra: 0,5 μm .

motoras de pulvínulos tratados con sacarosa 50 mM o manitol 50 mM, procesados con doble fijación química e inclusión convencional en Spurr (Material y Métodos, apartado 3.4.4.1.1).

Los criométodos ensayados se seleccionaron por su capacidad de retener la distribución de las sustancias solubles (Quintana, 1994). Se probaron dos métodos de criofijación, distintos fluidos de sustitución (metanol 100 %, acetona 100%) y dos resinas para la inclusión: Lowicryl HM20 con infiltración a -50 °C y Spurr (Spurr, 1969) con infiltración a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos, en cuanto a estructura y ultraestructura (Fig. 4.12), se compararon con los que presentan los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* sometidos a doble fijación (glutaraldehído 2,5 % y OsO₄ 2 %) e incluidos en Spurr (Moysset y Simón, 1991a), protocolo que preserva óptimamente la estructura y ultraestructura celular.

Los pulvínulos incluidos en **Lowicryl HM20 (protocolos 1 y 3)** fueron extremadamente difíciles de seccionar independientemente del protocolo de criofijación. Las secciones ultrafinas se doblaban fácilmente y eran inestables bajo el haz de electrones. Además, secciones transversales adyacentes de una misma rejilla mostraban

Figura 4.12.- Detalles ultraestructurales de células corticales motoras en secciones transversales ultrafinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* procesados con distintas criotécnicas.

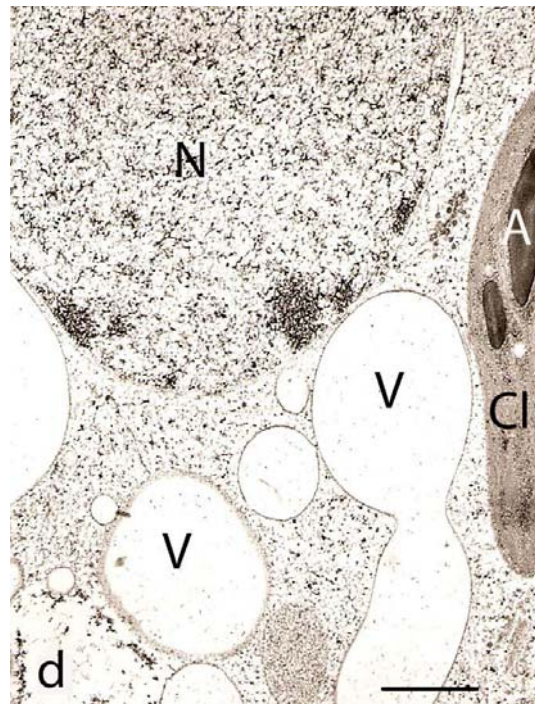
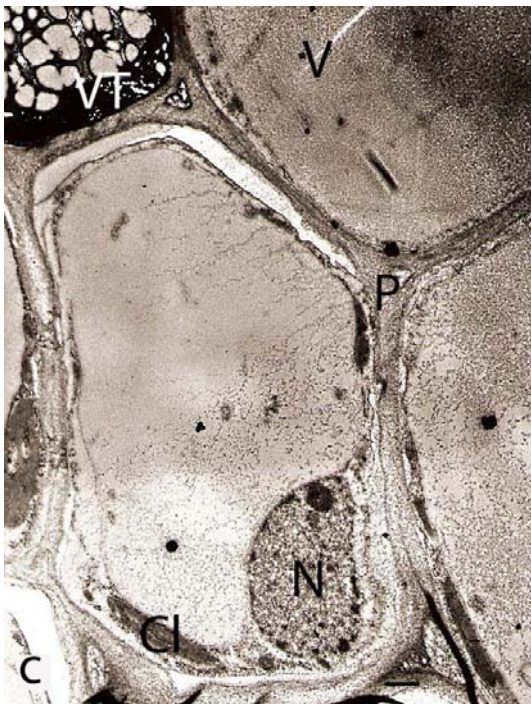
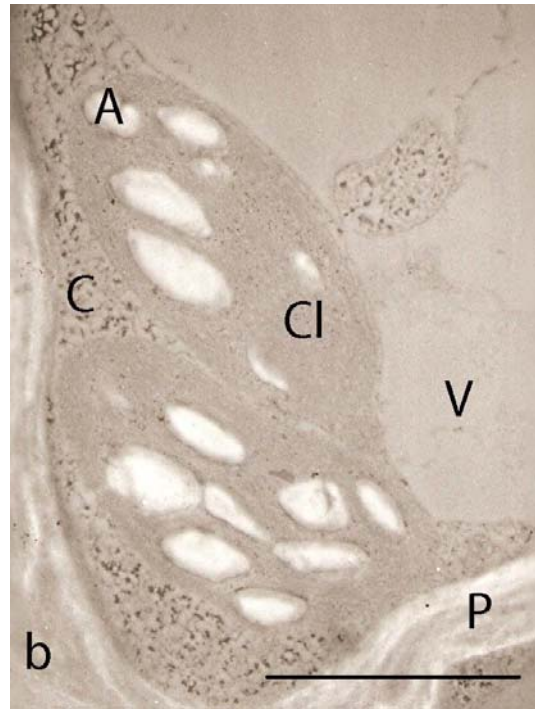
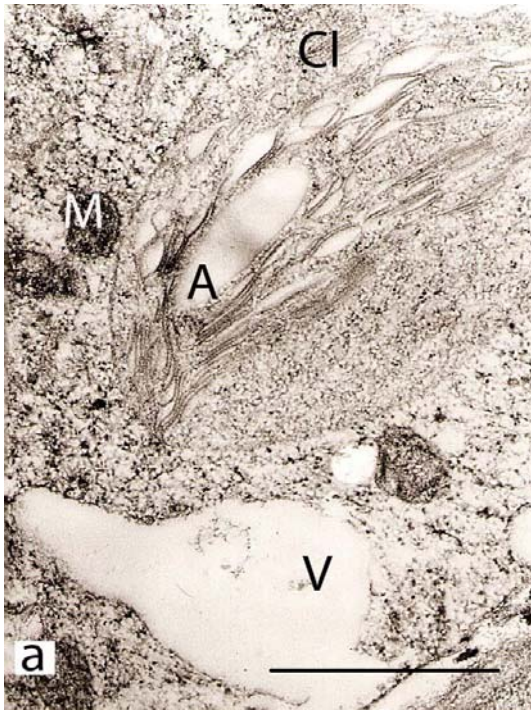
a) criofijación por inmersión en propano líquido, criosustitución en metanol 100 % y crioinclusión en Lowicryl HM20 (**protocolo 1**).

b) criofijación por inmersión en propano líquido, criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e inclusión en Spurr (**protocolo 2**).

c) criofijación por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido (-260 °C), criosustitución en metanol 100 % y crioinclusión en Lowicryl HM20 (**protocolo 3**).

d) criofijación por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido (-260 °C), criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e inclusión en Spurr (**protocolo 4**).

Más explicación en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. A, almidón; C, citoplasma; Cl, cloroplasto; M, mitocondria; N, núcleo; P, pared celular; V, vacuola; VT, vacuola de taninos. Barra: 1 µm.



distinto aspecto a pesar de haberse procesado de forma idéntica. La mayoría de células motoras de pulvínulos criofijados por **inmersión en propano líquido (protocolo 1**, Fig. 4.12a) mostraban un citoplasma finamente granular, cloroplastos de morfología alterada con tilacoides desorganizados y mitocondrias con una matriz relativamente electrodensa y crestas apenas perceptibles. El plasmalema y el tonoplasto no presentaban continuidad y, en algunas células, apenas eran perceptibles. En los pulvínulos criofijados por **proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido (protocolo 3**, Fig. 4.12c) muchas células motoras mostraban plasmólisis de tal forma que el citoplasma estaba separado de la pared celular y, además, el plasmalema era difícil de visualizar. La distribución periférica de orgánulos no estaba alterada y éstos se identificaron por su morfología y densidad a los electrones. Los cloroplastos, de forma elíptica, mostraban un estroma muy electrodenso y la doble membrana plastidial era difícil de visualizar. En los núcleos, de forma ovalada y con un contenido altamente granular, no se visualizaba la membrana nuclear. La mayoría de las vacuolas de taninos eran compactas y electrodensas pero, ocasionalmente, mostraban gran número de zonas transparentes a los electrones.

Los pulvínulos incluidos en **Spurr (protocolos 2 y 4)** se cortaron con más facilidad que los incluidos en Lowicryl HM20 y, además, las secciones mostraron buena estabilidad bajo el haz de electrones independientemente del protocolo de criofijación. De forma general, las células no mostraron plasmólisis pero la preservación ultraestructural varió considerablemente según el método de criofijación. Las células motoras de los pulvínulos criofijados por **inmersión en propano líquido (protocolo 2**, Fig. 4.12b) mostraban un citoplasma granular y relativamente electrodenso en comparación con la pared celular. En general, no se visualizó ninguna membrana y los orgánulos, como cloroplastos y mitocondrias, con distintos grados de dilatación y distorsión se identificaron por su morfología. En los cloroplastos, con un estroma relativamente electrodenso, se identificaron los gránulos de almidón como regiones translúcidas a los electrones. Cuando la criofijación se efectuó por **proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido (protocolo 4**, Fig. 4.12d) la preservación ultraestructural aumentó considerablemente. En comparación con el material criofijado por inmersión en propano líquido (**protocolo 2**), la matriz citoplasmática de las células motoras presentaba un aspecto granular uniforme similar al del material procesado por fijación química e

inclusión en Spurr (Moysset y Simón, 1991a). Además, se visualizaron fácilmente las membranas celulares (plasmalema, tonoplasto, etc.). Los cloroplastos y las mitocondrias, apenas dilatados, estaban situados en la periferia celular. Los cloroplastos, de forma elíptica, mostraban un estroma más electrodensa que el citoplasma, y en ellos destacaban los gránulos de almidón. Las mitocondrias presentaban crestas y una matriz electrodensa. También se observaron núcleos de forma ligeramente ovalada y con un contenido finamente granular más electrodensa que el de la matriz citoplasmática.

Estas observaciones permitieron seleccionar el **protocolo 4** de criofijación por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido, criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e inclusión en resina Spurr (Spurr, 1969) como el más idóneo para preservar la estructura y ultraestructura de las células motoras pulvinulares.

4.2.2.2.- Autorradiografía: movilización de sustancias solubles y selección del tiempo de exposición.

El procesamiento del material vegetal, mediante el protocolo seleccionado en el apartado anterior, no excluye la posible difusión de las sustancias solubles durante la infiltración de la resina a temperatura ambiente. Para descartar esta posibilidad se efectuaron ensayos paralelos usando pulvínulos criofijados por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido y **a)** incluidos en resina Spurr (Spurr, 1969) o **b)** crioincluidos en Lowicryl HM20. En estas pruebas preliminares no se detectaron diferencias en cuanto a cantidad y distribución de marcaje entre los dos protocolos y, dada la mayor facilidad de trabajar a temperatura ambiente, se optó por trabajar con material incluido en Spurr (Spurr, 1969).

La cantidad de marcaje con sacarosa-³H y manitol-³H en los autorradiogramas depende del tiempo de exposición a la emulsión fotográfica. En ambos casos:

- Tras 2 meses de exposición (Fig. 4.13a) las secciones transversales semifinas presentaban marcaje radioactivo en el cilindro central, el colénquima, la corteza

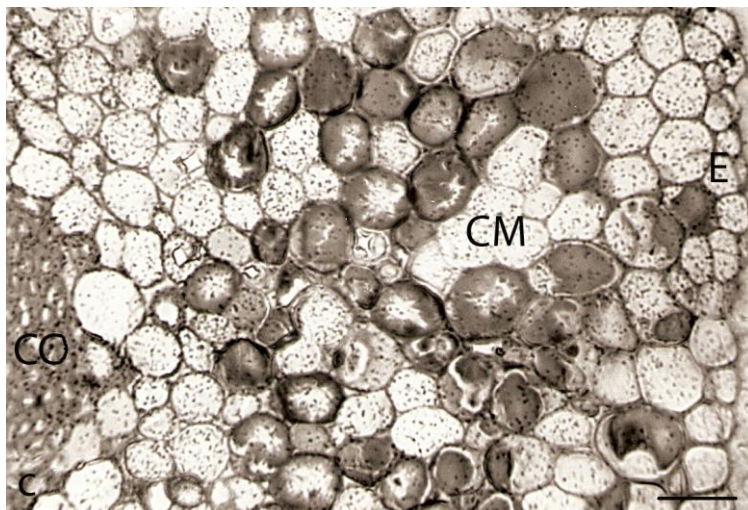
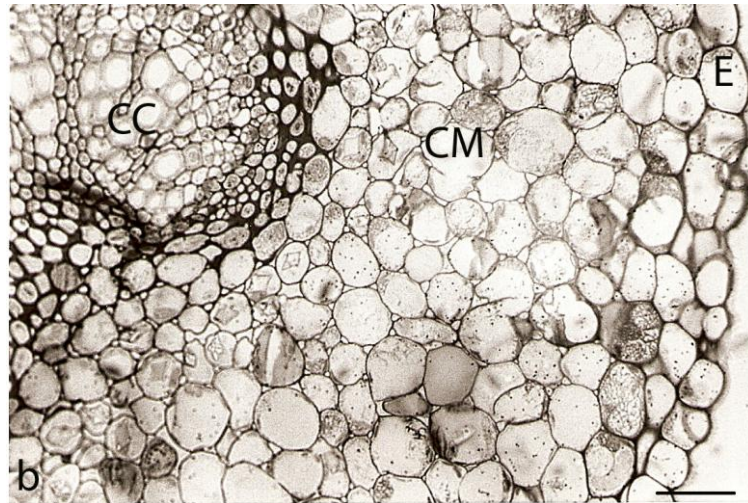
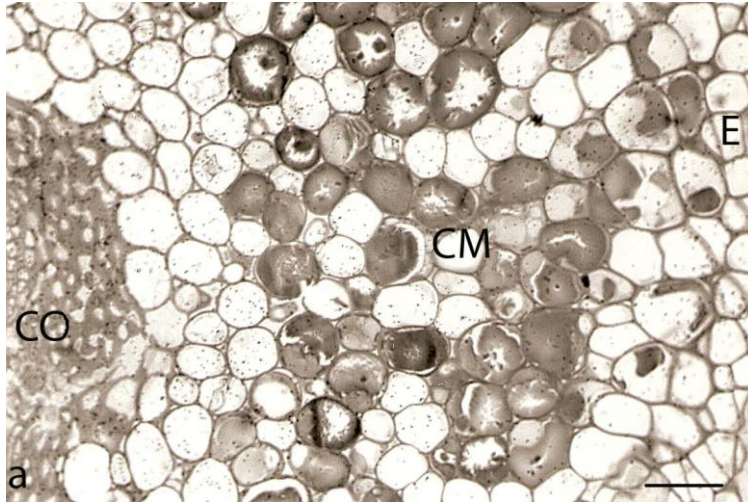


Figura 4.13.- Detalle de secciones transversales semifinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* mostrando la distribución de **sacarosa-³H** 50 mM después de 2 (a), 5 (b) y 8 (c) meses de exposición. Los pares de foliolos, obtenidos a las 2 h del fotoperiodo, se trataron con sacarosa-³H 50 mM e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se aislaron a las 3 h de oscuridad y se procesaron según el **protocolo 4** como se detalla en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. CC, cilindro central; CO, colénquima; CM, corteza motora; E, epidermis. Barra: 10 μ m.

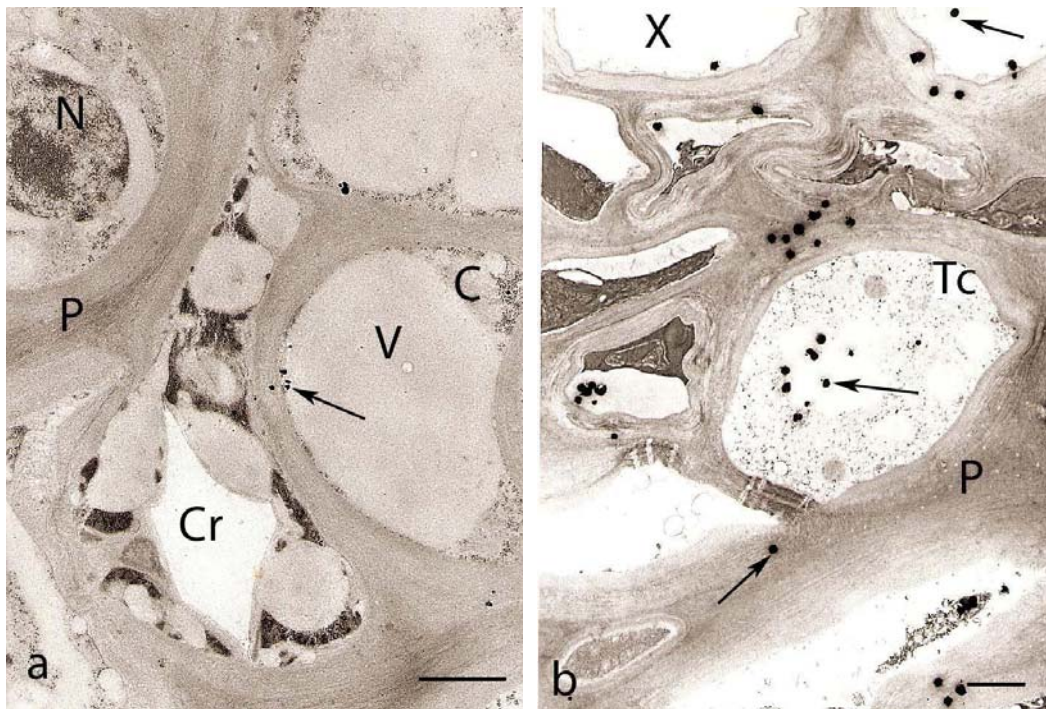


Figura 4.14.- Detalle de células corticales internas (a) y células del cilindro central (b) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* mostrando la distribución de **sacarosa-³H** 50 mM (flecha) a los 7 (a) y 10 (b) meses de exposición en secciones transversales ultrafinas. Los pares de foliolos, obtenidos a las 2 h del fotoperiodo, se trataron con sacarosa-³H 50 mM e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se aislaron a las 3 h de oscuridad y se procesaron según el **protocolo 4** como se detalla en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. C, citoplasma; Cr, cristal de oxalato cálcico; N, núcleo; P, pared; Tc, tubo criboso; V, vacuola; X, vaso xilemático. Barra: 1 μ m.

- motora y la epidermis. Después de 5 y 8 meses de exposición (Figs. 4.13b y c) la localización de marcaje fue la misma pero aumentó cuantitativamente dificultando el estudio de la distribución a nivel tisular y el análisis de los autorradiogramas. Por ello, se consideró que el marcaje adecuado era el obtenido a los 2 meses (Fig. 4.13a).
- En las secciones transversales ultrafinas se detectó marcaje radioactivo tras 7 meses de exposición (Fig. 4.14a) pero la cantidad de marcaje óptimo para estudiar su distribución celular y subcelular se obtuvo después de 10 meses (Fig. 4.14b). Exposiciones superiores a 10 meses presentaban un sobremarcaje que no permitía observar adecuadamente la distribución exacta en los distintos compartimentos celulares.

4.2.2.3.- Distribución de sacarosa-³H y manitol-³H en secciones pulvinulares.

En las secciones pulvinulares transversales semifinas no se apreciaron diferencias en cuanto a distribución tisular de sacarosa y manitol. Ambos compuestos se localizaron en el cilindro central, el colénquima, la corteza motora extensora y flexora y la epidermis de los pulvínulos irradiados con R (Figs. 4.15a-d) o FR. De forma general, la cantidad de marcaje disminuía al pasar del cilindro central a la epidermis. Además, la cantidad de marcaje correspondiente a manitol (Figs. 4.15c y d) fue notablemente inferior a la de sacarosa (Figs. 4.15a y b) en concordancia con los datos de incorporación de estos compuestos (apartado 4.2.1, Tabla 4.7).

La observación de secciones pulvinulares transversales ultrafinas confirmó la distribución de sacarosa-³H y manitol-³H detectada mediante microscopía óptica y aportó información sobre su distribución a nivel subcelular (Figs 4.16 y 4.17).

En el cilindro central (Fig. 4.16d), la **sacarosa-³H** se detectó en el lumen y pared de los tubos cribosos y los vasos xilemáticos así como en el citoplasma de las células del

parénquima xilemático. También se localizó en el citoplasma, compartimento vacuolar y gruesas paredes de las células del colénquima pero no en los plasmodesmos. En las células corticales motoras (Figs. 4.16b y c) se acumuló principalmente en el compartimento vacuolar, pared celular y citoplasma y, ocasionalmente en el núcleo y cloroplastos. También se localizó en los amiloplastos de células corticales internas pero

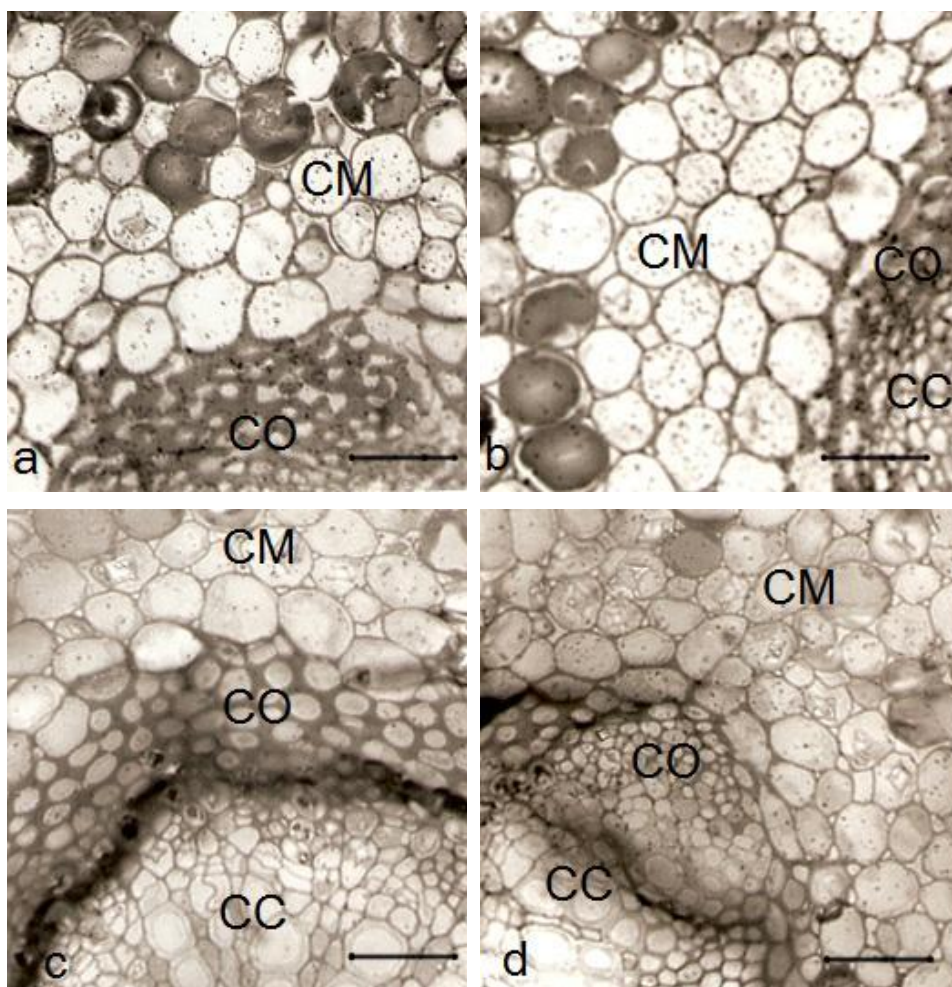


Figura 4.15.- Detalles de las zonas extensoras (**a** y **c**) y flexoras (**b** y **d**) internas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* mostrando la distribución de **sacarosa-³H 50 mM (a, b)** y **manitol-³H 50 mM (c, d)** en secciones transversales semifinas después de 2 meses de exposición. Los pares de folíolos, escindidos a las 2 h del fotoperíodo, se trataron con sacarosa-³H 50 mM o manitol-³H 50 mM, se irradiaron con R (15 min) e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se aislaron a las 3 h de oscuridad y se procesaron según el **protocolo 4** como se detalla en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. CC, cilindro central; CO, colénquima; CM, células corticales motoras. Barra: 5 μ m.

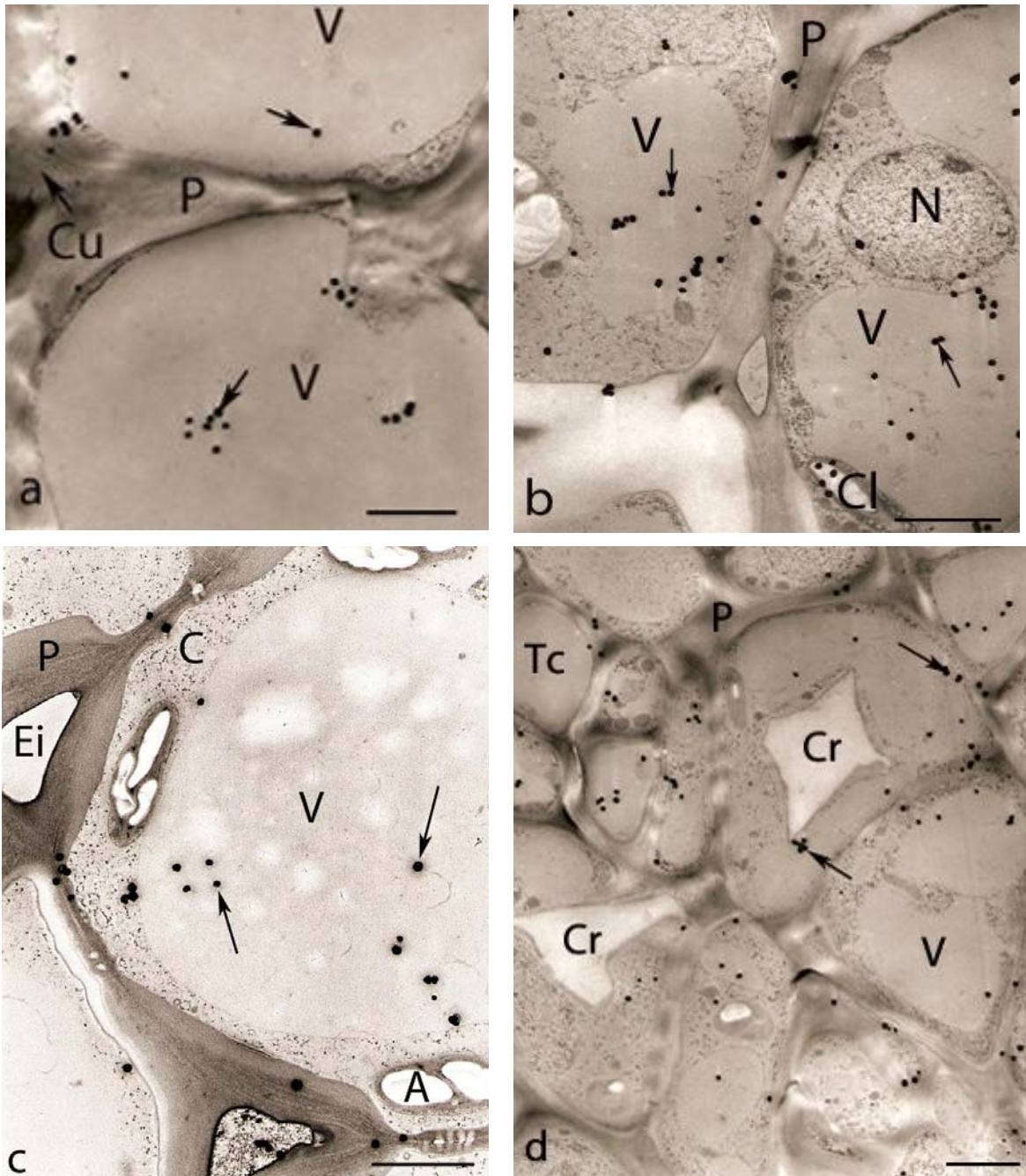


Figura 4.16.- Distribución de **sacarosa-³H** 50 mM (flecha) en células epidérmicas (**a**), corticales extensoras (**b** y **c**) y del cilindro central (**d**) de secciones transversales ultrafinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* después de 10 meses de exposición. Los pares de folíolos, escindidos a las 2 h del fotoperíodo, se trataron con sacarosa-³H 50 mM, se irradiaron con FR (5 min) e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se separaron a las 3 h de oscuridad y se procesaron según el **protocolo 4** como se detalla en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. A, almidón; C, citoplasma; Cl, cloroplasto; Cr, cristal de oxalato cálcico; Cu, cutícula; Ei, espacio intercelular; N, núcleo; P, pared; Tc, tubo criboso; V, vacuola. Barra: 2 μ m.

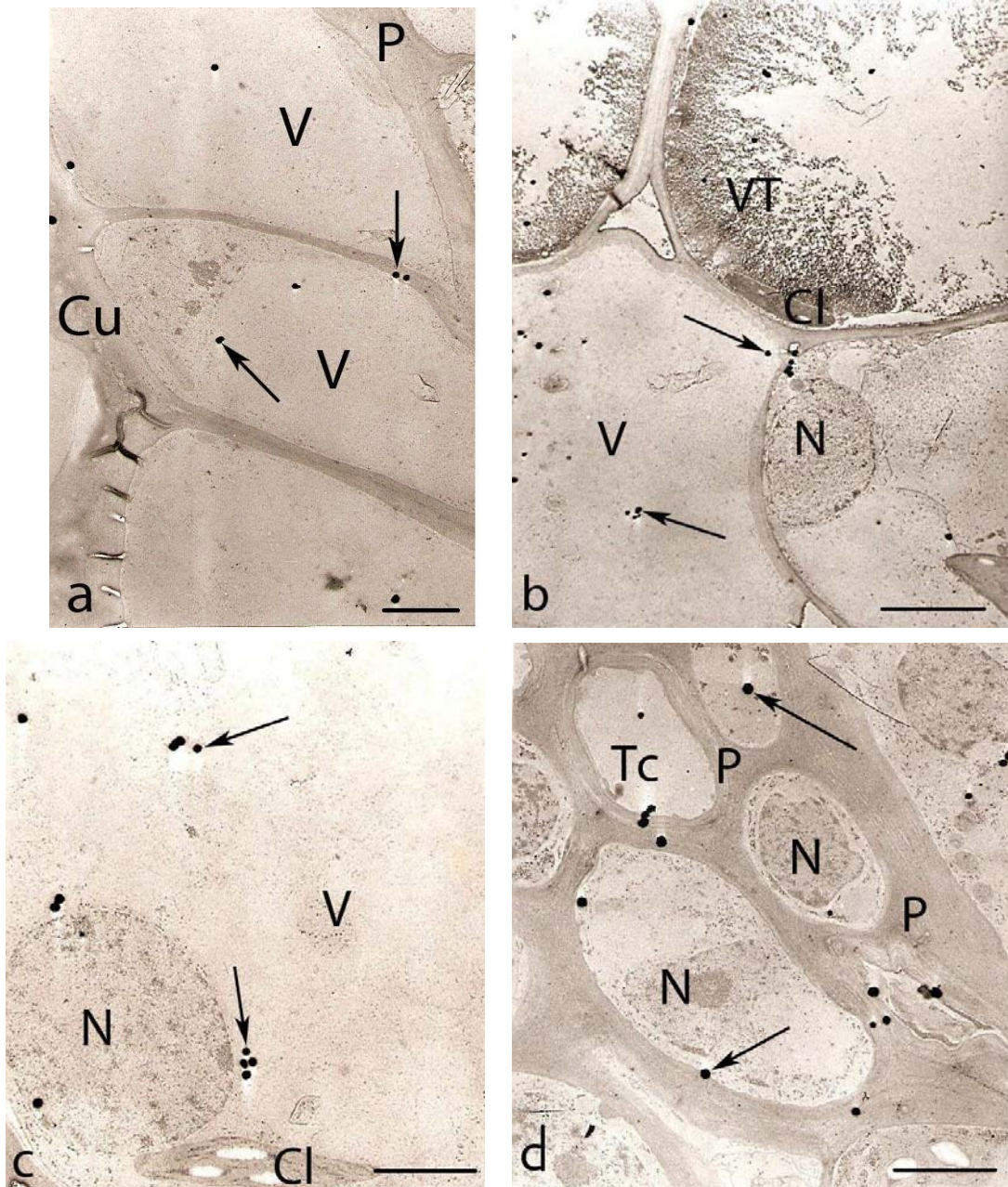


Figura 4.17.- Distribución de **manitol-³H** 50 mM (flecha) en células epidérmicas (**a**), corticales extensoras (**b** y **c**) y del cilindro central (**d**) de secciones transversales ultrafinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* después de 10 meses de exposición. Los pares de folíolos, escindidos a las 2 h del fotoperiodo, se trataron con manitol-³H 50 mM, se irradiaron con FR (5 min) e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Los pulvínulos se separaron a las 3 h de oscuridad y se procesaron según el **protocolo 4** como se detalla en Material y Métodos, apartado 3.4.4.2.1. Cl, cloroplasto; Cu, cutícula; N, núcleo; P, pared; Tc, tubo criboso; V, vacuola; VT, vacuola de tanino. Barra: 2 μ m.

no en el retículo endoplasmático ni en mitocondrias. En las células epidérmicas (Fig. 4.16a) se detectó en la pared y compartimento vacuolar y, ocasionalmente, en el citoplasma. No se detectó sacarosa-³H en los cristales de oxalato cálcico. Tanto en los pulvínulos irradiados con R como en los irradiados con FR la distribución subcelular de sacarosa-³H fue similar en las zonas extensora y flexora.

La distribución subcelular de **manitol-³H** fue similar a la de la sacarosa-³H. En el cilindro central (Fig. 4.17d) se localizó en el lumen y pared de los tubos cribosos y los vasos xilemáticos y en el citoplasma de las células del parénquima xilemático. También se localizó en el citoplasma y gruesas paredes de las células del colénquima pero no en los plasmodesmos. En las células corticales motoras (Figs. 4.17b y c) se acumuló principalmente en el compartimento vacuolar, citoplasma y pared celular y ocasionalmente en el núcleo y cloroplastos. En las células epidérmicas (Fig. 4.17a) se detectó en la pared y compartimento vacuolar. No se detectó manitol-³H en los cristales de oxalato cálcico. Tampoco se detectaron diferencias apreciables en la distribución subcelular de manitol-³H entre las zonas extensoras y flexoras de pulvínulos irradiados con R o con FR.

4.2.2.4.- Efecto de la luz R y de la luz FR en la distribución de sacarosa-³H y manitol-³H en las zonas extensoras y flexoras.

Para determinar si la incorporación de sacarosa-³H y manitol-³H en las zonas extensora y flexora de pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* dependía del estado del/los phy(s) (Pfr o Pr) se evaluó la cantidad de sacarosa-³H y manitol-³H [número de granos (10^{-2}). μm^{-2}] acumulada en protoplastos (citoplasma más compartimento vacuolar) extensores y flexores localizados en la parte externa e interna de estas zonas corticales motoras (Figs. 4.18a y 4.19a). Las medidas se efectuaron a las 3 h de inducir el cierre nictinástico.

De forma general, considerando conjuntamente las zonas extensora y flexora, la acumulación de **sacarosa-³H** en los protoplastos corticales internos (zonas 2 + 3, Fig.4.18a) superó a la incorporada en los protoplastos externos (zonas 1 + 4, Fig .4.18a)

tanto en los pulvínulos irradiados con R como en los irradiados con FR (Fig. 4.18b).

En los pulvínulos irradiados con R (Fig. 4.18b), la sacarosa-³H incorporada se distribuyó de forma similar entre los protoplastos flexores internos y externos. En cambio, en la zona extensora, este compuesto se acumuló significativamente en los protoplastos internos.

En los pulvínulos irradiados con FR (Fig. 4.18b), la sacarosa-³H se incorporó mayoritariamente en los protoplastos flexores, siendo más abundante en la zona cortical interna que en la externa. En cambio, en la zona extensora, la sacarosa-³H se distribuyó de forma similar entre los protoplastos internos y externos. Así pues, después de una irradiación FR: **a)** la máxima incorporación de sacarosa-³H se detectó en los protoplastos flexores internos y, **b)** la sacarosa-³H incorporada en los protoplastos extensores fue aproximadamente cinco veces inferior a la incorporada en los flexores internos y tres veces inferior a la acumulada en los flexores externos.

En referencia al **manitol-³H**, considerando conjuntamente las zonas extensora y flexora, la cantidad de marcaje incorporado en los protoplastos internos (zonas 2 + 3, Fig.4.19a) fue similar al incorporado en los protoplastos externos (zonas 1 + 4, Fig.4.19a) en pulvínulos irradiados con R. Sin embargo, en los protoplastos internos de pulvínulos irradiados con FR el manitol-³H incorporado fue aproximadamente el doble (zonas 2 + 3, Fig.4.19a) al incorporado en los protoplastos externos (zonas 1 + 4, Fig.4.19a) tanto en la zona extensora como en la flexora. La máxima acumulación de manitol-³H se detectó en los protoplastos flexores internos (Fig. 4.19b).

En los pulvínulos irradiados con R la incorporación de manitol-³H fue aproximadamente dos veces inferior a la de sacarosa-³H (comparación Figs. 4.19b y 4.18b), no apreciándose diferencias significativas entre la acumulación en la zona extensora y flexora. En cambio, en los pulvínulos irradiados con FR, la acumulación de manitol-³H y de sacarosa-³H fue similar detectándose la máxima incorporación en la zona flexora.

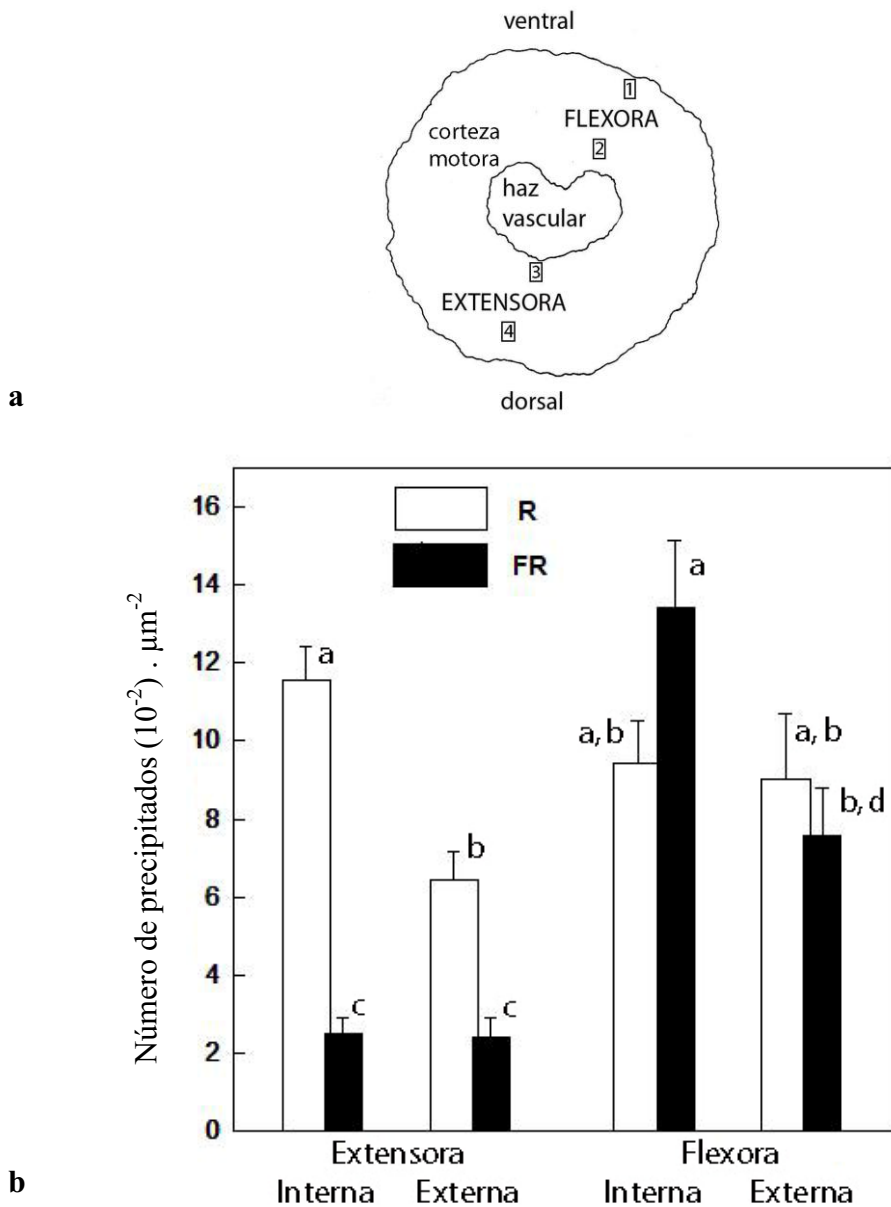


Figura 4.18.- a) Representación esquemática de una sección transversal de un pulvínulo secundario de *Robinia pseudoacacia*. Los números señalan las zonas corticales donde se determinó la acumulación de sacarosa- ^3H 50 mM. 1, zona flexora externa; 2, zona flexora interna; 3, zona extensora interna; 4, zona extensora externa.

b) Incorporación de **sacarosa- ^3H** 50 mM [número de precipitados (10^{-2}) por μm^{-2}] en protoplastos extensores y flexores de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* a las 3 h de inducir el cierre nictinástico. Los pares de folíolos se recolectaron a las 2 h del fotoperíodo, se incubaron en sacarosa- ^3H 50 mM y se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) antes de transferirse a la oscuridad. Detalles en Material y Métodos, apartado 3.4.4. Los valores corresponden a la media \pm SE ($n = 10$). Las diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,001$).

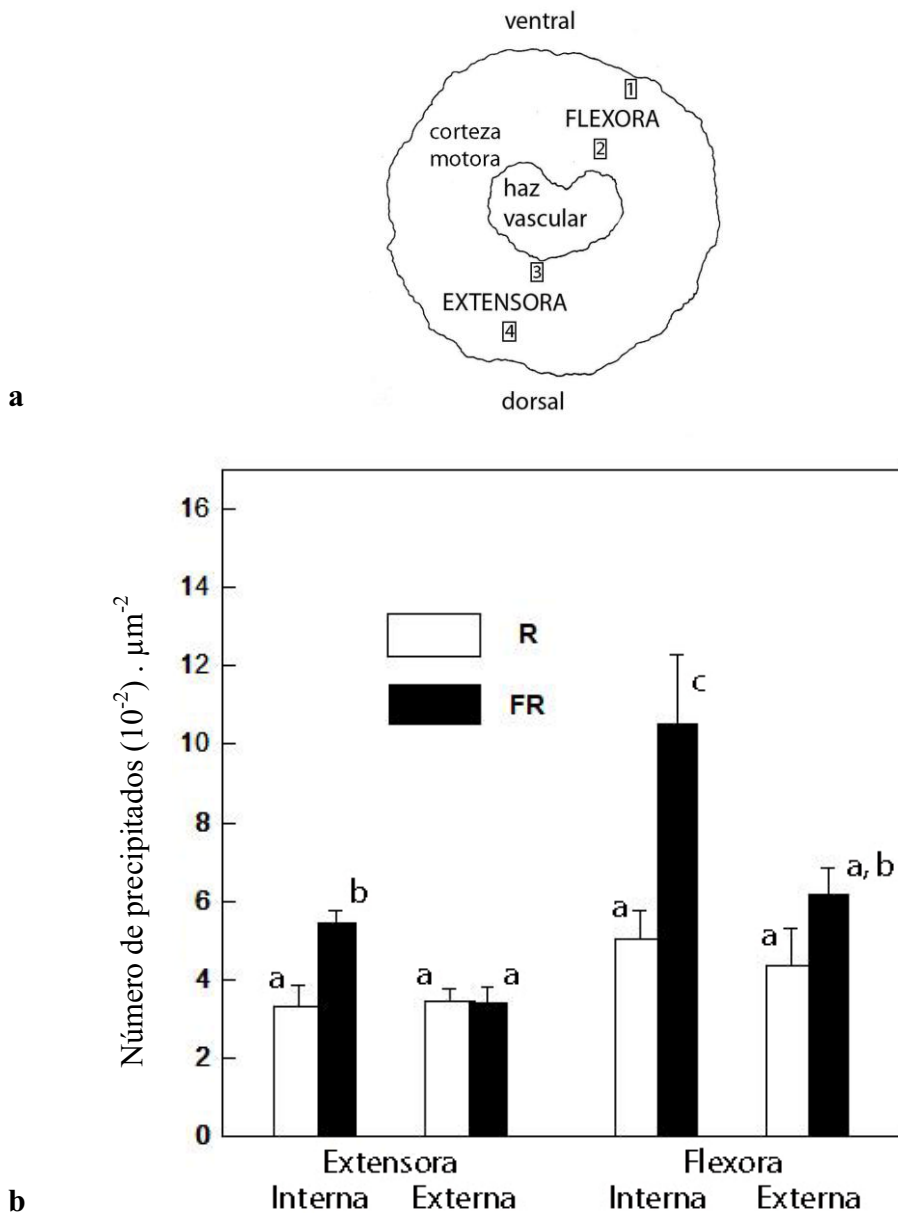


Figura 4.19.- a) Representación esquemática de una sección transversal de un pulvínulo secundario de *Robinia pseudoacacia*. Los números señalan las zonas corticales donde se determinó la acumulación de manitol-³H 50 mM. 1, zona flexora externa; 2, zona flexora interna; 3, zona extensora interna; 4, zona extensora externa.

b) Incorporación de manitol-³H 50 mM [número de precipitados (10^{-2}) por μm^{-2}] en protoplastos extensores y flexores de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* a las 3 h de inducir el cierre nictinástico. Los pares de folíolos se recolectaron a las 2 h del fotoperiodo, se incubaron en manitol-³H 50 mM y se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) antes de transferirse a la oscuridad. Detalles en Material y Métodos, apartado 3.4.4. Los valores corresponden a la media \pm SE (n = 10). Las diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA, P < 0,001).

4.3.-Distribución de Ca^{2+} en los pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*.

Para estudiar la intervención del Ca^{2+} en el cierre nictinástico foliar controlado por *phys* se seleccionaron pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Material y Métodos, apartado 3.5.2), de tamaño óptimo y fácil manipulación.

4.3.1.-Optimización del método de fijación y composición de los precipitados.

Los distintos protocolos de fijación ensayados (Material y Métodos, Tabla 3.4) no alteraron la estructura de los pulvínulos (Introducción, Figura 1.3) pero provocaron cambios ultraestructurales importantes. Independientemente del protocolo de fijación las secciones transversales ultrafinas mostraron buena estabilidad al haz de electrones.

Protocolo A.

Las células de los pulvínulos sometidos a una doble fijación (fijación mediante **glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 %** y postfijación con **OsO_4 2 %**, mostraron una preservación ultraestructural óptima en concordancia con resultados previos (Moysset y Simón, 1991a). En todas las células pulvinulares se observaba fácilmente el citoplasma granular, el plasmalema y las membranas de los distintos orgánulos. Las células motoras externas mostraron dos tipos de vacuolas (acuosas o de taninos) y en el citoplasma podían distinguirse mitocondrias con crestas, cloroplastos elípticos con tilacoides formando granas, gránulos osmófilos y gránulos de almidón (Fig. 4.20a).

Ocasionalmente, se visualizaron cisternas de retículo endoplasmático y el núcleo con el nucleoplasma altamente granular y un prominente nucleolo. Las células corticales internas contenían varios amiloplastos o bien un cristal de oxalato cálcico y vacuolas acuosas que destacaban respecto al citoplasma granular. También algunas células del parénquima vascular contenían un cristal de oxalato cálcico.

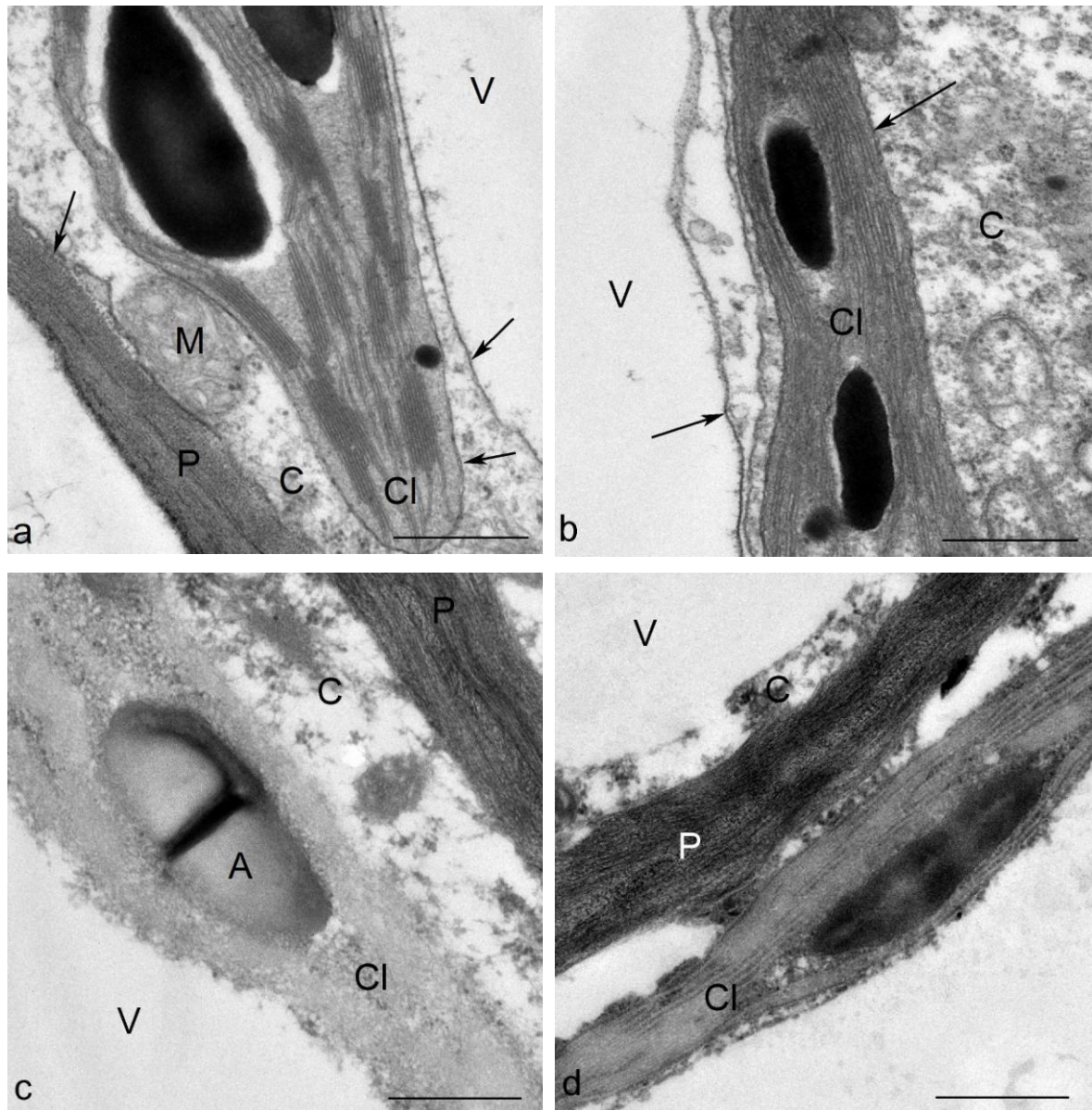


Figura 4.20- Detalles ultraestructurales de células corticales motoras en secciones transversales ultrafinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* procesados con distintas soluciones de fijación en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8) durante 5 h.

a) protocolo A: glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - OsO₄ 2 %.

b) protocolo B: glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % - OsO₄ 2 %.

c) protocolo C: glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 %.

d) protocolo D: glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 %.

Más explicación en Material y Métodos, apartado 3.5.2. Membrana plasmática (flecha); A, almidón; C, citoplasma; Cl, cloroplasto; M, mitocondria; P, pared celular; V, vacuola. Barra: 0,5 μm.

Protocolo B

La adición de **fenol 1 %** a la solución de fijación inicial (**glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 %**) seguida por postfijación con **OsO₄ 2 %** no alteró la morfología de los orgánulos celulares ni su distribución en el citoplasma granular. En todas las células pulvinulares se observaban claramente las membranas celulares: el plasmalema íntimamente adosado a la pared celular, el tonoplasto y la doble membrana plastidial, mitocondrial y nuclear. No obstante, la incorporación de fenol 1% provocó un aumento de la densidad a los electrones del estroma mitocondrial y plastidial (Fig. 4.20b). El fenol también provocó cambios en las vacuolas de taninos, algunas presentaban un aspecto compacto y muy electrodensito similar al del material fijado según el protocolo A pero otras mostraron un aspecto granular.

Protocolo C

La fijación con **glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 %**, eliminando la postfijación con OsO₄ 2 % disminuyó la preservación ultraestructural (Fig. 4.20c). No se visualizaron las membranas celulares y el citoplasma mostró un aspecto más laxo aunque continuó íntimamente adosado a la pared celular y limitado a una capa periférica. Los orgánulos celulares, salvo los núcleos, mostraron poco contraste. En general, estos orgánulos se identificaron por su morfología y en el caso de los plastos, además, por la presencia de gránulos de almidón.

Protocolo D

La adición de **fenol 1 %** a la solución de fijación inicial (**glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 %**) sin postfijación con OsO₄ 2 % aumentó sensiblemente la electrodensidad de los orgánulos celulares respecto a la del material fijado solamente con glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % (protocolo C). El citoplasma de las células corticales mostraba un aspecto laxo y, a pesar de no visualizarse el tonoplasto, estaba limitado a la periferia por el compartimento vacuolar. En el citoplasma destacaban los cloroplastos (Fig. 4.20d) y las mitocondrias por su morfología y mayor densidad a los electrones así como los núcleos por su contenido granular y electrodensito. En los cloroplastos, la elevada densidad del estroma dificultaba visualizar los tilacoides que, de forma ocasional, podían intuirse como tenues líneas transparentes a los electrones.

Protocolo E

La incorporación de **KPA 4 %** a la solución de fijación formada por **glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 %** no alteró la ultraestructura celular respecto a la obtenida en ausencia de KPA 4 % (protocolo D) pero provocó la formación de abundantes precipitados en todas las células pulvinulares, desde las epidérmicas hasta las del cilindro central. Estos precipitados de diferentes tamaños y en forma de gránulos (circulares o de morfología irregular) o de agregados se distinguían fácilmente por su elevada densidad a los electrones (Figs. 4.21a y b).

En las células epidérmicas (Fig. 4.22a) se formaron abundantes precipitados granulares en el citoplasma. Se distribuían aleatoriamente y, en algunas células, también se visualizaban alineados junto a la pared celular, presumiblemente situados en la cara citoplasmática del plasmalema. No se observaron precipitados ni en la pared ni en la cutícula.

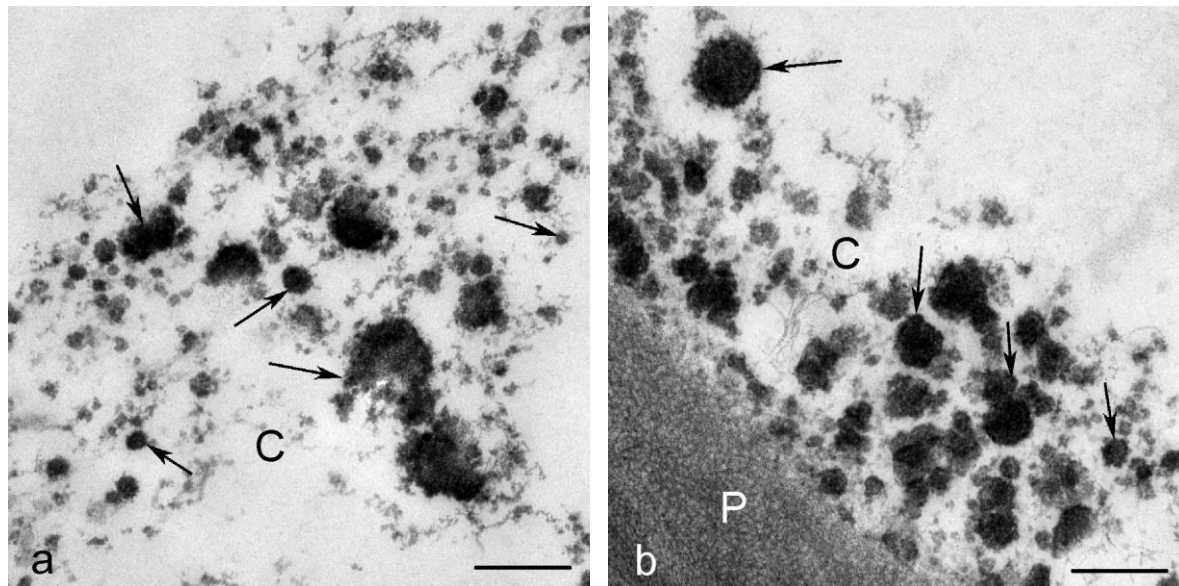
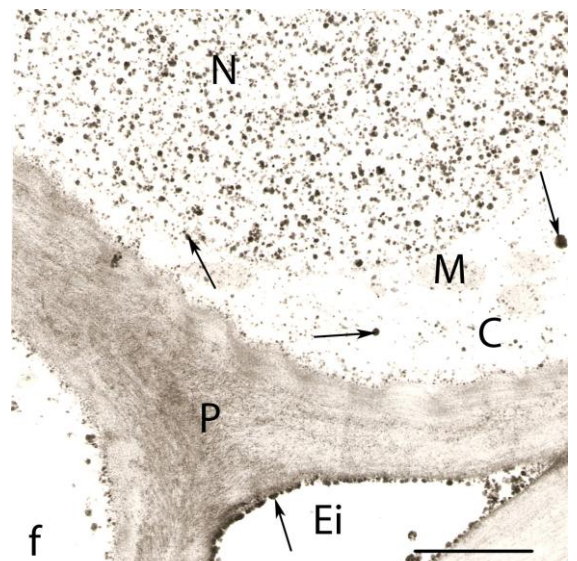
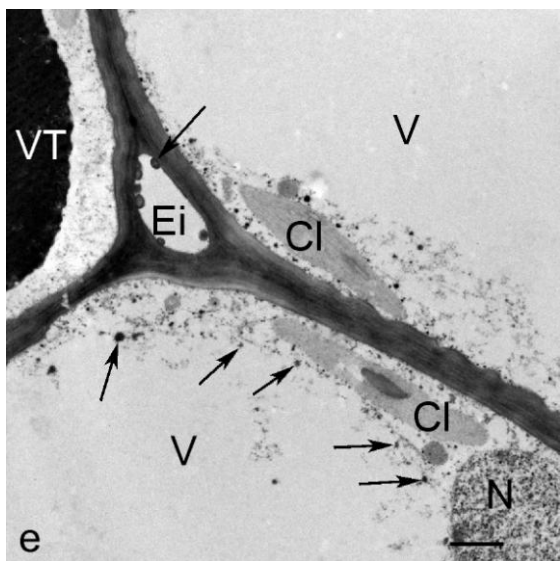
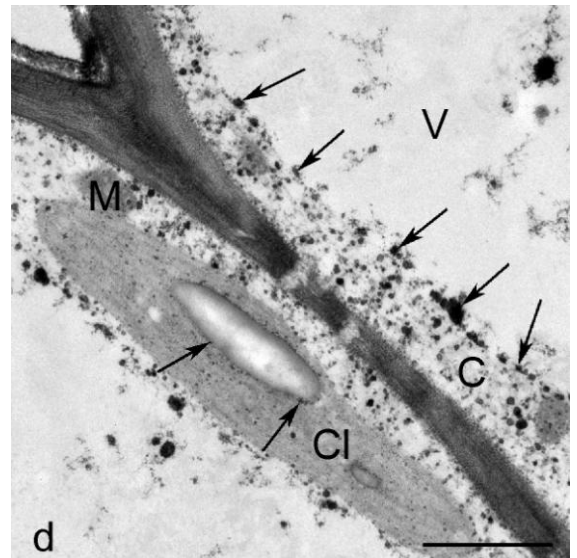
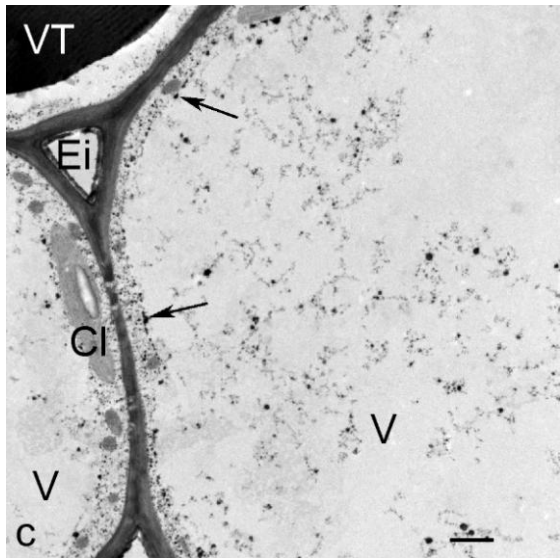
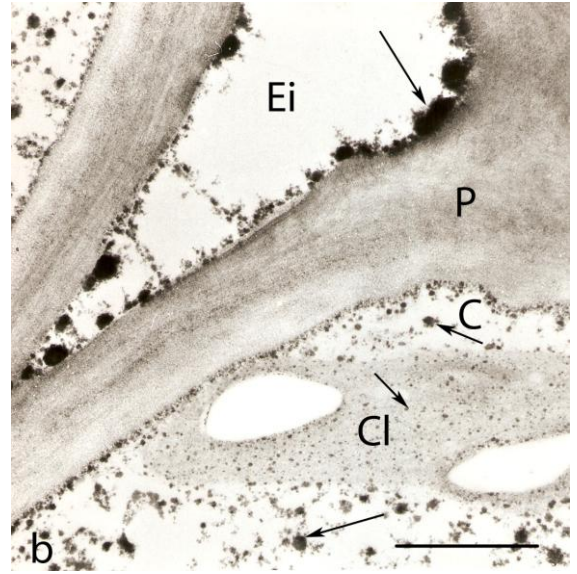
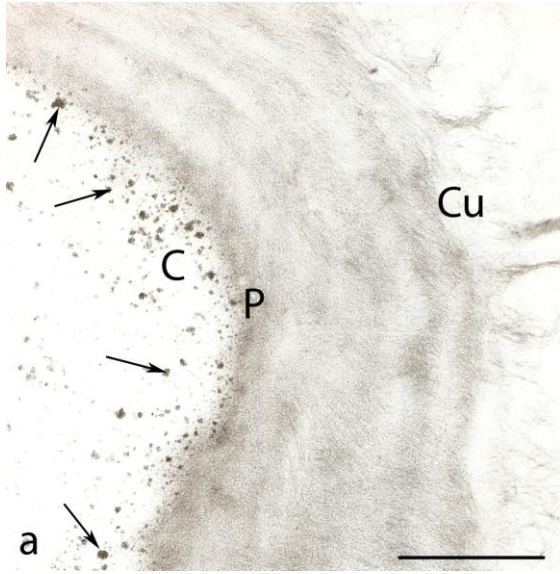


Figura 4.21a y b- Precipitados de piroantimoniato cálcico en el citoplasma de las células corticales de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* fijados según el **protocolo E**. Detalles en Material y Métodos, apartado 3.5.2. Las flechas señalan precipitados de diferente tamaño y forma. C, citoplasma; P, pared celular. Barra: 0,2 μ m.

En las células corticales externas se detectaron precipitados granulares en el citoplasma distribuidos de forma aleatoria, alineados junto a la pared celular, presumiblemente situados en la cara interna del plasmalema (Fig. 4.22b) y, a veces, rodeando los plastos que, esporádicamente mostraron diminutos precipitados en el estroma y rodeando los gránulos de almidón (Fig. 4.22d). Respecto al compartimento vacuolar, las vacuolas acuosas de algunas células mostraron abundantes precipitados distribuidos aleatoriamente y acumulados en el límite citoplasma-vacuola, previsiblemente en la cara vacuolar del tonoplasto (Figs. 4.22c y d). En cambio, en otras células, la mayoría de precipitados vacuolares se localizaban previsiblemente adosados a la cara interna del tonoplasto. No se observaron precipitados en las vacuolas de taninos que mostraban un aspecto muy electrodensito o altamente granular (Figs. 4.22c y e). También se localizaron precipitados en los núcleos, distribuyéndose aleatoriamente por el nucleoplasma y previsiblemente adosados a la cara interna de la doble membrana nuclear (Fig. 4.22f). Esporádicamente se observaron algunos precipitados en las mitocondrias.

En las células corticales internas con amiloplastos (Fig. 4.23a) o con cristales de oxalato cálcico (Fig. 4.23b) se formaron abundantes precipitados en el citoplasma. No se detectaron precipitados en los espacios ocupados por estos cristales. Excepcionalmente, se observó algún precipitado en las paredes de las células con concreciones cristalinas, concretamente en zonas de campos de puntuaciones con plasmodesmos (Fig. 4.23d). Abundantes precipitados en forma de gránulos circulares o de agregados de morfología irregular se localizaron en los espacios intercelulares, principalmente, adosados a las paredes celulares (Fig. 4.23b).

Figura 4.22- Localización citoquímica de Ca^{2+} mediante precipitación *in situ* con KPA en células epidérmicas (a) y corticales motoras externas (b, c, d, e, f) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*. Los pulvínulos se fijaron con glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8) durante 5 h (**protocolo E**) (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Precipitados de piroantimoniato cálcico (flechas); C, citoplasma; Cl, cloroplasto; Cu, cutícula; Ei, espacio intercelular; M, mitocondria; N, núcleo; P, pared celular; V, vacuola; VT, vacuola de taninos. Barra: 1 μm .



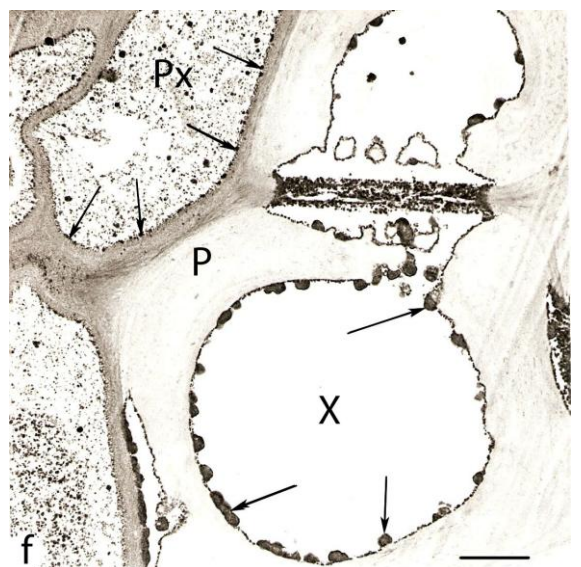
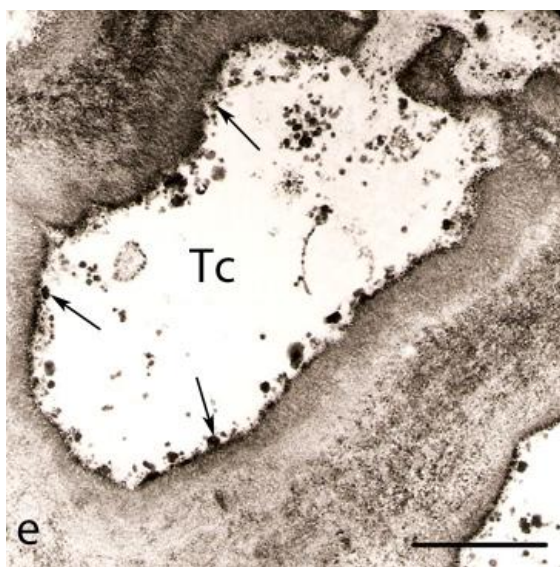
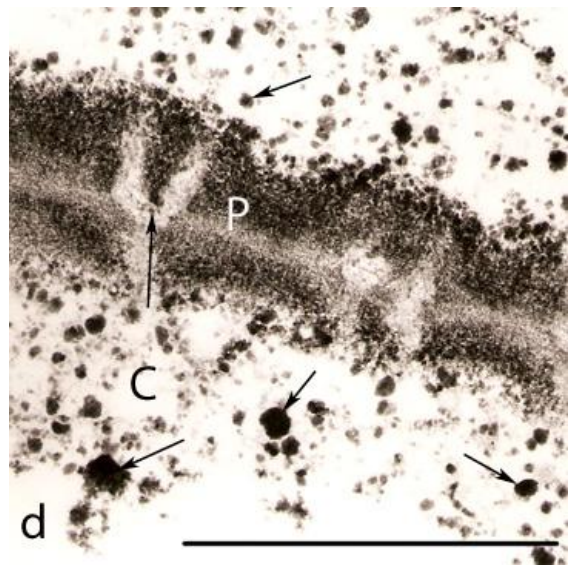
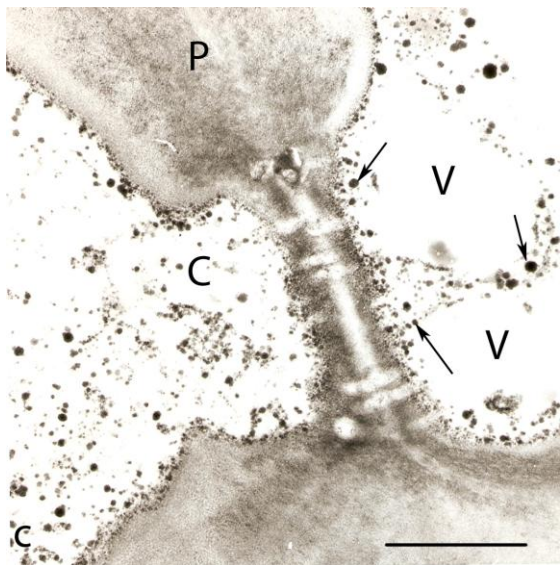
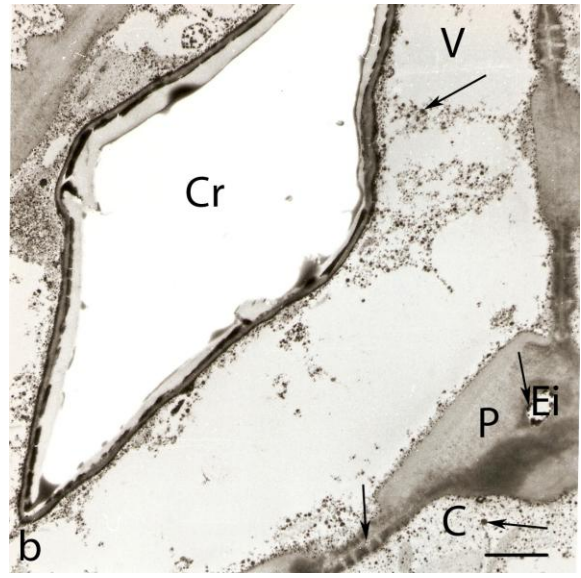
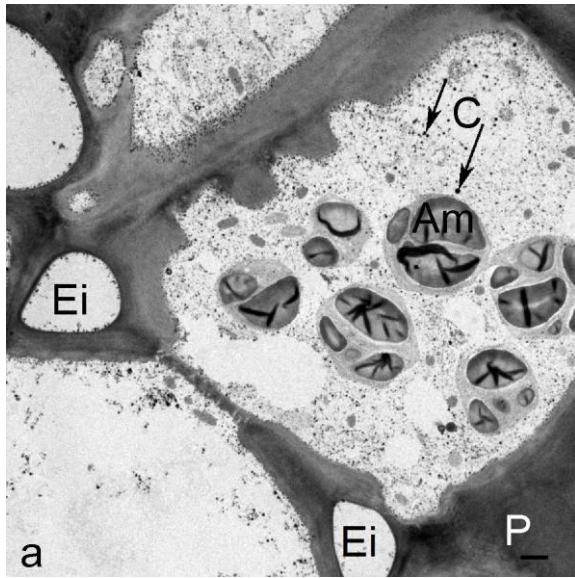
La distribución de precipitados en las células del colénquima coincidió con la observada en las células corticales internas. En el cilindro central, los precipitados se localizaron en el lumen y acumulados (a veces, formando una fina capa) previsiblemente junto al plasmalema y junto a las paredes celulares de los tubos cribosos y los vasos xilemáticos respectivamente (Figs. 4.23e y f). En las células de parénquima vascular se distribuían aleatoriamente en el citosol y alineados previsiblemente junto al plasmalema. No se observaron precipitados en las paredes celulares (Figs. 4.23e y f).

Las determinaciones microanalíticas de estos precipitados pusieron de manifiesto que contenían Ca y Sb (Figs. 3.9b, c y d; espectros de energía dispersiva de Rayos X. Material y Métodos, apartado 3.5.3) independientemente de su localización tisular y compartimentación intracelular. En cambio, en los espectros de energía dispersiva de Rayos X de la resina Spurr (Spurr, 1969) depositada sobre la membrana de Formvar no se detectó Ca, solamente se detectaron picos correspondientes a O, Si, Cl, Fe, Co y Cu. Tampoco se detectó Ca en la parte central (sin precipitados) de las vacuolas acuosas (Fig. 3.9e, espectros de energía dispersiva de Rayos X. Material y Métodos, apartado 3.5.3). De forma general, los espectros de energía dispersiva de Rayos X pusieron de manifiesto la existencia de Ca en las paredes (Fig. 3.9d, Material y Métodos, apartado 3.5.3), no se detectaron precipitados en las mismas.

Protocolo F

La disminución del contenido de glutaraldehído (2,5 % a 1 %) de la solución de fijación

Figura 4.23- Localización citoquímica de Ca^{2+} mediante precipitación *in situ* con KPA en células corticales motoras internas (**a, b, c, d**) y vasculares (**e, f**) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*. Los pulvínulos se fijaron con glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 % en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8) durante 5 h (**protocolo E**) (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Precipitados de piroantimoniato cálcico (flechas); Am, amiloplasto; C, citoplasma; Cr, cristal de oxalato cálcico; Ei, espacio intercelular; P, pared celular; Px, parénquima xilemático; Tc, tubo criboso; V, vacuola; X, vaso xilemático. Barra: 1 μm .



(fijación con **KPA 4 % - glutaraldehido 1 % - paraformaldehido 2 % - fenol 1 %**) disminuyó la preservación ultraestructural, principalmente de las células corticales externas, y aparentemente no alteró la diversidad de morfologías y tamaños de los precipitados de piroantimoniato cálcico (Figs. 4.24a y b). No se visualizó ninguna membrana. El tamaño del compartimento vacuolar transparente a los electrones se redujo considerablemente. En algunas células, el citoplasma, de aspecto muy laxo, ocupaba prácticamente todo el volumen celular. Las mitocondrias y los plastos mostraban un estroma más electrodensito que el citoplasma. Con este método de fijación se formaron numerosos precipitados en el citoplasma y escasos precipitados en los cloroplastos, mitocondrias (Fig. 4.24b) y las vacuolas acuosas. No se detectaron precipitados en las vacuolas de taninos. Las paredes celulares mostraron una elevada electrodensidad. No se detectaron precipitados en las paredes pero éstos eran abundantes en los espacios intercelulares.

Protocolo G

La fijación con **KPA 4 % - paraformaldehido 2 % - fenol 1 %** alteró profundamente la ultraestructura celular y también la distribución de precipitados. Las células corticales, principalmente las más externas (Fig. 4.24c), presentaban una acusada plasmólisis, un citoplasma muy laxo y reducción del volumen vacuolar. No se visualizaron las membranas celulares y, en general, resultaba imposible identificar los orgánulos celulares salvo: **a)** los cloroplastos por la presencia de gránulos de almidón (Fig. 4.24d) y, **b)** los núcleos por su nucleoplasma altamente granular. Con este método de fijación, a pesar de incorporar **KPA 4 %**, disminuyó sensiblemente la cantidad de precipitados citoplasmáticos, en el límite citoplasma-vacuola y en los espacios intercelulares donde se distribuían formando una capa continua.

De estas observaciones se seleccionó el **protocolo E** (fijación con **KPA 4 % - glutaraldehido 2,5 % - paraformaldehido 2 % - fenol 1 %**) para la localización de Ca^{2+} porque: **a)** la preservación ultraestructural era adecuada para identificar los principales orgánulos celulares, **b)** al eliminar la osmificación no se observaban las membranas celulares pero disminuía el ruido de fondo del microanálisis y, **c)** la pauta de distribución de precipitación de Ca^{2+} era altamente repetitiva. Así pues, el protocolo E se usó para

procesar los pulvínulos con el fin de investigar posibles cambios en la distribución de Ca^{2+} durante el cierre nictinástico bajo control de phy(s).

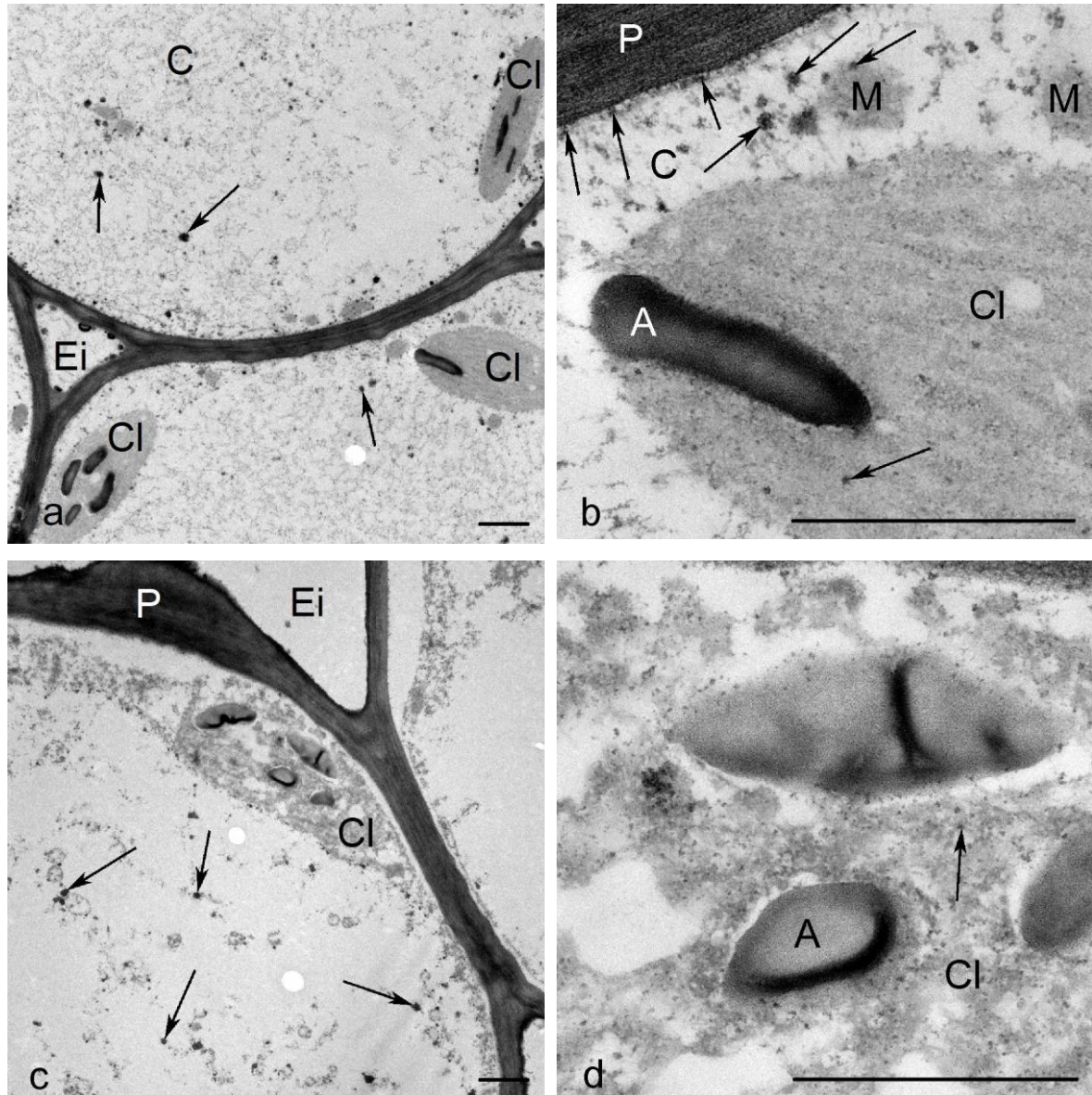


Figura 4.24- Detalles ultraestructurales de células corticales motoras en secciones transversales ultrafinas de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* procesados con distintas soluciones de fijación en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,8) durante 5 h.

a y b) protocolo F: glutaraldehído 1 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 %.

c y d) protocolo G: paraformaldehído 2 % - fenol 1 % con KPA 4 %.

Más explicación en Material y Métodos, apartado 3.5.2. Precipitados de piroantimoniato cálcico (flechas); A, almidón; C, citoplasma; Cl, cloroplasto; Ei, espacio intercelular; M, mitocondria; P, pared celular. Barra: 1 μm .

4.3.2.- Distribución de precipitados de Ca^{2+} en los pulvínulos secundarios durante el cierre nictinástico controlado por fitocromo(s).

El cierre nictinástico de los folíolos de *R. pseudoacacia* depende de la fotoconversión del/los phy(s). Este efecto no se observa inmediatamente después de aplicar las irradiaciones R o FR, pero es evidente después de 30 min. El cierre de los folíolos irradiados con R ($83 \pm 10,95$; $n = 8$) es superior a los irradiados con FR ($24 \pm 6,7$; $n = 8$). En los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* - procesados inmediatamente o a los 30 min de una irradiación R o FR aplicada a las 2 h del fotoperiodo - la distribución de precipitados de Ca^{2+} fue similar a la del material procesado a las 2 h del fotoperiodo (apartado 4.3.1) aunque aparentemente disminuyó el número de precipitados. En general, estos precipitados mostraron forma granular y diversidad de tamaños.

En las células epidérmicas se formaron precipitados granulares en el citoplasma, que se distribuían aleatoriamente y alineados previsiblemente en la cara citoplasmática del plasmalema (Fig. 4.25a). En la pared celular no se detectaron precipitados al igual que en la cutícula.

En las células corticales externas (extensoras y flexoras) también se detectaron precipitados citoplasmáticos distribuidos aleatoriamente y alineados previsiblemente junto al plasmalema. El tamaño de los precipitados variaba considerablemente pero aparentemente eran de mayor tamaño en los pulvínulos irradiados con FR (Figs. 4.26a-d). No se detectaron precipitados en las vacuolas de taninos ni en la parte central de las vacuolas acuosas (Figs. 4.25b y 4.27a) si bien éstos se acumulaban delimitando estas vacuolas previsiblemente adosados a la cara vacuolar del tonoplasto (Figs. 4.25c y 4.26a). También se formaron precipitados en los núcleos, distribuyéndose aleatoriamente por el nucleoplasma (Fig. 4.25d) y en los espacios intercelulares (Figs. 4.25b y c). En las células corticales internas con amiloplastos se formaron precipitados en el citoplasma y esporádicamente se observaron diminutos precipitados en el estroma de los plastos y sobre los gránulos de almidón (Fig. 4.27b).

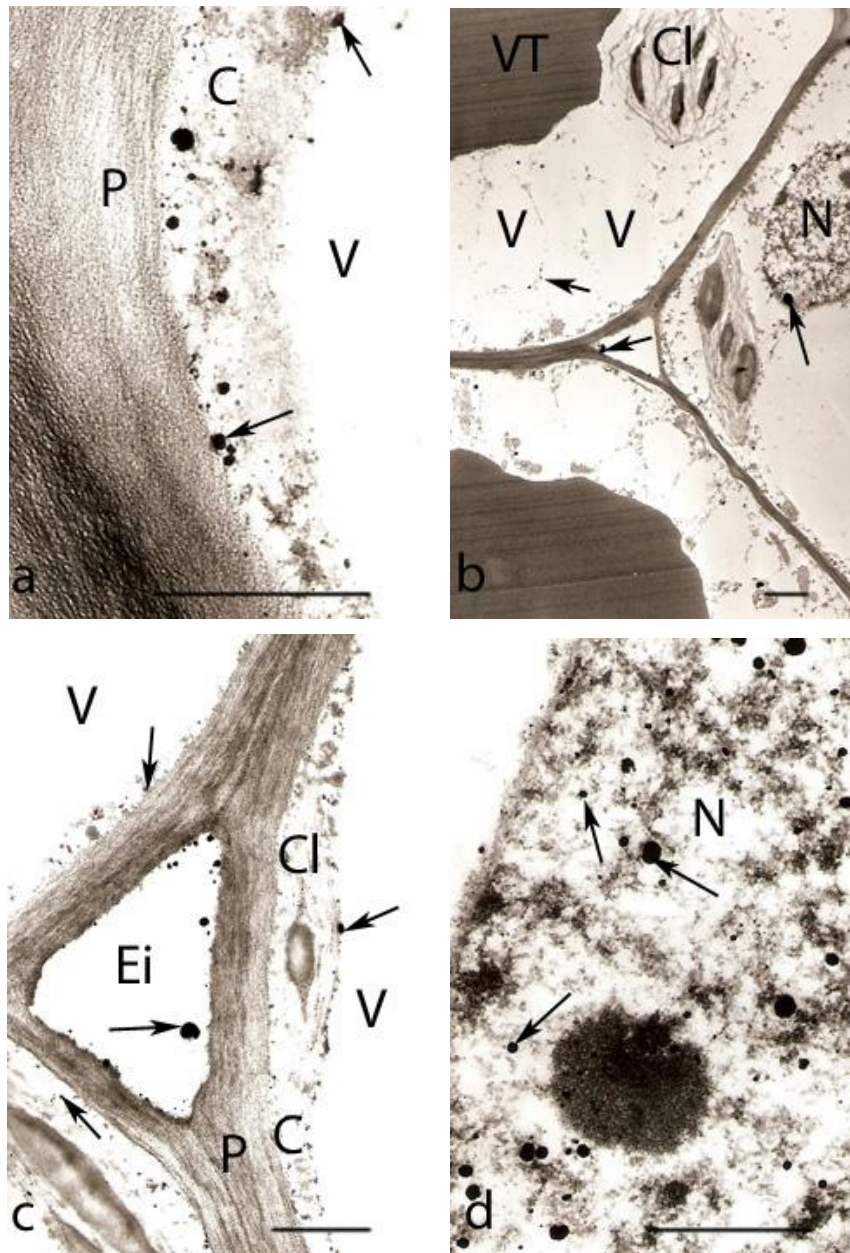


Figura 4.25- Localización citoquímica de Ca^{2+} mediante precipitación *in situ* con KPA 4 % en células epidérmicas (a) y corticales motoras externas (b, c, d) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*, procesados inmediatamente después de una irradiación **R** aplicada a las 2 horas del fotoperiodo. El material se procesó según el **protocolo E** (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Precipitados de piroantimoniato cálcico (flechas); C, citoplasma; Cl, cloroplasto; Ei, espacio intercelular; N, núcleo; P, pared; V, vacuola; VT, vacuola de taninos. Barra: 1 μm .

En el cilindro central (Figs. 4.27c y d), los precipitados se localizaron en el lumen, alineados previsiblemente junto al plasmalema y junto a las paredes de los tubos cribosos y vasos xilemáticos respectivamente. También se observaron precipitados en el citosol de las células del parénquima vascular. No se detectaron precipitados en los espacios ocupados por los cristales de oxalato cálcico (Fig. 4.27c) ni en las paredes celulares.

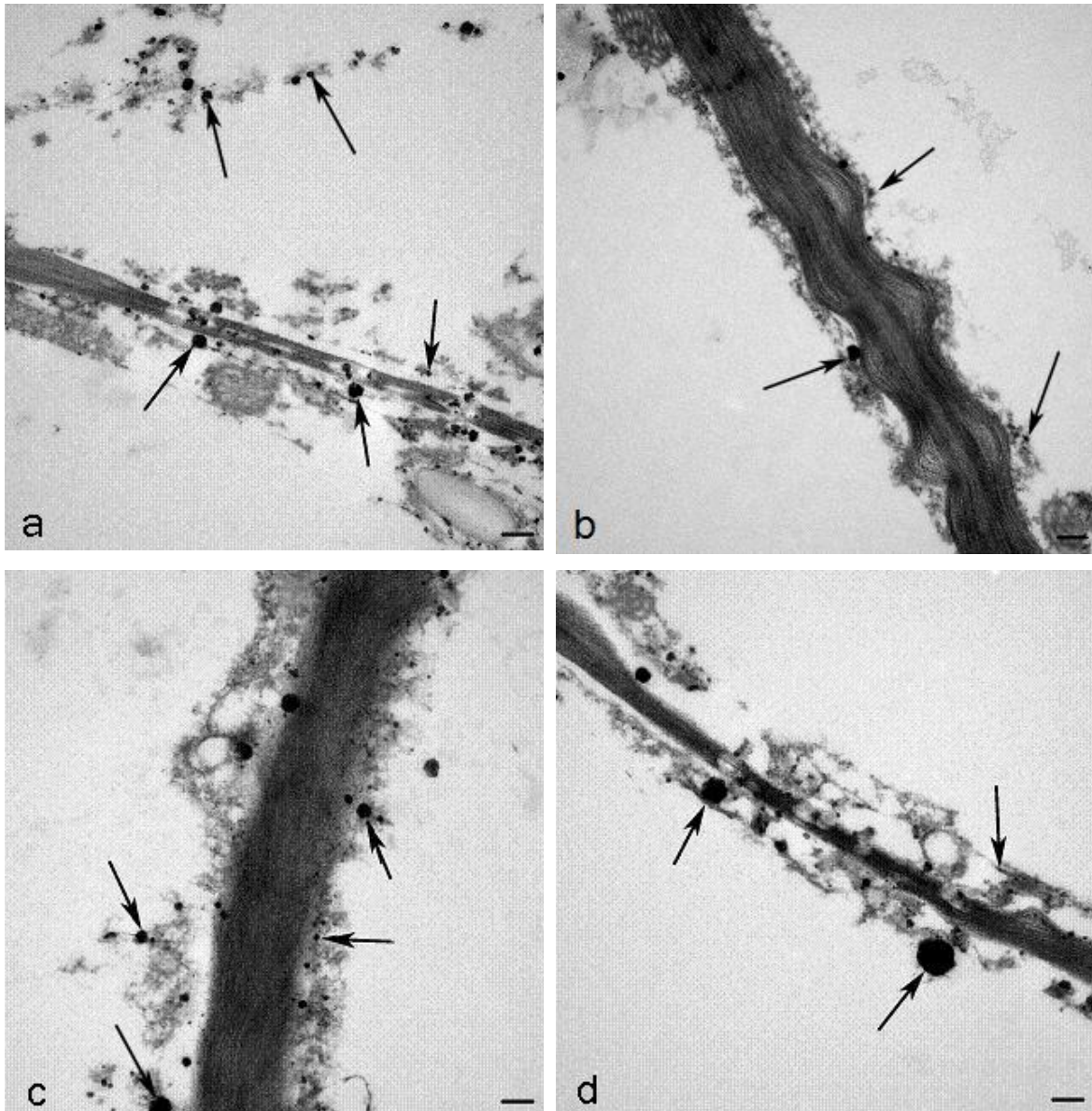


Figura 4.26- Precipitados de **piroantimoniato cálcico** en células corticales externas extensoras (**a, c**) y flexoras (**b, d**) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia*. Los pulvínulos se irradiaron con luz **R** (**a, b**) o **FR** (**c, d**) a las 2 h del fotoperiodo y se procesaron según el **protocolo E** (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Las flechas señalan precipitados de piroantimoniato cálcico citosólicos de diferente tamaño. Barra: 0,2 μm .

Un análisis más detallado de la compartimentación subcelular de Ca^{2+} en las zonas extensoras y flexoras de pulvínulos irradiados con R o FR evaluando: **a)** el número de precipitados de Ca^{2+} por μm^2 de citoplasma (Tabla 4.8), **b)** la superficie de precipitados por μm^2 de citoplasma (Fig. 4.28) y, por extensión, **c)** el tamaño medio estimado de los precipitados citoplasmáticos (Tabla 4.9), puso de manifiesto cambios relevantes según el tratamiento luminoso aplicado.

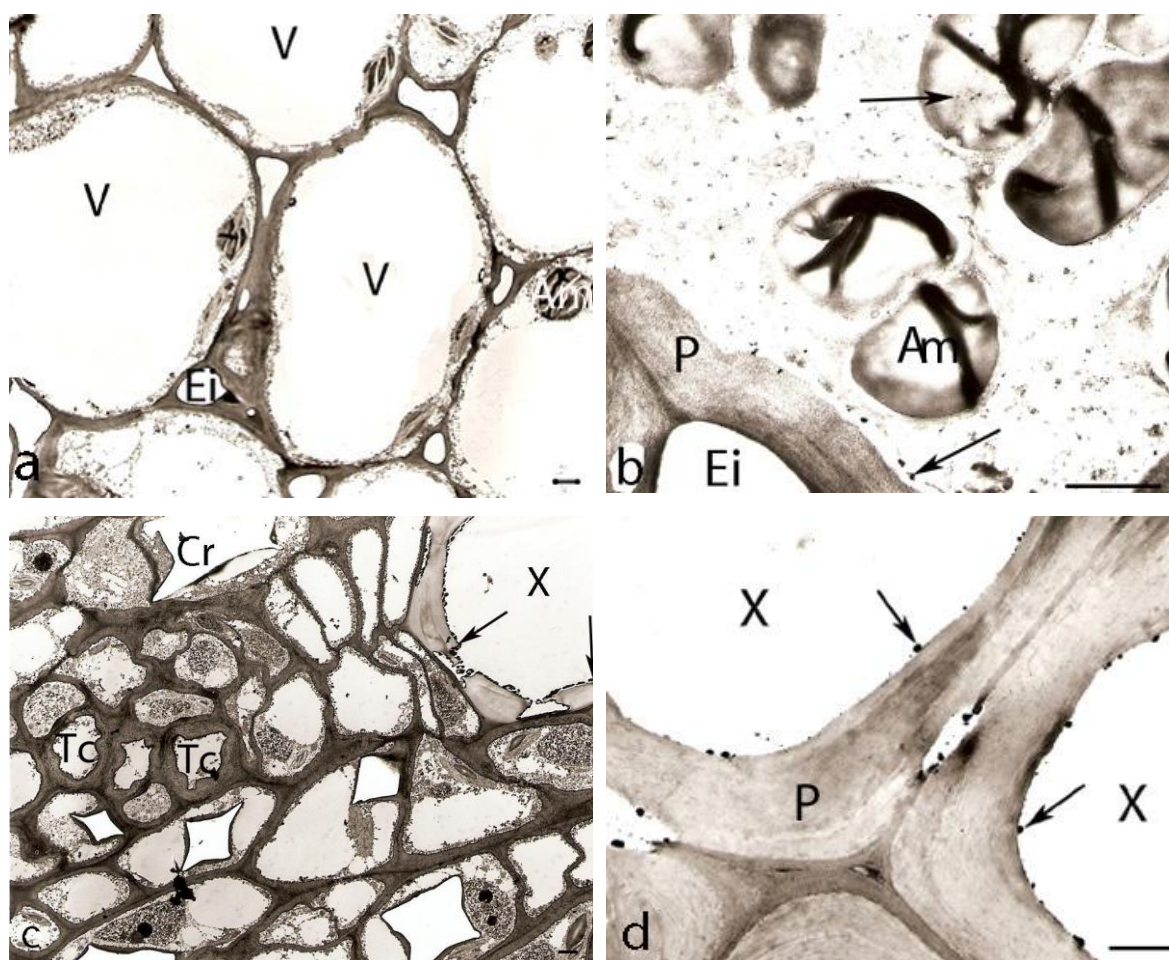


Figura 4.27- Localización citoquímica de Ca^{2+} mediante precipitación *in situ* con KPA 4 % en células corticales motoras internas (**a, b**) y células del cilindro central (**c, d**) de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* procesados inmediatamente después de una irradiación **R** aplicada a las 2 horas del fotoperiodo. El material se procesó según el **protocolo E** (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Precipitados de piroantimoniato cálcico (flechas); Am, amiloplasto; Cl, cloroplasto; Cr, cristal de oxalato cálcico; Ei, espacio intercelular; P, pared; Tc, tubo criboso; V, vacuola; X, vaso xilemático. Barra: 1 μm .

Pulvínulos irradiados con luz R.

En los pulvínulos, procesados inmediatamente después de un pulso de luz R, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} ($53,5 \pm 3,9 \text{ p.}\mu\text{m}^{-2}$ citosol, Tabla 4.8) así como la superficie que ocupan ($0,38 \pm 0,05 \mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ citosol, Fig. 4.28) y su tamaño medio estimado ($7072 \pm 420 \text{ nm}^2$, Tabla 4.9) fueron máximos en el citoplasma de las células extensoras. Estos valores disminuyeron aproximadamente en un 73 %, 82 % y 31 % respectivamente en las células flexoras (Tablas 4.8 y 4.9, Fig. 4.28). Tanto en las células extensoras como en las flexoras el número de precipitados de Ca^{2+} citosólico superó al detectado en el compartimento vacuolar (precipitados adosados a la cara vacuolar del tonoplasto), núcleo y espacios intercelulares. En general, salvo en los espacios intercelulares, los precipitados de Ca^{2+} fueron más abundantes en las células extensoras que en las flexoras.

Después de 30 min de oscuridad, disminuyó la abundancia de precipitados de Ca^{2+} en todos los compartimentos de las células extensoras y flexoras excepto en los espacios intercelulares de la zona extensora que se mantuvo invariable (Tabla 4.8). En estas condiciones, en las células extensoras el número de precipitados de Ca^{2+} citosólico fue similar al de los espacios intercelulares y el núcleo (Tabla 4.8). En cambio, en las células flexoras la abundancia de Ca^{2+} citosólico superó a la de los otros compartimentos celulares que era extremadamente baja y no difería entre sí (Tabla 4.8). Respecto a los precipitados citosólicos, su abundancia y superficie ocupada disminuyó acusadamente en un 91,59 % en las células extensoras (Tabla 4.8, Fig. 4.28) después de 30 min de oscuridad. En las células flexoras también disminuyó el número de precipitados citosólicos, un 76,92 %, sin variar la superficie ocupada (Tabla 4.8, Fig. 4.28). Este resultado, aparentemente contradictorio, puede explicarse por el tamaño de los precipitados que no varió en las células extensoras pero aumentó considerablemente ($\times 3,7$) en las flexoras (Tabla 4.9). Así pues, a los 30 min de oscuridad después de una irradiación R, la abundancia y área ocupada por los precipitados de Ca^{2+} citoplasmático así como la abundancia de precipitados vacuolares y nucleares no difería entre las células extensoras y flexoras. Al contrario, el número de precipitados de Ca^{2+} de los espacios intercelulares de la zona extensora superaba al de la zona flexora (Tabla 4.8).

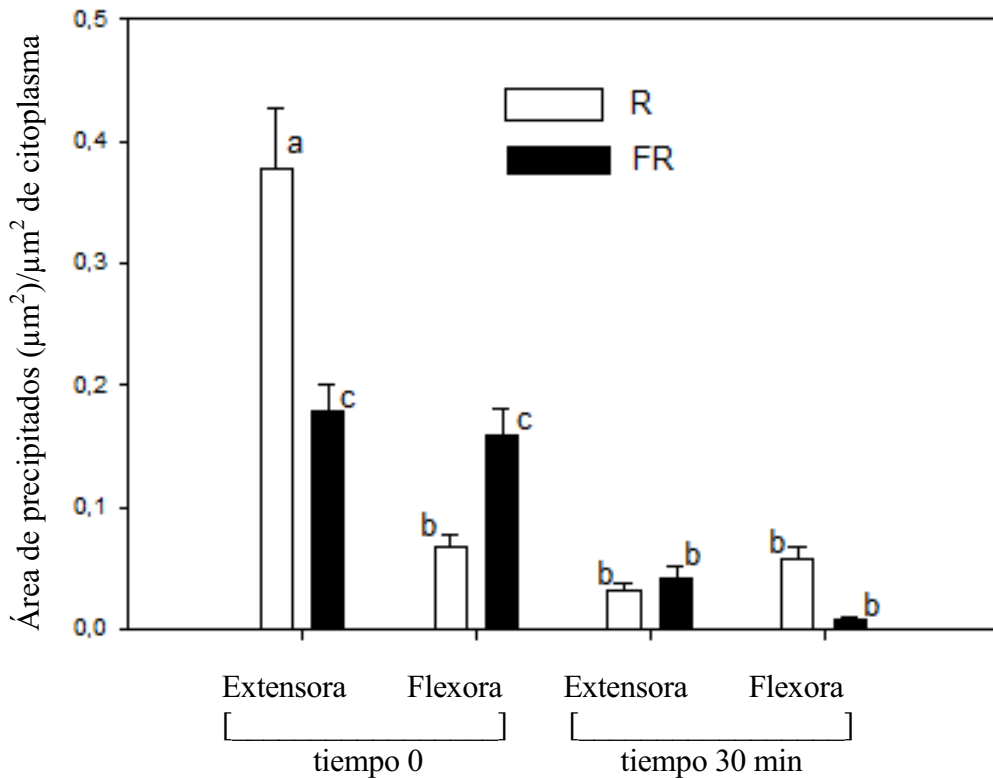


Figura 4.28- Área ocupada por los precipitados de piroantimoniato cálcico por μm^2 de citoplasma de las células corticales externas extensoras y flexoras de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* irradiados con un pulso de luz R (15 min) o de FR (5 min) a las 2 h del fotoperiodo. Inmediatamente después de aplicar estas irradiaciones (tiempo 0) o bien después de 30 min de oscuridad (tiempo 30 min) los pulvínulos se procesaron según el protocolo E (Material y Métodos, apartado 3.5.2). Los valores corresponden a la media \pm SE de 10 zonas analizadas (n=10). Las diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$).

Pulvínulos irradiados con luz FR.

En los pulvínulos - procesados inmediatamente después de una irradiación FR - la abundancia de precipitados de Ca^{2+} citosólico de las células extensoras ($11,2 \pm 2 \text{ p.}\mu\text{m}^{-2}$, Tabla 4.8) superó ligeramente a la de las células flexoras ($7,2 \pm 1,3 \text{ p.}\mu\text{m}^{-2}$, Tabla 4.8) pero, no se detectaron diferencias en la superficie ocupada por estos precipitados (Fig. 4.28) previsiblemente a causa de diferencias en su tamaño medio estimado, más elevado en las células flexoras que en las extensoras (Tabla 4.9). Tanto en las células extensoras como en las flexoras el tamaño medio estimado de los precipitados de Ca^{2+} citosólico formados inmediatamente después de una irradiación FR fue superior al de los formados después de irradiar con R (Tabla 4.9), en concordancia con las observaciones mediante

Tabla 4.8.- Abundancia de precipitados de piroantimoniato cálcico en células motoras extensoras y flexoras de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* durante el cierre nictinástico. Los pares de folíolos se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) a las 2 h del fotoperiodo e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Al inicio de la oscuridad (t_0) y 30 min más tarde (t_{30}) se aislaron los pulvínulos secundarios y se procesaron según el protocolo E (Material y Métodos, apartado 3.5.2). La abundancia (número de precipitados (p) por μm^2) corresponde a la media \pm SE (n = 4).

Compartimentos celulares	R						FR							
	t_0			t_{30}			t_0			t_{30}				
	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)	Extensora (p/ μm^2)	Flexora (p/ μm^2)		
Citosol	53,5 \pm 3,9	14,3 \pm 1,4	4,5 \pm 1,5	3,3 \pm 0,1	11,2 \pm 2	7,2 \pm 1,3	8,3 \pm 1,3	4,0 \pm 1	8,5 \pm 2,4	4,5 \pm 1,5	1,0 \pm 0	0,7 \pm 0,2	9,0 \pm 3,2	4,5 \pm 1,5
Vacuola	5,0 \pm 0	2,0 \pm 1	2,5 \pm 1,5	0,5 \pm 0,5	11,3 \pm 3,6	5,5 \pm 1,5	16,5 \pm 7,5	10,0 \pm 3,6	3,0 \pm 0	8,0 \pm 1	5,5 \pm 2,5	1,3 \pm 0,9	13,2 \pm 4,3	5,0 \pm 2,9
Núcleo														
Espacio intercelular														

p/ μm^2 = número de precipitados por μm^2

Tabla 4.9.- Superficie media de los precipitados citoplasmáticos de piroantimoniato cálcico en células motoras extensoras y flexoras de pulvínulos secundarios de *Robinia pseudoacacia* durante el cierre nictinástico. Los pares de folíolos se irradiaron con R (15 min) o FR (5 min) a las 2 h del fotoperíodo e inmediatamente se trasladaron a la oscuridad. Al inicio de la oscuridad (t_0) y 30 min más tarde (t_{30}) se aislaron los pulvínulos secundarios y se procesaron según el protocolo E (Material y Métodos, apartado 3.5.2). La superficie media de los precipitados citoplasmáticos corresponde a la relación entre el área y el número de precipitados por μm^2 de citoplasma \pm SE (n = 2).

	R				FR			
	t_0		t_{30}		t_0		t_{30}	
	Extensora	Flexora	Extensora	Flexora	Extensora	Flexora	Extensora	Flexora
a/ μm^2	0,38 \pm 0,05	0,07 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,01 \pm 0
p/ μm^2	53,5 \pm 3,9	14,3 \pm 1,4	4,5 \pm 1,5	3,3 \pm 0,1	11,2 \pm 2	7,2 \pm 1,3	8,3 \pm 1,3	4,0 \pm 1
s (nm ²)	7072 \pm 420	4873 \pm 222	6666 \pm 0	18106 \pm 2488	16271 \pm 1123	22452 \pm 1279	4746 \pm 462	2501 \pm 62

a/ μm^2 = área de precipitados citoplasmáticos (μm^2) por μm^2 de citoplasma

p/ μm^2 = número de precipitados citoplasmáticos por μm^2 de citoplasma

s= superficie media de los precipitados citoplasmáticos

TEM (Fig. 4.26). En las células extensoras, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} citosólico fue similar a la del núcleo y superior a la vacuolar (x 16) y la de los espacios intercelulares (x 8,6) que no diferían entre sí. En cambio, en las células flexoras, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} fue similar en los 4 compartimentos considerados (Tabla 4.8). Después de un pulso de FR, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} en los espacios intercelulares y las vacuolas de las células flexoras superó a la de las extensoras. Por el contrario, el número de precipitados de Ca^{2+} nuclear fue más elevado en las células extensoras (Tabla 4.8).

Después de 30 min de oscuridad, no varió el número de precipitados de Ca^{2+} citosólico de las células extensoras pero disminuyó la superficie que ocupan ($\approx 78\%$) así como su tamaño medio estimado ($\approx 70\%$) (Tabla 4.9). En las células flexoras disminuyó el número de precipitados citosólicos ($\approx 45\%$), la superficie que ocupan ($\approx 93\%$) y su tamaño medio estimado ($\approx 90\%$) (Tabla 4.9). En estas condiciones, la superficie ocupada por estos precipitados no difería significativamente entre las células extensoras y flexoras (Fig. 4.28). Además, los valores obtenidos tampoco diferían significativamente de los hallados: **a)** en las células extensoras y flexoras a los 30 min de una irradiación R y, **b)** en las células flexoras inmediatamente después de una irradiación R (Fig. 4.28). Respecto a los otros compartimentos celulares, después de 30 min de oscuridad, no se detectaron cambios en las células flexoras pero aumentó la abundancia de precipitados de Ca^{2+} en los espacios intercelulares (x 10) y en las vacuolas (x 12,8) de las células extensoras (Tabla 4.8). Así pues, a los 30 min de oscuridad después de una irradiación con FR, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} citosólico y de los espacios intercelulares de las células extensoras superó a la de las flexoras. En cambio, la abundancia de precipitados de Ca^{2+} en núcleos y vacuolas no difería entre las células extensoras y flexoras (Tabla 4.8).

5.-DISCUSIÓN

5.1.- Optimización de la metodología.

5.1.1.- Preparación de material vegetal para la localización de azúcares solubles por autorradiografía – microscopía óptica y electrónica.

La aplicación de la autorradiografía para la localización de compuestos a nivel estructural y/o ultraestructural depende de una correcta preparación del material vegetal, más cuando se desean localizar azúcares solubles pues debe evitarse su redistribución. En este trabajo, para reducir al máximo este problema, se ensayaron varios criométodos que difieren en la criofijación, criosustitución y crioinclusión. Se consideró, de forma especial, la criofijación, posiblemente el paso más importante de una criotécnica aunque, en la práctica, el resultado también depende de la criosustitución y la crioinclusión.

La criofijación por enfriamiento en un líquido criogénico es un método ampliamente usado en microautorradiografía de componentes solubles en plantas (Thangstad y col., 2001, Deeken y col., 2002, Bucking y col., 2004) y empleado previamente, por nuestro grupo, para detectar la composición elemental de pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* por microanálisis de Rayos X usando como líquido criogénico una mezcla de metilciclohexano 8 % en 2-metilbutano (Moysset y col., 1991b). En este trabajo la criofijación mediante propano como líquido criogénico, resultó totalmente inadecuada para la preservación ultraestructural de las células pulvinulares de *R. pseudoacacia* independientemente de la solución de criosustitución empleada y de la resina usada en la inclusión.

Los resultados han sido positivos cuando la criofijación se realizó por proyección de segmentos de pulvínulos contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido, uno de los métodos más satisfactorios de criofijación (Quintana, 1994) que no se utiliza mucho en plantas. Este tipo de criofijación es más cara y lenta (entre muestra y muestra el bloque metálico debe calentarse a temperatura ambiente) que la anterior pero tiene la ventaja de producir excelente congelación en una superficie relativamente amplia a pesar de que el grosor de la zona bien preservada oscila entre 1-3 μm , valor inferior al obtenido cuando la criofijación se realiza en un líquido criogénico que oscila entre 5-25 μm (Quintana, 1994;

López-Iglesias, C., comunicación personal).

La criodeshidratación fue llevada a cabo por criosustitución en acetona 100 % de acuerdo con Moysset y col. (1991b) o en metanol 100 %, y la inclusión en Lowicryl HM20 y Spurr. La criosustitución en metanol 100 % se efectuó porque este solvente disuelve los cristales de hielo más rápidamente y a temperatura más baja que la acetona 100 % y, en general, preserva adecuadamente la ultraestructura (Robards, 1991) aunque puede también alterarla de forma negativa (Audit y col., 1996). La crioinclusión en Lowicryl HM20 es muy adecuada para retener la distribución espacial de componentes solubles (Robards, 1991), pues se trata de una resina hidrofóbica no polar de muy baja viscosidad por lo que penetra con relativa facilidad en los tejidos y que polimeriza en presencia de luz UV a baja temperatura (-50°C). Esta resina se ha empleado con éxito en la preparación de distintos materiales vegetales para microautorradiografía (Hippe, 1987; Kaneda y col., 2008). Sin embargo, en nuestro material no dio resultados satisfactorios a nivel ultraestructural probablemente por una inadecuada infiltración de la resina a bajas temperaturas (Robards, 1991) debido a las características estructurales de los pulvínulos. La criosustitución en metanol 100 % puede haber contribuido también a este resultado negativo ya que como solvente de lípidos puede provocar drásticas pérdidas de citoplasma (Audit y col., 1996). En comparación, la ultraestructura fue sensiblemente superior en el material sometido a criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e incluido en Spurr, resina ampliamente usada en otros sistemas vegetales para localizar, por autorradiografía, diversas moléculas (Saunders y Conn, 1977; Evans y col., 1982; Maule y Ride, 1982; Deeken y col., 2002; Bücking y col., 2004).

En conclusión, de la evaluación de los distintos protocolos considerando la preservación estructural y ultraestructural se seleccionó la criofijación por proyección de segmentos de pulvínulos contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido, seguida de criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e inclusión en Spurr (protocolo 4). Además, el material procesado según este protocolo también mostró buena preservación ultraestructural después del proceso de autorradiografía. Asimismo, la evaluación cuantitativa de los autorradiogramas fue satisfactoria pues aunque el número de granos fue bajo, su distribución fue muy concreta repitiéndose en distintas muestras.

5.1.2.- Preparación de material vegetal para la localización de Ca^{2+} mediante precipitación con piroantimoniato potásico. Validez del método.

De las diferentes formas celulares de calcio - ligado, almacenado y libre (Bush, 1995) - el método de precipitación con KPA es útil para la localización de Ca^{2+} almacenado denominado también ligeramente ligado o intercambiable (Lazzaro y Thomson, 1992). La forma ligada se encuentra, por ejemplo, en formas cristalinas (cristales de oxalato cálcico), y no reacciona con el KPA. El Ca^{2+} libre es soluble y se localiza en el citosol a concentración tan baja (100-200 nM) (Day y Reddy, 2011) que está al límite de detección (Wick y Hepler, 1982) o es indetectable (Bush, 1995) mediante esta metodología. En comparación, el Ca^{2+} almacenado o ligeramente ligado se encuentra a concentraciones más elevadas (superiores a 1 μM) que el libre, reacciona con el KPA y se localiza principalmente en la pared celular, en orgánulos concretos (vacuolas, mitocondrias, núcleo, entre otros) y está asociado a proteínas, lípidos o carbohidratos. Este tipo de Ca^{2+} está en equilibrio dinámico con el Ca^{2+} libre citosólico y puede transformarse en éste en respuesta a una señal (Wick y Hepler, 1982). De este modo, el estudio del Ca^{2+} ligeramente ligado es, de especial interés, por su contribución a la regulación de todos aquellos procesos celulares que requieren la activación dinámica de Ca^{2+} libre citosólico, el cual actúa como segundo mensajero, aspecto comentado en Introducción, apartado 1.3.6.1.

La aplicación de esta metodología requiere considerar varios aspectos o limitaciones como: **a)** la especificidad de la precipitación de Ca^{2+} pues el piroantimoniato también reacciona con otros cationes mono (Na^+ , K^+) y divalentes (Mg^{2+}) (Material y Métodos, apartado 3.5), **b)** la posible pérdida y redistribución de cationes durante la fijación, **c)** la posible disolución y/o redistribución de precipitados durante la deshidratación, inclusión y contrastado y además, **d)** la preservación ultraestructural del material vegetal. Asimismo, debe aceptarse que no es apropiada para obtener valores absolutos de la concentración de Ca^{2+} pero sí valores relativos o estimas semicuantitativas (Slocum y Roux, 1982).

La fijación es de suma importancia en determinar la especificidad de la

precipitación y redistribución de Ca^{2+} . En general se usan mezclas de KPA 2-4 % con glutaraldehído 2-3 % \pm paraformaldehído 2 % o con OsO_4 1-2 % (Trillas-Gay y Arous, 1993; Qin y col., 2005; Li y col., 2007; Ma y col., 2009; Otulak y Garbaczewska, 2011). Ni el glutaraldehído ni el OsO_4 afectan la especificidad ni el umbral de la reacción de los cationes con el KPA (Wick y Hepler, 1982). Las tres soluciones de fijación (E, F y G) ensayadas en los pulvínulos de *R. pseudoacacia* estaban formadas de una solución sobresaturada de KPA 4 % para una rápida precipitación de Ca^{2+} (Mentré y Escaig, 1988) y distintas concentraciones de glutaraldehído (2,5 %, 1 % y 0 %). Además, para acelerar el proceso de fijación y reducir la redistribución y difusión de cationes hacia el exterior se añadió: **a)** fenol 1 % que facilita la penetración del fijador sin alterar la afinidad del Ca^{2+} por el KPA (Mentre y Scaig, 1988) y, **b)** paraformaldehído 2 %, compuesto de penetración más rápida que el glutaraldehído y que actúa estabilizando rápida y temporalmente estructuras celulares que posteriormente se fijan permanentemente por acción del glutaraldehído. La osmificación se omitió dado que la mayor parte del Ca^{2+} precipita con el glutaraldehído (Hayat, 1993) y, además, porque de este modo: **a)** los precipitados se identificaban como depósitos de piroantimoniato, no como gránulos osmófilos (Tandler y col., 1970) y, **b)** se eliminaba la contribución del Os al espectro de energía dispersiva de Rayos X (Jessen y col., 1976). La preferencial precipitación del Ca^{2+} se facilitó tamponando el glutaraldehído con una elevada concentración de tampón fosfato (0,1 M) a pH ligeramente alcalino (Hayat, 1993) y, además, eliminando las sales relativamente solubles de piroantimoniato potásico y sódico lavando el material vegetal solamente con tampón fosfato (sin antimoniato) antes de la deshidratación (Klein y col., 1972). Finalmente, la formación de estos complejos insolubles de piroantimoniato cálcico se confirmó mediante microanálisis de Rayos X.

Los resultados obtenidos, en concordancia con lo esperado, demuestran la importancia del glutaraldehído en la fijación: al disminuir su concentración (1 %-protocolo F y 0 %-protocolo G) disminuyó la preservación ultraestructural y también, en distinto grado, el número y distribución de precipitados. La fijación del material con KPA 4 %, glutaraldehído 2,5 %, paraformaldehído 2 % y fenol 1 % (protocolo E) resultó adecuada para la preservación ultraestructural (en cuanto a identificación de orgánulos celulares, no de membranas por falta de osmificación) y la formación de precipitados en

forma de gránulos y agregados de distintos tamaños en los que se confirmó la presencia de Ca^{2+} mediante microanálisis de Rayos X como se ha comentado en el párrafo anterior. Evidentemente, la presencia de precipitados no permite excluir posibles pérdidas y redistribución de Ca^{2+} durante la manipulación y procesamiento del material. No obstante, puede aceptarse que la pauta de distribución de los precipitados corresponde a la distribución de Ca^{2+} en base a: **1)** la formación de precipitados en todos los tejidos pulvulares lo que indica la ausencia o relativamente baja migración de este catión hacia el medio externo, **2)** la distribución subcelular concreta (no aleatoria) de los precipitados y, **3)** la repetitividad de los resultados en distintas muestras. En conclusión, el método se considera apropiado para investigar los efectos de las irradiaciones R y FR en la localización *in situ* de Ca^{2+} intercambiable en los pulvínulos.

Esta metodología se ha usado ampliamente en animales y vegetales para la localización *in situ* de Ca^{2+} y demostrar su implicación en procesos muy diversos. Como ejemplos destacan, la localización de Ca^{2+} en el xilema de plantas leñosas (Plavcová y Hacke, 2011), en hipocotilos de *Linum usitatissimum* (Jauneau y col., 1997) y *Vigna radiata* (Lieberman y col., 1999), en hojas de *Z. mays* sometidas a estrés hídrico (Ma y col., 2009), en hojas de *Catharanthus roseus* infectadas con fitoplasmas (Musetti y Favali, 2003), en meristemos apicales radiculares de *Z. mays* (Sakai-Wada y Yagi, 1993) y *P. sativum* (Belyavskaya, 2001), en ápices de raíces de *Glycine max* en condiciones de microgravedad (Klymchuk y col., 2001, 2003; Hayatsu y col., 2012) y en callos de *Dianthus caryophyllus* susceptibles y resistentes a *Fusarium oxysporum* (Trillas-Gay y Araus, 1993). También esta metodología ha sido efectiva para demostrar cambios en la distribución de Ca^{2+} durante la formación de complejos estomáticos de *Hordeum vulgare* (Wick y Hepler, 1980), de esclereidas en hojas de *Nymphaea tetragona* (Kuo-Huang y Chen, 1999) y de embriones somáticos en *Cichorium* sp. (Verdus y col., 1993). También ha demostrado la importancia del Ca^{2+} en la polinización y fertilización de *Lactuca sativa* (Qiu y col., 2008), *Nicotiana tabacum* (Tian y Russell, 1997), *Plumbago zeylanica* (Tian y col., 2000) y *Oryza sativa* (Tian y col 1998; Zhao y col., 2002; Qin y col., 2005). Del mismo modo ha puesto de manifiesto: **a)** el papel del Ca^{2+} como segundo mensajero en el gravitropismo de tallos de *Chrysanthemum morifolium* (Zhang y col., 2011), **b)** cambios estacionales de Ca^{2+} , asociados a cambios de actividad del cambium, en *Fagus sylvatica*

(Follet-Gueye y col., 1998) y, c) cambios espacio-temporales en la distribución intracelular de Ca^{2+} en células parenquimáticas de coleoptilos etiolados de *A. sativa* irradiados con R o FR (Tretyn y col., 1992).

5.2.- Control del cierre nictinástico foliar por fitocromo(s) en *Albizia lophantha*.

El grado de cierre de los folíolos de *A. lophantha*, superior en los irradiados con R que en los irradiados con FR (Figs. 4.1 a 4.3 y 4.5 a 4.10) indica un control del cierre nictinástico por phys(s) en concordancia con resultados previos en esta misma especie (Moysset y Simón, 1989), en *A. julibrissin* y en *S. saman* (revisado por Satter y Galston, 1981).

En *A. lophantha* el modelo de movimiento y el efecto fitocromo varía en función del tiempo de inicio de los ensayos (Figs. 4.2 y 4.3). Así, el cierre de los folíolos irradiados con R y el efecto fitocromo es inferior en los ensayos realizados a las 2 h del fotoperiodo que en los efectuados a las 8 h (mitad) del fotoperiodo. Además, en los ensayos efectuados a las 2 h del fotoperiodo con frecuencia se observa reabertura foliar, característica ausente en las pruebas efectuadas a la mitad del fotoperiodo. Estos resultados parecen estar en desacuerdo con los obtenidos en *A. julibrissin* por Hillman y Koukkari (1967) quienes observaron el máximo efecto fitocromo a las 2 h del inicio del fotoperiodo. Sin embargo, en sus ensayos las plantas estaban sometidas a ciclos de 12 h luz/ 12 h oscuridad, mientras que en nuestros experimentos se han adaptado a ciclos de 16 h luz/ 8 h oscuridad. Los folíolos de *A. lophantha* se mueven con ritmicidad circadiana (Gómez, 1993) al igual que los de *A. julibrissin* (Satter y col., 1976), *S. saman* (Simón y col., 1976b) y *R. pseudoacacia* (Gómez y Simón, 1995). La luz R cambia la fase del ritmo y su efecto inmediato depende del momento en que se efectúa la irradiación (revisado por Satter y Galston, 1981). Por tanto, las diferencias en el tiempo en que se presenta el máximo efecto fitocromo podrían deberse a que el fotoperiodo no se inicia en la misma fase del ritmo en ambos experimentos.

5.3.- Implicación de ATPasas-H⁺ en el cierre nictinástico dependiente de fitocromo(s) de los folíolos de *Albizia lophantha*.

5.3.1.- Fusicoccina y ATPasas-H⁺.

Nuestros datos indican que la FC, activador de ATPasas-H⁺ del plasmalema y estimulador de la absorción de K⁺ (Marrè, 1979) inhibe el cierre nictinástico dependiente de phy(s) de *A. lophantha* y, en general, estimula la reapertura foliar de forma dependiente de la concentración (óptima a 10 µM), manifestándose ambos efectos de forma más acusada en los folíolos irradiados con R que en los irradiados con FR (Figs. 4.1, 4.3, 4.6, 4.8 y 4.10). Estos resultados y el efecto de los inhibidores de ATPasas-H⁺ - dietilestilbestrol y mersalil (ácido) - anulando el efecto de la FC en el cierre nictinástico de *A. lophantha* y en la disminución del pH externo (Moysset, 1981), apoyan la implicación de ATPasas-H⁺ en el movimiento foliar. Los cambios de pH desencadenados por transiciones luz-oscuridad en el apoplasto extensor y flexor de los pulvínulos secundarios de *S. saman* apoyan también la intervención de ATPasas-H⁺ en los movimientos foliares (Iglesias y Satter, 1983a, 1983b). Además, en el plasmalema de las células motoras pulvinulares de *M. pudica* se han detectado ATPasas-H⁺ cuya actividad podría generar gradientes electroquímicos capaces de inducir rápidos flujos de iones responsables de cambios de turgencia durante el movimiento seismonástico (Fleurat-Lessard y col. 1997a). También, en pulvínulos de *P. coccineus*, la actividad de esta bomba electrogénica es clave para el transporte de K⁺ en dirección opuesta al flujo de H⁺ (Bialczyck y Lechowski, 1990).

La reapertura de los folíolos de *A. lophantha* inducida por la FC coincide con el efecto de esta toxina estimulando la reapertura de las hojas de *C. fasciculata* y *M. pudica* en oscuridad (Bonnemain y col., 1978) e incrementando la salida de H⁺ hacia el apoplasto en pulvínulos escindidos de *M. pudica* (Roblin, 1980; Roblin y Fleurat-Lessard, 1983).

Los efectos de la luz R y la FC son opuestos (Figs. 4.1, 4.3, 4.6, 4.8 y 4.10) de manera que tras 3 h de oscuridad la FC disminuye significativamente el efecto fitocromo tanto en los ensayos efectuados a las 2 h como a las 8 h del fotoperiodo (Tabla 4.3). No

hay datos de que Pfr regule directamente la actividad ATPasa-H⁺ del plasmalema de las células motoras pulvinulares. No obstante, en pulvínulos de *S. saman*, una irradiación R seguida de oscuridad disminuye el pH del apoplasto flexor (Lee y Satter, 1989) e hiperpolariza el plasmalema de las células flexoras (Racusen y Satter, 1975) lo que se interpreta a favor de la existencia de esta regulación. En este contexto, es posible que en los pulvínulos de *A. lophantha* una irradiación R estimule la actividad de las ATPasas-H⁺ del plasmalema de las células flexoras generándose un flujo de H⁺ hacia el apoplasto. Del mismo modo, dado que la dirección del flujo de H⁺ es opuesta entre las células flexoras y extensoras (Iglesias y Satter 1983a) y que la luz R seguida de oscuridad alcaliniza el apoplasto extensor en pulvínulos de *S. saman* (Lee y Satter, 1989), puede asumirse que las ATPasas-H⁺ de plasmalema de las células extensoras estén inactivas. En estas condiciones, la FC actuaría activando las ATPasas-H⁺ de las células extensoras y, en consecuencia, se generaría un flujo de H⁺ hacia el apoplasto extensor, se hiperpolarizaría el plasmalema y se activarían canales K_H con la consiguiente entrada de K⁺ y, en último término, aumentaría la turgencia celular. Ello explicaría la inhibición del cierre y la reabertura subsecuente.

La FC también estimula la abertura de los estomas e inhibe el cierre inducido por la oscuridad activando ATPasas-H⁺. Se desconocen los intermediarios implicados en el proceso de activación de las ATPasas-H⁺; sin embargo, la inhibición del cierre estomático de *V. faba* por la FC se ha relacionado con una acidificación del citoplasma y una disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) y de peróxido de hidrógeno por un mecanismo desconocido (She y col., 2004, 2010a, 2010b). Datos recientes, obtenidos por nuestro grupo, han demostrado que el NO inhibe el cierre nictinástico de los folíolos de *A. lophantha* (Bergareche y col., 2012) y que se distribuye asimétricamente en los pulvínulos de *R. pseudoacacia*. En la oscuridad, los niveles de NO disminuyen en las células flexoras (turgentes) y aumentan en las extensoras (flácidas) (Angelo, A., comunicación personal).

5.3.2.- Los polioles como moduladores de la actividad ATPasa-H⁺.

Los resultados obtenidos con el manitol y el sorbitol en el cierre nictinástico de *A. lophantha* contrastan con datos previos. El manitol 50 mM, es inefectivo en el movimiento rítmico de los folíolos de *A. julibrissin* en la oscuridad (Satter y col., 1976) y, a una concentración 10 mM, no afecta el potencial de membrana en pulvínulos de *S. saman* (Racusen y Galston, 1977).

El doble efecto del sorbitol y del manitol de incrementar el cierre y posteriormente promover la reapertura (Figs. 4.5 y 4.7) está asociado a la presencia de Pfr porque se detecta en los folíolos irradiados con R y no en los irradiados con FR. El efecto promotor de la reapertura concuerda con el de la FC y podría estar relacionado con una modulación de la actividad de ATPasas-H⁺ del plasmalema de las células motoras en concordancia con resultados previos en pulvínulos de *S. saman* (Lee y Satter, 1987). En estos órganos motores, las células extensoras alcalinizan el medio durante el movimiento rítmico circadiano en oscuridad. La adición de manitol o sorbitol 0,4 M aumenta la amplitud del ritmo de absorción de H⁺ de las células extensoras y pone de manifiesto un ritmo de liberación de H⁺ en las flexoras. Reinhold y col. (1984) propusieron que este efecto del manitol estimulando la liberación de H⁺, también observado en otros órganos como hojas de *A. sativa* (Gepstein, 1982), podría basarse en un proceso de osmorregulación. El manitol reduciría el gradiente de presión hidrostática en el complejo pared celular-plasmalema y la disminución de turgencia celular estimularía directamente la actividad de las ATPasas-H⁺ del plasmalema. En consecuencia, se produciría una fuerza protón motriz que proporcionaría energía para la absorción de solutos restableciendo la presión de turgencia celular. En este contexto, la adición de manitol al medio externo estimula la absorción de K⁺ en *Daucus carota* (Enoch y Glinka, 1981) y de sacarosa en discos foliares de *P. coccineus* (Daie y Wyse, 1985). Un tratamiento hiperosmótico (manitol 150 mM) también estimula la absorción de K⁺ en cultivos celulares de *A. thaliana* (Curti y col., 1993) y de K⁺ y Cl⁻ en células del mesófilo de *P. coccineus* (Daie y Wyse, 1985).

Se sabe que durante el cierre nictinástico aumenta la turgencia de las células flexoras y disminuye la de las extensoras (revisado por Satter y Galston, 1981). En estas

condiciones, estos polioles podrían actuar principalmente en las células extensoras de los pulvínulos de *A. lophantha* induciendo, inicialmente, una disminución de la presión de turgencia e intensificando el cierre de los foliolos. Luego, cuando la turgencia sea mínima estimularían la actividad ATPasa-H⁺ que, a su vez, promovería la absorción de solutos osmóticamente activos y de agua provocando un aumento de turgencia celular y desencadenando la reapertura de los foliolos. Los efectos del manitol 150 mM y del PEG 6000 22 % activando ATPasas-H⁺ de plasmalema en suspensiones celulares de *A. thaliana* (Curti y col., 1993) así como del manitol 398 mM hiperpolarizando el plasmalema y acidificando el medio externo en granos de polen de *Lilium* (Pertl y col., 2010) apoyan la propuesta anterior. También el sorbitol 200 mM estimula la salida de H⁺ y modula la actividad de canales iónicos en cultivos celulares de *D. carota* (Teodoro y col., 1998). En comparación, en las células flexoras con ATPasas-H⁺ activas durante el movimiento de cierre, el gradiente de H⁺ generado favorecería la entrada de estos compuestos a través del plasmalema mediante cotransporte con H⁺ y, de este modo, podrían contribuir a incrementar la turgencia celular y, en consecuencia, al cierre foliar. Evidentemente, esta propuesta es discutible y no pueden excluirse otras posibilidades dado que el manitol-³H 50 mM no provoca plasmólisis ni se acumula de forma acusada en el apoplasto de las células corticales motoras de *R. pseudoacacia*. Además, también debe verificarse la existencia de un cotransporte manitol-H⁺ en los pulvínulos de *R. pseudoacacia*. El manitol no afecta el potencial de membrana en pulvínulos de *S. saman* (Racusen y Galston, 1977).

El manitol es un producto de la fotosíntesis y es metabolizado por algunas especies de las familias *Apiaceae*, *Rubiaceae* y *Olaeaceae* (Conde y col., 2011). Sin embargo, se considera que la mayoría de las especies no lo metabolizan y se asume que no penetra en las células o lo hace muy lentamente. Los resultados obtenidos en *R. pseudoacacia* indican que el manitol-³H 50 mM se incorpora en los pulvínulos secundarios a través de los tejidos vasculares y se distribuye en las paredes, el citoplasma y las vacuolas de las células motoras en concordancia con la distribución subcelular en *Apium graveolens* (Keller y Matile, 1989; Noiraud y col., 2001; Nadwodnik y Lohaus, 2008) y *Olea europaea* (Conde y col., 2011) donde actúa como fuente de carbono y energía, osmorregulador y osmoprotector en situaciones de estrés abiótico. Se han

caracterizado cotransportadores de manitol- H^+ en *A. graveolens* (Juchaux-Cachau y col., 2007).

En nuestras condiciones experimentales, la incorporación de manitol- 3H 50 mM no difiere entre los pulvínulos irradiados con R o FR después de 3 h de oscuridad, a pesar de que el cierre de los folíolos irradiados con R es muy superior (unos 100 °) al de los irradiados con FR (Tabla 4.7). Por el contrario, su incorporación en las zonas extensoras y flexoras varía según el estado de fotoequilibrio de los phys (Fig. 4.19). En los pulvínulos irradiados con luz R, la incorporación de manitol- 3H 50 mM no difiere significativamente entre las células extensoras y flexoras a pesar de sus distintos estados de turgencia lo que sería incompatible con la función osmorreguladora de este compuesto en concordancia con resultados en otros sistemas experimentales (Cram, 1984). En cambio, una irradiación FR estimula la incorporación de manitol- 3H 50 mM en las células flexoras internas (Fig. 4.19). Se desconoce el mecanismo bioquímico responsable de la acumulación de este compuesto así como su función en estas células que no varían de turgencia durante el movimiento foliar.

La aplicación simultánea de sorbitol o manitol con la FC potencian el efecto de la FC inhibiendo el cierre y potenciando la reapertura en presencia de Pfr (Figs. 4.6 y 4.8). Este sinergismo manitol y FC también se ha observado en la liberación de H^+ en entrenudos de guisante (Marrè y col., 1973), en semillas de rábano en germinación (Cocucci y col., 1990) y en células de *A. thaliana* (Curti y col., 1993). Curti y col (1993) han sugerido que los cambios de presión de turgencia y la FC podrían modular la actividad ATPasa- H^+ del plasmalema por vías confluentes.

Finalmente, los resultados obtenidos con el PEG 6000 son similares a los del sorbitol y manitol aunque muestran una elevada variabilidad entre distintos y en un mismo experimento posiblemente debido a la distinta capacidad de penetración de estas moléculas en el apoplasto. El manitol y el sorbitol, compuestos de bajo peso molecular, pueden penetrar más fácilmente que el PEG 6000, compuesto de mayor peso molecular que no penetra a través de los poros de la pared o lo hace con dificultades y provoca una salida de agua de la célula y la pared celular (Mayer y col., 1985c; Hohl y Schopfer,

1991). En nuestras condiciones experimentales, al final de los ensayos, los folíolos no presentaron síntomas visuales de deshidratación ni cambios morfológicos aparentes, por ejemplo, flacidez y curvatura, lo que sugiere que el PEG 6000 a las concentraciones aplicadas no provocó efectos tóxicos (por contaminantes) o deletéreos (por infiltración y falta de oxígeno en los tejidos) descritos en otros sistemas (Hohl y Schopfer, 1991; Verslues y col., 1998; Ober y Sharp, 2003).

La similitud entre los efectos del manitol y el PEG 6000 en el cierre nictinástico también se manifiesta durante el movimiento foliar rítmico de *P. coccineus* en luz continua. En este caso, manitol (5-45 mM) y PEG 6000 (0,025 a 0,5 %) aumentan la longitud del periodo (27,9 a 29,5 h) y disminuyen la amplitud del movimiento posiblemente provocando una salida de agua y disminución de la turgencia de las células motoras (Mayer y col., 1985c). En esta situación, sería de esperar que el PEG 6000, al igual que el manitol, potenciara el efecto de la FC inhibiendo el cierre nictinástico en concordancia con los resultados obtenidos en cultivos celulares de *A. thaliana* (Curti y col., 1993). Sin embargo, los resultados son incompatibles con esta propuesta dado que este poliol anula el efecto de la FC (Fig. 4.10). Trabajos más recientes han demostrado que el efecto del PEG 6000 (10-25 %) provocando el cierre de los estomas de *V. faba* está asociado a un aumento de los niveles de NO de las células estomáticas (Huang y col., 2009). Estos efectos del PEG 6000 sobre el cierre estomático y los niveles de NO son opuestos a los de la FC (She y col., 2004, 2010a, 2010b). Una actuación similar de estos compuestos en los pulvínulos permitiría explicar el efecto del PEG 6000 anulando al de la FC en el cierre nictinástico de *A. lophantha*.

En conjunto, los resultados obtenidos mostrando el doble efecto de los azúcares – alcohol incrementando el cierre y promoviendo la reabertura así como el sinergismo observado cuando se aplican simultáneamente a la FC, sugieren una osmorregulación indirecta de la actividad ATPasa-H⁺. Este proceso podría ser la clave en la regulación del movimiento foliar, puesto que la ATPasa-H⁺ podría tener un doble papel: como detectora y/o efectora de los cambios de turgencia de acuerdo con Reinhold y col. (1984).

5.4.- La sacarosa como fuente de energía, molécula osmóticamente activa y/o de señalización en el cierre nictinástico foliar dependiente de fitocromo(s) de *Albizia lophantha*.

La sacarosa aumenta el cierre nictinástico de los folíolos de *A. lophantha* de forma dependiente de la concentración y del tiempo de inicio de los ensayos (Figs. 4.2 y 4.3), manteniéndose el efecto fitocromo después de 3 h de oscuridad (Tabla 4.2). Esta potenciación del cierre por la sacarosa también se ha observado durante el movimiento rítmico de los pulvínulos de *S. saman* en oscuridad continua; en cambio, la sacarosa inhibe el cierre cuando los folíolos se mantienen en luz continua o en ciclos luz-oscuridad (Simón y col., 1976a). Tanto en *S. saman* como en *A. julibrissin*, la sacarosa 50 mM es necesaria para la manifestación del movimiento foliar rítmico en la oscuridad aunque disminuye el mesor y la amplitud de la oscilación. No obstante, la aplicación diaria de una irradiación R (por ejemplo, al inicio de cada ciclo) en presencia de sacarosa 50mM mantiene el ritmo y la amplitud de la oscilación (Simón y col., 1976b; Satter y col., 1976). Así pues, Pfr y sacarosa son claves para mantener las oscilaciones en la oscuridad.

Se desconoce cómo actúa la sacarosa estimulando el cierre y cómo interacciona con Pfr, si bien se ha sugerido que podría actuar: **a)** suministrando esqueletos carbonados para la síntesis de aniones orgánicos como el malato, que compensaría - junto con el Cl^- - la carga positiva del K^+ , **b)** como osmótico al igual que en las células estomáticas o, **c)** como fuente de energía (Simón y col., 1976a; Satter y col., 1976; Rieger y col., 1992; Talbott y Zeiger, 1998). Posteriormente, se ha puesto de manifiesto que la sacarosa, además de su función esencial en el metabolismo, también puede actuar como molécula de señalización (Wind y col., 2010). En *A. thaliana*, el oscilador circadiano es muy sensible a la sacarosa en la oscuridad ya que este disacárido modula su funcionamiento aumentando la expresión de los genes *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1*), *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) y *GI* (*GIGANTEA*) y, además, presumiblemente puede actuar como *zeitgeber*, es decir, como una señal capaz de restablecer los ritmos circadianos y ajustar la fase del oscilador (Knight y col., 2008; Dalchau y col., 2011).

Respecto a la interacción sacarosa-phys, ensayos moleculares y fisiológicos en *A. thaliana* sugieren que este disacárido podría modular la vía de señalización del phyA en una respuesta FR-HIR así como la interacción phyA-phyB aunque, en cualquier caso, no puede excluirse que las vías de señalización de la sacarosa y los phys sean independientes e interaccionen entre sí (Barnes y col., 1996; Dijkwel y col., 1997; Short, 1999). Datos recientes demuestran que la sacarosa estimula la transcripción de los genes *PIF1, 3, 4* y *5* que codifican los factores de transcripción PIF1, 3, 4 y 5, componentes de las vías de transducción de los phys y de fitohormonas como las auxinas y las giberelinas (Stewart y col., 2011; Liu y col., 2011).

En nuestras condiciones experimentales, la aplicación simultánea sacarosa – FC potencia el efecto de la FC en el movimiento foliar (Figs. 4.3a y b) en concordancia con resultados previos (Moysset, 1981) y disminuye el efecto fitocromo a las 2 h del fotoperiodo (Tabla 4.3). En *A. lophantha*, el cierre nictinástico va acompañado de una acidificación del medio externo, la FC incrementa la disminución de pH mientras que la sacarosa *per se* y aplicada después de la FC lo estabiliza o aumenta ligeramente (Moysset, 1981). En esta situación, el resultado obtenido podría explicarse asumiendo que la FC activa ATPasas- H^+ del plasmalema de las células extensoras (comentado en el apartado anterior) y, de este modo, se genera un gradiente de H^+ hacia el apoplasto que favorecería la entrada de la sacarosa mediante cotransporte con H^+ . En el citoplasma la sacarosa podría actuar como osmótico, fuente de energía para mantener la actividad ATPasa- H^+ y/o actuar como señal.

La existencia de este cotransporte sacarosa- H^+ , solamente efectivo en determinadas fases del ritmo, fue propuesto por Racusen y Galston (1977) en pulvínulos de *S. saman*. En otros sistemas experimentales se han caracterizado varias subfamilias de transportadores de sacarosa (SUT) cuya expresión muestra especificidad tisular y sigue un ritmo circadiano (Chincinska y col., 2008). La actividad de los transportadores de sacarosa (SUT) depende de la fuerza protón motriz establecida por las ATPasas- H^+ (Kühn y Grof, 2010; Ayre, 2011) y su afinidad por los H^+ y la sacarosa dependen del voltaje (Kühn y col., 1999; Contim y col., 2003). Hay pruebas indirectas de que Pfr puede modular la actividad ATPasa- H^+ de las células motoras (Lee y Satter, 1989) pero no hay

información sobre su posible acción regulando la actividad de los SUT. No obstante, dado que irradiaciones R y FR alteran (de forma reversible) el potencial de membrana (Racusen y Satter, 1975) y la abertura-cierre de canales K_H de las células flexoras de pulvínulos de *S. saman* (Kim y col., 1993) es posible que Pfr module indirectamente la incorporación de sacarosa. La implicación de canales de K^+ en el cotransporte de sacarosa- 3H se ha descrito en *A. thaliana* (Deeken y col., 2002). En *Solanum tuberosum* SUT4 está directamente implicado en la respuesta a la sombra mediada por phyB, FR aumenta la vida media de los transcritos (Chincinska y col., 2008).

Los resultados obtenidos demuestran que, durante el cierre nictinástico, la sacarosa- 3H 50 mM se incorporó en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Tabla 4.7) en una proporción similar a la encontrada en secciones de hojas y pecíolos de *Beta vulgaris* (Maynard y Lucas, 1982) pero inferior a la detectada en cotiledones aislados de *Ricinus communis*, material que presenta un elevadísimo nivel de incorporación comparado con otros sistemas de transporte de azúcares en plantas superiores (Komor, 1977).

En nuestras condiciones experimentales la incorporación de sacarosa- 3H 50 mM no resultó alterada por la aplicación de irradiaciones R y FR aunque la magnitud de cierre de los folíolos irradiados con R fue superior a la de los irradiados con FR a las 3 horas de oscuridad (Tabla 4.7). Estos resultados coinciden con los obtenidos en pulvínulos de *S. saman* (Simón, 1980) y discrepan de los obtenidos en plántulas de guisante etioladas pues, un pulso de luz R estimula incorporación de sacarosa en las yemas (Goren y Galston, 1966). Aunque en este trabajo no se ha abordado valorar la cinética de incorporación de la sacarosa- 3H 50 mM durante el movimiento de cierre (por ejemplo, después de irradiar con R o FR, a los 10 min, 30 min de oscuridad, etc.), sería interesante efectuarlo en un futuro ya que permitiría esclarecer el efecto más inmediato de estas irradiaciones sobre este proceso.

La sacarosa- 3H se incorporó en todos los tejidos pulvinulares sin provocar plasmólisis (Fig. 4.11a). Presumiblemente, a partir de los tejidos vasculares, alcanzó la corteza motora probablemente vía apoplasto. En presencia de Pfr se encontró

mayoritariamente en las células corticales internas (más en las extensoras que en las flexoras) y en menor cantidad en las externas (más en las flexoras que en las extensoras) (Fig. 4.18b) no detectándose en ningún plasmodesmo. También, en presencia de Pr se acumuló en la zona flexora interna. Esta elevada acumulación de sacarosa-³H 50 mM en el cortex interno coincide con los resultados obtenidos en pulvínulos de *P. coccineus* (Rieger y col., 1992).

En presencia de Pfr, no se detectaron diferencias en cuanto a incorporación de sacarosa-³H entre las células extensoras y flexoras externas, a pesar de que las primeras disminuyen de turgencia y alcalinizan el medio (Lee y Satter, 1989) y las segundas aumentan de turgencia y acidifican transitoriamente (durante 30 min) el medio (Lee y Satter, 1989) durante el cierre. Por tanto, estos resultados son incompatibles con un efecto osmótico de la sacarosa-³H 50 mM en concordancia con resultados obtenidos en los pulvínulos de *P. coccineus* (Rieger y col., 1992). En cambio, en presencia de Pr, la incorporación de sacarosa-³H difirió entre las células extensoras y flexoras (Fig. 4.18b), tal como se esperaba considerando la asimetría morfológica y fisiológica existente entre las zonas extensora y flexora de los pulvínulos (revisado por Satter y Galston, 1981).

Nuestros resultados indican que una irradiación FR inhibe la incorporación de sacarosa-³H en células extensoras (Fig. 4.18b), es decir, en las células que pierden turgencia durante el cierre nictinástico (Moysset y col., 1991b), posiblemente por la salida de K⁺ y Cl⁻ a través de canales dependientes de voltaje activados por despolarización como en las células motoras de *S. saman* (Moran, 1990). La disminución de incorporación de sacarosa-³H 50 mM en las células extensoras podría explicarse asumiendo que FR inhibe la actividad de canales K_D activados por despolarización de estas células, como ocurre en *Physcomitrella patens* y otros sistemas vegetales (Spalding, 2000) y, por extensión, despolariza el plasmalema.

La incorporación de sacarosa-³H en células flexoras internas fue ligeramente superior después del tratamiento con luz FR (Fig. 4.18b). Este resultado puede explicarse asumiendo un control del/los phys sobre la actividad de canales K_H tal como se ha descrito en los protoplastos flexores de *S. saman* (Kim y col., 1993). Una irradiación R

seguida de oscuridad provoca la abertura de estos canales K_H y FR revierte este efecto. De este modo, el cierre de los canales K_H por FR podría mantener el potencial de membrana más electronegativo, facilitando la incorporación de sacarosa- 3H 50 mM por cotransporte.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la sacarosa- 3H 50 mM exógena estimula el cierre nictinástico dependiente de phy(s) de *A. lophantha* y se incorpora en pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* durante el cierre. Después de 3 horas de oscuridad, la incorporación de sacarosa- 3H 50 mM en los pulvínulos es independiente de la aplicación de una irradiación con luz R o FR a pesar de que el cierre de los folíolos irradiados con R supera al de los irradiados con FR. En presencia de Pfr, la distribución simétrica de sacarosa- 3H 50 mM entre los protoplastos extensores y flexores descarta la posibilidad de que este disacárido actúe como compuesto osmótico. En cambio, en presencia de Pr la sacarosa- 3H 50 mM se acumula principalmente en los protoplastos flexores si bien falta clarificar la importancia fisiológica de esta distribución. En *A. julibrissin*, la sacarosa es necesaria para mantener el movimiento rítmico en la oscuridad y una irradiación FR aplicada diariamente en presencia de sacarosa inhibe el movimiento foliar evitando la abertura (Satter y col., 1976). Así, el efecto de FR inhibiendo la incorporación de sacarosa- 3H 50 mM en las células extensoras podría explicar la inhibición de la abertura rítmica en la oscuridad, ya sea porque la sacarosa- 3H 50 mM cubre las demandas de energía (revisado por Satter y Galston, 1981) y/o porque actúa como señal (Smeekens, 2000; Knight y col., 2008; Dalchau y col., 2011).

5.5.- El Ca^{2+} como segundo mensajero de fitocromo(s) en el cierre nictinástico foliar de *Robinia pseudoacacia*.

5.5.1.- Distribución de precipitados de Ca^{2+} en los pulvínulos.

En trabajos previos - mediante distintas metodologías (espectrometría de absorción atómica, colorantes específicos y microanálisis de Rayos X-microscopía electrónica entre otras) - se demostró la presencia de calcio en: **a)** las regiones ventrales y dorsales de los

pulvínulos terciarios de *A. julibrissin* (Satter y col., 1970b; Satter y Galston, 1971) y los primarios de *M. pudica* (Roblin y Fleurat-Lessard, 1983), **b**) en las paredes y protoplastos extensores y flexores de los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Moysset y col., 1991b) y de *S. saman* (Satter y col., 1974, 1982) y, **c**) en las vacuolas de taninos de las células motoras de los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia* (Moysset y col., 1991b) y los primarios de *M. pudica* (Toriyama y Jaffe, 1972; Campbell y col., 1979). En este contexto, los resultados de este trabajo concuerdan con los anteriores y los amplían al poner de manifiesto la fracción de Ca^{2+} intercambiable (no el total) en todos los tejidos pulvinulares, desde la epidermis a los tejidos vasculares y en distintos compartimentos celulares aspecto, sin lugar a dudas, de gran interés fisiológico y no considerado hasta ahora.

La distribución de Ca^{2+} intercambiable en todos los tejidos pulvinulares de *R. pseudoacacia* y su localización subcelular en el citosol, las vacuolas, los plastos, el núcleo y los espacios intercelulares de todas las células concuerda con lo observado en otros órganos como hipocotilos de *V. radiata* (Lieberman y col., 1999), raíces de *P. sativum* (Belyavskaya, 2001) y *Z. mays* (Sakai-Wada y Yagi, 1993), hojas de *C. roseus* (Musetti y Favali, 2003), tallos de *C. morifolium* (Zang y col., 2011), frutos de *Solanum lycopersicum* (Suzuki y col., 2003; Tonetto de Freitas y col., 2011) y coleoptilos de *A. sativa* (Tretyn y col., 1992).

La presencia de Ca^{2+} en el núcleo de las células pulvinulares de *R. pseudoacacia* no resulta sorprendente dada la importancia de este catión en la regulación del ciclo celular (Dudits y col., 2011) y de la transcripción génica (Galon y col., 2010), aspectos de sumo interés que no son objeto de este trabajo ni de trabajos previos focalizados en la distribución de iones osmóticamente activos (Satter y col., 1970b; Toriyama y Jaffe, 1972; Campbell y col., 1979; Satter y col., 1982; Roblin y Fleurat-Lessard, 1983).

Una característica de las células motoras de los pulvínulos es la presencia de vacuolas de taninos (Toriyama, H., 1973; Moysset y Simón, 1991a). En los pulvínulos primarios de *M. pudica* estas vacuolas contienen Ca^{2+} y K^+ que participan activamente en los movimientos seismonásticos. En concreto, el Ca^{2+} se desplaza de estas vacuolas al

citosol durante la curvatura pulvinular y se reincorpora a las vacuolas cuando el pulvínulo recupera la posición original (Toriyama y Jaffe, 1972; Campbell y col., 1979; Yao y col., 2008). En *R. pseudoacacia*, las vacuolas de taninos también contienen Ca^{2+} y K^+ (Moysset y Simón, 1991a) aunque no hay datos de su posible redistribución durante los movimientos foliares. *A priori*, los resultados del trabajo actual discrepan de los anteriores. Sin embargo, esta contradicción puede justificarse por diferencias metodológicas dado que: **a)** Moysset y Simón (1991a) determinaron la composición elemental de las vacuolas de taninos y, **b)** en este trabajo se valora solo la fracción de Ca^{2+} intercambiable. Así pues, los resultados indicarían que el Ca^{2+} de las vacuolas de taninos no es intercambiable y, por extensión, que no participaría en el cierre nictinástico. Alternativamente no puede excluirse que este catión se encuentre a una concentración indetectable mediante la metodología usada.

En la mayoría de trabajos en los que se investiga la distribución de Ca^{2+} mediante precipitación con piroantimoniato se detectan precipitados en las paredes celulares si bien su abundancia varía mucho según el material. Excepcionalmente faltan en las paredes de las células del pericarpio de frutos de *S. lycopersicum* (Suzuki y col., 2003; Tonetto de Freitas y col., 2011) y de zigotos de *O. sativa* a las 6 horas de la polinización (Zhao y col., 2002) así como en las paredes secundarias de los vasos xilemáticos de *Betula papyrifera*, *Populus balsamifera*, *Prunus virginiana* y *Amelanchier alnifolia* (Plavcova y Hacke, 2011). No obstante, los ensayos de microanálisis demuestran que este elemento se encuentra en las paredes de las células motoras (Figs. 3.9d y 3.10b) en concordancia con resultados previos en el mismo material (Moysset y col., 1991b) y en los órganos motores de *S. saman* (Satter y col., 1982) y de *A. julibrissin* (Satter y col., 1970b). Está demostrado que el pool apoplástico de Ca^{2+} es dinámico (Lenartowska y col., 2011) y en respuesta a estímulos bióticos y abióticos este Ca^{2+} puede desplazarse al citosol donde actúa como segundo mensajero iniciando respuestas celulares específicas (revisado por Hepler y Winship, 2010). Ensayos farmacológicos avalan la intervención del Ca^{2+} extracelular en los movimientos foliares (McEvoy y Koukkari, 1972; Roblin y Fleurat-Lessard, 1984b; Mayer y col., 1985b; Moysset y Simón, 1990; Moysset y col., 1994a; Gómez y Simón, 1995).

5.5.2.- El Ca^{2+} como señal osmorreguladora.

En nuestras condiciones experimentales - considerando la abundancia y superficie de los precipitados - un pulso de luz R genera una distribución asimétrica de Ca^{2+} citosólico intercambiable, siendo más abundante en las células extensoras que en las flexoras (Tabla 4.9). Este aumento de Ca^{2+} es transitorio, pues es evidente al finalizar la irradiación R e indetectable a los 30 min de oscuridad. Además, se produce en las células extensoras que disminuyen de turgencia durante el cierre nistínástico y precede a este movimiento. En comparación, una irradiación FR no genera apreciables diferencias en la distribución de Ca^{2+} citosólico intercambiable entre las células extensoras y flexoras pero la abundancia y superficie de los precipitados también disminuye a los 30 min de oscuridad. En pulvínulos de *P. vulgaris* el movimiento y distribución de ^{45}Ca entre las zonas extensoras y flexoras es opuesto al de compuestos osmóticamente activos (K^+) durante el movimiento foliar en ciclos 12 h luz / 12 h oscuridad (Raeini-Sarjaz, 2011).

En los pulvínulos de *R. pseudoacacia*, la distribución intracelular del phyA no difiere entre las zonas extensoras y flexoras independientemente de una aplicación de luz R o FR (Moysset y col., 2001a). Por tanto, la distribución asimétrica de Ca^{2+} citosólico intercambiable inducida por una irradiación R entre las células flexoras y extensoras presumiblemente no se debe a una distribución asimétrica de phy(s) sino a una asimetría morfológica y fisiológica existente entre ellas (revisado por Satter y Galston, 1981). Así, durante el movimiento foliar - ya sea rítmico o desencadenado por transiciones luz-oscuridad - experimentan cambios opuestos en cuanto a turgencia, acidificación del medio, actividad de ATPasas- H^+ y de canales iónicos, entre otros (revisado por Satter y Galston, 1981; Lee y Satter, 1989; Lowen y Satter, 1989; Kim y col, 1993). En este contexto, cabe suponer que los cambios desencadenados por una irradiación R o FR sean opuestos y varíen según el momento del ritmo.

No hay datos relacionando directamente Pfr - Ca^{2+} citosólico - turgencia celular en los órganos motores. No obstante, ensayos previos de tipo farmacológico en *A. lophanta*, *R. pseudoacacia* y otras especies, apoyan indirectamente la intervención del Ca^{2+} como segundo mensajero de los phys en el cierre nictinástico foliar y en los cambios de fase

inducidos durante el movimiento rítmico en la oscuridad (McEvoy y Koukkari, 1972; Roblin y Fleurat-Lessard, 1984b; Mayer y col., 1985b; Moysset y Simón, 1990; Moysset y col., 1994a; Gómez y Simón, 1995).

En otros sistemas experimentales, la luz R altera el volumen celular y/o modifica transitoriamente la $[Ca^{2+}]_c$ si bien la cinética y magnitud de los cambios varía considerablemente según el material. En *A. thaliana*, R aplicada de forma continua aumenta gradualmente (al menos durante 1,5 horas) la turgencia de los protoplastos de hipocotilos (Wang y Iino, 1998) y R aplicada en forma de un pulso disminuye el volumen celular e induce la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (Molchan y col., 2001). En cambio, un pulso de luz R aumenta el volumen de protoplastos aislados de hojas de cereales etiolados (Kim y col., 1986; Bossen y col., 1988; Zhou y col., 1990) y de hipocotilos de *P. radiatus* (Long y col., 1995). En *Triticum aestivum* el aumento de volumen va precedido por un incremento transitorio de $[Ca^{2+}]_c$ que se produce durante o al final de la irradiación R (2 min) y luego disminuye rápidamente (en 1 min) a su nivel basal. Los efectos de R sobre el cambio de volumen y la concentración de Ca^{2+} son revertidos por una irradiación FR (Bossen y col., 1988; Shacklock y col., 1992). En este marco, los resultados obtenidos en los pulvínulos de *R. pseudoacacia*, en cuanto a cambio transitorio de $[Ca^{2+}]_c$ intercambiable y anterior al movimiento foliar, concordarían con los anteriores y pueden interpretarse a favor del papel del Ca^{2+} como segundo mensajero de phy(s). La importancia del Ca^{2+} citosólico como segundo mensajero de los phys se ha demostrado en *Mougeotia* (Serlin y Roux, 1984), *Onoclea* (Wayne y Hepler, 1985) y en mutantes de *S. lycopersicum* deficientes en phyA (Bowler y col., 1994b).

En los pulvínulos de *P. coccineus*, el Ca^{2+} es clave regulando la turgencia de los protoplastos extensores. Mayer y col (1997) sugieren que la liberación de Ca^{2+} de reservorios internos inducida por IP_3 es crucial en la disminución de turgencia inducida por la transición luz-oscuridad al final del día. En cambio, el aumento de turgencia provocado por la transición oscuridad-luz requiere Ca^{2+} extracelular. En nuestras condiciones experimentales es imposible discernir si el aumento de $[Ca^{2+}]_c$ intercambiable se produce por: **a)** entrada de Ca^{2+} apoplástico o, **b)** liberación de Ca^{2+} de reservorios internos. Los efectos de quelantes de Ca^{2+} y del La^{3+} (bloqueador de canales de Ca^{2+}) así

como de agonistas y un antagonista intracelular del Ca^{2+} sobre el cierre nictinástico dependiente de phy(s) indican la participación tanto del Ca^{2+} apoplástico como del intracelular (McEvoy y Koukkari, 1972; Roblin y col., 1989; Moysset y Simón, 1989; 1990; Moysset y col., 1994a).

En un sistema similar, los estomas, el ácido abscísico provoca el cierre disminuyendo la turgencia de las células estomáticas de forma dependiente e independiente de Ca^{2+} . En el primer caso, esta hormona aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por entrada de Ca^{2+} extracelular y liberación de Ca^{2+} de reservorios internos a través de canales dependientes de IP_3 y cADPR (Kim y col., 2010). En los órganos motores de *S. saman*, un pulso de luz R no altera los niveles de IP_3 de los protoplastos flexores (Kim y col., 1996) pero disminuye (55 %) transitoriamente (30 s) los niveles de IP_3 de los protoplastos extensores. Esta disminución precede al cierre de canales K_H que se produce cuando los niveles de IP_3 aumentan al nivel basal (Kim y col., 1993, 1996). En este contexto, se ha sugerido que el IP_3 movilizaría Ca^{2+} intracelular el cual inhibiría la entrada de K^+ , estimularía la salida de Cl^- y disminuiría la turgencia celular (Kim y col., 1996).

La intervención del Ca^{2+} apoplástico o extracelular está apoyada por ensayos electrofisiológicos que identificaron dos tipos de canales permeables a Ca^{2+} en el plasmalema de células motoras de pulvínulos de *S. saman* (Moran, 1990). Se trata de canales activados por despolarización exclusivos de las células extensoras y de canales selectivos de cationes activados por una fuerza mecánica que permanecen abiertos en las células turgentes. En otros sistemas experimentales, como células de *Mougeotia* (Dreyer y Weisenseel, 1979), protoplastos de hojas de maíz (Das y Sopory, 1985) y de *A. sativa* (Chae y col., 1990) e hipocotilos de *Phaseolus radiatus* (Long y col., 1998) los phys controlan flujos de Ca^{2+} a través del plasmalema.

Por otra parte, la adición de Ca^{2+} 1-10 mM, en determinados momentos del movimiento rítmico en oscuridad, despolariza el plasmalema de las células motoras de los pulvínulos de *S. saman* (Racusen y Galston, 1977). En otros sistemas como coleoptilos de *A. sativa* (Newman y Briggs, 1972) y en el musgo *P. patens* (Ermolayeva y col., 1996, 1997) la luz R provoca despolarización del plasmalema en presencia de Ca^{2+} extracelular.

En *P. patens* esta despolarización es transitoria, muy rápida (2-15 s) y coincide con una entrada de Ca^{2+} y una salida de aniones (Cl^-). No hay datos de una respuesta similar en los órganos motores.

En este contexto, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ intercambiable provocado por R en las células extensoras podría disminuir la turgencia celular regulando la actividad de canales iónicos, de acuerdo con el modelo propuesto en *Characeae* (Beilby y Coster, 1979), aunque sin excluir contribuciones adicionales como la inhibición de la actividad ATPasa- H^+ (Kinoshita y col., 1995). Así, R provocaría un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de las células extensoras estimulando la entrada de Ca^{2+} extracelular (posiblemente a través de canales activados por fuerza mecánica que están abiertos en la células turgentes) y la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares. Esta elevación de Ca^{2+} provocaría despolarización y activaría canales de salida de aniones (Cl^-). Esta salida de aniones provocaría despolarización que, a su vez, activaría a canales K_D resultando así un flujo neto de solutos osmóticamente activos, pérdida de agua y de turgencia celular. A su vez, la despolarización también activaría la abertura de canales de entrada de Ca^{2+} dependientes de voltaje y aumentaría la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que actuaría inhibiendo las ATPasas- H^+ (Kinoshita y col., 1995) e inactivando canales K_H en concordancia con lo observado en células estomáticas (revisado por Hubbard y col., 2012). En pulvínulos de *S. saman*, la oscuridad provoca el cierre de canales K_H de protoplastos extensores (Kim y col., 1993). En el plasmalema de las células motoras de pulvínulos de *S. saman*, se han identificado canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} que, activados en el momento apropiado del ciclo, por ejemplo, en el pico de máxima turgencia, proporcionarían la señal de despolarización que activaría los canales K_D y, por tanto, salida de K^+ y disminución de turgencia celular (Moran, 1990). En *Mougeotia* la luz R regula canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Lew y col., 1990).

En la misma situación, cabe suponer que la menor $[\text{Ca}^{2+}]_c$ intercambiable de las células flexoras -después de una irradiación R- permitiría la actividad de las ATPasas- H^+ así como la abertura de canales K_H . En los pulvínulos de *S. saman* una irradiación R provoca hiperpolarización del plasmalema (Racusen y Satter, 1975) y acidificación transitoria del apoplasto flexor (Lee y Satter, 1989). También estimula la abertura de

canales K_H de las células flexoras (Kim y col., 1993) cuya actividad está modulada por fosforilación e inhibida por acidificación (Yu y col., 2001, 2006).

En nuestras condiciones experimentales, una irradiación FR actuó preferentemente en las células extensoras inhibiendo el incremento de $[Ca^{2+}]_c$ intercambiable inducido por R. De este modo, FR atenuó (Tabla 4.8), prácticamente anuló (Fig. 4.28), las diferencias en contenido de Ca^{2+} intercambiable citosólico entre las células extensoras y flexoras observadas en el material irradiado con R. Este efecto de R y FR, más acusado en las células extensoras *versus* las flexoras, concuerda con resultados previos en *R. pseudoacacia* (Moysset y Simón, 1991a), *A. julibrissin* (Satter y col., 1970b) y *S. saman* (Morse y Satter, 1979) que asignan a las células extensoras un papel predominante (no exclusivo) en el movimiento foliar.

En los ensayos realizados, FR se aplicó – a las 2 h del fotoperiodo – a pulvínulos en posición de abertura con las células extensoras turgentes y las flexoras más flácidas, características que explicarían la respuesta diferencial de estos dos tipos de células a un contenido similar de Ca^{2+} citosólico intercambiable. Así, puede especularse que tras una irradiación FR el contenido de Ca^{2+} intercambiable citosólico de las células extensoras mantendría o reduciría ligeramente la turgencia de estas células al mantener activas las ATPasas- H^+ del plasmalema, abiertos los canales K_H y cerrados los canales K_D . En cambio, en las células flexoras FR anularía o reduciría parcialmente el aumento de turgencia desencadenado por la oscuridad anulando o reduciendo la actividad ATPasa- H^+ así como la de los canales K_H y K_D . Resultados previos, en pulvínulos de *S. saman*, apoyan parcialmente esta interpretación puesto que R y oscuridad estimulan la actividad ATPasa- H^+ (Racusen y Satter, 1975; Iglesias y Satter, 1983a y b; Lee y Satter, 1989), el cierre de canales K_D (Suh y col., 2000) y la abertura de los canales K_H de las células flexoras, siendo este último efecto revertido por FR (Kim y col., 1993). En *P. patens*, FR inhibe la actividad de canales K_D (Spalding, 2000). En cambio, los canales K_H de las células extensoras permanecen cerrados independientemente del estado de fotoequilibrio de phy(s) (Kim y col., 1993) y no hay datos de que FR anule el efecto de R sobre la actividad ATPasa- H^+ .

En conjunto, los resultados obtenidos muestran, por primera vez, que el efecto de la luz R estimulando el cierre nictinástico está asociado a un incremento de $[Ca^{2+}]_c$ intercambiable en las células extensoras y pueden interpretarse a favor de la actuación de este catión como segundo mensajero de phy(s) posiblemente regulando la actividad de ATPasas- H^+ y la de canales iónicos. Evidentemente, el sistema es muy complejo y serán necesarios más trabajos para clarificar el procesamiento de esta señal.

6.-CONCLUSIONES

- 1.- La criofijación por proyección contra un bloque de cobre enfriado con helio líquido, criosustitución en acetona - glutaraldehído 3 % e inclusión en resina Spurr es adecuada para preservar la ultraestructura y localizar azúcares solubles por autorradiografía en las células motoras pulvinulares de *R. pseudoacacia*.
- 2.- La fijación con piroantimoniato potásico 4 % - glutaraldehído 2,5 % - paraformaldehído 2 % - fenol 1 % es adecuada para la preservación ultraestructural y la detección citoquímica de Ca^{2+} intercambiable en los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*.
- 3.- La aplicación de fusicoccina, estimuladora de ATPasas- H^+ , inhibe el cierre nictinástico y, en general, induce la reabertura de los folíolos secundarios de *A. lophantha*, a las 2 h y a las 8 h del fotoperiodo y de forma independiente del estado de fotoequilibrio de los fitocromos. Ello indica la presencia de ATPasas- H^+ en las células extensoras y el consiguiente aumento de turgencia de dichas células, provocando inhibición del cierre y estimulando la reabertura.
- 4.- La sacarosa exógena estimula el cierre nictinástico dependiente de fitocromos de los folíolos secundarios de *A. lophantha* tanto a las 2 h como a las 8 h del fotoperiodo, probablemente suministrando aporte energético y/o actuando como señal.
- 5.- La aplicación simultánea o secuencial de fusicoccina y sacarosa inhibe el efecto de la sacarosa sobre el cierre nictinástico de *A. lophantha* y potencia la acción de la fusicoccina inhibiendo el cierre y estimulando la reabertura. Ello sugiere que la fusicoccina al incrementar la actividad ATPasa- H^+ estimularía indirectamente el cotransporte sacarosa- H^+ , dando un sistema de retroalimentación positivo.
- 6.- Los azúcares-alcohol (sorbitol y manitol) incrementan el cierre nictinástico de los folíolos secundarios de *A. lophantha*, siendo dicho efecto más acusado en presencia de Pfr. La aplicación simultánea de estos azúcares-alcohol con fusicoccina potencia, al igual que la sacarosa, la acción de la fusicoccina.

- 7.- La sacarosa-³H 50 mM y el manitol-³H 50 mM, se incorporan a los pulvínulos secundarios durante el cierre nictinástico de los folíolos de *R. pseudoacacia*. La cantidad de sacarosa incorporada es prácticamente el doble que la de manitol y, en ambos casos, es independiente del estado de fotoequilibrio de los fitocromos.
- 8.- Tanto la sacarosa-³H 50 mM como el manitol-³H 50 mM, incorporados vía vascular, se distribuyen por todos los tejidos pulvinulares de *R. pseudoacacia* desde el cilindro central hasta la epidermis. Se localizan preferentemente en las paredes celulares, el citoplasma y las vacuolas acuosas.
- 9.- La distribución de sacarosa-³H 50 mM en los protoplastos extensores y flexores depende del estado de fotoequilibrio de los fitocromos. Después de una irradiación FR se reduce drásticamente la incorporación de sacarosa en los protoplastos extensores y aumenta ligeramente en los flexores internos. La incorporación de sacarosa en los protoplastos extensores y flexores difiere después de un tratamiento con luz R.
- 10.- La distribución de manitol-³H 50 mM en los protoplastos extensores y flexores también depende del estado de fotoequilibrio de los fitocromos. No presenta diferencias después de un tratamiento con luz R y se acumula en los protoplastos flexores después de una irradiación con luz FR.
- 11.- La sacarosa-³H 50 mM y el manitol-³H 50 mM probablemente no actúan como compuestos osmóticos, durante el cierre nictinástico de los pulvínulos secundarios de *R. pseudoacacia*, puesto que su incorporación en las células extensoras y flexoras no está relacionada con sus distintos estados de turgencia.
- 12.- El Ca²⁺ intercambiable se detecta, en forma de precipitados de distinta forma y tamaño, en todos los tejidos pulvinulares de *R. pseudoacacia*. A nivel subcelular se localiza principalmente en el citosol, las vacuolas acuosas, los núcleos y los espacios intercelulares.

13.- Una irradiación con luz R provoca un acusado incremento de Ca^{2+} intercambiable en el citosol de las células extensoras de *R. pseudoacacia* durante el cierre nictinástico. Este aumento, determinado por la presencia de Pfr, es transitorio pues es indetectable a los 30 minutos de la irradiación. Una irradiación con luz FR evita la acumulación de Ca^{2+} intercambiable en el citosol dando lugar a valores muy similares en las células flexoras y extensoras. Esto indicaría que Pfr actúa modulando la concentración de Ca^{2+} citosólico intercambiable en las células extensoras pulvinulares.

7.-BIBLIOGRAFÍA

- Annunciata**, M. F. y Kessler, M. J. 2003. Liquid scintillation analysis: Principles and practice. -En: Handbook of radioactivity analysis. Annunziata, M. F. (ed.). Academic Press. 412-518.
- Antkowiak**, B., Mayer, W-E. y Engelmann, W. 1991. Oscillations on the Membrane Potential of Pulvinar Motor Cells in-Situ in Relation to Leaflet Movements of *Desmodium-Motorium*. -Journal of Experimental Botany 42: 901-10.
- Audit**, M., Barbier, M., Soyer-Gobillard, M. O., Albert, M., Geraud, M. L., Nicolas, G. y Lenares, G. 1996. Cyclin B (p56^{cdc13}) localisation in the yeast **Schizosaccharomyces pombe**: an ultrastructural and immunocytochemical study. -Biol. Cell 86 (1): 1-10.
- Ayre**, B. G. 2011. Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. -Molecular Plant 4 (3): 377-394.
- Bae**, G. y Choi, G. 2008. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. -Annu. Rev. Plant Biol. 59: 281-311.
- Bailey**, L. H. 1942. The standard Cyclopaedia of Horticulture (I). McMillan Company. New York. Pág. 179.
- Baker**, J. R. J. 1989. Autoradiography: A comprehensive overview. -Microscopy Handbooks 18 Series. Oxford University Press. Pág. 120.
- Balasubramanian**, S., Sureshkumar, S., Lempe, J. y Weigel, D. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. -PLoS Genetics 2: 106.
- Barnes**, S. A., Nishizawa, N. K., Quaggio, R. B., Whitlam, G. C. y Chua, N. H. 1996. Far-red light blocks greening of *arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. -Plant Cell 8 (4): 601-615.
- Beilby**, M. J. y Coster, H. G. L. 1979. The action potential in *Chara corallina*. II. Two activation-inactivation transients in voltage clamps of plasmalemma. -Aust. J. Plant Physiol. 6: 329-335.
- Belyavskaya**, N. A. 2001. Ultrastructure and calcium balance in meristem cells of pea roots exposed to extremely low magnetic fields. -Advances in Space Research 28 (4): 645-650.
- Bendayan**, M. 1984. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications and limitations. -J. Electron Microsc. Tech. 1: 243-270.

- Bergareche, C., Angelo, A. P., Chellik, S., Moysset, L. y Simón, E.** 2012. Nitric oxide inhibits nyctinastic closure of *Albizzia lophantha* Benth. leaflets: the effect is mediated by cGMP. -4th Plant NO Club International Meeting P16, pg. 42.
- Bewley, J. D. y Black, M.** 1982. Viability, Dormancy, and Environmental Control. - Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 76-77.
- Bialczyk, J. y Lechowski, Z.** 1986. Diurnal changes in the malic acid concentration in *Phaseolus coccineus* L. pulvini. -Plant and Cell Physiology 27: 981-987.
- Bialczyk, J. y Lechowski, Z.** 1989. Malic acid synthesis in relation to K⁺ and Cl⁻ availability in *Phaseolus coccineus* L. pulvini. -Biochem. Physiol. Pflanzen 184: 79-86.
- Bialczyk, J. y Lechowski, Z.** 1990. Influence of a potassium-channel blocker and metabolic and ATPase inhibitors on potassium and malate content of *Phaseolus coccineus* L. pulvini. - New Phytol. 115: 595-601.
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R. y Kaldenhoff, R.** 1999. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. -The Plant Journal 18: 565-570.
- Bonnemain, J. L., Gaillochet, J. y Fleurat-Lessard, P.** 1978. Effets de l'acide abscissique et de la fusicoccine sur les réactions motrices des pulvini du *Cassia fasciculata* Michx. et du *Mimosa pudica* L. -C. R. Acad. Sci. Sér. D 286: 1681-1686.
- Bonza, M. C. y De Michelis, M. I.** 2011. The plant Ca²⁺-ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions. -Plant Biology (Stuttgart) 13 (3): 421-430.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. y Toole, V. K.** 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. -Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38: 662-666.
- Bossen, M. E., Dassen, H. H. A., Kendrick, R. E. y Vredenberg, W. J.** 1988. The role of calcium ions in phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. -Planta 174: 94-100.
- Botto, J. F., Sanchez, R. A., Whitlam, G. C. y Casal, J. J.** 1996. Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. -Plant Physiol. 110: 439-444.
- Bouteille, M.** 1976. The "LIGOP" Method for Routine Ultrastructural Autoradiography. A combination of single Grid Coating, gold latensification and Phenidon development. - J. Microscopie Biol. Cell. 27: 121-128.

- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. y Chua, N. H. 1994a.** Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. –*Cell* 77: 73-81.
- Bowler, C., Yamagata, H., Neuhaus, G. y Chua, N. H. 1994b.** Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. –*Genes & Dev.* 8: 2188-2202.
- Boyenval, J. y Fischer, J. 1976.** Dipping technique. –*J. Microscopie Biol. Cell.* 27: 115-120.
- Bucking, H., Forster, H., Stenzel, I., Miersch, O. y Hause, B. 2004.** Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley. –*FEBS Lett* 562: 45-50.
- Bush, D. S. 1995.** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. –*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 95-122.
- Campbell, N. A. y Garber, R. C. 1980.** Vacuolar reorganization in the motor cells of *Albizia* during leaf movement. –*Planta* 148: 251-255.
- Campbell, N., Satter, R. y Garber, R. 1981.** Apoplastic transport of ions in the motor organ of *Samanea*. –*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (5): 2981-2984.
- Campbell, N. A., Stika, K. M. y Morrison, G. H. 1979.** Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscopy. –*Science* 204: 185-187.
- Chae, Q., Park, H. J. y Hong, S. D. 1990.** Loading of quin-2 into the oat protoplast and measurement of cytosolic calcium ion concentration changes by phytochrome action. –*Biochim. Biophys. Acta* 1051: 115-122.
- Chincinska, I. A., Liesche, J., Kruegel, U., Michalska, J., Geigenberger, P., Grimm, B. y Kuehn, C. 2008.** Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. –*Plant Physiology (Rockville)* 146 (2): 515-528.
- Chiou, T. -J. y Bush, D. R. 1998.** Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. –*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8): 4784-4788.
- Clack, T., Mathews, S. y Sharrock, R. A. 1994.** The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. –*Plant Molecular Biology* 25: 413-427.

- Clack**, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M. y Sharrock, R. A. 2009. Obligate heterodimerization of Arabidopsis phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. –*The Plant Cell* 21: 786-799.
- Cocucci**, M. C., Morgutti, S., Abruzzese, A. y Alisi, C. 1990. Response to osmotic medium and fusicoccin by seeds of radish (*Raphanus sativus*) in the early phase of germination. –*Physiol. Plant.* 80: 294-300.
- Conde**, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C. y Gerós, H. 2011. Mannitol Transport and Mannitol Dehydrogenase Activities are Coordinated in *Olea europaea* Under Salt and Osmotic Stresses. –*Plant Cell Physiol.* 52 (10): 1766-1775.
- Contim**, L. A. S., Waclawovsky, A. J., Delhú-Filo, N., Pirovani, C. P., Clarindo, W. R., Nogueira, M. E., Carvalho, C. R. y Fontes, E. P. B. 2003. The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression of the *SBP2* promoter. –*J. Exp. Bot.* 54: 2643-2653.
- Cram**, W. J. 1984. Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. –*Physiologia Plantarum* 61 (3): 396-404.
- Curti**, G., Massardi, R. y Lado, P. 1993. Synergistic activation of plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* cells by turgor decrease and by fusicoccin. –*Physiol. Plant.* 87: 592-600.
- Daie**, J. y Wyse, R. E. 1985. Evidence on the mechanism of enhanced sucrose uptake at low cell turgor in leaf discs of *Phaseolus coccinius*. –*Physiol. Plant.* 64 (4): 547-552.
- Dalchau**, N., Baek, S. J.; Briggs, H. M.; Robertson, F. C.; Dodd, A. N.; Gardner, M. J.; Stancombe, M. A.; Haydon, M. J.; Stan, G.-B.; Gonçalves, J. M. y Webb, A. A. R. 2011. The circadian oscillator gene GIGANTEA mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. –*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12): 5104-5109.
- Darwin**, C. 1880. *The Power of Movements in Plants*. –Murray, Londres.
- Das**, R., y Sopory, S. K. 1985. Evidence of Regulation of Calcium Uptake by Phytochrome in Maize *Zea-Mays* Cultivar Ganga-5 Protoplasts. –*Biochemical and Biophysical Research Communications* 128: 1455-60
- Day**, I. S. y Reddy, A. S. N. 2011. Elucidation of calcium signaling components and networks. –In *Coding and Decoding of Calcium Signals in Plants*. Ed. S. Luan, Springer, 10: 147-175.

- De Mairan**, J-JDO. 1729. Observation botanique. Histoire de l'Académie Royale des Sciences, Paris, pp 35-36.
- Deeken**, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heiser, R., Sauer, N., May, S. T. y Hedrich, R. 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. –*Planta* 216: 334-344.
- DeFalco**, T. A.; Bender, K. W. y Snedden, W. A. 2010. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. –*Biochemical Journal* 425 (1): 27-40.
- Devlin**, P. F., Patel, S. R. y Whitelam, G. C. 1998. Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis*. –*Plant Cell* 10: 1479-1488.
- Devlin**, P. F., Robson, P. R. H., Patel, S. R., Goosey, L., Sharrock, R. A. y Whitelam, G. C. 1999. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. –*Plant Physiol.* 119: 909-915.
- Dijkwel**, P. P., Huiser, C., Weisbeek, P. J., Chua, N. H. y Smeekens, S. C. M. 1997. Sucrose control of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. –*Plant Cell* 9: 583-595.
- Dijkwel**, P. P., Kock, P. A. M., Bezemer, R., Weisbeek, P. J. y Smeekens, S. C. M. 1996. Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of plastocyanin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. –*Plant Physiology (Rockville)* 110 (2): 455-463.
- Doi**, M., Wada, M. y Shimazaki, K. 2006. The fern *Adiantum capillus-veneris* lacks stomatal responses to blue light. –*Plant and Cell Physiology* 47 (6): 748-755.
- Dreyer**, E. M. y Weisenseel, M. H. 1979. Phytochrome-mediated uptake of calcium in *Mougeotia* cells. –*Planta* 146: 31-39.
- Droz**, B. 1976. Artefacts in radioautography. –*J. Microscop. Biol. Cell.* 27: 133-134.
- Dudits**, D., Abraham, E., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Bilgin, M. y Horváth, G. 2011. Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. –*Annals of Botany* 107 (7): 1193-1202.
- Endeward**, V., Musa-Aziz, R., Cooper, G. J., Chen, L. M., Pelletier, M. F., Virkki, L. V., y col.. 2006. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. –*FASEB Journal* 20: 1974-1981.
- Enoch**, S. y Glinka, Z. 1981. Changes in potassium fluxes in cells of carrot storage tissue related to turgor pressure. –*Physiol. Plant.* 53: 548–552.

- Ermolayeva, E., Hohmeyer, H., Johannes, E. y Sanders, D.** 1996. Calcium-dependent membrane depolarisation activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. -Planta 199: 352-358.
- Ermolayeva, E., Sanders, D. y Johannes, E.** 1997. Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarization in caulonemal side branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*. -Planta 201: 109-118.
- Escaig, J.** 1982. New instruments which facilitate freezing at 83 and 6 K. -J. Microsc. 126: 221-229.
- Evans, D. E., Bengochea, T., Cairns, A. J., Dodds, J. H. y Hall, M. A.** 1982. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L.: subcellular localization. -Plant Cell Environ. 5: 101-107.
- Fernández, E.** 2007. Fitocromo A de *Robinia pseudoacacia* L.: caracterización molecular y expresión temporal del gen *PHYA* e inmunolocalización pulvinular de la apoproteína. -Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 292 páginas.
- Fleurat-Lessard, P.** 1981. Ultrastructural Features of the Starch Sheath Cells of the Primary Pulvinus After Gravistimulation of the Sensitive Plant (*Mimosa pudica* L.). - Protoplasma, 105: 177-184.
- Fleurat-Lessard, P. y Bonnemain, J. L.** 1978. Structural and Ultrastructural Characteristics of the Vascular Apparatus of the Sensitive Plant (*Mimosa pudica* L.). - Protoplasma 94: 127-143.
- Fleurat-Lessard, P., Bouché-Pillon, S., Leloup, C. y Bonnemain, J. L.** 1997a. Distribution and activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Mimosa pudica* L. in relation to ionic fluxes and leaf movements. -Plant Physiol 113: 747-754.
- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J. y Martinoia, E.** 1997b. Increased expression of vacuolar aquaporin and H⁺-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L.. -Plant Physiol. 114: 827-834.
- Fleurat-Lessard, P. y Millet, B.** 1984. Ultrastructural Features of Cortical Parenchyma Cells (Motor Cells) in Stamen Filaments of *Berberis Canadensis* Mill and Tertiary Pulvini of *Mimosa pudica* L. -J. Exp. Bot. 35: 1332-1341.
- Fleurat-Lessard, P. y Roblin, G.** 1982. Comparative Histocytology of the Petiole and the Main Pulvinus in *Mimosa pudica* L. -Annals of Botany 50: 83-92.

- Follet-Gueye, M. L., Verdus, M. C., Demarty, M., Thellier, M. y Ripoll, C. 1998.** Cambium pre-activation in beech correlates with a strong temporary increase of calcium in cambium and phloem but not in xylem cells. –*Cell calcium* 24 (3): 205-11.
- Franklin, K. A., Davis, S. J., Stoddart, W. M., Vierstra, R. D. y Whitelam, G. C. 2003.** Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in *Arabidopsis thaliana* photomorphogenesis. –*Plant Cell* 15: 1981-1989.
- Franklin, K. A. y Quail, P. H. 2010.** Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. –*J. Exp. Bot.* 61: 11-24.
- Franklin, K. A. y Whitelam, G. C. 2006.** The roles of phytochromes in adult plants. –In *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria* 3rd Edition. Eds Schäfer E and Nagy F, Springer, Dordrecht, Netherlands. pp 475-498.
- Fromm, J. y Eschrich, W. 1988.** Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. II. Energesis and transmission of seismic stimulation. *Trees Struct. Funct.* 2: 18-24.
- Furuya, M. 1993.** Phytochromes: Their Molecular Species, Gene Families, and Functions. –*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 617-645.
- Galon, Y., Finkler, A. y Fromm, H. 2010.** Calcium-Regulated Transcription in Plants. –*Molecular Plant* 3 (4): 653-669.
- Garre, Y. 2010.** Contribución a la caracterización molecular de los genes *PHYA* y *PHYE* de *Fabaceae*. –Màster de Biologia Experimental. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- Garre, Y. 2011.** Contribución a la caracterización molecular de genes *PHY* de *Fabaceae*. –Màster de Bioquímica Experimental. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- Geisler, M., Axelsen, K. B., Harper, J. F. y Palmgren, M. G. 2000.** Molecular aspects of Higher Plant P-Type Ca^{2+} -ATPases. –*Biochim. Biophys. Acta* 1465: 52-78.
- Gepstein, S. 1982.** Light-Induced H^+ Secretion and the Relation to Senescence of Oat Leaves. –*Plant Physiol.* 70: 1120-1124.
- Gerbeau, P., Guclu, J., Ripoche, P. y Maurel, C. 1999.** Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. –*The Plant Journal* 18: 577-587.

- Gil, P., Kirrcher, S., Adam, E., Bury, E., Kozma-Boggnar, L., Schäfer, E. y Nagy, F.** 2000. Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome-B: GFP fusion protein in tobacco seedlings. –*Plant J.* 22: 135-145.
- Gillapsy, G. E.** 2011. The cellular language of myo-inositol signaling. –*New Phytologist* 192: 823-839.
- Gómez, L. A.** 1993. Estudio del movimiento rítmico foliar en *Albizia lophantha* y *Robinia pseudoacacia*: implicación del calcio y la calmodulina. –Tesis Doctoral. Univ. de Barcelona.
- Gómez, L. A. y Simón, E.** 1995. Circadian rhythm of *Robinia pseudoacacia* leaflet movements: role of calcium and phytochrome. –*Photochem Photobiol* 61: 210-215.
- Gómez, L. A., Moysset, L. y Simón, E.** 1999. Effect of calmodulin inhibitors and blue light on rhythmic movement of *Robinia pseudoacacia* leaflets. –*Photochem Photobiol* 69: 722-727.
- Goren, R. y Galston, A. W.** 1966. Control by phytochrome of C¹⁴-Sucrose incorporation into buds of etiolated pea seedlings. –*Plant Physiol.* 41 (6): 1055-1064.
- Gorton, H. L.** 1990. Pulvinar wáter relations in nyctinastic plants. In *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement*. –*Current Concepts in Plant Physiology*, Vol. 3, R. L. Satter, H. L. Gorton and T. C. Vogelmann eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 214-222.
- Halpern, S. y Quintana, C.** 1989. Two simple devices for quick-freezing and low temperature embedding. –*Biol. Cell* 67: 10a.
- Han, Y. J., Kim, H. S., Kim, Y. M., Shin, A. Y., Lee, S. S., Bhoo, S. H., Song, P. S. y Kim, J. I.** 2010. Functional characterization of phytochrome autophosphorylation in plant light signaling. –*Plant Cell Physiol.* 51: 596- 609.
- Harada, A. y Shimazaki, K.** 2009. Measurement of Changes in Cytosolic Ca²⁺ in Arabidopsis Guard Cells and Mesophyll Cells in Response to Blue Light. –*Plant and Cell Physiology* 50 (2): 360-373.
- Hayat, M.** 1993. Stains and cytochemical methods. –Plenum Press, New York.
- Hayatsu, M., Ono, M., Hamamoto, C. y Suzuki, S.** 2012. Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity. –*J. Electron Microsc.* 61 (1): 57-69.

- Hennig**, L., Stoddart, W. M., Dieterle, M., Whitlam, G. C. y Schäfer, E. 2002. Phytochrome E Controls Light-Induced Germination of *Arabidopsis*. -Plant Physiol. 128: 194-200.
- Hepler**, P. K. y Winship, L. J. 2010. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. –Journal of Integrative Plant Biology 52 (2): 147-160.
- Hillman**, W. S. y Koukkari, W. L. 1967. Phytochrome effects in the nyctinasty leaf movements of *Albizzia julibrissin* and some other legumes. -Plant Physiol. 42: 1413-1418.
- Hippe**, S. 1987. Combined application of low temperature preparation and electron microscopic autoradiography for the localization of systemic fungicides. – Histochemistry and Cell Biology 87 (4): 309-315.
- Hirschi**, K. 2001. Vacuolar H⁺/Ca²⁺ Transport: Who Is Directing the Traffic? –Trends Plant Sci. 6: 100-104.
- Hohl**, M. y Schopfer, P. 1991. Water relations of growing maize coleoptiles. –Plant Physiol. 95: 716-722.
- Holm**, L. M., Jahn, T. P., Moller, A. L., Schjoerring, J. K., Ferri, D., Klaerke, D. A. y col. 2005. –NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin expressing *Xenopus* oocytes. –Pfluegers Archiv 450: 415-428.
- Huang**, A. -X., She, X. -P., Cao, B., Zhang, B., Mu, J. y Zhang, S.-J. 2009. Nitric oxide, actin reorganization and vacuoles change are involved in PEG 6000-induced stomatal closure in *Vicia faba*. -Physiologia Plantarum 136 (1): 45-56.
- Hubbard**, K. E., Siegel, R. S., Valerio, G., Brandt, B. y Schroeder, J. I. 2012. Abscisic acid and CO₂ signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus-response analyses. –Annals of Botany 109 (1): 5-17.
- Iglesias**, A. y Satter, R. L. 1983a. H⁺ fluxes in excised *Samanea* motor tissue. I. Promotion by light. -Plant Physiol. 72: 564-569.
- Iglesias**, A. y Satter, R. L. 1983b. H⁺ fluxes in excised *Samanea* motor tissue. II. Rhythmic Properties. -Plant Physiol. 72: 570-572.
- Jaensch**, L. y Findlay, G. P. 1998. Ion channels in the plasma membrane of *Phaseolus* motor cells. –In: Tester M., Morris C., Davies J (eds) Abstr. Vol 11th Int Worksh Plant Membrane Biology. Springer, Cambridge, UK, p 148.

- Jahn**, T. P., Moller, A. L., Zeuthen, T., Holm, L. M., Klaerke, D. A., Mohsin, B., y col. 2004. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. –FEBS Letters 574: 31-36.
- Jauneau**, A., Quentin, M. y Driouich, A. 1997. Micro-heterogeneity of pectins and calcium distribution in the epidermal and cortical parenchyma cell walls of flax hypocotyl. –Protoplasma 198: 9-19.
- Jaunin**, F., Boutinard Rouelle-Rossier, V. y Hofer, R. 1991. Cytochemical and X-ray microanalytical studies of calcium in the extending zone, particularly in the rhizodermis of *Zea mays* roots. –Physiologia Plantarum 81: 15-23.
- Jessen**, H., Peters, P. D. y Hall, T. A. 1976. Sulphur in epidermal keratohyalin granules: a quantitative assay by X-Ray microanalysis. –J. Cell Sci 22: 161-171.
- Juchaux-Cachau**, M., Landouar-Arsivaud, L., Pichaut, J., Campion, C., Porcheron, B., Jeauffre, J., Noiraud-Romy, N., Simoneau, P., Maurousset, L. y Lemoine, R. 2007. Characterization of AgMaT2, a Plasma Membrane Mannitol Transporter from Celery, Expressed in Phloem Cells, Including Phloem Parenchyma Cells. –Plant Physiology 145: 62-74.
- Kaneda**, M., Rensing, K. H., Wong, J. C. T., Banno, B., Mansfield, S. D. y Samuels, A. L. 2008. Tracking monolignol during wood development in lodgepole pine. –Plant Physiol. 147: 1750–1760.
- Karniol**, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. y Vierstra, R. D. 2005. Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. –Biochem. J. 392: 103-116.
- Karnovsky**, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. –J. Cell Biol. 27: 137A-8A.
- Karve**, A. D., Deshmukh, A. K., Bhalerao, A. C. y Deshmukh, V. A. 1984. Photomorphogenic regulation of reproductive development in groundnut and the significance of nyctinastic leaf movements. –New Phytologist 96 (4): 535-543.
- Keller**, F. y Matile, P. 1989. Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. –New Phytologist 113 (3): 291–299.
- Kim**, H. Y., Coté, G. G. y Crain, R. C. 1992. Effects of Light on the Membrane Potential of Protoplasts from *Samanea saman* Pulvini. Involvement of K⁺ channels and the H⁺-ATPase. –Plant Physiology 99: 1532-1539.

- Kim, H. Y., Coté, G. G. y Crain, R. C.** 1993. Potassium channels in *Samanea saman* protoplasts controlled by phytochrome and the biological clock. *Science* 260: 960-962.
- Kim, H. Y., Coté, G. G. y Crain, R. C.** 1996. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate may mediate closure of K⁺ channels by light and darkness in *Samanea saman* motor cells. –*Planta* 198: 279-287.
- Kim, J.-C., Son, M. -J., Subedi, K. P., Kim, D. H. y Woo, S. -H.** 2010. IP₃-induced cytosolic and nuclear Ca²⁺ signals in HL-1 atrial myocytes: Possible role of IP₃ receptor subtypes. –*Molecules and Cells* 29 (4): 387-395.
- Kim, Y. -S., Moon, D. K., Goodin, J. R. y Sdong, P. -S.** 1986. Swelling of etiolated protoplasts induced by cAMP and red light. –*Plant Cell Physiol* 27: 193–197.
- Kinoshita, T., Nishimura, M. y Shimazaki, K.-I.** 1995. Cytosolic concentration of Ca²⁺ regulates the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of fava bean. –*Plant Cell* 7: 1333–1342.
- Kiyosawa, K.** 1979. Unequal distribution of potassium and anions within *Phaseolus pulvinus*. –*Plant and Cell Physiology* 20: 1621-1634.
- Klein, R. L., Yen, S. -S. y Thureson-Klein, A.** 1972. Critique on the K-pyroantimonate method for semi-quantitative estimation of cations in conjunction with electron microscopy. –*J Histochem Cytochem* 20: 65.
- Klymchuk, D. O., Brown, C. S., Chapman, D. K., Vorobyova, T. V. y Martyn, G. M.** 2001. Cytochemical localization of calcium in soybean root cap cells in microgravity. – *Adv Space Res* 27 (5): 967-72.
- Klymchuk, D. O., Kordyum, E. L., Vorobyova, T. V, Chapman, D. K y Brown, C. S.** 2003. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity. –*Adv Space Res* 31 (10): 2283-8.
- Knight, H., Thomson, A. J. W. y McWatters, H. G.** 2008. Sensitive to freezing6 integrates cellular and environmental inputs to the plant circadian clock. –*Plant Physiology (Rockville)* 148 (1): 293-303.
- Komnick, H.** 1962. Elektronenmikroskopische Lokalisaton von Na⁺ und Cl⁻ in Zellen und Geweben. –*Protoplasma* 55: 414.
- Komor, E. y Tanner, W.** 1980. Proton-cotransport of sugars in plants. –In *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues.* (Eds. RM Spanswick, WJ Lucas y J Dainty) pp. 247-257.

- Komor, W.** 1977. Sucrose uptake by cotyledons of *Ricinus communis* L.: characteristics, mechanism, and regulation. –*Planta* 137: 119-131.
- Kreslavski, V. D., Carpentier, R., Klimov, V. V. y Allakhverdiev, S. I.** 2009. Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells. –*Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews* 10 (2): 63-80.
- Kühn, C., Barker, L., Burkle, L. y Frommer, W. B.** 1999. Update on sucrose transport in higher plants. –*J Exp Bot* 50: 935-953.
- Kühn, C. y Grof, C.** 2010. Sucrose transporters of higher plants. –*Current Opinion in Plant Biology* 13: 288-298.
- Kuo-Huang, L. -L. y Chen, S. -J.** 1999. Subcellular Localization of Calcium in the Crystal-Forming Sclereids of *Nymphaea tetragona* Georgi. –*Taiwania*, 44 (4): 520-528.
- Lazzaro, M. D. y Thomson, W. W.** 1992. Ultrastructural localization of calcium in the organic acid secreting trichomes of chickpea (*Cicer arietinum*). –*Canadian Journal of Botany* 70: 2319-2325.
- Lee, Y.** 1990. Ion movements that control pulvinar curvature in nyctinastic legumes. In: Satter, R. L., Gorton, H. L. y Vogelmann, T. C. (eds) *The pulvinus: motor organ for leaf movement*, vol 3, ASPP, Rockville, MD, pp 130-138.
- Lee, Y. y Satter, R. L.** 1987. H⁺ uptake and release during circadian rhythmic movements of excised *Samanea* motor organs. –*Plant Physiol.* 83: 856-862.
- Lee, Y. y Satter, R. L.** 1989. Effects of white, blue, red light and darkness on pH of the apoplast in the *Samanea* pulvinus. –*Planta* 178: 31-40.
- Leivar, P. y Quail, P. H.** 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. –*Trends Plant Sci.* 16(1): 19-28.
- Lenartowska, M., Krzeslowska, M. y Bednarska, E.** 2011. Pectin dynamic and distribution of exchangeable Ca(2+) in *Haemanthus albiflos* hollow style during pollen-pistil interactions. –*Protoplasma* 248 (4): 695-705.
- Lew, R. R., Serlin, B. S., Schauf, C. L. y Stockton, M. E.** 1990. Calcium activation of mougeotia potassium channels. –*Plant Physiol.* 92 (3): 831-6.
- Li, D. H., Yang, X. y Cui, K. M.** 2007. Formation of archegonium chamber is associated with nucellar-cell programmed cell death in *Ginkgo biloba*. –*Protoplasma* 231: 173-181.

- Li, J., Li, G., Wang, H. y Deng, X. W.** 2011. Phytochrome Signaling Mechanisms. –The Arabidopsis Book 9:e0148.
- Liu, Z., Zhang, Y., Liu, R., Hao, H., Wang, Z. y Bi, Y.** 2011. Phytochrome interacting factors (PIFs) are essential regulators for sucrose-induced hypocotyl elongation in Arabidopsis. -Journal of Plant Physiology 168 (15): 1771-1779.
- Liberman, M., Mutaftschiev, S., Jauneau, A., Vian, B., Catesson, A. M. y Goldberg, R.** 1999. Mung Bean Hypocotyl Homogalacturonan: Localization, Organization and Origin. –Annals of Botany 84 (2): 225-233.
- Long, C. y Iino, M.** 2001. Light-dependent osmoregulation in pea stem protoplasts. Photoreceptors, tissue specificity, ion relationships, and physiological implications. – Plant Physiol. 125: 1854-1869.
- Long, C., Wang, X. y Pan, R.** 1995. The role of calcium ions in red light-induced swelling of mung bean protoplasts. -Chinese Sci Bull 40: 248–251.
- Long, C., Wang, X. J. y Pan, R. C.** 1998. The effect of external Ca^{2+} and Ca^{2+} -channel modulators on red light induced swelling of protoplasts of *Phaseolus radiatus* L. -Cell Res. 8: 41-50.
- López-Iglesias, C., Puvion-Dutilleul, F., Cebrian, J. y Christensen, M. E.** 1988. Herpes simplex virus type 1-induced modifications in the distribution of nucleolar B-36 protein. -Europ. J. Cell Biol. 46: 259-269.
- Lowen, C. Z. y Satter R. L.** 1989. Light-promoted changes in apoplastic K^+ activity in the *Samanea saman* pulvinus, monitored with liquid membrane microelectrodes. –Planta 179: 421-427.
- Lucas, L. L. y Unterweger, M. P.** 2000. Comprehensive Review and Critical Evaluation of the Half-Life of Tritium. –Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology 105 (4): 541.
- Ma, Y., Song, W., Liu, Z., Zhang, H., Guo, X., Shao, H. y Ni, F.** 2009. The dynamic changing of Ca^{2+} cellular localization in maize leaflets under drought stress. -Comptes Rendus Biologies 332 (4): 351-362.
- Mabberley, D. J.** 1987. The plant book: a portable dictionary of the higher plants. – Cambridge University Press, England, UK : XII+706P.
- Mancinelli, A. L.** 1994. The physiology of phytochrome action. –In Photomorphogenesis in plants. Edited by Kendrick, R. E. y Kronenberg, G. H. M. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 211-269.

- Marrè, E.** 1979. Fusicoccin: a tool in plant physiology. -Annu. Rev. Plant Physiol. 30: 273-288.
- Marrè, E., Lado, R., Rasi-Caldogno, F. y Colombo, R.** 1973. Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in the pH of the medium of incubation. I. Effects of fusicoccin, natural and synthetic auxins and mannitol. -Plant Sci. 1: 179-184.
- Maule, A. J. y Ride, J. P.** 1982. Ultrastructure and autoradiography of lignifying cells in wheat leaves wound inoculated with *Botrytis cinerea*. -Physiological Plant Pathology 20: 235-241.
- Mayer, W. -E., Flach, D., Raju, M., Starrach, N. y Wiech, E.** 1985a. Mechanics of circadian pulvini movements in *Phaseolus coccineus* L. -Planta 163: 381-390.
- Mayer, W. -E., Flach, D. y Wiech, E.** 1985b. Cation chelating agents affect leaf movement via leakage and not by inhibition of contractile proteins. -J. Plant Physiol. 118: 79-90.
- Mayer, W. -E., Hohloch, C. y Kalkuhl, A.** 1997. Extensor protoplasts of the *Phaseolus* pulvinus: light-induced swelling may require extracellular Ca^{2+} influx, dark-induced shrinking inositol 1, 4, 5-triphosphate-induced Ca^{2+} mobilization. -Journal of Experimental Botany 48: 219-228.
- Mayer, W. -E., Maier, M. y Flach, D.** 1985c. Osmotica, dimethyl sulfoxide, parahydroxymercuribenzoate, and cyanide change the period of the circadian clock in the pulvini of *Phaseolus coccineus* L. -Chronobiology International 2 (1): 11-18.
- Maynard, J. W. y Lucas, W. J.** 1982. Sucrose and glucose uptake into *Beta vulgaris* leaf tissues. Plant Physiol 70: 1436-1443.
- McAinsh, M. R. y Pittman, J. K.** 2009. Shaping the calcium signature. -New Phytologist 181 (2): 275-294.
- McEvoy, R. C. y Koukkari, W. L.** 1972. Effects of ethylenediaminetetraacetic acid, auxin and gibberellic acid on phytochrome-controlled nyctinastic closure in *Albizia julibrissim*. -Physiologia Plantarum 26: 143-7.
- Medina, R.** 2008. Caracterització parcial dels gens *PHYA* y *PHYE* d' *Albizia lophantha* Benth. -Màster de Biologia Experimental. Facultat de Biologia. Universidad de Barcelona.

- Meena**, S., Senthilvalavan, P. y Malarkodi, M. 2008. Availability of phosphorus from organic manures in maize – Assessment using radio tracer technique. –Advances in Plant Science 21 (1): 245-246.
- Mentré**, P. y Escaig, F. 1988. Localization of Cations by Pyroantimonate. I. Influence of Fixation on Distribution of Calcium and Sodium. An Approach by Analytical Ion Microscopy. -The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 36 (1): 49-54.
- Molchan**, O. V., Kim I. V., Beliaeva, T. V., Dolgachev, V. A., Kovalev, A. E., Zinchenko, V. P. y Volotovskii I. D. 2001. The role of intracellular Ca²⁺ pools in the regulation of protoplast volume. Effect of red light on the Ca²⁺ mobilization in cytoplasm of **Arabidopsis** cells. –Biofizika 46: 642–646.
- Moran** N. 1990. The role of ion channels in osmotic volume changes in *Samanea* motor cells analysed by patch clamp methods. In ‘The pulvinus: motor organ for leaf movement’. (Eds RL Satter, HL Gorton and TC Vogermann) (The American Society of Plant Physiologists, University of Connecticut: Connecticut).
- Moran**, N. 2007. Osmoregulation of leaf motor cells. –FEBS Letters 581: 2337-2347.
- Moran**, N., Ehrenstein, G., Iwasa, K., Mischke, C., Bare, C. y Satter, R. L. 1988. Potassium channels in motor cells of *Samanea saman*: a patch-clamp study. -Plant Physiol. 88: 643-648.
- Moran**, N., Fox, D. y Satter, R. L. 1990. Interaction of the depolarization-activated K channel of *Samanea saman* with inorganic ions: a patch-clamp study. –Plant Physiol. 94: 424-431.
- Moran**, N. y Satter, R. L. 1989. Depolarization-activated inward currents in motor cells of *Samanea saman*. –Plant Physiol. 89: S269.
- Moran**, N., Yueh, Y. G. y Crain, R. C. 1996. Signal transduction and cell volume regulation in plant leaflet movements. –News Physiol. Sci. 11: 108-114.
- Morse**, M. J., Crain, R. C. y Satter R. L. 1987. Light-stimulated inositol-phospholipid turnover in *Samanea saman* leaf pulvini. –Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (20): 7075-7078.
- Morse**, M. J. y Satter, R. L. 1979. Relationships between Motor Cell Ultrastructure and Leaf Movements in *Samanea saman*. –Physiologia Plantarum 46 (4): 338-346.
- Moshelion**, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N. y Kaldenhoff, R. 2002a. Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. –Plant Cell 14: 727-739.

- Moshelion, M., Becker, D., Czempinski, K., Mueller-Roeber, B., Attali, B., Hedrich, R. y Moran, N. 2002b.** Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ. –*Plant Physiol* 128: 634-642.
- Moshelion, M. y Moran, N. 2000.** Potassium-efflux channels in extensor and flexor cells of the motor organ of *Samanea saman* are not identical: effects of cytosolic calcium. – *Plant Physiol* 124: 911-919.
- Moysset, L. 1981.** Efecto del pH externo, sacarosa y activadores e inhibidores de ATPasas de membrana sobre los movimientos foliares controlados por el fitocromo en *Albizzia lophantha*. –Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Moysset, L., Fernández, E., Cortadellas, N. y Simón E. 2001a.** Intracellular localization of phytochrome in *Robinia pseudoacacia* pulvini. –*Planta* 213: 565-574.
- Moysset, L., Fernández, E., Gómez, L. A. y Simón, E. 2001b.** Calcium, calmodulin and phosphoinositides in leaflet movements mediated by phytochrome: nyctinastic and rhythmic movements. –Signal transduction in plants. Current advances, Sopory, S. K., Oelmüller, R. y Maheshwari S. C. (eds.), Kluwer Academic/Plenum Pub., Nova York, 103-111.
- Moysset, L., Gómez, L. A. y Simón, E. 1994a.** Effects of lanthanum on rhythmic and nyctinastic leaflet movements in *Albizzia lophantha*.-*J Exp Bot* 45: 85-93.
- Moysset, L., Llambrich, E., López-Iglesias, C. y Simón, E. 2006.** Microautoradiographic localisation of [³H]sucrose and [³H]mannitol in *Robinia pseudoacacia* pulvinar tissues during phytochrome-mediated nyctinastic closure. –*Protoplasma* 229: 63-73.
- Moysset, L., Llambrich, E. y Simón, E. 1994b.** Phytochrome-mediated closure of *Albizzia lophantha* leaflets as affected by sorbitol, mannitol and fusicoccin. -*Physiol. Plant.* 91: 307-311.
- Moysset, L. y Simón, E. 1989.** Role of calcium in phytochrome-controlled nyctinastic movements of *Albizzia lophantha* leaflets. -*Plant Physiol.* 90: 1108-1114.
- Moysset, L. y Simón, E. 1990.** Effect of EGTA on Nyctinastic Closure Mediated by Phytochrome in *Albizzia lophantha*. –*Plant Cell Physiol.* 31 (2): 187-193.
- Moysset, L. y Simón, E. 1991a.** Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (leguminosae): structural and ultrastructural features. -*American Journal of Botany* 78 (11): 1467-1486.

- Moysset**, L., Solé-Sugrañes, L. y Simón E. 1991b. Changes in morphometry and elemental composition of *Robinia pseudoacacia* pulvinar motor cells during leaflet movements. -J. Exp. Bot. 42: 1315-1323.
- Musetti**, R. y Favali, M. A. 2003. Cytochemical localization of calcium and X-ray microanalysis of *Catharanthus roseus* L. infected with phytoplasmas. –Micron 34: 387-393.
- Nadwodnik**, J. y Lohaus, G. 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. –Planta 227 (5): 1079-1089.
- Nagy**, F. y Schäfer, E. 2002. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. Annu Rev Plant Biol 53: 329-355.
- Neuhaus**, G., Bowler, C., Kern R. y Chua, N. H. 1993. Calcium/calmodulin-dependent and –independent phytochrome signal transduction pathways. –Cell 73: 937-952.
- Newman**, I. A. y Briggs, W. R. 1972. Phytochrome-mediated Electric Potential Changes in Oat Seedlings. -Plant Physiol. 50 (6): 687–693.
- Nishizaki**, Y. 1986. Rhythmic and blue light-induced turgor movements and electrical potential in the laminar pulvinus of *Phaseolus vulgaris* L. –Plant Cell Physiol. 27: 155-162.
- Noiraud**, N., Maurousset, L. y Lemoine, R. 2001. Transport of polyols in higher plants. Plant Physiol Biochem 39: 717-728.
- Ober**, E. S. y Sharp, R. E. 2003. Electrophysiological responses of maize roots to low water potentials: Relationship to growth and ABA accumulation. -Journal of Experimental Botany 54 (383): 813-824.
- Okamoto**, H., Matsui, M. y Deng, X. W. 2001. Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in Arabidopsis. -Plant Cell 13 (7): 1639-1651.
- Otsiogo-Oyabi**, H. y Roblin, G. 1984. Effect of glycine on dark and light-induced pulvinar movements and modifications of proton fluxes in the pulvinus of *Mimosa pudica* during glycine uptake. –Planta 161: 404-408.
- Otulag**, K. y Garbaczewska, G. 2011. Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to *Potato virus Y*. –Micron 42: 381-391.

- Pertl, H., Pöckl, M., Blaschke, C. y Obermeyer, G.** 2010. Osmoregulation in *Lilium* Pollen Grains Occurs via Modulation of the Plasma Membrane H⁺ ATPase Activity by 14-3-3 Proteins. –Plant Physiology 154: 1921-1928.
- Pfeffer, W.** 1881. Pflanzenphysiologie. Ein Handbuch des Stoffwechsels und Kraftwechsels in der Pflanze. Erster Band: Stoffwechsel. Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Plavcová, L. y Hacke, U. G.** 2011. Heterogeneous distribution of pectin epitopes and calcium in different pit types of four angiosperm species. –New Phytologist 192 (4): 885-897.
- Poenie, M. y Epel, D.** 1987. Ultrastructural Localization of Intracellular Calcium Stores by a New Cytochemical Method. –The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 35 (9): 939-956.
- Pratt, L. H.** 1984. Phytochrome purification. -En Smith H, Holmes MG (eds) "Techniques in Photomorphogenesis". Academic Press, London, pp 175-200.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. y Agre, P.** 1992. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. –Science 256: 385-387.
- Puvion-Dutilleul, F., Pichard, E., Laithier, M. y Leduc E. H.** 1987. Effect of dehydrating agents on DNA organization in herpes viruses. -J. Histochem. Cytochem. 35: 635-645.
- Quigley F., Rosenberg, J. M., Shachar-Hill, Y. y Bohnert, H. J.** 2001. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. –Genome Biology 3: 1-17.
- Qiu, Y. -L., Liu, R. -S., Xie, C. -T., Russell, S. D. y Tian, H. -Q.** 2008. Calcium changes during megasporogenesis and megaspore degeneration in lettuce (*Lactuca sativa* L). – Sex Plant Reprod 21: 197-204.
- Qin, Y., Yang, J. y Zhao, J.** 2005. Calcium changes and the response to methyl jasmonate in rice lodicules during anthesis. –Protoplasma 225: 103-112.
- Quintana, C.** 1994. Cryofixation, Cryosubstitution, Cryoembedding for Ultrastructural, Immunocytochemical and Microanalytical Studies. -Micron 25 (1): 63-99.
- Rabot, A., Henry, C., Ben Baaziz, K., Mortreau, E., Azri, W., Lothier, J., Hamama, L., Boummaza, R., Leduc, N., Pelleschi-Travier, S., Le Gourrierec, J. y Sakr, S.** 2012. Insight into the Role of Sugars in Bud Burst Under Light in the Rose. -Plant and Cell Physiology 53 (6): 1068-1082.

- Racusen, R. H.** y Galston, A. W. 1977. Electrical evidence for rhythmic changes in the cotransport of sucrose and hydrogen ions in *Samanea saman* pulvini. –Planta 135: 57-62.
- Racusen, R. H.** y Satter, R. L. 1975. Rhythmic and phytochrome-regulated changes in transmembrane potential in *Samanea pulvini*. –Nature 225: 408-410.
- Raeini-Sarjaz, M.** 2011. Circadian rhythm leaf movement of *Phaseolus vulgaris* and the role of calcium ions. –Plant Signaling & Behavior 6 (7): 962-967.
- Reinhold, L.,** Seiden, A. y Volokita, M. 1984. Is modulation of the rate of proton pumping a key event in osmoregulation? -Plant Physiol. 75: 846-849.
- Reuveni, M.,** Colombo, R., Lerner, H. R., Pradet, A. y Poljakoff-Mayber, A. 1987. Osmotically induced proton extrusion from carrot cells in suspension culture. -Plant Physiol. 85: 383-388.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. -Journal of Cell Biology 17: 208-212.
- Rieger, A.,** Lutz, A. y Hampp, R. 1992. Compartmentation of soluble carbohydrates, of starch and of malate in motor organs (pulvini) and other parts of *Phaseolus coccineus* L. leaves. –Planta 187: 95-102.
- Robards, A. W.** 1991. Rapid-freezing methods and their application. In: Hall JL, Hawes C (eds) Electron microscopy of plant cells. Academic Press, London, pp 257-312.
- Roblin, G.** 1979. *Mimosa pudica*: a model for the study of the excitability in plants. – Biological Reviews 54 (2): 135-153.
- Roblin, G.** 1980. Fusicoccin-induced H⁺ excretion in the sensitive plant pulvini (Abstr.). –Plant Physiol. 65, Suppl. 912.
- Roblin, G.** y Bonmort, J. 1984a. Effects of prostaglandins E, precursors and some inhibitors of prostaglandin biosynthesis on dark –and light- induced leaflet movements in *Cassia fasciculata* Michx. –Planta 160: 109-112.
- Roblin, G.** y Fleurat-Lessard, P. 1983. Distribution of potassium, chloride and calcium and capacity of hydrogen ion excretion in various parts of the *Mimosa pudica* plant. - Ann. Bot. 52: 763-768.
- Roblin, G.** y Fleurat-Lessard, P. 1984b. A possible mode of calcium involvement in dark- and light-induced leaflet movements in *Cassia fasciculata* Michx. –Plant Cell Physiol. 25: 1495-1499.

- Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. y Bonmort, J.** 1989. Effects of compounds affecting calcium channels on phytochrome- and blue pigment-mediated pulvinar movements of *Cassia fasciculata*. –Plant Physiol. 90: 697-701.
- Sachs, J.** 1887. Vorlesung uber Pflanzen-Physiologie. 2. Aufl., Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Sage, L.** 1992. Pigment of the Imagination: A History of Phytochrome Responses. – Academic Press, San Diego.
- Sakai-Wada, A. y Yagi, S.** 1993. Ultrastructural Studies on the Ca²⁺ Localization in the Dividing Cells of the Maize Root Tip. –Cell Structure and Function 18: 389-397.
- Salla, M.** 2007. Contribució a la caracterització molecular del gen *PHYA* de *Robinia pseudoacacia* L. –Memòria de màster en Biologia experimental, Universidad de Barcelona, 100 pàgines.
- Satter, R. L.** 1979. Relationships between Motor Cell Ultrastructure and Leaf Movements. Leaf movements and tendril curling. –In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (W. Haupt and M. E. Feinleib, eds.) 7: 442-484.
- Satter, R. L., Applewhite, . B., Chaudhri, J. y Galston, A. W.** 1976. P_{FR} phytochrome and sucrose requirement for rhythmic leaflet movement in *Albizzia*. –Photochem Photobiol 23: 107-112.
- Satter, R. L. y Galston, A. W.** 1971. Phytochrome-controlled Nyctinasty in *Albizzia julibrissin*. III. Interactions between an Endogenous Rhythm and Phytochrome in Control of Potassium Flux and Leaflet Movement. –Plant Physiology 48: 740-746.
- Satter, R. L. y Galston, A. W.** 1981. Mechanisms of control of leaf movements. -Annu. Rev. Plant Physiol. 32: 83-110.
- Satter, R. L., Garber, R. C., Khairallah, L. y Cheng, Y. S.** 1982. Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. –J Cell Biol 95: 893-902.
- Satter, R. L., Geballe, G. T., Applewhite, P. B. y Galston, A. W.** 1974. Potassium flux and leaf movement in *Samanea saman*. I. Rhythmic movement. -Journal of General Physiology 64: 413-430.
- Satter, R. L., Gorton, H. L. y Vogelmann, T. C. (eds).** 1990. The pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement. Current Topics in Plant Physiology, Vol. 3: 1-264. -American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. ISBN 0-943088-17-8.

- Satter**, R. L., Marinoff, P. y Galston, A. W. 1970b. Phytochrome controlled nyctinasty in *Albizzia julibrissin*. II: Potassium flux as a basis for leaflet movement. –*Amer. J. Bot.* 57 (8): 916-926.
- Satter**, R. L. y Morse, M. J. 1990. Light-modulated circadian rhythmic movements in nyctinastic legumes. –En: *The pulvinus: Motor organ for leaf movement*. Satter, RL; Gorton, HL; Vogelmann, TC (eds.) A. Soc. Plant. Physiol. Pub. 130-141.
- Satter**, R. L., Sabnis, D. D. y Galston, A. W. 1970a. Phytochrome controlled nyctinasty in *Albizzia julibrissin*. I. Anatomy and fine structure of the pulvinule. –*Amer. J. Bot.* 57: 374-81.
- Satter**, R. L., Schrempf, M., Chaudhri, J. y Galston, A. W. 1977. Phytochrome and Circadian Clocks in *Samanea* Rhythmic Redistribution of Potassium and Chloride within the Pulvinus during Long Dark Periods. –*Plant Physiol.* 59: 231-235.
- Satter**, R. L., Xu, Y. y DePass, A. 1987. Effects of temperature on H⁺ secretion and uptake by excised flexor cells during dark-induced closure of *Samanea* leaflets. –*Plant Physiol.* 85(3): 850-856.
- Saunders**, J. A y Conn, E. E. 1977. Subcellular localization of the cyanogenic glucoside of Sorghum by autoradiography. –*Plant Physiology* 59: 647-652.
- Scott**, B. I. H., Gulline, H. F. y Robinson, G. R. 1977. Circadian Electrochemical Changes in the Pulvinules of *Trifolium repens* L. –*Australian Journal of Plant Physiology* 4 (2): 193-206.
- Serlin**, B. y Roux, J. 1984. Modulation of chloroplast movement in the green alga *Mougeotia* by the Ca²⁺ ionophore A23187 and by calmodulin antagonists. –*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6368-6372.
- Shacklock**, P. S., Read, N. D. y Trewavas, A. J. 1992. Cytosolic Free Calcium Mediates Red Light Induced Photomorphogenesis. –*Nature* 358: 153-155.
- Sharrock**, R. A. y Clack, T. 2002. Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. –*Plant Physiol.* 130: 442-456.
- Sharrock**, R. A. y Quail, P. H. 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. –*Genes Dev.* 3: 1745-1757.
- She**, X. -P., Huang, A. -X., Li, J. y Han, X. -Z. 2010a. Inhibition of dark-induced stomatal closure by fusicoccin involves a removal of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba*. –*Physiol. Plant.* 140 (3): 258-268.

- She, X. -P., Li, J., Huang, A. -X. y Han, X. -Z.** 2010b. Fusicoccin inhibits dark-induced stomatal closure by reducing nitric oxide in the guard cells of broad bean. –*Australian Journal of Botany* 58: 81-88.
- She, X.-P., Song, X.-G. y He, J.-M.** 2004. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. –*Acta Botanica Sinica* 46: 1292-1300.
- Sheen, J.** 1999. C4 gene expression. –*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 187-217.
- Shen, Y., Zhou, Z., Feng, S., Li, J., Tan-Wilson, A., Qu, L. J., Wang, H. y Deng, X. W.** 2009. Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of *Arabidopsis* FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 in a low fluence response. –*Plant Cell* 21: 1341-1359.
- Shinkle, J.** 2008. Basic photomorphogenesis. –www.photobiology.info/Shinkle.html.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M. y Furuya, M.** 1996. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. –*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8129-8133.
- Short, T. W.** 1999. Overexpression of *Arabidopsis* phytochrome B inhibits phytochrome A function in the presence of sucrose. –*Plant Physiol* 119: 1497-1505.
- Simón, E.** 1980. Incorporación de ^{14}C -sacarosa en los pulvínulos de *Samanea*. –*Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 78: 21-30.
- Simón, E., Satter, R. L. y Galston, A. W.** 1976a. Circadian rhythmicity in excised *Samanea* pulvini. I. Sucrose-white light interactions. –*Plant Physiol* 58: 417-420.
- Simón, E., Satter, R. L. y Galston, A. W.** 1976b. Circadian rhythmicity in excised *Samanea* pulvini. II. Resetting the clock by phytochrome conversion. –*Plant Physiol* 58: 421-425.
- Simson, J. A. V. y Spicer, S. S.** 1975. Selective subcellular localization of cations with variants of the potassium (pyro)antimonite technique. –*J Histochem Cytochem* 23: 575.
- Slocum, R. D. y Roux, S. J.** 1982. An Improved Method for the Subcellular Localization of Calcium Using a Modification of the Antimonate Precipitation Technique. –*The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30 (7): 617-629.
- Smith, H.** 2000. Phytochromes and light signal perception by plants — an emerging synthesis. –*Nature* 407: 585-591.

- Smeekens, S.** 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49-81.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson J. y Rolland, F.** 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. –*Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 274-279.
- Spalding, E. P.** 2000. Ion channels and the transduction of light signals. *Plant Cell Environ* 23: 665-674.
- Spanswick, R. M.** 1981. Electrogenic ion pumps. –*Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 267-289.
- Spurr, A. R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. –*J. Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C. y Teige, M.** 2012. Plant organellar calcium signalling: an emerging field. –*Journal of Experimental Botany* 63 (4): 1525-1542.
- Starrach, N. y Mayer, W. -E.** 1989. Changes of the Apoplastic pH and K^+ Concentration in the *Phaseolus* Pulvinus *in situ* in Relation to Rhythmic Leaf Movements. –*Journal of Experimental Botany* 40 (8): 865-873.
- Stepinski, D.** 2008. Nucleolar vacuolation in soybean root meristematic cells during recovery after chilling. –*Biologia Plantarum* 52 (3): 507-512.
- Stewart, J. L., Maloof, J. N. y Nemhauser, J. L.** 2011. *PIF* genes mediate the effect of sucrose on seedling growth dynamics. –*PloS ONE* 6 (5): e19894.
- Stoeckel, H. y Takeda, K.** 1993. Plasmalemmal, voltaje-dependent ionic currents from excitable pulvinar motor cells of *Mimosa pudica*. –*J Membr Biol* 131: 179-192.
- Stoeckel, H. y Takeda, K.** 1995. Calcium-sensitivity of the plasmalemmal delayed rectifier potassium current suggests that calcium influx in pulvinar protoplasts from *Mimosa pudica* L. can be revealed by hyperpolarization. –*J Membr Biol* 146: 201-209.
- Stowe-Evans, E. L., Luesse, D. R. y Liscum, E.** 2001. The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in Arabidopsis occurs via a photoreversible phytochrome A-dependent modulation of auxin responsiveness. –*Plant Physiol.* 126: 826-834.
- Suh, S., Moran, N. y Lee, Y.** 2000. Blue light activates depolarization-dependent K^+ channels in flexor cells from *Samanea saman* motor organs via two mechanisms. –*Plant Physiol.* 123: 833-843.

- Suzuki, K., Shono, M. y Egawa, Y.** 2003. Localization of calcium in the pericarp cells of tomato fruits during the development of blossom-end rot. –*Protoplasma* 222: 149-156.
- Sweet, H. y Hillman, W.** 1969. Response of Pea Stem Tissues With Different Phytochrome Contents to Red Light Dosage. –*Plant Physiol.* 44: 458-460.
- Takano, M., Inagaki, N., Xie, X., Yuzurihara, N., Hihara, F., Ishizuka, T., Yano, M., Nishimura, M., Miyao, A., Hirochika, H. y Shinomura, T.** 2005. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B and C in the control of deetiolation and flowering in rice. –*Plant Cell* 17: 3311-3325.
- Talbott, L. D. y Zeiger, E.** 1998. The role of sucrose in guard cell osmoregulation. - *Journal of Experimental Botany* 49 (SPEC. ISSUE): 329-337.
- Tandler, C. J., Libanati, C. M. y Sanchis, C. A.** 1970. The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. –*J Cell Biol* 45: 355.
- Teodoro, A. E., Zingarelli, L. y Lado, P.** 1998. Early changes of Cl⁻ efflux and H⁺ extrusion induced by osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* cells. –*Physiologia Plantarum* 102: 29-37.
- Testillano, P. S., Sanchez-Pina, M. A., López-Iglesias, C., Olmedilla, A., Christensen, M. E. y Risueño, M. C.** 1992. Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. -*Chromosoma* 102: 41-49.
- Thangstad, O. P., Bones, A. M., Holtan, S., Moen, L. y Rossiter, J. T.** 2001. Microautoradiographic localization of a glucosinolate precursor to specific cells in *Brassica napus* L. embryos indicates a separate transport pathway into myrosin cells. – *Planta* 213: 207-213.
- Thureson-Klein, A. y Klein, R. L.** 1971. Cation distribution and cardiac jelly in early embryonic heart: a histochemical and electron microscopic study. –*Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2 (1): 31-40.
- Thomson, J.** 2003. Sample preparation for liquid scintillation analysis. –En: *Handbook of radioactivity analysis*. Annunziata, M. F. (ed.). Academic Press. 656-699.
- Tian, H. Q. y Russell, S. D.** 1997. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sac of *Nicotiana tabacum* L. –*Planta* 202: 93-105.
- Tian, H. Q., Kuang, A., Musgrave, M. E. y Russell, S. D.** 1998. Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. –*Planta* 204: 183-192.

- Tian, H. Q., Zhu, H. y Russell, S. D.** 2000. Calcium changes in ovules and embryo sacs of *Plumbago zeylanica* L. –Sex Plant Reprod 13: 11-20.
- Tonetto de Freitas, S., Padda, M., Wu, Q., Park, S. y Mitcham, E.** 2011. Dynamic Alterations in Cellular and Molecular Components during Blossom-End Rot Development in Tomatoes Expressing sCAX₁, a Constitutively Active Ca²⁺/H⁺ Antiporter from Arabidopsis. –American Society of Plant Biologists 156 (2): 844-855.
- Toriyama, H.** 1954a. Observational and experimental studies of sensitive plants I. The structure of parenchymatous cells of pulvinus. –Cytologia 18: 283-92.
- Toriyama, H.** 1954b. Observational and experimental studies of sensitive plants II. On the changes in motor cells of diurnal and nocturnal condition. –Cytologia 19: 29-40.
- Toriyama, H.** 1973. Tannins and the tannin vacuole in the motor organ of higher plants. –Science Reports of Tokyo Woman's Christian College 29-31: 386-392.
- Toriyama, H. y Jaffe, M. J.** 1972. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cells of *Mimosa pudica* L.. –Plant Physiol. 49: 72-81.
- Tretyn, A., Kendrick, E. y Kopcewicz, J.** 1992. Cytochemical Studies on Phytochrome-Mediated Changes of Ca²⁺ Localization in Etiolated Oat Coleoptile Cells. –Journal of Experimental Botany 43 (249): 439-448.
- Trillas-Gay, M. I. y Araus, J. L.** 1993. Effects of *Fusarium oxysporum* cultura filtrates on Carnation callus cell ultrastructure and cytoplasmic calcium distribution. –Physiological and Molecular Plant Pathology 43: 231-241.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. y Kaldenhoff, R.** 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. –Nature 425: 734-737.
- Uehlein, N. y Kaldenhoff, R.** 2008. Aquaporins and Plant Leaf Movements. –Annals of Botany 101: 1-4.
- Ulijasz, A. T., Cornilescu, G., Cornilescu, C. C., Zhang, J., Rivera, M., Markley, J. L. y Vierstra, R. D.** 2010. Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. –Nature 463: 250-254.
- Van Buskirk, E. K., Decker, P. V. y Chen, M.** 2012. Photobodies in light signaling. - Plant Physiol 158: 52–60.
- Verdus, M. -C., Dubois, T., Dubois, J. y Vasseur, J.** 1993. Ultrastructural Changes in Leaves of *Cichorium* during Somatic Embryogenesis. –Annals of Botany 72(4): 375-383.

- Verslues**, P. E., Ober, E. S. y Sharp, R. E. 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials: Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. –*Plant Physiology* 116 (4): 1403-1412.
- Viader**, S., Moysset, L. y Simón, E. 2005. Partial isolation and characterization of phytochrome genes in *Albizia lophantha* Benth. –*Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology* 141 (3), Suppl. S, pages: S 277.
- Wang**, X y Iino M. 1998. Interaction of cryptochrome1, phytochrome, and ion fluxes in blue-light-induced shrinking of *Arabidopsis* hypocotyl protoplasts. –*Plant Physiol.* 117: 1265–1279.
- Wayne**, R. y Hepler, P. K. 1985. Red light stimulates an increase in intracellular calcium in the spores of *Onoclea sensibilis*. –*Plant Physiol.* 77: 8-11.
- Whitelam**, G. C. y Devlin, P. F. 1997. Roles for different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. –*Plant Cell Environ* 20: 752-758.
- Whitelam**, G. C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M., L., Cowl, J. S. y Harberd, N. P. 1993. Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. –*Plant Cell* 5: 757-768.
- Wick**, S. M. y Hepler, P. K. 1980. Localization of Ca^{2+} containing antimonate precipitates during mitosis. –*Journal of Cell Biology* 86: 500-513.
- Wick**, S. M. y Hepler, P. K. 1982. Selective localization of intracellular Ca^{2+} with potassium antimonate. –*J. Histochem. Cytochem.* 30: 1190.
- Wind**, J., Smeekens, S. y Hanson, J. 2010. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. –*Phytochemistry (Amsterdam)* 71 (14-15): 1610-1614.
- Yanovsky**, M. J., Casal, J. J. y Luppi, J. P. 1997. The VLF loci, polymorphic between ecotypes *Landsberg erecta* and *Columbia*, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that correspond to very-low-fluence and high-irradiance responses. –*Plant J.* 12: 659-667.
- Yanovsky**, M. J., Casal, J. J. y Whitelam, G. C. 1995. Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies. –*Plant Cell and Environment* 18: 788-794.
- Yao**, H., Xu, Q y Yuan, M. 2008. Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. –*Plant Signaling & Behavior* 3 (11): 954-960.

- Yeh, K. C. y Lagarias, J. C.** 1998. Eukaryotic phytochromes: lightregulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. -Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13976-13981.
- Young, J. J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E. y Schroeder, J. I.** 2006. CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. -Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 7506-7511.
- Yu, L., Becker, D., Levi, H., Moshelion, M., Hedrich, R., Lotan, I., Moran, A., Pick, U., Naveh, L., Libal, Y. y Moran, N.** 2006. Phosphorylation of SPICK2, an AKT2 channel homologue from *Samanea* motor cells. -Journal of Experimental Botany 57 (14): 3583-3594.
- Yu, L., Moshelion, M. y Moran, N.** 2001. Extracellular protons inhibit the activity of inward-rectifying potassium channels in the motor cells of *Samanea saman* pulvini. - Plant Physiol 127: 1310-1322.
- Zeiger, E.** 1983. The biology of stomatal guard cells. -Annu. Rev. Plant Physiol. 34: 441-475.
- Zhang, S., Chen, S., Chen, F. y Jiang, B.** 2011. The role of ionic calcium in the gravitropic response of a creeping chrysanthemum cultivar. -Russian Journal of Plant Physiology 58 (4): 696-702.
- Zhao, J., Liang, S. P., Zhou, C. y Yang, H. Y.** 2002. Changes of calcium distribution in egg cells, zygotes and two-celled proembryos of rice (*Oryza sativa* L.). -Sex Plant Reprod 14 (6): 331-337.
- Zhou, S., Jones, A. M. y Scott, T. K.** 1990. Phytochrome-mediated swelling of etiolated leaf protoplasts and its possible biological significance. -Plant Cell Reports 9: 435-438.