

03072



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDIOS ACERCA DEL EFECTO DEL ACIDO  
ABSCISICO SOBRE LA GERMINACION DE  
SEMILLAS DE ARABIDOPSIS THALIANA**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A :  
JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO**

**CUERNAVACA, MORELOS; MEXICO  
AGOSTO DE 1993.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue entender como el ácido abscísico (ABA) exógeno inhibe la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados fueron los siguientes: tal inhibición no ocurre si al medio de cultivo se le adiciona sacarosa, glucosa o peptona (o una combinación de ellas). Esto sugiere que el ABA inhibe la germinación por restringir la disponibilidad de la energía y de los nutrientes necesarios para que el proceso se lleve a cabo. El ABA promovió la síntesis de un patrón de proteínas prominente cuya inducción no se afecta por la adición de azúcares y peptona (aminoácidos). Se concluye que los metabolitos proporcionados pueden estar siendo utilizados como bloques de construcción para los procesos anabólicos de germinación y que no interfieren con los efectos bioquímicos del ABA. Los resultados que aquí se muestran indicaron que el ABA evita la degradación y/o utilización de las proteínas mas abundantes de la semilla y que no inhibe alguna actividad anabólica indispensable de la germinación.

## TABLA DE CONTENIDO

TEMA	PAGINA
1. TITULO.....	i
2. DEDICATORIA.....	ii
3. RECONOCIMIENTOS.....	iii
4. RESUMEN.....	iv
5. INTRODUCCION.....	1
5.1. La embriogénesis y desarrollo de la semilla.....	2
5.2. La germinación.....	3
5.3. El papel del ABA durante la embriogénesis y desarrollo de la semilla.....	6
5.4. Efectos del ABA sobre la germinación de semillas maduras y embriones inmaduros.....	9
5.5. Efectos del ABA y el ambiente osmótico sobre la germinación.....	13
6. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	14
7. MANUSCRITO ANEXO.....	15
7.1. Title.....	15
7.2. Abstract.....	16
7.3. Introduction.....	17
7.4. Materials and Methods.....	22
7.5. Results.....	25
7.6. Discussion.....	34
8. DISCUSION.....	39
9. CONCLUSIONES.....	48
10. PERSPECTIVAS.....	49
11. LITERATURA CITADA.....	51

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

Con este trabajo se ha tratado de reevaluar el papel que desempeña la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) durante la germinación de las semillas.

Se escogió a *Arabidopsis thaliana* no sólo por sus características generales como una planta modelo, sino también porque se dispone de varios mutantes deficientes e insensibles a ABA (Karssen et al; 1983; Koornneef et al; 1984; Koornneef et al; 1989).

Es una idea común el considerar al ácido abscísico como un regulador que mantiene al programa de desarrollo del embrión e inhibe al de germinación. De acuerdo con esto, existe la concepción tácita de que la transición entre los dos programas es controlada por una "molécula switch" sobre la que el ABA actúa, sin embargo su naturaleza no ha quedado lo suficientemente clara. Un punto de vista diferente y que se discute en esta tesis, asume que el ABA tiene un efecto amplio sobre el desarrollo, actuando al nivel de varias vías metabólicas. Se presentan evidencias de que el ABA, mas que regular la germinación directamente, lo hace por cambiar el metabolismo de la utilización de las reservas a almacenamiento o acumulación de las mismas. Se plantea que el ABA ejerce control directo sobre el catabolismo de las reservas y por cortar el suministro de los bloques de construcción a los procesos anabólicos, inhibe indirectamente la germinación.

Si bien el concepto de programa evade una definición clara, cuando se utiliza en este contexto, implica la existencia de un conjunto coherente de actividades que toman lugar en orden secuencial a causa de que se tomó una decisión previa. La noción de programa de desarrollo está asociada a la idea de "switches" que regulan el comportamiento de un conjunto coherente de actividades que ocurren en secuencia. Se considera que estas actividades se llevan a cabo como una respuesta



al "switch", mas o menos independientemente de las condiciones prevalecientes en las células donde ellas toman lugar. Este concepto tiene gran utilidad para explicar el desarrollo animal. Su aplicación en plantas es incierto ya que comúnmente éstas muestran una plasticidad y grado de respuesta al ambiente no visto en animales. Sin embargo, debido a su simplicidad, el concepto de programa de desarrollo se utiliza frecuentemente para explicar el desarrollo de las plantas.

La formación de una semilla y su germinación constituyen fenómenos adaptativos únicos en el ciclo de vida de las plantas superiores. Involucran el desarrollo del embrión y median varios procesos fisiológicos para asegurar la supervivencia de la planta en la próxima generación. Marcan etapas en que eventos metabólicos claves relacionados con el estado de reservas almacenadas, contrastan en forma muy marcada.

## **1. LA EMBRIOGENESIS Y DESARROLLO DE LA SEMILLA.**

Durante el desarrollo de la semilla de plantas dicotiledóneas, el embrión se forma a partir de una única célula diploide a una plántula compuesta de dos cotiledones y los rudimentos foliares y radicales. El proceso de desarrollo de la semilla comprende distintos eventos que ocurren en secuencia: 1) fertilización del óvulo por el núcleo polínico; 2) histogénesis e histodiferenciación, durante las que el embrión adquiere los tejidos especializados característicos de una planta (tejido epidérmico, tejido vascular, raíces, ápices foliares y los meristemas correspondientes); 3) maduración, caracterizada por presentar expansión celular y una fuerte acumulación de nutrientes de reserva (principalmente almidón, lípidos y proteínas); 4) adquisición de la tolerancia a la desecación, la cual entre otros

procesos implica la acumulación de proteínas y azúcares osmoprotectores; 5) desecación, durante la que la semilla manifiesta una notable pérdida de agua y una drástica disminución de las actividades metabólicas. El resultado final de estos procesos es una semilla en estado quiescente, capaz de soportar por mucho tiempo condiciones ambientales adversas (Dure, 1975; Murphy and Thompson, 1988; Choi and Sung, 1989; Kermodé, 1990; Lyndon, 1990; Steeves and Sussex, 1990; Black, 1991).

Los eventos metabólicos principales que ocurren durante el desarrollo de la semilla son, por tanto, de tipo anabólico, ya que existe poca o ninguna degradación de las macromoléculas de reserva, en tanto que las enzimas necesarias para su movilización (amilasas, lipasas y proteasas) están ausentes o inactivas.

## **2. LA GERMINACION.**

La germinación de una semilla es la etapa más precaria en el ciclo de vida de una planta. El desarrollo de la semilla puede verse como un período de preparación previo a la ocurrencia de la germinación. La síntesis y depositación de reservas es característico de las semillas en desarrollo, mientras que su movilización es inherente al proceso de germinación.

La germinación consiste en la reanudación de la actividad metabólica y del crecimiento activo de los tejidos del embrión que resulta en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una plántula. En orden secuencial involucra la rehidratación, la utilización de los nutrientes de reserva y la formación de las estructuras de síntesis que permitirán a la plántula asumir un modo autótrofo de existencia (Murphy and Thompson, 1988; Kermodé, 1990; King, 1991). En términos bioquímicos, es el resultado de procesos catabólicos y anabólicos contrastantes. Los

primeros ocurren en los órganos de almacenamiento (endospermo en plantas monocotiledóneas y cotiledones en dicotiledóneas) e intervienen en la degradación y movilización de macromoléculas de reserva. Los segundos se efectúan en los ejes embrionarios e incluyen la síntesis de macromoléculas, componentes estructurales como membranas y paredes celulares, generando nuevas células y tejidos durante el crecimiento (Dure, 1975; Kermodé, 1990). Las sustancias de reserva constituyen los sustratos para el acelerado metabolismo que se inicia en esta etapa de formación de la planta. Estas sustancias de reserva están constituidas por almidón, lípidos y proteínas, las cuales se acumulan normalmente durante el desarrollo de la semilla, permanecen estables a través del período de latencia que separa a la embriogenia de la germinación, y se degradan específicamente durante la germinación y crecimiento de la plántula para proveerla de fuentes de carbono y nitrógeno. La energía inicialmente requerida para los procesos metabólicos, también se deriva de las sustancias de reserva (Ashton, 1976; Pang et al; 1988; DeLisle and Crouch, 1989; Murphy and Cummins, 1989; Kruger, 1990).

El almidón se acumula en los plástidos como granulos insolubles en agua. Durante la germinación de los granos de cereales, su rompimiento coincide con la destrucción del endospermo. En este caso la degradación del almidón es extracelular y ocurre vía una ruta hidrolítica (Boyer, 1985). La glucosa que se produce por la acción de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa se absorbe por el escutelo, se convierte a sacarosa, y se transporta al embrión donde se utiliza como una fuente de energía. En cotiledones de chícharo el rompimiento es fosforolítico, mientras que en soya y lenteja  $\alpha$ -amilasa es la actividad predominante (Jacobsen and Chandler, 1988; Kruger, 1990).

Los lípidos se almacenan como triacilgliceroles en los cuerpos grasos. Su

degradación ocurre por acción de lipasas (Huang, 1987). Los productos se metabolizan luego en los glioxisomas (Beevers, 1980). La oxidación de los ácidos grasos resulta en su rompimiento a acetil-CoA que se utiliza como fuente de carbono para la síntesis de sacarosa. También, el succinato, un producto del ciclo del glioxilato se metaboliza a oxaloacetato en la mitocondria, se convierte luego a fosfoenolpiruvato en el citosol, ocurriendo la formación de sacarosa vía gluconeogénesis. La conversión de los triacilgliceroles en los cuerpos grasos y posteriormente a sacarosa en el citosol, involucra la participación de complejos enzimáticos de cuatro compartimentos celulares: cuerpos grasos, glioxisomas, mitocondrias y citosol (Andrews and Ohlrogge, 1990).

Las proteínas de reserva se depositan en organelos llamados cuerpos protéicos y se hidrolizan a aminoácidos por acción de enzimas proteolíticas. Los productos pueden permanecer en los tejidos de almacenamiento pero la mayoría se translocan a los puntos de crecimiento donde se utilizan para la síntesis de varias enzimas y proteínas estructurales. Algunos aminoácidos pueden sufrir desaminación y utilizarse como fuente de energía (Ashton, 1976; Bewley and Greenwood, 1990; Casey, 1990; Hatfield and Vierstra, 1990). Las proteínas de reserva de *Arabidopsis* presentan pesos moleculares en el intervalo de los 10, 20 y 30 kD (Heath et al; 1986). Las proteínas que migran en el intervalo de los 20 y 30 kD representan a los polipéptidos 12S básicos y ácidos, respectivamente, mientras que las proteínas 2S muestran bandas en la región de los 10 kD. En el ecotipo Columbia, las proteínas 12S ácidas y básicas se producen por rompimiento post-traducciona de precursores únicos sintetizados a partir de una familia de tres genes (Pang et al; 1988). Las proteínas 2S, que se sintetizan de cuatro genes repetidos, se rompen después de su traducción para rendir cadenas polipeptídicas de 3 y 9 kD (Guerche et al; 1990).

### 3. EL PAPEL DEL ABA DURANTE LA EMBRIOGENESIS Y DESARROLLO DE LA SEMILLA.

El ABA ha sido implicado en el control de algunos eventos que ocurren durante la embriogénesis y la formación de la semilla, incluyendo la morfogénesis del embrión (Quatrano, 1988), la síntesis de las proteínas de reserva (Finkelstein et al; 1985), la tolerancia a la desecación (Kermode and Bewley, 1987), y el mantenimiento de la dormancia (Koornneef, 1986).

El concepto de que el ABA tiene un papel importante en regular la depositación de reservas viene de la observación de que en algunas especies la tasa mas alta de acumulación coincide con un alto contenido de ABA (Fig. 1) (King, 1976; Quebedeaux et al; 1976; Ackerson, 1984; Quatrano, 1988). La aplicación exógena de la hormona durante las etapas intermedia y tardía del desarrollo de la semilla también incrementa la síntesis y acumulación de las proteínas de reserva (Sussex and Dale, 1979; Steeves and Sussex, 1990). Otra evidencia proviene de los mutantes recombinantes (*aba/abi3*) de *Arabidopsis* que son insensibles (*abi3*) y deficientes en ABA (*aba*), que producen bajos niveles de las proteínas de reserva que se sintetizan normalmente durante el desarrollo de las semillas silvestres (Koornneef et al, 1989; Nambara et al; 1992). La promoción de la síntesis de las proteínas de reserva en cotiledones o embriones cultivados, al mismo tiempo que se inhibe la aparición de proteasas y la germinación precoz, es otro ejemplo bien documentado del efecto del ABA (Asthon, 1976; Trewavas, 1976; Kermode, 1990). La producción de polipéptidos característicos de embriogénesis tardía (LEA, del inglés, late embryogenesis abundant), aparentemente involucrados en impartir tolerancia a la desecación, coincide con altos niveles de ABA endógeno en las semillas, aunque este fenómeno no se presenta en todas las especies. Experimentos en donde se

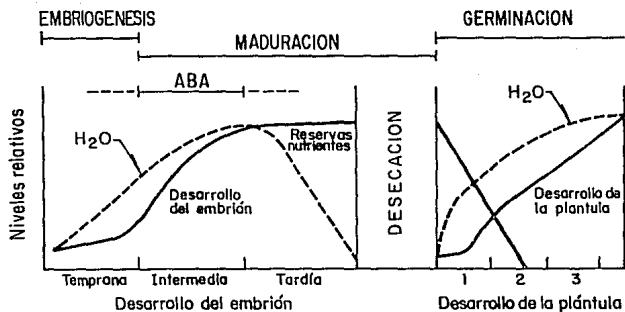


Figura 1. Gráfica mostrando los niveles relativos de los nutrientes de reserva, contenido de agua y crecimiento durante las etapas de embriogénesis, maduración y germinación. El período de desecación separa el final de la maduración del inicio de crecimiento de la plántula, y los niveles de ABA correlacionan temporalmente con la síntesis máxima y acumulación de los nutrientes de reserva y la prevención de la germinación precoz durante la etapa intermedia del desarrollo del embrión (Tomado de Quatrano, 1988).

aplica ABA exógenamente muestran que la síntesis de las proteínas LEA ocurre en respuesta a la hormona (Dure et al; 1981). Los productos de los genes LEA, que normalmente se sintetizan en las etapas finales de la formación de la semilla, y cuyos niveles permanecen constantes en las semillas maduras, normalmente desaparecen al inicio de la germinación. Sin embargo, su acumulación puede restaurarse post-germinación por tratamiento con ABA exógeno (Skriver and Mundy, 1990). Estos resultados sugieren que el ABA no solamente inhibe pasos claves durante la germinación, sino que también es capaz de reiniciar parte del programa de desarrollo embriogénico. La síntesis de otras proteínas como el inhibidor de amilasas/subtilisina, del endospermo de cebada, se promueven también por la aplicación de ABA (Leah and Mundy, 1989).

Poco se conoce acerca del posible papel que juega el ABA en la depositación de reservas no protéicas. Se han reportado efectos sobre la acumulación de ciertos ácidos grasos como triacilgliceroles de reserva de colza (Finkelstein and Somerville, 1989). En *Arabidopsis*, semillas mutantes insensibles (*abi3*) mostraron una disminución en la depositación de ácidos grasos eicosanoicos, en relación a las silvestres, pero no se sabe si ocurre lo mismo en otras especies (Finkelstein and Somerville, 1990). También, se indica que en frijol castor el ABA exógeno puede inhibir la actividad de la isocitrato-licasa, una enzima involucrada en la movilización de lípidos, mientras que el ácido giberélico la incrementa (Dommes and Northcote, 1985).

Los datos anteriores sugieren que durante la embriogénesis, el ABA promueve los procesos de tipo anabólico por incrementar la síntesis de los compuestos de reserva e impedir los procesos catabólicos, al interferir con la degradación de estos mismos compuestos.

#### **4. EFECTOS DEL ABA SOBRE LA GERMINACION DE SEMILLAS MADURAS Y EMBRIONES INMADUROS.**

Dependiendo de la especie, la semilla puede tener la capacidad para germinar inmediatamente o mostrar un período de ingermabilidad, denominado latencia. En especies cuyas semillas son latentes, la germinación se promueve por aplicación de hormonas, frío, calor o por efecto del tiempo. Conceptualmente, la latencia implica la presencia de un inhibidor cuya acción se inactiva por efecto de las condicionantes ambientales. El mantenimiento y rompimiento de la latencia pueden ser controlados por los niveles relativos de ABA y ácido giberélico (AG). Durante la germinación de cereales el AG induce los niveles y actividad de  $\alpha$ -amilasa, una enzima catabólica que hidroliza el almidón de reserva, mientras que el ABA puede oponerse a estos efectos estimulando la síntesis de un inhibidor de  $\alpha$ -amilasa (Jacobsen and Chandler, 1988; Leah and Mundy, 1989; Robertson et al; 1989).

Cuando las semillas que no manifiestan latencia se rehidratan, se reactiva el metabolismo y se reinicia el crecimiento. Durante la transición no se detecta la presencia de un inhibidor de la germinación y la latencia puede ser el resultado de la falta de agua, lo que impide la actividad de las enzimas y por tanto del metabolismo. En estas semillas los niveles de ABA son sumamente bajos y la sensibilidad a sus efectos es también reducida (Xu and Bewley, 1991). Se ha observado que al añadir ABA al medio, la hormona bloquea la germinación pero no la rehidratación (Milborrow, 1974; Rivin and Grudt, 1991; Xu and Bewley, 1991). Este no es un efecto tóxico o artefactual del ABA, ya que al analizar la síntesis de proteínas en las semillas se observa que el patrón se constituye por aquellas proteínas propias de la embriogénesis (Sobolev et al; 1990; Dmitrieva et al; 1991). Entonces, parece ser que con esta manipulación experimental es posible forzar la continuación del programa



de desarrollo del embrión y bloquear el germinativo.

Cuando se aíslan embriones inmaduros del ambiente materno, se puede abortar el programa de desarrollo embriogénico y entrar en un crecimiento germinativo típico. La capacidad depende de la edad en la que se disecte la semilla, perdiéndose tardíamente durante el desarrollo (Crouch and Sussex, 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein and Crouch, 1984; Kermode and Bewley, 1988; Xu and Bewley, 1991). La tendencia para germinar de los embriones inmaduros ha motivado a los investigadores a preguntarse que factores del ambiente materno mantienen el desarrollo del embrión y previenen la germinación (Figura 2). Aunque las respuestas al respecto suelen ser contradictorias, diversos trabajos sugieren que el ABA pudiera estar involucrado (King, 1976; Walton, 1980; Quatrano, 1986; Zeevaart and Creelman, 1988). La evidencia mas fuerte a favor de esta hipótesis proviene de mutantes vivíparas de maíz y de *Arabidopsis thaliana*, que pueden germinar en el tejido materno sin pasar por el período de desecación. Existen 7 de ellas en maíz y 4 en *Arabidopsis*. Todas se caracterizan por ser deficientes en su capacidad de síntesis de ABA o mostrar sensibilidad reducida a la hormona (Mc Daniel et al; 1977; Smith et al; 1978; Karssen et al; 1983; Koornneef et al; 1984; Rochibaud and Sussex, 1986; Neill et al; 1987; Finkelstein and Somerville, 1988; Groot et al; 1991; Rivin and Grudt, 1991). Otros testimonios provienen de experimentos en los que se ha inducido viviparidad en semillas silvestres de maíz y otras especies al tratarlas *in situ* con fluoridona, un inhibidor de la formación de carotenoides que son precursores en la vía de síntesis de ABA. La especificidad de su efecto se ha corroborado al ser completamente reversible por la adición de ABA (Fong et al; 1983; Zeevaart and Creelman, 1988; Barrat et al; 1989).

Cuando embriones de la edad adecuada se separan de la semilla y se cultivan *in vitro*, tienden a germinar; sin embargo, ello no sucede si al medio se le añade ABA,

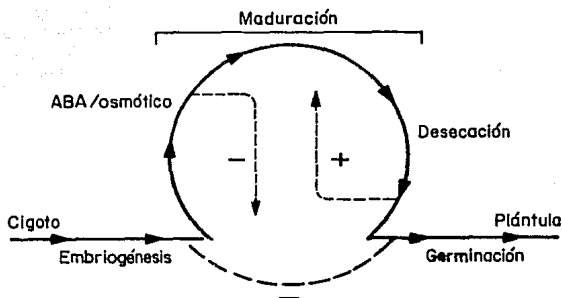


Figura 2. Representación del desarrollo del embrión en angiospermas, mostrando las tres etapas que ocurren durante la transición del cigoto a plántula: embriogénesis, maduración y germinación. La etapa de maduración puede evitarse *in vitro* mediante la germinación precoz de los embriones que han superado la fase de embriogénesis. Esto ocurre en la ausencia de hormonas pero con una fuente de nitrógeno y energía y en algunos casos por desecación prematura. En la presencia de alta concentración de osmolitos y/o ABA se promueve la maduración y se inhibe la germinación precoz. Sobre la desecación éstos procesos finalizan y la germinación normal resulta en respuesta a la hidratación de las semillas y a condiciones ambientales adecuadas. En cultivo, los embriones pueden reversiblemente entrar o salir de la etapa de maduración por la aplicación de ABA o alta osmolaridad o por su remoción, respectivamente (Tomado de Quatrano, 1988).

o un osmótico y ABA (Figura 2). En este caso el proceso de desarrollo del embrión continúa. Esto se ha corroborado bioquímicamente por la síntesis continua de proteínas de reserva y de otras características de la embriogénesis (Rochibaud et al; 1980; Crouch and Sussex, 1981; Long et al; 1981; Ackerson, 1984; DeLisle and Crouch, 1989; Morris et al; 1990).

Los embriones cultivados *in vitro* también pueden adquirir tolerancia a la desecación. Al parecer, la presencia de ABA en el medio de cultivo es un requisito para que se manifieste (Ammirato, 1977; Eisenberg and Mascarenhas, 1985; Bartels et al; 1988; Senaratna et al; 1989; Meurs et al; 1992). Si se asume que *in vivo* la adquisición de dicho mecanismo es un evento tardío del programa embriogénico, lo anterior se puede interpretar como otra evidencia de que el ABA mantiene el programa de desarrollo del embrión.

Consistentes con este planteamiento, existen numerosos reportes en los que se analizan genes regulados por el ABA. En general, el ABA estimula la transcripción de genes característicos de la embriogénesis, tales como los de las proteínas de almacenamiento o las abundantes de la embriogénesis tardía, e inhibe a los de enzimas que actúan durante la germinación (Dure et al; 1980; Mundy et al; 1986; DeLisle and Crouch, 1989; Leah and Mundy, 1989; Medford and Sussex, 1989; Morris et al; 1990; San et al; 1990; Taylor et al; 1990; Barrat and Clark, 1991; Groot et al; 1991; Hughes and Galau, 1991; Rivin and Grudt, 1991; Xu and Bewley, 1991). De éstos últimos, se han estudiado esencialmente los genes de las enzimas degradadoras de las macromoléculas de reserva. Estos resultados apoyan la idea de que el ABA estimula al programa de desarrollo de la semilla e inhibe el de germinación. También sugieren que puede evitar la germinación por restringir la disponibilidad de la energía y de los metabolitos requeridos para el desarrollo de este proceso.

## **5. EFECTOS DEL ABA Y EL AMBIENTE OSMOTICO SOBRE LA GERMINACION.**

Un componente del ambiente químico que rodea al embrión en desarrollo es el ambiente osmótico. Al parecer, este último está altamente especializado. Se sabe que el endospermo líquido en que nadan los embriones en desarrollo presenta generalmente potenciales osmóticos e hídricos bastante negativos. La germinación precoz de embriones inmaduros aislados se suprime frecuentemente al sembrarlos en un medio de cultivo de bajo potencial osmótico, aún en ausencia de ABA (Obendorf and Wettlaufer, 1984; Finkelstein and Crouch, 1987; Kermode, 1990). Potenciales osmóticos altamente negativos no provocan necesariamente la acumulación de ABA en embriones en cultivo, la respuesta parece ser especie-específica (Black, 1991). El ABA y bajos potenciales osmóticos no actúan frecuentemente por el mismo mecanismo (Finkelstein and Crouch, 1986, 1987). Durante la inhibición de la germinación precoz, tanto el ambiente osmótico como el ABA pueden actuar evitando la toma de agua; el ambiente osmótico al reducir el gradiente de potencial hídrico, y el ABA al evitar el relajamiento de la pared celular por algún mecanismo desconocido (Schopfer and Plachy, 1985).

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS**

Esta tesis se desarrolló bajo el planteamiento de las siguientes tres hipótesis:

I. Si se rehidratan las semillas (activando con ello la maquinaria enzimática), entonces el crecimiento germinativo del embrión sólo requiere de los metabolitos y energía necesarios para la construcción de nuevas macromoléculas.

II. Si el ABA inhibe la germinación por restringir la disponibilidad de energía y nutrientes, entonces el suministro exógeno de los mismos puede promover la germinación en presencia de la hormona.

III. Si secuencias o proteínas características de la embriogénesis se reinducen en etapas post-germinación, entonces los programas embriogénico y germinativo pueden coexistir y no son mutuamente excluyentes.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general fue evaluar, en base a las hipótesis, el papel del ABA en la decisión entre el programa embriogénico y el programa germinativo.

Los objetivos particulares fueron:

1. Establecer criterios bioquímicos para analizar el efecto del ABA.
2. Establecer las condiciones bajo las que el ABA estimula o inhibe a los programas embriogénico y germinativo.
3. Demostrar que la inhibición de la germinación por el ABA puede ser revertida por la adición de nutrientes.

## **MANUSCRITO ANEXO**

**Abscisic acid limits the availability of energy and nutrients during germination of *Arabidopsis* seeds.**

Alejandro Garcíarrubio<sup>♦</sup>, Juan P. Legaria and Alejandra A. Covarrubias \*

***Department of Plant Molecular Biology, Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3  
Cuernavaca, Morelos 62271, México.***



## **ABSTRACT.**

The addition of abscisic acid usually inhibits the germination of mature non-dormant seeds. This effect might be related to its natural function as an inhibitor of precocious germination. In this work, we studied several aspects of the effect of ABA on the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. Our findings were as follow: a) the ABA response was concentration dependent; b) the inhibition of germination by ABA was circumvented by the addition of metabolizable sugars or amino acids; c) the effect of sugars and amino acids was synergistic indicating that they relieved different deficiencies; and d) ABA prevented the degradation of the seed storage proteins. The antagonistic effect of sugars and amino acids to the inhibition of germination in *Arabidopsis*, suggested that this hormone inhibits germination by restricting the availability of energy and metabolites.

## INTRODUCTION

A seedling is a fragile structure. Without the seed's remarkable design, a seedling would never succeed into independent life. Seeds contain abundant reserves on which the seedling can depend until it attains an autotrophic way of life. Built in mechanisms prevent seed germination until environmental conditions are met that favor the seedlings subsequent survival. Meanwhile, seeds are dormant and can endure extreme environmental conditions during relatively long periods.

While seed maturation leads to growth detention, reserves accumulation, inactivity of metabolism, desiccation tolerance and dehydration; germination leads to rehydration, desiccation intolerance, activation of metabolism, reserves degradation and growth. It is not surprising that seed maturation and germination are usually seen as two alternative, and sometimes opposed, pathways (Quatrano, 1988; Kermodé, 1990). The plant hormone abscisic acid (ABA) has been implied in almost any seed maturation process (Jacobsen and Chandler, 1988; Black, 1991). This hormone also inhibits germination both of immature and mature embryos (Milborrow, 1974; Walton, 1980; Quatrano, 1986; Kermodé, 1990). Thus, ABA appears to perpetuate the seed maturation pathway and inhibit the germination pathway. Whether these pathways represent true developmental programs and whether there are switch proteins through which ABA exerts the turning on or off of those programs is unknown.

Under normal conditions immature seeds do not germinate. However, immature embryos are able to germinate if they are extracted from their maternal environment and cultivated *in vitro*. This implies that, before full maturation, the embryos already have the potential for germination and that some factor in the maternal environment inhibits it. ABA might be such an inhibitor. If ABA is included in the cultivation media the embryos do not germinate and instead follow a route that resembles normal development (Long et al; 1981; Triplett and Quatrano, 1982; Finkelstein and Crouch, 1984; Obendorf and Wettlaufer, 1984; Quatrano, 1988; Barrat et al; 1989; Kermodé, 1990).

The strongest evidence of the role of ABA as an inhibitor of precocious germination comes from the ABA deficient and the ABA insensitive mutants in *Arabidopsis* and other species. Depending on the strength of the mutation they germinate precociously, without having to go through dehydration, or show reduced dormancy (Rochibaud et al; 1980; Quarrie, 1982; Karssen et al; 1983; Koornneef et al; 1984; Neill et al; 1987; Taylor, 1987; Quatrano, 1988; Koornneef et al; 1989; Kermodé, 1990).

Germination usually begins by the orderly rehydration of the seed structures. It is followed by the activation of metabolism, the mobilization of reserves from the specialized storage organs to the embryonic axis, and by the rapid growth of this axis which is first made

evident by the emergence of the radicle. The contact of the radicle with the exterior allows an increased water and mineral uptake which is indispensable for further growth. However, seedling growth remains dependent on the seed's organic reserves until chloroplasts mature and gain access to light, usually several days after the start of germination (Dure, 1975; Kermode, 1990).

Biochemically, germination involves two contrasting types of activities. In the storage organs, they are essentially catabolic (sugar polymers, proteins, fats and sometimes all the cellular structures are degraded and exported to the embryonic axis) and in the embryonic axis, they are mainly anabolic (energy and metabolites are consumed in the building of proteins, nucleic acids, membranes and cell walls) (Kermode, 1990).

The best studied biochemical process occurring during germination is the synthesis and regulation, in the barley aleurone, of  $\alpha$ -amylase, a catabolic enzyme that hydrolyzes reserve starch (Jacobsen and Chandler, 1988). The levels and activity of this enzyme are induced by the plant hormone gibberellic acid (Duffus, 1969; Higgins et al 1982; Callis and Ho, 1983; Jacobsen and Chandler, 1988; Nolan and Ho, 1988; Garcia-Maya et al; 1990; Kermode, 1990). ABA opposes those effects and also stimulates the synthesis of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (Jacobsen and Chandler, 1988; Leah and Mundy, 1989; Robertson et al; 1989).

ABA inhibits the germination of fully mature non-dormant seeds of *Arabidopsis* and other species when they are sown in its presence (Koorneef et al; 1984; Kermode, 1990) . The similarity between this later effect, and the effect of ABA as an inhibitor of precocious germination, suggests that ABA may operate by a similar mechanism in both cases. Since ABA inhibits  $\alpha$ -amylases, we may expect that, in species which store most of their energy as starch (i.e., most cereals), it may prevent the utilization of stored energy and, thereby inhibit germination. Many species, including *Arabidopsis*, store energy mainly as fatty acids (Appelquist, 1975; Finkelstein and Somerville, 1990). The energy limitation hypothesis could be applicable to *Arabidopsis* if ABA inhibited the utilization of fatty acids. In agreement with this hypothesis, it has been found that in castor bean ABA inhibits isocitrate lyase activity, an enzyme which participates in the conversion of fatty acids into sugars (Marriot and Northcote, 1977; Dommès and Northcote, 1985).

In this work we studied several aspects of the effects of ABA on the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. These include the effect of ABA on the mobilization of nutrients and the induction of a set of proteins that include the seed storage proteins. Our findings indicated that, the inhibition of germination by ABA, does not act directly on a developmental "switch". Rather it seems that ABA limits the

availability of the energy and amino acids required for the anabolic processes that trigger seed germination. Consistent with this, we found that ABA prevented the degradation of seed storage proteins. The finding that germination can take place in the presence of ABA if energy and amino acids are provided exogenously, opens the way to studies on which the direct effects of ABA can be separated from indirect effects such as inhibition of germination.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Throughout this work mature seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia from our stock were used. Seeds were produced in Cuernavaca, México; under greenhouse conditions and therefore showed no dormancy. All seeds used came from a single lot and had been stored at 4°C for at least one month.

**Chemicals.** Most chemicals were from Sigma Chemical Co.. Bacto-agar and peptone were from DIFCO. Trans-label, a pool of <sup>35</sup>S-methionine and <sup>35</sup>S-cysteine, (Trans-label, 1163 Ci/ mmole) was from ICN Radiochemicals. BIO RAD protein assay, a system for protein quantification based on the method of Bradford, was from BIO RAD. X-ray film, XAR-5, was from Eastman Kodak Co.

**Growth media.** Mineral medium (MM) contained:  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  KNO<sub>3</sub>,  $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$  KPO<sub>4</sub> (pH5.5),  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  MgSO<sub>4</sub>,  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  Fe.EDTA,  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  $1.4 \times 10^{-5} \text{M}$  MnCl<sub>2</sub>,  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  CuSO<sub>4</sub>,  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>,  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  NaMoO<sub>4</sub>,  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  NaCl,  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  CoCl<sub>2</sub> (Haughn and Somerville, 1986).

All media used were based on MM. MM supplemented with additional chemicals is referred to as follows: A=+ ABA, G=+ glucose, S=+ sucrose, P=+ peptone. When MM was supplemented with more than one chemical the initials of all supplements are used ( i.e. AGP refers to MM medium containing ABA+glucose+peptone). Unless otherwise stated, the final concentrations were: ABA, 10µM; Bacto-agar, 0.7% (w/v); glucose, 0.5% (w/v); sucrose, 0.5% (w/v); peptone, 0.3% (w/v). When B (Bacto-agar) is specified in a medium it corresponds to a solid agar medium.

**Growth conditions.-** Seeds were sterilized with 30% (v/v) bleach and 0.02% (v/v) Triton X-100, and kept sterile throughout the experiments (Haughn and

Somerville, 1986) . All experiments were carried out in growth chambers at 22°C with 16:8 hrs light:dark periods. Illumination was provided with two 15 watt, cool white fluorescent lamps (Lights of America F15 T8/CW) at a distance of 50 cm from the plants. Experiments were initiated 4 hrs after the onset of the light period.

**Quantification of germination.**- These experiments were carried out in media containing Bacto-agar. Samples contained approximately 100 seeds and were done in duplicate. Counting was done with the help of an amplifying glass. Seeds with emerging radicles were considered as germinated. The same samples were counted at different ages after sowing, as indicated in each experiment. Percent germination is 100 times the number of germinated seeds divided by the total number of seeds.

***In vivo* labeling of proteins.** *Arabidopsis* seeds were germinated in solid MM with or without chemical supplements. Plant material was harvested after 3 days and imbibed in a drop of 0.3 ml of the appropriate medium containing approximately 10.66  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  of [ $^{35}\text{S}$  Met +Cys]-Trans-label . The seeds were labeled for 24 hrs. Afterwards, the seeds were washed with sterile water and frozen for protein isolation.

**Protein Isolation and analysis.** Total proteins were isolated by a phenol extraction method (Hurkman and Tanaka, 1986; Bauw et al; 1987) and analyzed in 15% SDS- polyacrylamide gels (Laemmli, 1970). The seed storage proteins were visualized by staining the gels with Coomassie Brilliant Blue. Radioactive proteins were detected by fluorography on X-ray films. Total protein was quantified by one or more of the following methods: Lowry (Lowry and Rosebrough, 1951); BIO RAD protein assay; and with the PVDF- immobilized proteins method (Shultz, 1992). Radioactivity incorporated into proteins was determined by scintillation counting after TCA precipitation of plant extracts (Schleif and Wensink, 1981). To compare the

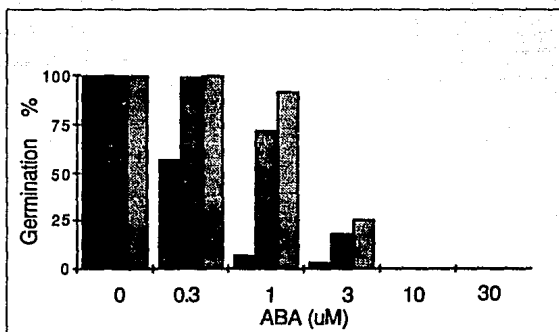


amount of particular proteins between different samples, equal amounts of total protein were loaded per lane; when the relative abundance of a protein within each sample was relevant, equal amounts of incorporated radioactivity were loaded per lane.

## RESULTS

**The ABA inhibition of germination in *Arabidopsis* is concentration dependent.** We sowed *Arabidopsis* seeds in agar minimal media (MM) in the absence or presence of various concentrations of ABA (0.3, 1.0, 3.0, 10 and 30  $\mu\text{M}$ ) and quantified germination as the emergence of the radicle at 3, 7 or 14 days after sowing. ABA concentrations of 3 $\mu\text{M}$  or lower did not inhibit germination completely, but rather retarded germination (Fig. 1). ABA concentrations of 0.1 $\mu\text{M}$  still induce a delay in germination (data not shown). This delay of germination induced by ABA varied from seed to seed. For example, in 0.3  $\mu\text{M}$  ABA, 57% of the seeds germinated between day 2 and day 3, 41% between day 3 and day 7, and 1% between day 7 and day 14. The retardation in germination correlated with the ABA concentration. We did not find a threshold in the effect of ABA. After radicle emergence (in ABA concentrations below 10  $\mu\text{M}$ ), the presence of ABA caused a slowing of growth and overall development. Thus the effect of ABA was not relieved after germination.

**Sugars and amino acids circumvent the inhibitory effect of ABA on germination.** Concentrations of ABA of 10  $\mu\text{M}$  or higher inhibited germination completely even 14 days after sowing (10 and 30  $\mu\text{M}$ ; Table I, row 1). This inhibition was relieved when, in addition to ABA, 0.5% (w/v) sucrose or glucose was present (Table I, rows 3 and 4, respectively). Mannitol (0.5 % w/v), a non metabolizable sugar was ineffective (Table I, row 2). In the absence of ABA, sugars had no apparent effect (Table I). Experiments described below show that these sugars did not interfere with the intake or detection of ABA. Apparently, in the presence of ABA germination is limited by an energy deficiency. The fact that germination occurred in the presence of sugars, indicated that ABA does not inhibit anabolic activities but



**Figure 1.** Effect of ABA on the germination of *Arabidopsis* seeds. Seeds were sown in MM containing different ABA concentrations and the percentage of germination was evaluated after 3 (■), 7 (▨) and 14 (▩) days after sowing. In all cases, seeds with emerging radicles were considered as germinated.

**Table 1.** Percentage of germination of *Arabidopsis* seeds in media containing different ABA concentration and/or mannitol, sucrose, glucose or peptone .

Sterilized *Arabidopsis* seeds were germinated in mineral medium (MM) containing different ABA concentrations (0.3, 1.0, 10.0 and 30.0  $\mu$ M). Different compounds (0.5% (w/v) mannitol=M, 0.5% (w/v) sucrose=S, 0.5% (w/v) glucose=G, 0.3% (w/v) peptone=P and 0.5% (w/v) glucose plus 0.3 % (w/v) peptone=GP) were added to this media to look at their effect on the inhibition of the germination caused by ABA. Seeds with emerging radicles were considered as germinated. Germination was evaluated 3, 7, and 14 days after sowing.

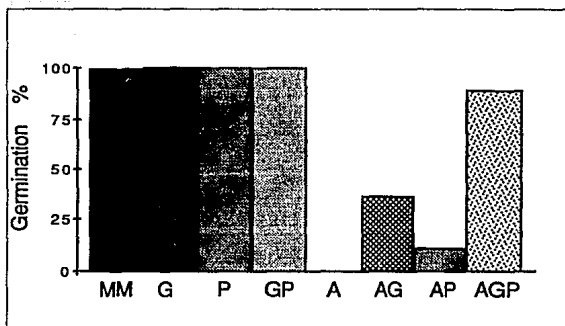
Medium	Day 3 after sowing					Day 7 after sowing					Day 14 after sowing				
	ABA concentration ( $\mu$ M)														
	0	0.3	1	10	30	0	0.3	1	10	30	0	0.3	1	10	30
MM	99	57	7	0	0	99	98	71	0	0	99	99	92	0	0
M	99	55	4	0	0	100	98	57	0	0	100	99	83	0	0
S	99	69	23	0	0	100	98	81	8	7	100	100	98	30	24
G	99	89	46	10	0	100	100	94	36	19	100	99	99	97	87
P	99	73	49	9	0	100	100	97	11	5	100	100	99	20	10
GP	99	98	60	14	4	100	99	98	89	68	100	100	99	99	98

rather interferes with some essential catabolic processes.

Peptone (0.3% w/v), a pool of amino acids, had a similar effect to that of metabolizable sugars (Table I, row 5). Peptone had no stimulatory effect on germination in the absence of ABA (Table I). The effect of amino acids was synergistic to that of glucose (Table I and Figure 2). For example, in 10  $\mu$ M ABA, by day 7, glucose or peptone by themselves caused 37 and 11% germination, respectively, while in combination they caused 89%. This result indicated that amino acids were not merely being used as an energy source. Rather, it seemed that these two kinds of metabolites were alleviating different deficiencies provoked by ABA. These results seem to indicate that ABA prevents the catabolism of seed reserves.

We investigated the influence that different concentrations of sugars or amino acids have on the reversion of the ABA inhibitory effect on germination. As shown in Table II, germination was not inhibited with relatively low concentrations of these nutrients. High concentrations (10 and 20% w/v) of glucose or sucrose had a negative effect on germination even in the absence of ABA. A similar effect was observed with mannitol, suggesting an osmotic problem. High concentrations of peptone also had a negative effect by themselves. The negative effect of peptone was stronger than that of equiosmolar concentrations of mannitol. In summary, metabolizable sugars and amino acids showed optimal concentrations for the stimulation of germination in the presence of ABA due to the balancing of their positive and negative effects.

**ABA prevents the degradation of the seed storage proteins.** Since germination was not prevented by ABA in the presence of peptone (amino acids), we suspected that ABA was in some way preventing the degradation of seed storage proteins. We analyzed the pattern of seed storage proteins in the presence of ABA during germination. *Arabidopsis* seeds were sown in MM or in MM containing ABA



**Figure 2.** Effect of different nutrients on the germination of *Arabidopsis* seeds. Seeds were sown on MM without additions (MM) or containing glucose 0.5% (w/v) (G), peptone 0.3% (w/v) (P), ABA 10  $\mu$ M (A), ABA 10  $\mu$ M + glucose 0.5% (w/v) (AG), ABA 10  $\mu$ M + peptone 0.3% (w/v) (AP), or ABA 10  $\mu$ M + glucose 0.5% (w/v) + peptone 0.3% (w/v) (AGP). Percentage of germination was scored 7 days after sowing.

**Table II. Percentage of germination of Arabidopsis seeds in media containing mannitol, sucrose, glucose or peptone without or with 10 $\mu$ M ABA.**

Sterilized *Arabidopsis* seeds were germinated in mineral medium (MM) containing different concentrations of mannitol (M), sucrose (S), glucose (G) or peptone (P) without or with 10 $\mu$ M ABA. Germination was evaluated 3, 7, and 14 days after sowing.

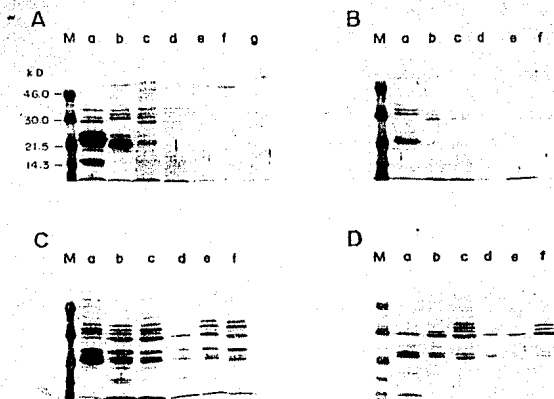
Medium	Day 3 after sowing						Day 7 after sowing						Day 14 after sowing					
	Concentration (% w/v)																	
	0	0.5	1	5	10	20	0	0.5	1	5	10	20	0	0.5	1	5	10	20
M	99	100	100	95	0	0	100	100	100	100	79	0	100	100	100	100	94	0
S	99	100	100	95	69	0	100	100	100	100	100	4	100	100	100	100	100	10
G	99	100	100	97	0	0	100	100	100	100	55	0	100	100	100	100	88	0
P	99	93	89	0	0	0	100	100	97	24	0	0	100	100	96	37	0	0
AM*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS*	0	0	7	18	0	0	0	11	11	38	20	0	0	29	47	66	59	0
AG*	0	14	18	4	0	0	0	29	96	60	44	0	0	100	99	98	75	0
AP*	0	12	2	0	0	0	0	16	8	0	0	0	0	18	10	3	0	0

\* A= 10 $\mu$ M ABA

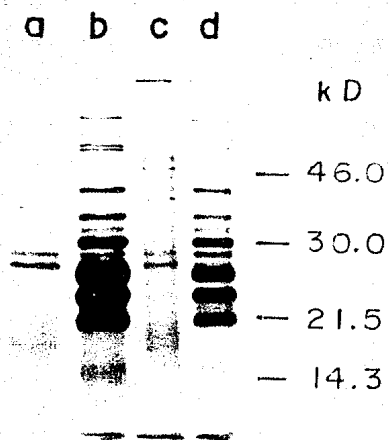
(A), ABA plus glucose plus peptone (AGP), or peptone plus glucose (PG) and harvested after 0, 1, 2, 3, 4 and 7 days. At each time point, total protein extracts were obtained as described in Materials and Methods. In Figure 3A, we can see that when seeds were sown in MM, seed storage proteins disappeared completely three days after sowing. However, when ABA was present, these proteins were still detectable after seven days (Fig. 3C). Moreover, we can see that seed storage proteins are present even at plantule stages when the seeds were forced to germinate in the presence of ABA by the addition of glucose and peptone (Fig. 3D). Glucose and peptone by themselves did not prevent the degradation of seed storage proteins (Figure 3B).

As an indicator of the intake and detection of ABA by the seeds, we analyzed the effects of this hormone on the *in vivo* synthesis of proteins. The *in vivo* labelling experiments were done as described in Materials and Methods. ABA induced the labeling of over 13 proteins (Figure 4, lane b). These radiolabeled proteins corresponded to approximately 70% of the total radioactivity incorporated. Five protein bands in the range of 20-30kD were very intense, creating a readily identifiable pattern that we call the "ABA pattern". This pattern corresponds to some of the most abundant proteins in *Arabidopsis* seeds whose molecular weights are in the range of the *Arabidopsis* storage proteins (Koorneef et al; 1989; Nambara et al; 1992). Glucose (0.5% w/v) that promoted germination in the presence of ABA (Table II), did not alter the synthesis of the ABA pattern (Figure 4, lane d), indicating that it did not interfere with the intake or detection of ABA. Glucose alone did not induce the ABA pattern (Figure 4, lane c).





**Figure 3.** SDS-PAGE of total protein extracts from *Arabidopsis* seeds under different treatments. Seeds were sown in MM without additions (A) or containing glucose 0.5% (w/v) + peptone 0.3% (w/v) (B), ABA 10  $\mu$ M (C) or ABA 10 $\mu$ M + glucose 0.5% (w/v) + peptone 0.3% (w/v) (D). Plant material was harvested 0 (a), 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f), and 7 (g) days after sowing and total protein was extracted and electrophoresed in SDS-PAGE gels (20 $\mu$ g protein/lane) as described in Material and Methods. Gels were stained with Coomassie blue R250, destained, and dried. Lane f in panels B,C, and D corresponds to 7 days after sowing.



**Figure 4.** Fluorography of a SDS-PAGE gel of *in vivo* [<sup>35</sup>S-Met]-labeled proteins from *Arabidopsis* seeds. Seeds were sown in MM without additions (a) or containing ABA 10  $\mu$ M (b), glucose 0.5% (w/v) (c), or ABA 10  $\mu$ M + glucose 0.5% (w/v) (d). After 4 days plant material was labeled as described in Material and Methods and total protein was extracted. Molecular weight markers are indicated at the left of the figure.

## DISCUSSION

In this work we analyzed the mechanism by which ABA inhibits germination. We have chosen *Arabidopsis* not only for its general characteristics as a plant model but also because several ABA deficient and ABA insensitive mutants are available (Karssen et al., 1983; Koorneef et al., 1984; Koorneef et al., 1989).

First, we wanted to know if ABA turned off a germination program. The simplest test we could devise to answer this question is based on the idea that developmental switches can only take discreet states (i.e. germination or no germination). If ABA acts on a regulatory switch, we should expect to find no effect at concentrations below a certain threshold and a full effect at concentrations above that threshold. Instead, we found a dose response curve, in which low concentrations of ABA caused only a delay in the germination time. Based on these results, we concluded that ABA does not act directly upon a germination program switch. The fact that ABA causes a retardation of germination suggests that ABA may modulate a rate limiting step of germination. This effect could be due to different events or factors. We investigated energy and amino acid limitations since there are some indications in the literature that ABA inhibits reserve utilization (the effect of ABA on the  $\alpha$ -amylases of cereals and of beans) (Van Onckelen et al., 1980; Jacobsen and Chandler, 1988; Nolan and Ho, 1988). We found that seeds sown in the presence of ABA were deficient in available or attainable energy. Sucrose and glucose stimulated germination even at very high concentrations of ABA, while mannitol did not. This extra energy alleviated a deficiency specifically caused by ABA since, in the absence of ABA, sugars had no beneficial effect in the control experiments (Tables I and II) or when germination was inhibited with other treatments (osmotically or with cycloheximide; data not shown).

Similar evidence indicated that ABA also caused an amino acid limitation.

Peptone, a source of amino acids, allowed the seeds to germinate in otherwise inhibitory concentrations of ABA. The fact that amino acids had a synergistic effect with glucose, seems to indicate that sugars and amino acids alleviated different deficiencies. Thus, amino acids were not merely being used as alternative energy source. The amino acid limitation indicated that, in the presence of ABA, the amino acids from the seed storage proteins were not becoming available for the germination process.

We found that for each of the additions (glucose, sucrose or peptone) there was an optimal concentration, below or above of which the stimulation of germination in the presence of ABA was reduced. These effects could be explained if these nutrients had inhibitory effects by themselves in the absence of ABA. In fact, that was the case since high concentrations of glucose, sucrose or peptone inhibited germination. Glucose and sucrose at a concentration of 20% (w/v) inhibited germination in a similar way than mannitol (see Table II), suggesting an osmotic effect. The inhibition of germination by peptone was much more pronounced (Table II). We are not certain about the nature of the pronounced inhibition of germination by peptone but it may be due to a selective utilization of amino acids from peptone by the seeds which may have caused an adverse pH change.

ABA induced the synthesis of a conspicuous set of proteins that we termed the "ABA pattern" (Fig. 4 lane b). As estimated from the incorporated radioactivity, the ABA pattern accounted for over 60% of the total protein synthesis. Neither sugars nor peptone interfered with the induction of these proteins. Thus, these metabolites seem to promote germination without interfering with the intake, detection, or regulatory effects of ABA.

As shown in this paper, ABA prevented the degradation of the storage proteins. Their stability was not the result of the inhibition of germination by ABA since ABA

prevented their degradation even when seeds were allowed to germinate by the addition of glucose and peptone. In contrast, in the absence of ABA, sugars and peptone had no effect on the stability of these proteins. This result indicated that the degradation of seed storage proteins is not regulated by amino acid demand, since seeds even in the presence of peptone (amino acids) undertook the degradation of seed storage proteins. It is worth noting that, there was a first step in the degradation of the storage proteins (occurring during day 1) that ABA did not prevent (See Fig. 3C). We do not know if this first step is insensitive to ABA or if it just occurs before ABA is able to penetrate the seed in sufficient amount.

The results presented in this paper suggest that ABA rather than regulating a germination program directly, changes metabolism from reserve utilization to reserve storage or accumulation. This is in agreement with several known effects of ABA, including the promotion of the synthesis of seed reserve proteins (Finkelstein et al., 1985; Quatrano, 1988; Kermode, 1990) and the inhibition of  $\alpha$ -amylase synthesis and activity (Jacobsen and Chandler, 1988; Nolan and Ho, 1988; Robertson et al., 1989). The regulation of storage and use of reserves could be an underlying mechanism of ABA action in different processes; even in some where this mechanism might be less obvious such as environmental stress conditions.

Although ABA inhibits the transcription of several 'germination genes' (Quatrano et al., 1983; Jacobsen and Chandler, 1988), our results suggest that, unless their function is to mobilize seed reserves, their transcription is not essential for germination. However, many of these genes could actually be required for post-germinative growth. For example, the gene of the small subunit of Rubisco probably belongs to this group (Quatrano et al., 1983; Medford and Sussex, 1989).

There are numerous reports on which different effects of ABA were studied in

cultured embryos . In many of them sucrose was a standard component of the cultivation media (Rochibaud et al., 1980; Long et al., 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein and Crouch, 1984; Finkelstein et al., 1985; Barrat et al., 1989; Xu and Bewley, 1991). We advise extreme care in the interpretation of results thus obtained, particularly if they are related to dormancy.

Apparently, what we call the "ABA pattern" is made up of seed storage proteins. The fact that, under our experimental conditions, this protein pattern is induced in a seed that is actually germinating supports the finding that some embryo specific sequences or proteins can be reinduced at post-maturation stages if the concentration of ABA is restored by exogenous application ( Skriver and Mundy, 1990; Sobolev et al.,1990; Thomas et al., 1991; Dmitrieva et al., 1991).

The possibility to induce germination in the presence of ABA allows to distinguish between the direct effects of ABA from those indirect effects such as inhibition of germination. We believe this opens new ways to study the effects of ABA during germination.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to J. Nieto and G. Cassab for critical reading of the manuscript, and to J. Mazzari for technical assistance.

## DISCUSION



## DISCUSION

En este trabajo se analizó el mecanismo mediante el que el ABA inhibe la germinación en *Arabidopsis thaliana*.

Primero, se pretendió conocer si el ABA apaga un programa de germinación. El diseño de experimentos sencillos para responder a esta pregunta, se basó en la idea de que los "switches" del desarrollo pueden tomar solo estados discretos (por ejemplo, germinación o no germinación). Si el ABA actuara sobre un "switch" regulador, se esperaría no encontrar algún efecto a concentraciones por debajo de un umbral y un efecto completo a concentraciones por arriba del mismo. En su lugar, se detectó una curva dosis-respuesta, en la que bajas concentraciones de ABA provocaron solo un retardamiento en el tiempo de germinación (ver Figura 1 en el manuscrito anexo). En base a estos resultados, se concluye que el ABA no actúa directamente sobre un "switch" del programa de germinación. El hecho de que el ABA cause un retardamiento de la germinación mas bien sugiere que la hormona modula un paso limitante en este proceso. Este efecto de retardamiento de la germinación provocado por el ABA pudo ser el resultado de la acción de diferentes factores y no de un evento sencillo. Se investigó sobre la limitación de la energía y los aminoácidos ya que en la literatura se indica que el ABA inhibe la utilización de las reservas (el efecto sobre las  $\alpha$ -amilasas de cereales y de frijoles) (Van Onckelen et al; 1980; Jacobsen and Chandler, 1988; Nolan and Ho, 1988). Se encontró que las semillas sembradas en presencia de ABA fueron deficientes en la energía disponible o accesible. Sacarosa y glucosa estimularon la germinación aún a muy altas concentraciones de ABA, mientras que esto no sucedió en el caso de manitol. La energía generada por estos compuestos subsanó una deficiencia provocada específicamente por el ABA ya que, en su ausencia, los azúcares no tuvieron efecto

benéfico en los experimentos control (ver Tablas I y II en el manuscrito anexo) o cuando la germinación se inhibió con otros tratamientos. No se observó incremento en la germinación por la adición de azúcares cuando se inhibió la germinación con cicloheximida, un inhibidor de la traducción, en lugar del ABA (datos no mostrados).

Evidencia similar indicó que la hormona también causó una limitación de aminoácidos. Peptona, una fuente de aminoácidos, ayudó a las semillas a germinar bajo diferentes concentraciones inhibitorias de ABA (ver Tablas I y II del manuscrito anexo). El hecho de que los aminoácidos tengan un efecto sinérgico con glucosa indica que los azúcares y los aminoácidos restituyen diferentes deficiencias (ver Figura 2 del manuscrito anexo). Por lo tanto, se deduce que los aminoácidos no fueron utilizados como una fuente de energía alternativa. Mas bien parece que en la presencia de ABA, los aminoácidos de las proteínas de reserva no llegaron a estar disponibles para el proceso de la germinación y que la adición exógena de los mismos remueve esta limitante.

Se encontró que para cada una de las adiciones (glucosa, sacarosa o peptona) hubo una concentración óptima, debajo o por arriba de la cual, se reduce la estimulación de la germinación en la presencia del ABA. Estos efectos podrían explicarse si los nutrientes tuvieran efectos inhibitorios por sí mismos en la ausencia del ABA. De hecho, este fue el caso, ya que altas concentraciones de glucosa, sacarosa o peptona inhibieron la germinación. Glucosa y sacarosa a una concentración de 20%, inhibieron la germinación en forma semejante a manitol (ver Tabla II del manuscrito anexo), lo que sugiere un efecto osmótico. La inhibición de la germinación por peptona fue mucho mas pronunciada (ver Tabla II del manuscrito anexo). No se tiene certeza acerca de la naturaleza de la pronunciada inhibición de la germinación por peptona, pero es razonable pensar que la utilización selectiva de aminoácidos por las semillas pudo provocar un cambio adverso de pH o que algún

aminoácido pudiera estar sirviendo de inhibidor.

También encontramos que el ABA induce la síntesis de un grupo conspicuo de proteínas que nosotros denominamos el "patrón del ABA" (Fig. 4, línea b, del manuscrito anexo). Según se estimó de la radioactividad incorporada, el "patrón del ABA" representa más del 50% de la proteína total sintetizada. Ni los azúcares, ni la peptona, interfirieron con la inducción de estas proteínas. Por lo tanto, estos metabolitos parecen promover la germinación sin interferir con la entrada, detección, o efectos reguladores del ABA.

Como se muestra en la Figura 3 del manuscrito anexo, el ABA inhibe la degradación de las proteínas de reserva. Su estabilidad no fue el resultado de la inhibición de la germinación por el ABA, ya que la hormona evitó su degradación aún cuando las semillas se ayudaron a germinar por la adición de glucosa y peptona. En contraste, en la ausencia de ABA, los azúcares y la peptona no tuvieron efecto sobre la estabilidad de estas proteínas. Este resultado indicó que la degradación de las proteínas de reserva de la semilla no se regula por demanda de aminoácidos, ya que las proteínas se degradan aún en la presencia de peptona (aminoácidos). Es importante hacer notar que, al parecer, el ABA no evitó un primer paso en la degradación de las proteínas de reserva (ocurriendo durante el día 1) (ver Fig. 3C del manuscrito anexo). No se sabe si este primer paso es insensible al ABA o si ocurre justamente antes de que el ABA sea capaz de penetrar en la semilla en cantidad suficiente.

Los resultados que se presentan en esta tesis sugieren que el ABA, más que regular la germinación directamente, cambia el metabolismo de utilización de reservas a almacenamiento o acumulación de las mismas. Esto está de acuerdo con varios efectos conocidos del ABA, incluyendo la promoción de la síntesis de las proteínas de reserva de la semilla (Finkelstein et al; 1985; Quatrano, 1988; Kermodé,

1990) y la inhibición de la síntesis y actividad de  $\alpha$ -amilasa (Jacobsen and Chandler, 1988; Nolan and Ho, 1988; Robertson et al; 1989). La regulación del almacenamiento y uso de las reservas puede ser la base de la acción del ABA en diferentes procesos; aún en algunos donde este mecanismo puede ser menos obvio, tal como las condiciones de estrés ambiental.

Aún cuando el ABA inhiba la transcripción de varios "genes de germinación" (Quatrano et al; 1983; Jacobsen and Chandler, 1988), nuestros resultados sugieren que, a menos que su función sea movilizar las reservas de la semilla, su transcripción no es esencial para la germinación. Sin embargo, algunos de estos genes pueden requerirse para el crecimiento post-germinativo. Por ejemplo el gene de la subunidad pequeña de Rubisco probablemente pertenece a este grupo (Quatrano et al; 1983; Medford and Sussex, 1989).

Existen numerosos reportes en los que se estudiaron diferentes efectos del ABA en embriones cultivados. En algunos de ellos la sacarosa fue un componente normal del medio de cultivo ( Rochibaud et al; 1980; Long et al; 1981; Ackerson, 1984; Finkelstein and Crouch, 1984; Finkelstein et al; 1985; Barrat et al; 1989; Xu and Bewley, 1991). Nuestros resultados indican que se debe ser muy cuidadoso en la interpretación de los resultados, particularmente si ellos están relacionados a la dormancia.

Aparentemente, lo que hemos denominado el "patrón del ABA" está formado de proteínas de reserva de la semilla. Estas proteínas se sintetizan normalmente y se inducen por aplicación de ABA en silículas verdes( datos no mostrados), corresponden con las proteínas mas abundantes de las semillas de *Arabidopsis* y sus pesos moleculares están en el intervalo de las proteínas de reserva de *Arabidopsis* . Esto se corroboró mediante sobreposición de geles tefidos con azul de

Coomassie con su autoradiografía correspondiente. El hecho de que, bajo nuestras condiciones experimentales, este patrón de proteínas se induzca en semillas germinando, soporta la conclusión de que algunas secuencias o proteínas específicas de la etapa de embriogénesis pueden reinducirse en estados post-maduración si la concentración del ABA se restaura por su aplicación exógena (Skriver and Mundy, 1990; Sobolev et al; 1990; Thomas et al; 1991; Dmitrieva et al; 1991).

La posibilidad de inducir germinación en la presencia del ABA, ayuda a distinguir entre los efectos directos del ABA de aquellos efectos indirectos, tales como la inhibición de la germinación. Consideramos que esto abre nuevas vías para el estudio de los efectos del ABA durante la germinación.

En la Figura 3, se esquematizan las vías posibles por las que el ABA pudiera inhibir la germinación de las semillas, en función del control que ejerce sobre la acumulación y movilización de las reservas. El panel I muestra que en semillas hidratadas y en ausencia de ABA, el programa de desarrollo de la semilla no procede. En su lugar se expresa el programa típico de germinación, en el que procesos catabólicos ocurriendo en los órganos de almacenamiento, promueven la movilización de las reservas hacia los puntos de crecimiento, donde se manifiestan procesos anabólicos involucrados en la formación de nuevas estructuras celulares. Los paneles II y III representan dos modelos posibles de como el ABA puede inhibir a la germinación. El modelo 1 establece que el ABA no inhibe directamente alguna actividad anabólica indispensable para que ocurra el proceso de la germinación, sino que solamente actúa sobre los procesos catabólicos involucrados en la movilización de las reservas nutrientes. El modelo 2 establece que se inhiben actividades que participan en los dos procesos. En los dos modelos, el ABA promueve el programa de desarrollo de la semilla y la acumulación de las reservas e impide el programa de

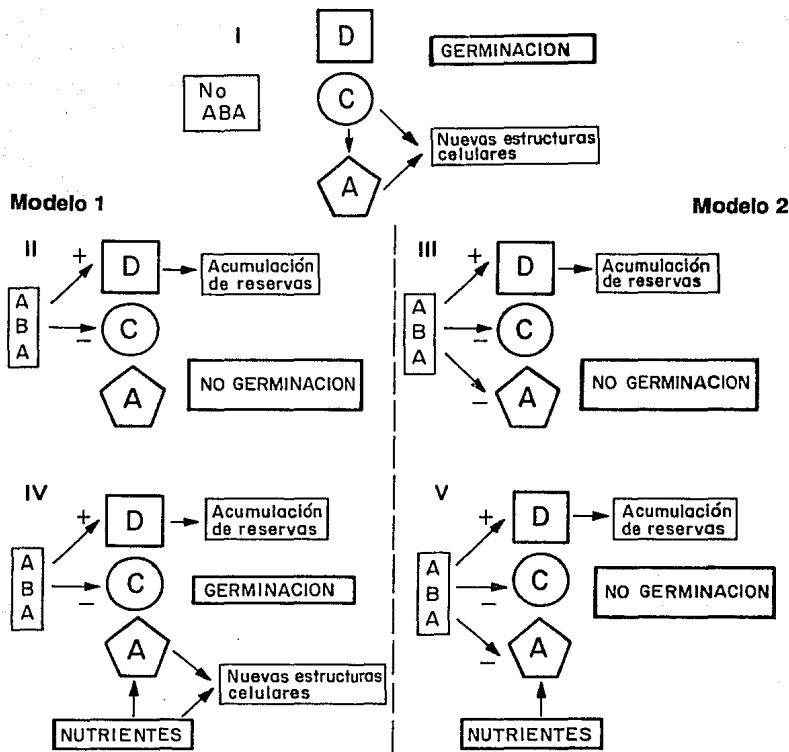


Figura 3. Modelos alternativos para explicar el modo de acción del ABA durante la germinación de las semillas de *Arabidopsis*. El panel I muestra los procesos que ocurren durante la germinación normal en ausencia de ABA. Los paneles II y III representan dos modelos posibles de como el ABA puede inhibir la germinación. El modelo 1 establece que el ABA no inhibe directamente alguno de los procesos anabólicos de la germinación, el modelo 2 indica que sí. Los paneles IV y V muestran las predicciones de los modelos 1 y 2 respectivamente, cuando el ABA está presente pero los nutrientes se proporcionan en forma exógena. El modelo 1 predice germinación, mientras que el modelo 2 predice no germinación, ya que algunos procesos pueden impedirse por la regulación ejercida por el ABA. D, C y A representan alguna actividad de transcripción, traducción o enzimática requerida para que ocurran procesos del desarrollo de la semilla (D) o catabólicos (C) y anabólicos (A) de germinación.

germinación. Los paneles IV y V muestran las predicciones de los modelos 1 y 2, respectivamente, cuando el ABA está presente pero los nutrientes se proporcionan exógenamente. El modelo 1 predice GERMINACION, mientras que el modelo 2 predice NO GERMINACION, ya que algunos procesos anabólicos deben impedirse por la regulación que ejerce el ABA. Nuestros resultados concuerdan con las predicciones del modelo 1.

La síntesis y degradación de las reservas de la semilla parecen estar bajo el control del ABA pero no los procesos anabólicos. Esta es una diferencia fundamental entre los procesos catabólicos y anabólicos de la germinación. Consideramos que los dos tipos de procesos reflejan la existencia de dos programas diferentes. De acuerdo con esto, parece ser que el papel que juega el ABA en la decisión entre proceder por el programa de desarrollo de la semilla o el programa de germinación, consiste en optar por construir reservas o degradarlas.

Pensamos que el "patrón del ABA" refleja la decisión para almacenar proteínas. Su degradación en presencia de ABA es extremadamente lenta: su vida media es de varias semanas (datos no mostrados). Debido a que bajo nuestras condiciones de ensayo, este patrón de proteínas característico de la etapa de embriogénesis, también se manifiesta en semillas germinando, se sugiere que los programas embriogénico y germinativo no son necesariamente alternativos y pueden expresarse simultáneamente. Además, puede no haber un "switch" entre ellos.

Por otro lado, el hecho de que los azúcares metabolizables y los aminoácidos aplicados exógenamente reviertan el efecto inhibitorio de la germinación provocado por el ABA (sin interferir con sus efectos bioquímicos), sugiere que la hormona impide la germinación indirectamente por restringir la disponibilidad de la energía y de los metabolitos necesarios. Esto significa que el ABA ejerce control directo sobre los procesos catabólicos, pero no sobre los anabólicos de la germinación, a los que

previene indirectamente por cortarles el suministro de los bloques de construcción. Si el ABA ejerciera control directo sobre los dos procesos, la germinación no procedería por la adición de nutrientes.

Todo lo expuesto nos conduce al concepto de que la germinación es mejor entendida en términos de 3 programas, como se esquematiza en la Figura 4. El programa de desarrollo de la semilla que es estimulado por el ABA y los programas catabólico y anabólico de la germinación (en lugar de solo los de desarrollo de la semilla y germinación). Se sugiere que si el ABA inhibe algún programa, lo hace entre el de desarrollo de la semilla y el catabólico de germinación, ya que no regula directamente alguna actividad indispensable del programa anabólico. Por otro lado, aquí se muestra que si existe un "switch" que controla la decisión entre la embriogénesis y la germinación, éste no es afectado directamente por el ABA.



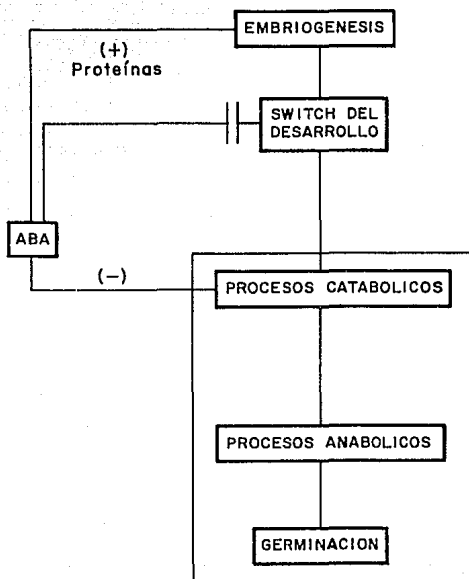


Figura 4. El esquema indica que al germinar semillas de *Arabidopsis* en presencia de ABA, la hormona promueve la manifestación del programa embriogénico a través de la síntesis y acumulación de las proteínas de reserva e inhibe al programa de germinación indirectamente, por regular negativamente los procesos catabólicos de la germinación, cortando el suministro de los bloques de construcción necesarios para que se efectúen los procesos anabólicos de la germinación. Si existe o no un "switch" que controla la decisión entre el programa embriogénico y el germinativo, éste no es afectado directamente por el ABA.

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES**

- 1. El ABA no actúa directamente sobre el posible "switch" del programa de germinación.**
- 2. Los azúcares y aminoácidos revierten el efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación.**
- 3. El ABA evita la degradación de las proteínas de reserva de la semilla.**
- 4. El ABA mas que regular la germinación directamente, lo hace por cambiar el metabolismo de utilización de reservas a almacenamiento o acumulación de las mismas.**
- 5. El ABA no inhibe las actividades anabólicas indispensables para la germinación.**
- 6. Algunas secuencias o proteínas específicas de la etapa de embriogénesis pueden reinducirse en estados post-maduración si la concentración de ABA es restaurada por aplicación exógena.**
- 7. Los programas embriogénico y germinativo no son alternativos necesariamente, pueden expresarse simultáneamente.**

## **PERSPECTIVAS**

## PERSPECTIVAS

1. La posibilidad de inducir la germinación en la presencia de ABA, permite distinguir entre los efectos directos del ABA de aquellos efectos indirectos, tales como la inhibición de la germinación. Consideramos que ésto abre nuevas vías para el estudio de los efectos del ABA durante la germinación.
2. En un futuro sería interesante el poder dilucidar los mecanismos moleculares a través de los que la hormona cambia el metabolismo de la movilización/utilización de las reservas a acumulación de las mismas. Posiblemente el ABA inhiba pasos enzimáticos específicos en las vías del catabolismo del almidón y de las proteínas.
3. La obtención de mutantes de *Arabidopsis thaliana* incapaces de producir las enzimas involucradas en la movilización de las sustancias de reserva y el aislamiento y caracterización de los genes que las codifican, permitiría profundizar en el estudio del papel que desempeñan durante la germinación y del efecto del ABA en la regulación de su expresión.
4. Es posible que la promoción de la germinación por los metabolitos suministrados, además de proporcionar energía y nutrientes, funcionen mediante la conversión del ABA de un regulador activo a uno inactivo ya sea por reacción con la hormona o mediante desplazamiento de las moléculas del ABA de su posible receptor.
5. Algunos autores consideran que la germinación inicia y termina con el primer ciclo de división celular y por tanto a la movilización y utilización de reservas como un proceso post-germinativo. El estudio de los efectos del ABA sobre tal evento y sobre las actividades que ocurren a nivel molecular permitirá ampliar nuestra comprensión del fenómeno.
6. Por otro lado, la explicación que en ésta tesis se ha dado acerca de como el ABA

Inhibe la germinación de las semillas de *Arabidopsis* se basa en datos obtenidos considerando a la germinación como el momento en que la radícula se hace visible, es decir, a nivel fisiológico. Seguramente la profundización en el estudio del fenómeno al nivel de pasos enzimáticos involucrados en las diferentes vías metabólicas y de expresión de "genes específicos de germinación", arrojará mas luz a nuestro entendimiento.

7. Finalmente, es posible que el ABA promueva la síntesis de un represor de genes "específicos" de germinación y que la adición de azúcares y aminoácidos lo desplace, promoviendo su expresión. También, el posible represor pudiera actuar sobre genes que codifican enzimas que participan en el catabolismo de las reservas.

## LITERATURA CITADA

## LITERATURA CITADA

- Ackerson RC** (1984) Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid J Exp Bot 35: 403-413
- Ammirato PV** (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. Interactions of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. Plant Physiol 59: 579
- Andrews JE, Ohlrogge J** (1990) Fatty acid and lipid biosynthesis and degradation. In DT Dennis and DH Turpin, eds, Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman Scientific and Technical, USA, pp 117-129
- Appelquist LA** (1975) Biochemistry and structural aspects of storage and membrane lipids in developing oilseeds. In T Galliard and EI Mercer, eds, Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids. Academic Press, London, pp 247-283
- Ashton FM** (1976) Mobilization of storage proteins of seeds. Ann Rev Plant Physiol 27: 95-117
- Barrat DHP, Whitford PN, Cook SK, Butcher G, Wang TL** (1989) An analysis of seed development in *Pisum sativum* . VIII. Does abscisic acid prevent precocious germination and control storage protein synthesis. J Exp Bot 40: 1009-1014
- Barrat DHP, Clarck JA** (1991) Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. Planta 184: 14-23
- Bartels D, Singh M, Salamini F** (1988) Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. Planta 175: 485-492



- Bauw G, De Loose M, Inze D, Van Montagu M, Vanderkerckhove J (1987)** Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH<sub>2</sub>-terminal amino acid-sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4806-4810
- Beevers, H (1980)** The role of the glyoxylate cycle. In PK Stumpf, ed, *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, pp 117-129
- Bewley JD, Greenwood JS (1990)** Protein storage and utilization in seeds. In DT Dennis and DH Turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, USA, pp 456-469
- Black M (1991)** Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. In WJ Davies and AG Jones, eds, *Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry*. Bios Scientific Publishers, pp 99-124
- Boyer CD (1985)** Synthesis and Breakdown of Starch. In CA Neyra, ed, *Biochemical Basis of Plant Breeding*. CRC Press, Boca Ratón, pp 133-153
- Callis J, Ho T-HD (1983)** Multiple molecular forms of the gibberellin-induced  $\alpha$ -amylase from the aleurone layers of barley seeds. *Arch Biochem Biophys* **224**: 224-234
- Casey R (1990)** Regulation of gene expression during development. In DT Dennis and DH turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, USA, pp 16-27
- Choi JH, Chung RZ (1989)** Induction, commitment, and progression of plant embryogenesis. In Shain-dow K and CH J Artzen, eds, *Plant Biotechnology*, Butterworths Publishers, pp 141-159
- Crouch ML, Sussex IM (1981)** Development and storage proteins synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vitro* and *in vivo*. *Planta* **153**: 64

- DeLisle AJ, Crouch ML** (1989) Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol* **91**: 617-623
- Dmitrieva MI, Chayanova SS, Sobolev AM, Azarkovich MI** (1991) Possible resumption of storage protein synthesis during germination: II. Nature and functions of proteins synthesized in castor bean endosperm during germination of abscisic acid treated seeds. *Fiziologia Rastenii* **38**: 106-113
- Dommes J, Northcote DH** (1985) The action of exogenous abscisic and gibberellic acids on gene expression in germinating castor beans. *Planta* **165**: 513-521
- Duffus CM** (1969)  $\alpha$ - amylase activity in the developing barley grain and its dependence on gibberellic acid. *Phytochemistry* **8**: 1205-1209
- Dure III LS** (1975) Seed formation. *Ann Rev Plant Physiol* **26**: 259-278
- Dure III LS, Galau GA, Greenway S** (1980) Changing protein patterns during cotton cotyledon embryogenesis and germination as shown by *in vivo* and *in vitro* synthesis. *Isr J Bot* **29**: 293
- Dure III LS, Greenway SC, Galau GA** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XIV. Changing mRNA populations as show by *in vitro* and *in vivo* proteins synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162-4168
- Eisenberg AJ, Mascarenhas JP** (1985) Abscisic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta* **166**: 505
- Finkelstein RR, Crouch ML** (1984) Precociously germinating rapeseed embryos retain characteristics of embryogeny. *Planta* **162**: 125-131

- Finkelstein RR, Tembargo KM, Shumway JE, Crouch ML (1985)** Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol* **78**: 630-636
- Finkelstein RR, Crouch ML (1986)** Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. *Plant Physiol* **81**: 907-912
- Finkelstein RR, Crouch ML (1987)** Hormonal and osmotic effects on developmental potential of maturing rapeseed. *Hort Sci* **22**: 797-800
- Finkelstein RR, Somerville CH R (1988)** Analysis of ABA insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biochem Suppl* **12C**: 160
- Finkelstein RR, Somerville C (1989)** Abscisic acid or osmoticum promote accumulation of long-chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus*. *Plant Sci* **61**: 213-217
- Finkelstein RR, Somerville CH R (1990)** Three classes of abscisic acid (ABA) -insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol* **94**: 1172-1179
- Fong F, Smith JD, Koelher DE (1983)** Early events in maize seed development. Fluridone induction of vivipary. *Plant Physiol* **73**: 899
- Garcia-Maya M, Chapman JM, Black M (1990)** Regulation of  $\alpha$ -amylase formation and gene expression in the developing wheat embryo. Role of abscisic acid, the osmotic environment and gibberellin. *Planta* **181**: 296-303
- Groot SPC, Van Y, Karssen CM (1991)** Strongly reduced levels of endogenous abscisic acid in developing seeds of tomato mutant *sitiens* do not influence *in vivo* accumulation of dry matter and storage proteins. *Physiol Plant* **81**: 73-78
- Guerche P, Tire C, Grossi de Sa F, De Clercq A, Van Montagu M, Krebbers E (1990)** Differential expression of the *Arabidopsis* 2S-albumin genes and the effect of increasing gene family size. *Plant Cell* **2**: 469-478

- Haughn GW, Somerville CH** (1986) Sulfonyleurea resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **204**: 430-434
- Hatfield PM, Vierstra RD** (1990) Protein turnover. In DT Dennis and DH Turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, USA, pp 448-455
- Heath JD, Weldon R, Monnot R, Meinke DW** (1986) Analysis of storage proteins in normal and aborted seeds from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **169**: 304-312
- Higgins TJB, Jacobsen JV, Zwar JA** (1982) Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant Mol Biol* **1**: 191-215
- Hsu FC** (1979) Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **63**: 552-556
- Huang AHC** (1987) Lipases. In PK Stumpf and EE Conn, eds, *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, pp 91-116
- Hughes DW, Galau GA** (1991) Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* messenger RNAs and the post-abscission program during embryo culture. *Plant Cell* **3**: 605-618
- Hurkman WJ, Tanaka CK** (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **81**: 802-806
- Jacobsen JV, Chandler PM** (1988) Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publishers, pp 164-193

- Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Brækland AE, Koornneef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Planta* **157**: 158-165
- Kermode AR, Bewley JD** (1987) Regulatory processes involved in the switch from seed development to germination: Possible roles for desiccation and ABA. In L Monti and E Porceddu, eds, *Drought Resistance in Plants, Physiological and Genetics Aspects*, Brussels, pp59-76
- Kermode AR, Bewley JD** (1988) The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. V. Responses of immature castor bean embryos to isolation from the whole seed: a comparison with premature desiccation. *J Exp Bot* **39**: 487
- Kermode AR** (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit Rev Plant Sci* **9**: 155-195
- King RW** (1976) Abscisic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta* **132**: 552
- King J** (1991) *The Genetic Basis of the Plant Physiological Processes*. Oxford University Press, USA, pp 347- 393
- Koornneef M, Reullng G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383
- Koornneef M** (1986) Genetics aspects of abscisic acid. In AD Blonstein and PJ King, *Plant Genetic Research, A Genetic Approach to Plant Biochemistry*. Springer- Verlag, Vienna, pp 35-54

- Koornneef M, Hanhart CJ, Hillhorst HWM, Karssen CM (1989)** *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **90**: 463-469
- Kruger NJ (1990)** Carbohydrate synthesis and degradation. In DT Dennis and DH Turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, USA, pp 59-76
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Leah R, Mundy J (1989)** The bifunctional  $\alpha$ -amylase/ subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed-specific expression. *Plant Mol Biol* **12**: 673-682
- Long SR, Dale RMK, Sussex IM (1981)** Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryonic axes in culture. *Planta* **153**: 405-415
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951)** Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265
- Lyndon RF (1990)** *Plant Development. The Cellular Basis*. Chapman and Hall, London, pp 3-320
- Marriot KM, Northcote DH (1977)** The influence of abscisic acid, adenosine 3', 5' cyclic phosphate, and gibberellic acid on the induction of Isocitrate lyase activity in the endosperm of germinating castor bean seeds. *J Exp Bot* **28**: 219-224
- Mc Daniel S, Smith JD, Price HJ (1977)** Response of viviparous mutants to abscisic acid. *Maize Genet Newslett* **51**: 85
- Medford JI, Sussex IM (1989)** Regulation of Chlorophyll and Rubisco levels in embryonic cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **179**: 309-315

- Meurs C, Basra AS, Karssen CM, Van Loon LC** (1992) Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **98**: 1484-1493
- Milborrow BV** (1974) The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol* **25**: 259-307
- Morris PC, Kumar A, Bowles DJ, Cuming AC** (1990) Osmotic stress and abscisic acid induce expression of the wheat Em genes. *Eur J Biochem* **190**: 625-630
- Mundy J, Helgaard J, Hanson A, Hallgren L, Jorgensen KG, Munck L** (1986) Differential synthesis in vitro of barley aleurone and starchy endosperm proteins. *Plant Physiol* **81**: 630-636
- Murphy MP, Thompson FW** (1988) *Molecular Plant Development*. Prentice Hall, USA, pp 1-29
- Murphy DJ, Cummins I** (1989) Biosynthesis of seed storage products during embryogenesis in rapeseed, *Brassica napus*. *J. Plant Physiol* **135**: 63-69
- Nambara E, Naito S, Mc Courth P** (1992) A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *The Plant J* **2** :435-441
- Nelli SJ, Horgan R, Rees AF** (1987) Seed development and vivipary in *Zea mays* L. *Planta* **171**: 358-364
- Nolan RC, Ho THD** (1988) Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase expression in barley aleurone layers. *Plant Physiol* **88**: 588-593
- Obendorf RL, Wettlaufer SH** (1984) Precocious germination during *in vitro* growth of soybean seeds. *Plant Physiol* **76**:1023-1028

- Pang PP, Prultt RE, Meyerowitz EM** (1988) Molecular cloning, genomic organization, expression and evolution of 12S seed storage protein genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **11**: 805-820
- Quarrie SA** (1982) Droopy: A wilty mutant of potato deficient in abscisic acid. *Plant Cell Environ* **5**: 23-26
- Quatrano RS, Ballo BL, Williamson JD, Hamblin MT, Mannsfield M** (1983) ABA controlled expression of embryo-specific genes during wheat grain development. In R Goldberg, ed, *Plant Molecular Biology*. Alan R. Liss, New York, pp 343-353
- Quatrano RS** (1986) Regulation of gene expression by abscisic acid during angiosperm seed development. In BJ Mifflin, ed, *Oxford Surveys in Plant Molecular and Cell Biology*, Vol 3. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 467-477
- Quatrano RS** (1988) The role of hormones during seed development. In PJ Davies, (ed), *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publishers, pp 494-514
- Qubedeaux B, Sweettser PB, Rowell JC** (1976) Abscisic acid levels in soybean reproductive structures during development. *Plant Physiol* **58**: 636
- Radley M** (1979) The role of gibberellin, abscisic acid and auxin in the regulation of developing wheat grains. *J Exp Bot* **30**: 381
- Rivlin CJ, Grudt T** (1991) Abscisic acid and the developmental regulation of embryo storage proteins in maize. **95**: 358-365
- Robertson M, Walker-Simmons M, Munro D, Hill RD** (1989) Induction of  $\alpha$ -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and young seedlings by abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiol* **91**: 415-420
- Rochlbaud CS, Wong J, Sussex IM** (1980) Control of *in vitro* growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Develop Gen* **1**: 325-330



- Rochlbaud C, Sussex IM** (1986) The response of viviparous-1 and wild type embryos of *Zea mays* to culture in the presence of abscisic acid. *J Plant Physiol* **126**: 235
- San SB, Casacuberta JM, Puigdomenech P** (1990) Sequential expression and differential hormonal regulation of proteolytic activities during germination in *Zea mays* L. *Planta* **181**: 467-474
- Schleif RF, Wensink PC** (1981) *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin and New York, p 163
- Schopfer P, Plachy C** (1985) Control of seed germination by abscisic acid. *Plant Physiol* **77**: 676-686
- Senaratna T, Mc Kersle BD, Bowley SR** (1989) Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos: Influence of abscisic acid, stress pretreatments and drying rates. *Plant Sci* **65**: 253-260
- Shults J** (1992) Improved staining of small PVDF-immobilized proteins. *Promega Notes*. Num 36, p 20-21
- Skriver K, Mundy J** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**: 503-512
- Smith JD, Mc Daniel S, Lively S** (1978) Regulation of embryo growth by abscisic acid *in vitro*. *Maize Gen Newslett* **52**: 107
- Sobolev AM, Azarkovitch MI, Chayanova SS** (1990) On possible resumption of storage protein synthesis during seed germination: I. Abscisic acid-stimulated synthesis of some proteins in castor bean endosperm during germination. *Fiziologia Rastenii* **37**: 1015-1023
- Steeves TA, Sussex IM** (1990) *Patterns in Plant Development*. Second edition, Cambridge University Press, USA, pp 1-38

- Sussex IM, Dale RMK** (1979) Hormonal control of storage protein synthesis in *Phaseolus vulgaris*. In *The Plant Seed Development, Preservation, and Germination*. Academic Press, New York, pp 129-141
- Taylor IB** (1987) ABA-deficient tomato mutants. In H Thomas, D Grierson, eds, *Developmental Mutants in Higher Plants*(SEB Seminar Series). Cambridge University, Press Cambridge, p 218
- Taylor DCN, Weber EW, Underhill MK, Pomeroy WA, Keller WR, Scowcroft RW, Wilen MM, Moloney M, Holbrook LA** (1990) Storage-protein regulation and lipid accumulation in microspore embryos of *Brassica napus* L. *Planta* **181**: 18-26
- Thomas TL, Vivekananda J, Bogue MA** (1991) ABA regulation of gene expression in embryos and mature plants. In WJ Davies and HG Jones, eds, *Abscisic Acid. Physiology and Biochemistry*. Bios Scientific Publishers, United Kingdom, pp 125-135
- Trewavas AJ** (1976) Plant growth substances. In JA Bryant, ed, *Molecular Aspects of Gene Expression in Plants*. Academic Press, London, pp 249-298
- Triplett BA, Quatrano RS** (1982) Timing, localization, and control of wheat germ agglutinin synthesis in developing wheat embryos. *Dev Biol* **91**: 491-496
- Van Onckelen H, Caubergs R, Horemans S, De Greef JA** (1980) Metabolism of abscisic acid in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. and its correlation to germination and  $\alpha$ -amylase activity. *J Exp Bot* **31**: 913-920
- Walton DC** (1980) Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol* **31**: 453-489
- Xu N, Bewley JD** (1991) Sensitivity to abscisic acid and osmotic changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). *J Exp Bot* **42**: 821-826

**Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid.**

**Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 439-473**