



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

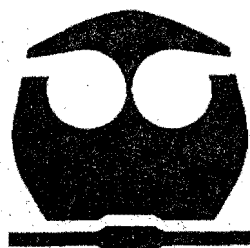
*BIOACTIVIDAD DE COMPUESTOS DE
COORDINACIÓN DE Co(II), Ni(II) Y Zn(II) CON
EL LIGANTE EMIZCO EN LA FOTOSÍNTESIS Y
EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE
SEMILLAS*

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(B I O Q U Í M I C A)**

P R E S E N T A:

Q. BEATRIZ KING DÍAZ



MÉXICO, D.F.

1999.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Marieta Tuena De Gómez- Puyou
Vocal	Dra. Norah Barba Behrens
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Suplente	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Suplente	Dr. Javier Plasencia de la Parra

Este trabajo se realizó en el laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Blas Lotina-Hennsen

Sustentante:

Asesor de Tesis:

Q. Beatriz King Díaz

Dr. Blas Lotina-Hennsen

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a la memoria de mi Padre con mucho respeto y amor y a mi madre Emma porque siempre me han apoyado, y porque sin el apoyo y amor de ella esta meta, quizá, jamás hubiera sido alcanzada.

A mis amados hijos: Roberto y Alejandra, por su paciencia, apoyo, cariño y comprensión.

A mis hermanos: Angelina, Roberto y Gonzalo por el amor que nos une en los buenos y malos momentos.

Con cariño a mis sobrinos: Karina, Omar, Diana, Mariana, Tania, Rosnay, Roxana y Raybet

A mi esposo José Reyes Varela Orona

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Blas Lotina-Hennsen, por trabajar bajo su dirección; por el apoyo e interés en la realización de este proyecto.

A la Dra. Noráh Barba Behrens por la síntesis de los compuestos estudiados, la revisión de este trabajo y el gran interés y apoyo que siempre ha mostrado.

A la Dra. Silvia Castillo Blum por los estudios de estabilidad de los compuestos y por el apoyo brindado durante todo este tiempo.

Al Dr. Roberto Iglesias por los estudios de fluorescencia.

A la B. Patricia Fierro por su ayuda en el trabajo del invernadero y apoyo técnico.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por su ayuda en mis primeros pasos en la computación.

A la B. Susana Reyes Martínez y Jacqueline Fernández Vargas por su ayuda incondicional en el trabajo de laboratorio y sobre todo por su amistad.

A la M. en C. Minerva González Ibarra y al Dr. Lahoucine Achnine por las sugerencias al presente trabajo.

Al M. en C. Sergio Rodríguez Morales por su ayuda con los programas de computación y su amistad.

Al Dr. Carlos L. Céspedes por el apoyo brindado.

A los niños de Servicio Social y tesis de laboratorio 115: Susana Valenzuela, J. Rodrigo Salazar, Iliana, José Luis, Andrés, Milton, Aurora, Lilian; la Sra. Mary Chuy, el Dr. Rogelio Rodríguez, y a todos los que de alguna u otra manera han hecho mi estancia en el laboratorio más amable y divertida y a todos los que no menciono aquí, no por falta de ganas, sino por que esto ocuparía demasiado espacio.

A los compañeros del 114, Pilo, José Juan, Alberto, Mary Paz, etc.

Finalmente quiero agradecer a CONACyT la beca de maestría que me otorgo y al proyecto DGAPA IN222096 por la beca otorgada y el apoyo económico para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVOS	9
3. ANTECEDENTES	10
3.1 FOTOSÍNTESIS	10
3.1.1 <i>Inhibidores del transporte de electrones</i>	13
3.1.2 <i>Aceptores de electrones</i>	14
3.1.3 <i>Inhibidores de la transferencia de energía</i>	14
3.1.4 <i>Desacoplantes</i>	15
3.1.5 <i>Fluorescencia de la clorofila a</i>	16
3.2 GERMINACIÓN	20
3.2.1 <i>Medición de la germinación</i>	20
3.2.2 <i>Respiración durante la imbibición y la germinación</i>	21
3.3 COBALTO	24
3.3.1 <i>Toxicidad</i>	24
3.4 NÍQUEL	26
3.4.1 <i>Toxicidad</i>	26
3.5. ZINC	27
3.5.1 <i>Toxicidad</i>	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	29
4.1 <i>Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de la clorofila</i>	29
4.2 <i>Medición de la velocidad del transporte de electrones y</i>	30
<i>síntesis de ATP.</i>	
4.3 <i>Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS II</i> ...	32

4.4. Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS I	32
4.5 Medición de las reacciones parciales de los fotosistemas II y I	33
4.6 Fluorescencia de la corofila a del FS II.	33
4.7 Ensayos de germinación y crecimiento de raíz y tallo	34
4.8 Ensayos de respiración de semillas	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Efecto del ligante emizco, de las sales y de sus	36
compuestos de coordinación de cobalto (II), níquel(II) y zinc (II) con el ligante emizco en la fotosíntesis	
5.2 Efecto de los compuestos de coordinación de emizco con los	48
metales de transición Ni (II), Co (II) y Zn (II), las sales y el ligante en la respiración de las semillas	
5.2.1 Efecto de los compuestos las semillas de trigo.	48
(<i>Triticum vulgare</i>)	
5.2.2 Efecto de los compuestos en la respiración de	49
las semillas de tomate (<i>Physalis ixocarpa</i>)	
5.2.3 Efecto de los compuestos en la respiración de	49
las semillas de <i>Lolium multiflorum</i>	
5.2.4 Efecto de los compuestos en la respiración de	50
las semillas de trébol (<i>Trifolium alexandrinum</i>)	
5.3 Efecto de los compuestos (compuestos de coordinación,	52
sales y ligante) en la germinación y desarrollo de la raíz y el tallo.	
Publicación. Interference by Nickel (II) Salts and Their	62
5-Methylimidazole-4-carboxylate Coordination Compounds on the Chloroplasts Redox Chain	
6. CONCLUSIONES	63
7. BIBLIOGRAFIA	66

ABREVIATURAS

Ao	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ASC	Ascorbato de sodio
Cfo	Parte lipofílica de la H ⁺ -ATPasa del cloroplasto
CF1	Parte hidrofílica de la H ⁺ -ATPasa del cloroplasto
DBMIB	2,5-Dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCBQ	Dicloro- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
Chl	Clorofila
Cyt b ₆ /f	Complejo Citocromo b ₆ /f
emizco	5-metilimidazol-4-carboxilato de etilo
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
Fo	Fluorescencia inicial
Fd	Ferredoxina
Fm	Fluorescencia máxima
FeS	Sulfoferroproteína
FNR	Ferredoxina-NADP-oxidoreductasa
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
Fv	Fluorescencia variable = Fm-Fo
HEPES	(N-[2-hidroxiethyl] piperazina-N'-[2-acido etanosulfónico])
KCN	Cianuro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
μequiv. e ⁻	Microequivalentes de electrones
MV	Metilviológeno
NADP ⁺	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
PC	Plastocianina
Pheo	Feofitina
Pi	Fosfato inorgánico
PMS	N-metilfenazina metosulfato
PQ	Plastoquinona
PQH ₂	Plastohidroquinona
P ₆₈₀	Centro de reacción del FS II
P ₇₀₀	Centro de reacción del FS I
Q _A	Aceptor de electrones primario del Fotosistema II
Q _A ⁻	Aceptor de electrones primario reducido del Fotosistema II

Q _B	Aceptor de electrones secundario del Fotosistema II
SiMo	Silicomolibdato de sodio
TMQH ₂	Tetrametil- <i>p</i> -benzoquinona
Tricina	{N-[tris(hidroximetil)metil]-glicina}
Tris	Tris(hidroximetil aminometano)
V(t)	Fluorescencia variable relativa
ZnSO ₄	Sulfato de zinc

RESUMEN

En este trabajo se estudio el efecto de los compuestos de coordinación de diferentes sales de níquel(II), cobalto(II) y zinc(II) con el ligante emizco (5-metilimidazol-4-carboxilato de etilo), en la síntesis de ATP, así como en el transporte de electrones en la fotosíntesis de cloroplastos aislados de hojas de espinaca, en la germinación y en la respiración de semillas, el desarrollo del tallo y la raíz, tanto de semillas agrícolas (*Triticum vulgare* y *Physalis ixocarpa*) como de semillas de malezas (*Lolium multiflorum* y *Trifolium alexandrinum*). El objeto de este estudio fué conocer la actividad biocida del ligante emizco y cómo se modifica la actividad de un compuesto con características biocidas al unirse con iones metálicos y formar compuestos de coordinación. Hacer una comparación de actividades entre las sales metálicas, el ligante y los compuestos de coordinación, para saber si de este forma podemos potenciar la actividad de compuestos biocidas o reducir su toxicidad ya que algunos compuestos son muy potentes pero muy tóxicos. Los compuestos de coordinación estudiados fueron: $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, así como las sales de cobalto(II): CoCl_2 , CoBr_2 y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$; y níquel(II): NiCl_2 , NiBr_2 y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, la sal ZnBr_2 , y el ligante emizco.

Los datos obtenidos de los efectos de los compuestos sobre el flujo de electrones en la fotosíntesis, indican que las sales metálicas presentan actividad inhibidora, sin

embargo, la actividad que presentaron los compuestos de coordinación fue mayor al de las sales metálicas.

Los resultados mostraron que los compuestos de coordinación de níquel(II), cobalto(II) y zinc(II), así como las sales de níquel(II) y cobalto(II), se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, siendo más potentes los compuestos de coordinación y presentando diferentes sitios de acción, comparados con las sales. Los compuestos de coordinación de níquel y cobalto presentan dos sitios de inhibición en la cadena redox: uno a nivel de Q_B en el FS II y el otro a nivel del complejo b_6/f , mientras que las sales de níquel y de cobalto presentan un sitio de acción en el complejo citocromo b_6/f , compartido con los compuestos de coordinación. Estos sitios fueron detectados por polarografía, al medir los cambios de concentración de oxígeno, utilizando un electrodo tipo Clark en presencia de los donadores, aceptores e inhibidores de electrones adecuados. Los sitios de inhibición de los compuestos en el FS II fueron corroborados midiendo la fluorescencia de la clorofila α .

El complejo de Zn(II) con emizco solo presentó un sitio de inhibición localizado en Q_B , y la sal $ZnBr_2$ presentó dos sitios de inhibición, uno en FS II y otro en FS I.

Por otro lado, el ligante emizco no presentó efecto alguno sobre la cadena transportadora de electrones ni en la síntesis de ATP. Este ligante es un inhibidor más potente, comparado con las sales y los compuestos de coordinación, en la germinación de las semillas, la elongación y el crecimiento del tallo y la raíz.

La actividad inhibidora sobre la respiración, la germinación y la elongación del tallo y la raíz que presentan los compuestos de coordinación de Co(II) y Zn(II) , es menor a la del ligante y mayor a la que presentan las sales metálicas.

1. INTRODUCCIÓN

Los nutrientes minerales son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los iones metálicos están incluidos en todos los aspectos de la vida; así por ejemplo, los cationes K^+ y Mg^{2+} se encuentran en la fase acuosa de las regiones intracelulares y de los organelos. Algunos metales de transición son elementos esenciales, que se requieren en pequeñas concentraciones.

Por otro lado, es bien conocido que los imidazoles presentan actividad biocida y que son usados extensivamente en la industria farmacéutica (Bennett, 1990) y en la agroquímica (Garaboyes, 1982; Parsons *et al.*, 1990). El compuesto 5-metilimidazol-4-carboxilato de etilo (emizco) (Figura 1), es un derivado imidazólico que puede quelatarse fácilmente con iones metálicos de manera similar al 2-metil-5-nitroimidazol, uniéndose al metal a través del N_3 y del oxígeno del carbonilo (Barba-Behrens *et al.*, 1991). El emizco se ha utilizado como un precursor de fármacos antivirales (Alonso *et al.*, 1985), pero hasta el momento no se ha ensayado su efecto en actividades fotosintéticas o de germinación.

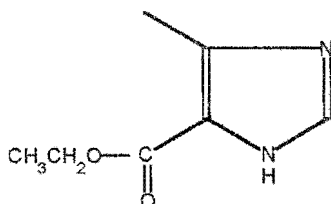


Figura 1. 5-metilimidazol-4-carboxilato de etilo (emizco).

En este trabajo se estudio el efecto del ligante emizco sobre la síntesis de ATP y el transporte de electrones de la fotosíntesis en sus tres diferentes estados (basal, fosforilante y desacoplado), así como el efecto de las sales de tres metales esenciales (cobalto, níquel y zinc) y de los compuestos de coordinación de éstas sales con el ligante emizco, para conocer la actividad del ligante y cómo se modifica al ser coordinado con un ion metálico, se compararon las actividades entre las sales metálicas, los compuestos de coordinación y el ligante. Además, se estudió el efecto de los compuestos mencionados sobre la respiración, la germinación y el desarrollo del tallo y la raíz de cuatro diferentes tipos de semillas, dos de ellas monocotiledóneas como son el trigo (*Triticum vulgare*) y un pasto (*Lolium multiflorum*) y dos semillas dicotiledóneas, el tomate (*Physalis ixocarpa*) y el trébol (*Trifolium alexandrinum*) que son semillas agrícolas y de malezas, para conocer más acerca de su actividad biocida. En años recientes, la búsqueda de nuevos herbicidas se ha incrementado notablemente debido a su baja biodegradabilidad, así como a su alta toxicidad y a la persistencia de algunos herbicidas que son frecuentemente utilizados.

Con base en las consideraciones anteriores, el presente trabajo pretende contribuir al entendimiento del mecanismo de acción de los compuestos en estudio como herbicidas, y su bioactividad al unirse a metales esenciales que a bajas concentraciones son nutrientes y altas concentraciones presentan toxicidad para las plantas.

En la figura 2, se presenta la estructura de los compuestos de coordinación de Co(II), Ni(II) y Zn(II) en disolución.

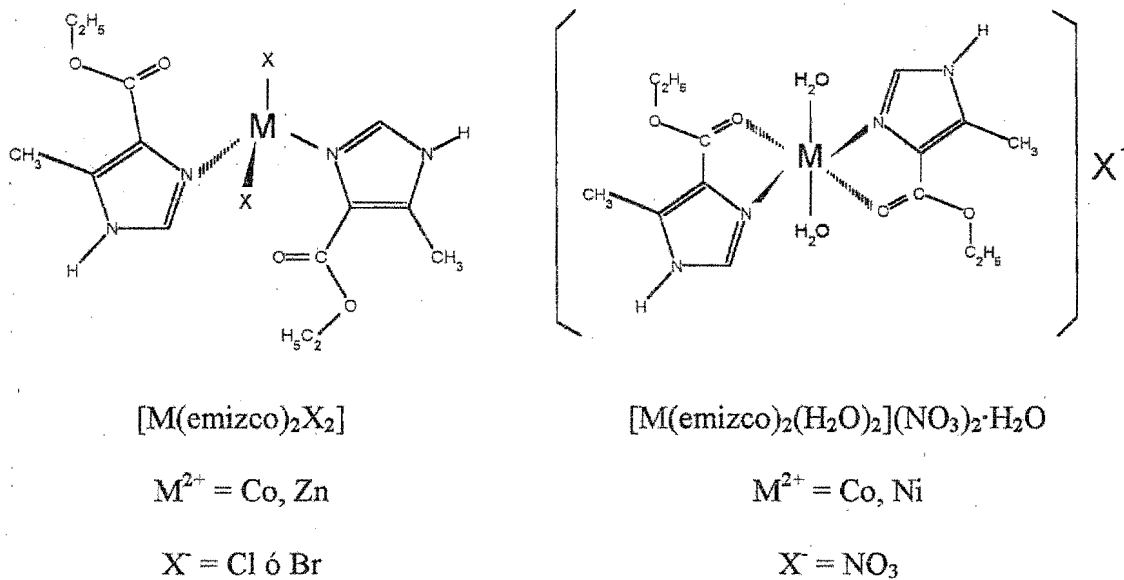


Figura 2. Estructura de los compuestos de coordinación de cobalto y zinc.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Investigar el efecto del ligante emizco, de los compuestos de coordinación con los iones metálicos de transición Ni(II), Zn(II), Co(II) y de sus respectivas sales, sobre la fotosíntesis *in vitro* y sobre la respiración y germinación de las semillas de plantas agrícolas y arvences, para conocer si los iones metálicos pueden modificar la actividad del ligante.

Objetivos particulares:

* Determinar la actividad del ligante emizco, de las sales metálicas de Co(II), Ni(II), y Zn(II) y de los compuestos de coordinación de las sales metálicas con el ligante sobre la fotofosforilación y la cadena transportadora de electrones en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.

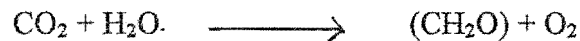
* Si los compuestos presentan algún efecto (inhibición o activación) en el transporte de electrones, se identificará el sitio de acción midiendo las reacciones parciales

* Determinar el efecto de los compuestos arriba mencionados en la respiración, la germinación y el crecimiento del tallo y la raíz de semillas de cultivo y de malezas.

3. ANTECEDENTES

3.1 FOTOSÍNTESIS

La vida en la tierra depende del sol. Las plantas y cianobacterias capturan la energía luminosa para convertirla en energía química que posteriormente será utilizada en la asimilación del CO_2 para producir carbohidratos (CH_2O).



El sitio en donde se lleva a cabo la fotosíntesis en eucariontes (algas y plantas superiores) es el cloroplasto (Figura 3).

La fotosíntesis se estudia en dos fases:

1. Las reacciones luminosas, las cuales utilizan la energía luminosa para generar NADPH y ATP.
2. Las reacciones en la obscuridad son reacciones independientes de la luz, en las cuales se utilizan los productos de las reacciones luminosas (NADPH y ATP) para sintetizar carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O .

Las reacciones luminosas ocurren en la membrana tilacoidal del cloroplasto.

El sistema fotosintético consiste de tres complejos proteicos (Figura 3): El FS II, el complejo citocromo b_6/f y el FS I, los cuales están eléctricamente “conectados” entre sí por la difusión de los acarreadores de electrones, el plastoquinol (Q) y la plastocianina (PC). El transporte de electrones de H_2O a NADP motiva el transporte de protones hacia el interior del espacio tilacoidal. Protones adicionales se obtienen por el complejo que fotoliza el agua (OEC, oxygen-envolving complex), produciendo O_2 . El gradiente de protones resultante es utilizado para la síntesis de ATP al translocarse los protones a través del CFo del complejo CF_1CF_o de la ATP-sintetasa. En la membrana también existen complejos de pigmentos “cosechadores de luz”, los cuales están compuestos por clorofilas y cromóforos que al ser excitados por un fotón transfieren su energía a los FS I y FS II. De este modo, cada electrón generado pasa a través de una cadena de acarreadores de electrones a una poza de moléculas de plastoquinonas (Q), y el plastoquinol resultante reduce al citocromo b_6/f , que acopla la transferencia de los electrones con la translocación de protones al interior de la membrana tilacoidal. El citocromo b_6/f transfiere los electrones a la plastocianina (PC). La plastocianina regenera P700 oxidado a reducido. El electrón que dona P700 reducido pasa a través de varios intermediarios de la cadena transportadora hasta reducir el $NADP^+$ a NADPH en el transporte de electrones no cíclico. Alternativamente, el electrón puede ser regresado al citocromo b_6/f en un proceso cíclico que transloca protones al espacio tilacoidal.

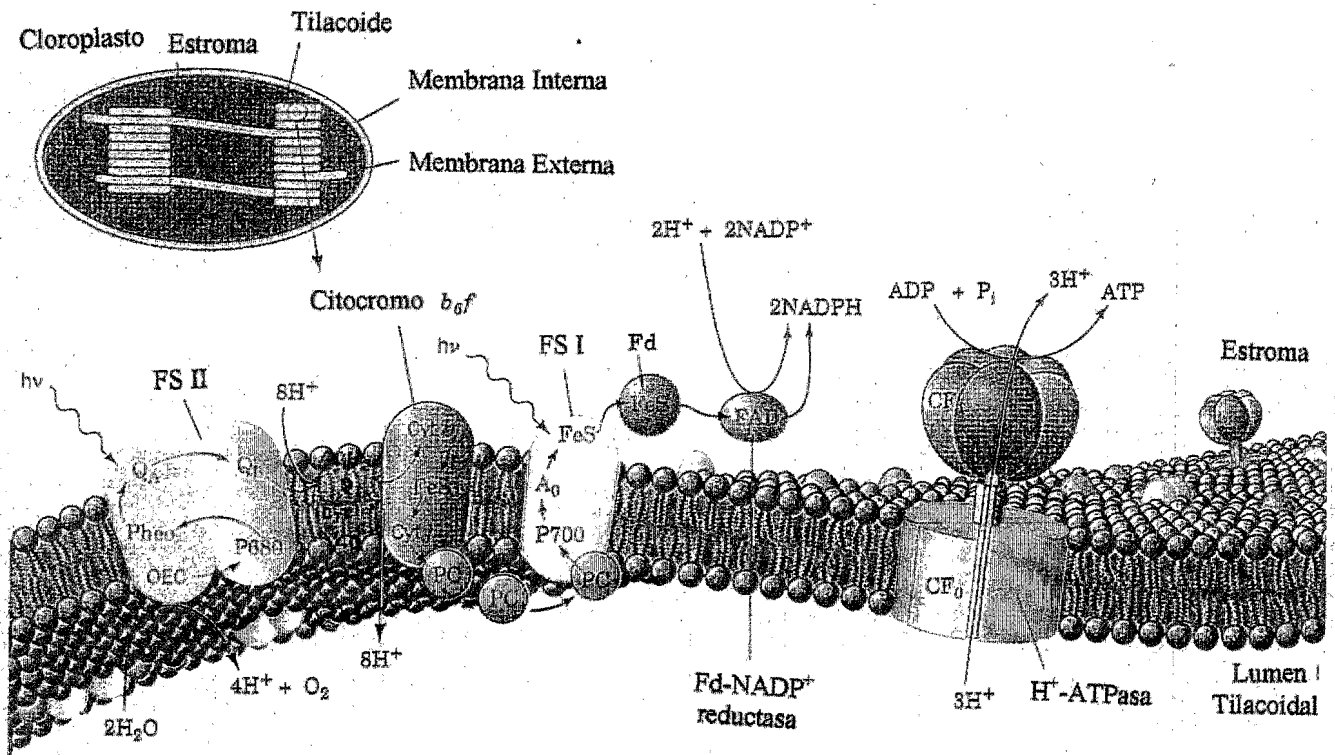


Figura 3. Esquema del cloroplasto y representación de la membrana tilacoidal mostrando los componentes de la cadena transportadora de electrones.

La fotosíntesis es esencial para las plantas. Tradicionalmente, la fotosíntesis ha sido dividida en reacciones no luminosas, que son aquellos procesos de la asimilación del carbono y que ocurren en las fases acuosas del estroma del cloroplasto, y las reacciones dependientes de la luz, transducción de energía, proceso asociado con las membranas tilacoidales, el cual es responsable de satisfacer las necesidades de ATP (fosforilación) y NADPH que son requeridos para la asimilación del carbono.

La fotofosforilación en los tilacoides se obtiene de la conversión de la energía almacenada en forma de potencial electroquímico en energía química. El gradiente electroquímico de protones resulta de la translocación de protones hacia el interior del tilacoide y esta asociado al transporte de electrones en los tilacoides. El complejo enzimático que se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y Pi es una ATP sintetasa, es decir el complejo CF_1CF_0 -ATPasa. Dicho complejo se compone de dos partes: una hidrofóbica (CF_1) y la otra lipofóbica (CF_0) (Figura 3).

Un gran número de reactivos y tratamientos afectan la fotofosforilación y el transporte de electrones. Existen diferentes mecanismos de acción que han permitido clasificar a los reactivos que afectan a las reacciones luminosas de la fotosíntesis (Trebs, 1980) los cuales se detallan a continuación.

3.1.1 Inhibidores del transporte de electrones.

Este tipo de compuestos son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill, debido a que en presencia o ausencia de ADP y Pi, o en presencia de NH_4Cl , inhiben el transporte de electrones no cíclico, así como la síntesis de ATP.

Estos compuestos afectan una o más enzimas transportadoras de electrones en la cadena fotosintética. El sitio más susceptible para la acción de estos compuestos en el flujo de electrones fotosintético está asociado al lado donador o aceptor del FS II, sobre todo el sitio Q_B en el polipéptido D_1 . Algunos ejemplos de compuestos inhibidores del transporte

de electrones, son la hidoxilamina, la cual inhibe la fotólisis del agua; el DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-*p*-benzoquinona), el cual puede prevenir la función de la plastoquinona; el DCMU (3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea) el cual previene la oxidación de Q_A^- en el FS II.

3.1.2 Aceptores de electrones.

Otro importante modo de acción sobre el flujo de electrones fotosintético, es la desviación de los electrones de su camino natural a los aceptores de electrones sintéticos. Muchos compuestos pueden aceptar electrones en diferentes sitios del transporte de electrones de la membrana tilacoidal, por ejemplo, el paraquat y el diquat que aceptan electrones del lado reducido del FS I. El FS I dona electrones desde los centros hierro-azufre (F_A y F_B), los cuales tienen potenciales redox de -550 y -590 mV respectivamente. La ferredoxina, con un potencial redox de -420 mV, en condiciones fisiológicas transfiere los electrones al NADP, vía la ferredoxina-NADP oxidoreductasa. El paraquat y el diquat, con potenciales redox de -340 y -446 mV, pueden aceptar electrones de los centros Fe-S y/o de la ferredoxina (Baker and Percival, 1991).

3.1.3 Inhibidores de la transferencia de energía.

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan uniéndose directamente al complejo H^+ -ATPasa del cloroplasto. Estos compuestos interfieren con la actividad de CF_1 y/o CF_0 e inhiben la fosforilación. El bombeo de protones inducido por la luz en el lumen

tilacoidal hace que el espacio interno sea ácido y que el lado del estroma sea básico. El flujo de protones a través de CF_o hacia el estroma induce la síntesis de ATP en la porción CF₁ del complejo CF_o-CF₁. Este evento transduce la energía del gradiente electroquímico de protones en energía química, mediante la fosforilación del ADP con Pi para producir ATP (Baker and Percival, 1991). La florizina, un inhibidor de la transferencia de energía que interactúa con el CF₁, inhibe el flujo de electrones dependiente de la fosforilación, pero no tiene efecto sobre el transporte de electrones desacoplado ni el flujo de electrones en condiciones no fosforilantes. El DCCD (diciclo hexilcarbodiimida), otro inhibidor de la transferencia de energía, interactúa con el CF_o (Mc. Carty, 1980).

3.1.4 Desacoplantes

La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno. Una vez protonados, éstos pasan nuevamente a la parte externa del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación. Muchos desacoplantes, incluyendo el CCP (carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona), son ácidos débiles solubles en lípidos que disipan el gradiente de protones. La gramicidina no es un acarreador de protones, pero forma un canal transmembranal acuoso, a través del cual, protones y otros pequeños iones pueden pasar (Baker and Percival, 1991).

3.1.5 Fluorescencia de la clorofila *a*.

La fluorescencia ha jugado un papel principal en la elucidación de muchos aspectos de la organización y el funcionamiento de la membrana tilacoidal.

La energía luminosa es absorbida por moléculas de clorofila *a* y *b* para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de luz absorbida se pierde como calor o por re-emisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete (Figura 4). La diferencia de energía entre los dos niveles es la energía del fotón absorbido. La molécula de clorofila *a* excitada libera esta energía y regresa a su estado basal, lo que sucede en cerca de 10^{-8} s. Durante este periodo de tiempo, ocurre una separación de carga en el centro de reacción, es decir el electrón en el nivel de alta energía puede ser transferido a un aceptor I, formando un aceptor reducido I lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal. La relación entre los tres procesos, fotoquímico (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación por la radiación, D), es expresada matemáticamente usando constantes de velocidad: de excitación vía fotoquímica, k_P ; vía fluorescencia, k_F ; y vía calor, k_D . El número total de excitaciones por segundo es:

$$(k_P + k_F + k_D)n,$$

donde: n es el número de moléculas de clorofila.

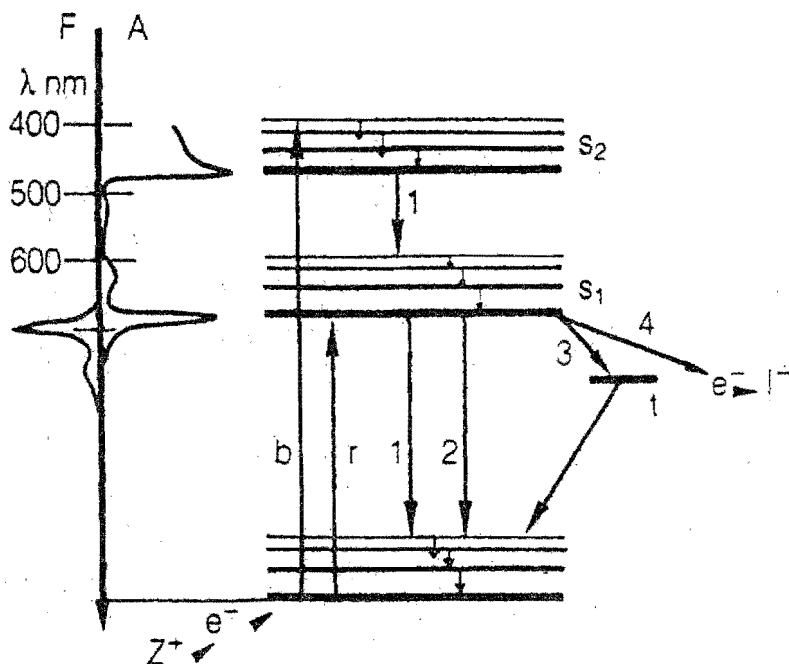


Figura 4. Diagrama de niveles de energía para la clorofila: espectro de la fluorescencia, F; espectro de absorbancia, A; fotón azul, b; fotón rojo, r; conversión interna (k_D), 1; fluorescencia (k_F), 2; cruzamiento inter-sistema, 3; separación de carga (k_P), 4; aceptor de electrones intermedio de FS II, I^- ; estados singulete, s_1 , s_2 ; estado triplete, t ; donador de electrones desde el sistema de fotólisis de agua del FS II.

Bajo condiciones de iluminación, cuando el proceso fotoquímico se lleva a cabo, cerca del 97 % de la luz absorbida es utilizada para realizar este trabajo fotoquímico, 2.5 % es transformado en calor y 0.5 % es re-emitido como fluorescencia. Si todos los centros de reacción están reducidos, del 95 al 97 % de la energía absorbida puede ser desactivada como calor y del 2.5 al 5.0 % vía fluorescencia.

La fluorescencia de la clorofila es roja debido a la diferencia de energía entre el nivel basal y el primer nivel excitado, y es igual a la energía de un fotón de luz roja (Bolhár-Nordenkampf and Öquist, 1993).

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de células de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a*. A estos cambios se les denomina inducción de la fluorescencia o *curva de inducción de la fluorescencia*, también es llamada *curva de Kautski* (Strasser *et al.*, 1995). En esta tesis, a las diferentes fases de la curva de inducción se les denomina como O J I P (Figura 5). El aumento de la fluorescencia desde O hasta P ocurre durante el primer segundo de iluminación y es llamada la "fase rápida". La fase lenta es después de P y puede tomar algunos minutos antes de llegar a su fase terminal. La fase rápida esta relacionada con los procesos primarios del FS II, mientras que la fase lenta esta principalmente relacionada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y los procesos metabólicos en el estroma.

La cinética de la curva de inducción de la fluorescencia de la fase rápida, ha sido estudiada por Delosme R (1971), las características de esta fase con relación a la luz y la temperatura sugiere que la fase O-J esta controlada por la separación de carga. La fluorescencia variable relativa en un tiempo *t* es definida como $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$. Esta expresión experimental puede ser tomada como una medida de la fracción del aceptor de electrones Q_A que esta en su estado reducido.

Cuando se agrega DCMU, hay un inmediato aumento de la fluorescencia en la fase rápida, la razón de que esto ocurra es debido a que el DCMU bloquea el flujo de electrones después del aceptor primario de FS II (Q_A) es decir, inhibe la reoxidación de Q_A^- (Strasser *et al.*, 1995).

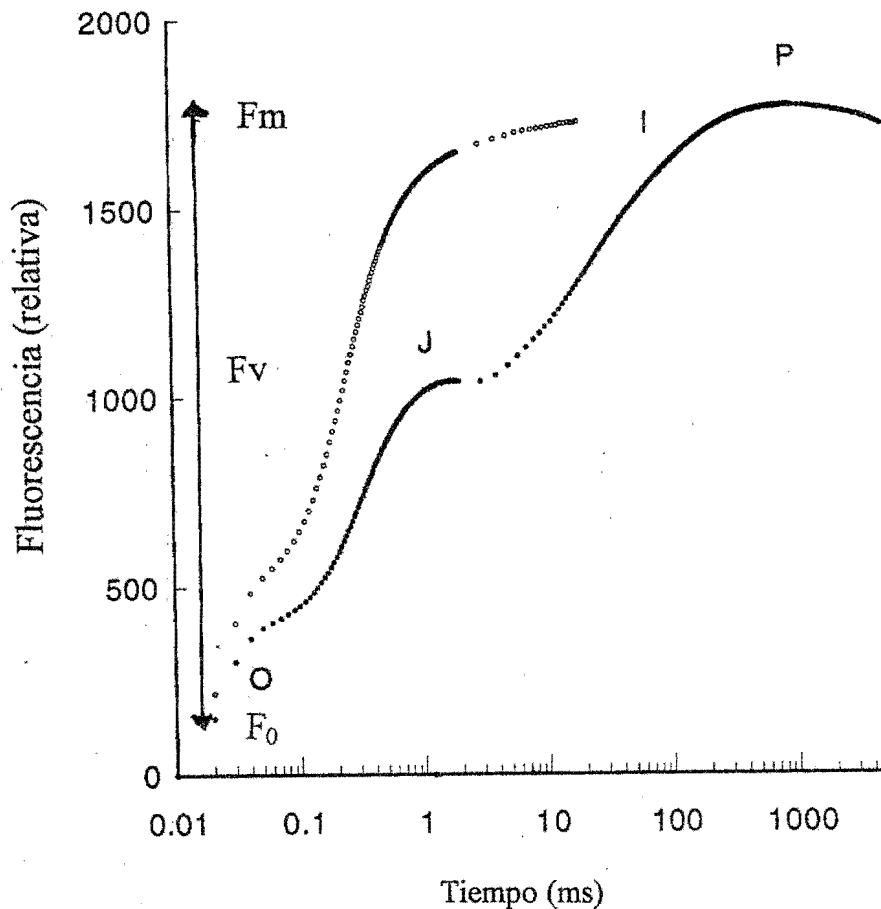


Figura 5. Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la obscuridad por 30 minutos. F_0 , fluorescencia inicial mínima; F_v , fluorescencia variable; F_m , fluorescencia variable máxima. La curva de abajo es el control, la curva superior son cloroplastos dañados en el lado aceptor del FS II con $50 \mu\text{M}$ de DCMU.

3.2 GERMINACIÓN

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario, llamado radícula. Esto incluye numerosos eventos, por ejemplo, la hidratación de las proteínas, cambios a nivel estructural, en la respiración, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular, ninguno de estos eventos por sí solo constituye la germinación. (Black and Bewley, 1994), pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado con un metabolismo lento y casi indetectable en un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación en su sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina. Los procesos que ocurren en la plántula naciente, tal como la movilización de las principales reservas de almacenamiento, no son parte de la germinación, son eventos postgerminatorios (Black and Bewley, 1994).

3.2.1 Medición de la germinación.

Los medios por los cuáles se puede determinar que la germinación ha progresado es la medición de la toma de agua o la respiración. Estas medidas dan solo una indicación aproximada del estado de germinación alcanzado.

La emergencia del eje (la radícula) nos permite reconocer cuando la germinación

ha sido completa. El grado de avance de la germinación en una población de semillas se expresa en porcentaje de germinación en función del tiempo. En la figura 6 se observa la diferencia estructural entre semillas monocotiledoneas (trigo) y dicotiledoneas (frijol).

3.2.2 Respiración durante la imbibición y la germinación.

La respiración de las semillas maduras "secas" (contienen de 10-15 % de humedad) es extremadamente baja, comparada con la respiración de las semillas que están desarrollando la germinación.

El consumo de oxígeno por las semillas puede seguir un modelo básico de cuatro fases.

Fase I. Inicialmente hay un aumento en el consumo de oxígeno, el cual puede ser atribuido, en parte, a la activación e hidratación de las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena transportadora de electrones. La respiración durante esta fase se incrementa linealmente a medida que se va hidratando el tejido.

Fase II. Se caracteriza por una estabilización en la respiración. La hidratación de la semilla ahora es completa y todas las enzimas preexistentes se activaron. Presumiblemente, hay poco incremento en las enzimas de la respiración o en el número de mitocondrias en esta fase. La disminución en la respiración de la fase II en algunas semillas se puede deber en parte a que las membranas de las células o estructuras circundantes limitan la toma de oxígeno del embrión embebido o de los tejidos de almacenamiento. Otra razón para esta disminución se puede deber a que la activación de la vía glicolítica durante la germinación

es más rápida que el desarrollo de mitocondrias. Esto puede permitir una acumulación de piruvato debido a las deficiencias en el ciclo del ácido cítrico o a la fosforilación oxidativa o a la cadena transportadora de electrones, por lo tanto, cierta proporción de piruvato es desviado temporalmente a la vía de la fermentación. Entre las fases I y II la radícula del embrión penetra las estructuras circundantes, y la germinación se completa.

Fase III. Se caracteriza por un segundo incremento en la respiración. Esto puede ser atribuido a un aumento en la actividad de las mitocondrias sintetizadas de *novo* y a las enzimas respiratorias en las células que proliferan en el crecimiento del eje embrionario. El número de mitocondrias en el tejido de almacenamiento también se ve incrementado y esto se asocia con la movilización de las reservas. Otro factor que contribuye al aumento de la respiración de las semillas es la ruptura de la testa o de otras estructuras de recubrimiento.

Fase IV. Esto ocurre en el tejido de almacenamiento y coincide con su envejecimiento seguido de la degradación de las reservas almacenadas.

La duración de las fases I-IV varía de especie a especie, dependiendo de varios factores como son: la velocidad de imbibición, la permeabilidad de las membranas de la semilla al oxígeno y las velocidades metabólicas. Por otra parte, la duración de las fases varía considerablemente con las condiciones ambientales, especialmente la temperatura.

Las mitocondrias de semillas secas y de semillas recién embebidas son estructural y funcionalmente deficientes. En el pasado existía un debate considerable acerca de sí

efectivamente podían conducir la fosforilación oxidativa en las primeras horas después de la hidratación. Actualmente se ha aceptado que sí pueden y que la fosforilación oxidativa mitocondrial es la principal fuente de ATP desde que la imbibición empieza. (Black and Bewley, 1994).

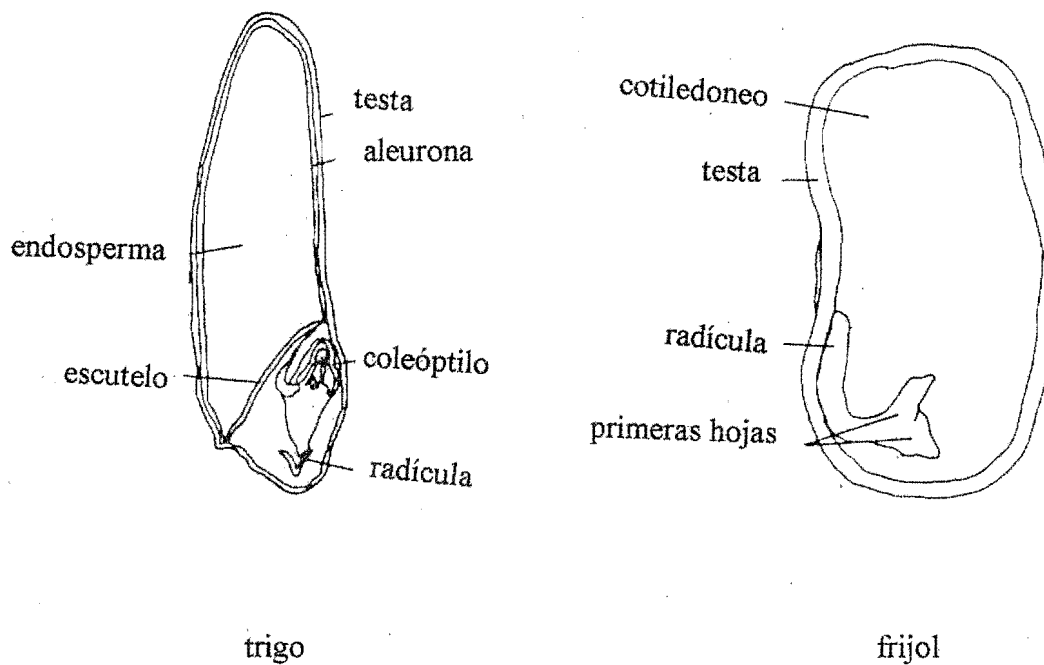


Figura 6. Localización de tejidos en semillas monocotiledóneas (trigo) y dicotiledóneas (frijol).

3.3 COBALTO

El cobalto es un mineral esencial para animales y microorganismos pero no ha sido reconocido como tal para las plantas superiores. La coenzima cobalamina (vitamina B₁₂ y sus derivados) tienen Co(III) como componente metálico, con cuatro átomos de nitrógeno en el centro de una estructura porfirínica coordinada a un Co(III). El papel fisiológico para este metal es ser esencial para la fijación de nitrógeno en los nódulos de las raíces de plantas leguminosas las cuales poseen vitamina B₁₂ (Palit and Sharma, 1994).

3.3.1 Toxicidad

El papel del cobalto en los procesos fotosintéticos ha sido controvertido. En experimentos *in vitro*, el cobalto ha mostrado una influencia positiva sobre la reacción de Hill, con una simultánea disminución en la cantidad de clorofila y un aumento de cloroplastos por unidad de superficie de la hoja. Los incrementos en la actividad pueden estar relacionados con la redistribución de los pigmentos (aumento en la cantidad de clorofila *b* y disminución en la cantidad de clorofila *a* (Lypskaya *et al.* 1973). Tripathy *et al.* (1983) observaron inhibición en la actividad del FS II y en la reacción de Hill en los cloroplastos de cebada tratados con CoCl₂ a concentraciones de 3 a 8 mM. Diferentes complejos de Co, por ejemplo, Co(III) ATP y Co(III) ADP, inhiben la actividad ATPasa competitivamente con el ATP y el ADP en el factor de acoplamiento I en cloroplastos de

lechuga (Hochman *et al.*, 1979). Complejos de Co(II) y *o*-fenantrolina actúan como desacoplantes del transporte de electrones y de la generación del gradiente de protones, concentraciones de 10^{-5} M de estos complejos actúan como donadores de electrones del FS I, con una potencia mucho más baja que los donadores de electrones típicos de FS I (Lukshene *et al.*, 1985).

En germinación, concentraciones de 0.03, 0.1 y 0.5 % de sulfato de cobalto disminuyen la germinación de *Pinus sylvestris* (Volkorezov, 1968) y *Nicotiana tabacum* (Siegel, 1977).

Además, el Co(II) disminuye el índice mitótico e inhibe el paso de células de la interfase a la mitosis en *Vicia faba*, actuando como un veneno de la pre-profase de la mitosis. (Herich, 1965).

En el crecimiento de plantas superiores, el Co inhibe el crecimiento de (i) *Chrysanthemum morifolium* (Patel *et al.*, 1976), (ii) coleoptilos de embriones aislados de *Fraxinum excelsior* (Kashes and Dolobovskaya, 1969). (iii) inhibe el crecimiento de la raíz en las plántulas de tomate, además de producir pronunciados cambios morfológicos, fisiológicos y citológicos (Burca *et al.*, 1978).

La respiración y la fosforilación oxidativa son inhibidas después de incubar mitocondrias por un largo periodo en soluciones 3.3×10^{-5} - 1.2×10^{-4} molar de Co(II). En la presencia de succinato, el Co(II) desacopla la respiración mitocondrial, lo cual indica

que al menos presenta dos sitios de acción en la mitocondria de levadura (Tuppy and Sieghart, 1973).

El cobalto contenido en el suelo disminuye la tasa de respiración en las hojas de betabel, lo que ocurre en las fases tardías de desarrollo (Satsukyeovich and Lyashkyevich, 1975).

3.4 NÍQUEL

El estado de oxidación preferido en los sistemas biológicos es el Ni(II), pero también puede existir como Ni(I) y Ni(III) en algunas enzimas. El níquel es un elemento esencial en trazas (micronutriente) para un gran número de bacterias; por ejemplo, como un componente en la ureasa y en muchas hidrogenasas. También induce la estimulación de la germinación y el crecimiento de varias especies de plantas de cultivo a bajas concentraciones de níquel (Marschner, 1988).

3.4.1. Toxicidad

El síntoma más común de la toxicidad del níquel en las plantas es la clorosis, lo cual está relacionado con el deterioro de la clorofila (Farago and Cole, 1988).

En la germinación *in vivo* e *in vitro* de semillas de *Helianthus annuus*, el níquel ha mostrado efectos tóxicos disminuyendo la germinación en un 80 % a concentraciones de

0.1 M, la inhibición es dependiente de la concentración y el tiempo de duración del tratamiento (Chakravarty and Srivastava, 1992).

El níquel está reportado como mutagénico y cancerígeno en células animales (Leonard *et al.*, 1981).

3.5 ZINC

Las características químicas del zinc lo hacen el cofactor ideal en los procesos de catálisis ácido-base de muchas enzimas, cerca de 300, algunos ejemplos son la alcohol deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, etc. (Valle Bert L. and Auld D. S., 1990), la coordinación del zinc con los aminoácidos histidina, aspartato, glutamato y cisteína proporcionan sitios activos para la coordinación al agua y a los sustratos. (Brambila and González, 1994).

3.5.1 Toxicidad

El zinc(II) ha sido ensayado en los cloroplastos aislados de cebada por Tripathy y Mohanty (1980), ellos encontraron que el zinc(II) como $ZnSO_4$ inhibe parcialmente el FS I a altas concentraciones (1-5 mM) y bloquea el transporte de electrones en el lado oxidante del FS II. Estos resultados fueron corroborados por Miller and Cox (1983). Con respecto a la germinación: el zinc(II), al igual que el níquel(II), ha sido estudiado en las semillas de

Helianthus annuus, el porcentaje de semillas germinadas y sus efectos tóxicos a diferentes concentraciones fueron ensayados. Los resultados de estos estudios muestran que el Zn es menos tóxico que el níquel (Chakravarty and Srivastava, 1992).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los compuestos de coordinación fueron sintetizados por la Q. Josefina Montes Ayala en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química, bajo la dirección de la Dra. Norah Barba Behrens.

4.1 Aislamiento de los cloroplastos y cuantificación de la clorofila.

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinaca (*Spinacea oleracea L.*). Se escogieron aprox. 40 g de hojas frescas y turgentes, se cortaron en trozos pequeños y se homogeneizaron por 5 s en una licuadora Osterizer en 100 mL de medio que contenía: 400 mM de sacarosa, 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ y 30 mM de tricina-KOH (pH 8.0). El homogeneizado se filtró a través de 8 capas de gasa. Los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm por 5 min, después se resuspendieron en el mismo medio y la suspensión concentrada se guardó en la oscuridad por 1 hr a 4°C. (Calera et al., 1995; Mills et al., 1980; Saha et al., 1971).

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon (1949), el cual consiste en aforar a un volumen de 5 mL con acetona, una alícuota de 30 µL de cloroplastos resuspendidos, después se incuban en la oscuridad a 0°C por 5 min y se centrifugan en una centrifuga clínica otros 5 min para eliminar las proteínas precipitadas. El contenido de clorofila se cuantifica mediante la determinación de la absorbancia del sobrenadante a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650, la

concentración de la clorofila es calculada con la siguiente fórmula:

$$[\text{Chl}] = 8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})$$

en donde:

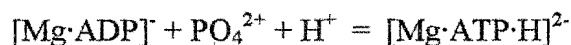
[Chl] = μg de clorofila por mL

8.05 y 20.29 = constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda.

A = absorbancia a las longitudes de onda indicadas.

4.2 Medición de la velocidad del transporte de electrones y síntesis de ATP.

La síntesis de ATP se midió con un microelectrodo Orion, Mod. 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning, modelo 12 con escala expandida (Dilley, 1972; Jiménez *et al.*, 1998), Los cambios de pH observados, se registraron en un aparato Gilson. El medio de reacción utilizado para la determinación de la síntesis de ATP contenía: 100 mM de sorbitol, 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de KCN, 50 μM de MV, 1 mM de ADP, 3 mM de Pi y 1 mM de HEPES-KOH (pH 8.0), 60 μg de clorofila se añadieron en un volumen final de 3 mL y se iluminó por 1 minuto, resultando en el consumo escalar de H^+ por ATP como se observa en la siguiente reacción:



Este es un método simple que provee una medida real de la síntesis o de hidrólisis de ATP. La técnica es por lo tanto, la ideal para determinar la velocidad de hidrólisis de ATP y para efectuar estudios cinéticos de este proceso (Hipkins, 1986).

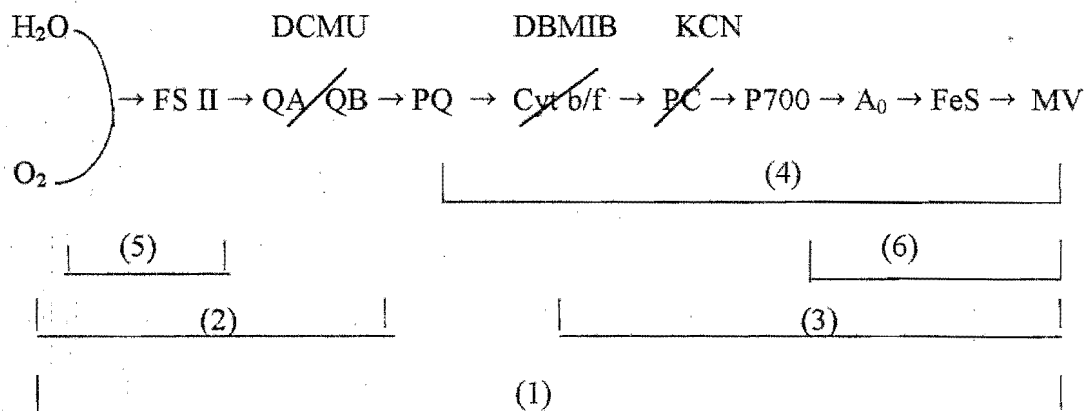


Figura 7. Reacciones parciales del transporte de electrones descritas en el texto. Q_A y Q_B, aceptores de electrones del FS II; PQ, plastoquinona; PC, plastocianina, A₀, aceptor primario del FSI.

(1) El flujo de electrones fotosintético no cíclico, se monitorea en presencia de metilviológeno (MV) que es un aceptor artificial de electrones, utilizando un oxímetro YSI

(Yellow Spring Instrumental) modelo 5300, con un electrodo tipo Clark. El medio de reacción contenía: 100 mM de sorbitol, 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de KCN, 50 μM de MV y 15 mM de HEPES-KOH (pH 8.0), para el transporte de electrones basal. Para la determinación del transporte de electrones fosforilante, se utilizó el mismo medio basal más 1 mM de ADP y 3 mM de Pi. Para la medición del transporte de electrones desacoplado se usó el medio del transporte de electrones basal más 6 mM de NH₄Cl. (Calera *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1971).

4.3 Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS II.

Las reacciones descritas abajo se ilustran en la Figura 7.

(2) El transporte de electrones desacoplado del FS II, se midió polarográficamente de H₂O a DCBQ (Yruela *et al.*, 1991). Se utilizó el mismo medio para medir el transporte de la cadena completa en su estado desacoplado, pero sin el MV y con 1 μM de DBMIB como inhibidor del paso de electrones al FS I y 100 μM de DCBQ como aceptor de electrones.

4.4 Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS I.

(3) El flujo de electrones desacoplado del FS I se determinó de manera similar al transporte de electrones basal, usando el mismo medio y agregando los siguientes reactivos: 100 μM de DCPIP reducido con 300 μM de ascorbato de sodio, 10 μM de DCMU y 6 mM de NH₄Cl (Allen *et al.*, 1974).

(4) Para determinar el transporte de electrones del FS I incluyendo la plastoquinona se realizó la medición igual que en el punto (3) para el FS I, pero en este caso el donador de electrones fue TMQH₂ 200 µM (Allen *et al.*, 1974).

4.5 Medición de las reacciones parciales de los fotosistemas II y I.

(5) Las reacciones parciales del FS II se midieron de H₂O a SiMo, usando la mezcla de reacción para el fotosistema II sin MV y se añadió 200 µM de SiMo, 10 µM de DCMU y 6 mM de NH₄Cl (Hauska, 1977).

(6) La reacción parcial del FS I desde PMS/ASC a MV fue medida usando cloroplastos tratados con 30 mM de KCN. El tratamiento de los cloroplastos con cianuro se llevo a cabo durante 30 min, a 0°C, en la oscuridad y después se centrifugo a 10, 000 rpm en una centrifuga Sorvall Super T21 por 1 minuto y se resuspendieron en el medio de aislamiento (Ouitrakul *et al.*, 1973). Se utilizó PMS debido que a estudios de espectroscopia de EPR han confirmado la habilidad del PMS reducido para interactuar con el P700 (Izawa *et al.*, 1973)

4.6 Fluorescencia de la Clorofila a del FS II.

Alicuotas de cloroplastos que contenían 15 µg de clorofila se transfirieron por gravedad sobre papel filtro con un aparato dot-blot (Bio-Rad USA) para asegurar una distribución homogénea y reproducible en el papel. Los cloroplastos se introdujeron

inmediatamente a viales que contenían 3 mL de solución con diferentes concentraciones de los diferentes compuestos ensayados e incubados por 5 minutos en la obscuridad. Las curvas de inducción de la fluorescencia de la clorofila α , se midieron a temperatura ambiente con un aparato Plant Efficiency Analyser (PEA Hansatech UK), como describe Strasser *et al.*, 1995. El análisis cinético de la fluorescencia variable relativa $[V(t)=(F_t-F_o)/(F_m-F_o)]$ se llevo a cabo por la deconvolución y la normalización de las curvas de inducción.

4.7 Ensayos de germinación y crecimiento de raíz y tallo.

Las semillas se escogieron manualmente descartando las dañadas. Los ensayos de germinación consistieron en poner 40 semillas de trigo (*Triticum vulgare*), 100 semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*), 100 de *Lolium multiflorum* y 100 de trébol (*Trifolium alexandrinum*) a incubar en una incubadora marca WTC binder durante 5 días (3 días para germinación y 2 días más para el crecimiento de la radícula en la obscuridad a 28° C en cajas de Petri de 9-cm de diámetro con papel filtro y 10 mL de solución (Einhelling, 1995).

Las soluciones a ensayar se prepararon diluyendo la cantidad apropiada de compuesto a partir de una solución stock de 20 mM preparada con agua desionizada para obtener la concentración requerida. La emergencia de la radícula de la semilla se tomo como índice de germinación.

4.8 Ensayos de respiración de semillas

La respiración de semillas se midió preparando las semillas del mismo modo como se hizo para la germinación, poniendo las semillas a germinar en cajas Petri manteniéndolas en la obscuridad, pero en este caso la temperatura se mantuvo a 20° C para retardar la germinación. La respiración de las semillas se midió como consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro y el oxígeno consumido se calculo con la siguiente formula:

$$\frac{1200 \text{ nanoátomos de O}_2}{20 \text{ cm}} \times \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hr}} \times \frac{Y}{1 \text{ min}} \times \frac{1}{\text{número de semillas}} =$$

$$\text{nanoátomos de O}_2 \times \text{hr}^{-1} \times \text{semilla}^{-1}$$

Donde:

1200 nanoátomos/20 cm corresponden al número total de nanoátomos de O₂ en 20 cm de la escala del papel graficador.

Y= La distancia en centímetros que se obtiene en la pendiente del trazo problema y que corresponde al número de nanoátomos de O₂ consumidos por las semillas en 1 minuto.

La primera lectura de respiración se efectuó a las 24 horas. Las lecturas subsecuentes se realizaron después del tercer y del quinto día, debido a que posterior a ello el tamaño de la radícula no permitieron la medición del consumo de oxígeno.

5. RESULTADOS

5.1 Efecto del ligante emizco, de las sales y de sus compuestos de coordinación con cobalto (II), níquel(II) y zinc (II) en la fotosíntesis.

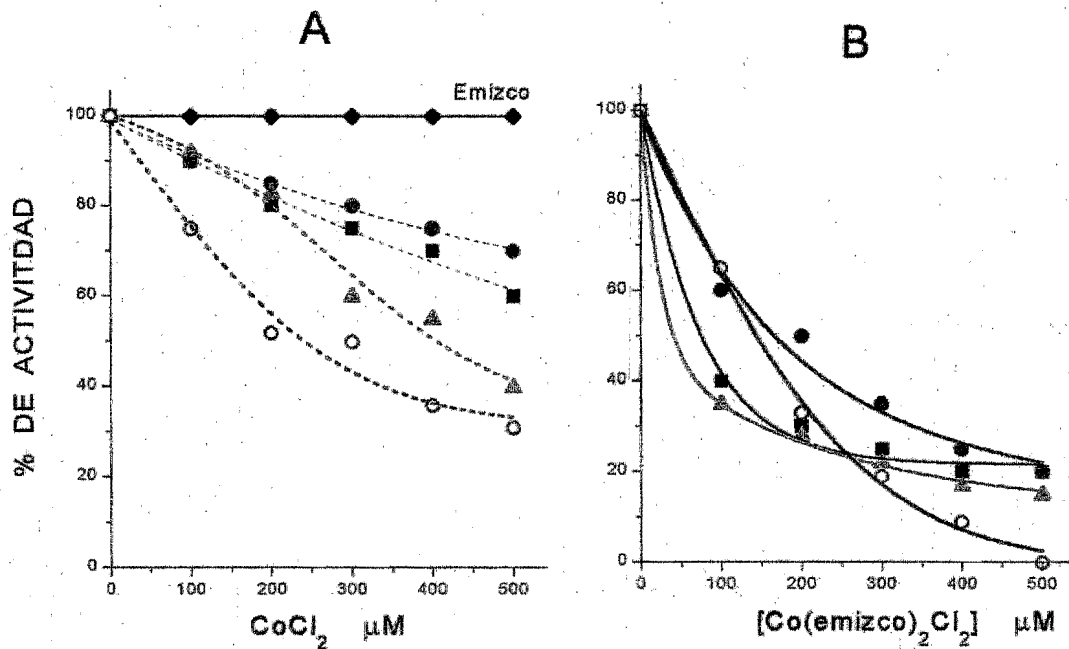


Figura 8. (A) Efecto de la sal de CoCl_2 y (B) efecto del compuesto coordinado, en el transporte de electrones fotosintético de H_2O a MV: basal (■), fosforilante (●), desacoplado (▲) y síntesis de ATP (○). El ligante emizco no presenta efecto en estas actividades y se incluye en la figura 8A (◆).

El flujo de electrones basal, fosforilante y desacoplado así como la síntesis de ATP se inhibieron a concentraciones crecientes de la sal de CoCl_2 , como se muestra en la gráfica de la figura 8(A). El efecto inhibitorio de la sal es menor que aquella presentada por el compuesto de coordinación $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ (figura 8B). En las condiciones experimentales ya mencionadas, el orden de inhibición de la síntesis de ATP es CoCl_2 69%, $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ 100% y el ligante emizco 0% a la concentración de $500 \mu\text{M}$ (Figura 8). El ligante emizco, no presenta efecto sobre la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ATP (Figura 8A).

$[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ y sus respectivas sales se comportan de manera similar al CoCl_2 y al $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, ya que, los compuestos de coordinación son mas potentes como inhibidores del transporte de electrones desacoplado comparados con las sales, como se puede observar con los valores de I_{25} (Tabla 1). Observandose que $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ son los más activos.

Los I_{25} (concentración μM a la cual se obtiene el 25 % de inhibición) de las sales y de los compuestos de coordinación se obtuvieron a partir de los valores del transporte de electrones desacoplado, y se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de I_{25} , calculados a partir de los valores del transporte de electrones desacoplado de agua a metilviológeno.

I_{25} (μM)			
CoCl ₂	236	[Co(emizco) ₂ Cl ₂]	14
CoBr ₂	233	[Co(emizco) ₂ Br ₂]	33
Co(NO ₃) ₂	197	[Co(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂] (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	12
NiCl ₃	252	[Ni(emizco) ₂ Cl ₂]	100
NiBr ₂	263	[Ni(emizco) ₂ Br ₂]	234
Ni(NO ₃) ₂	96	[Co(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂] (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	96
ZnBr ₂	463	[Zn(emizco) ₂ Br ₂]	88

Para localizar el sitio de inhibición de los compuestos de coordinación y sus sales, se procedió a medir el flujo de electrones desacoplado de los FOTOSISTEMAS II y I. El FS II se midió de agua a dicloro-*p*-benzoquinona (DCBQ) y el FS I de DCPIP reducido a MV y de TMQH₂ a MV. Los resultados muestran que el FS II se inhibió parcialmente por los compuestos de coordinación de Co (II), Ni(II) y Zn(II) y la sal de ZnBr₂.

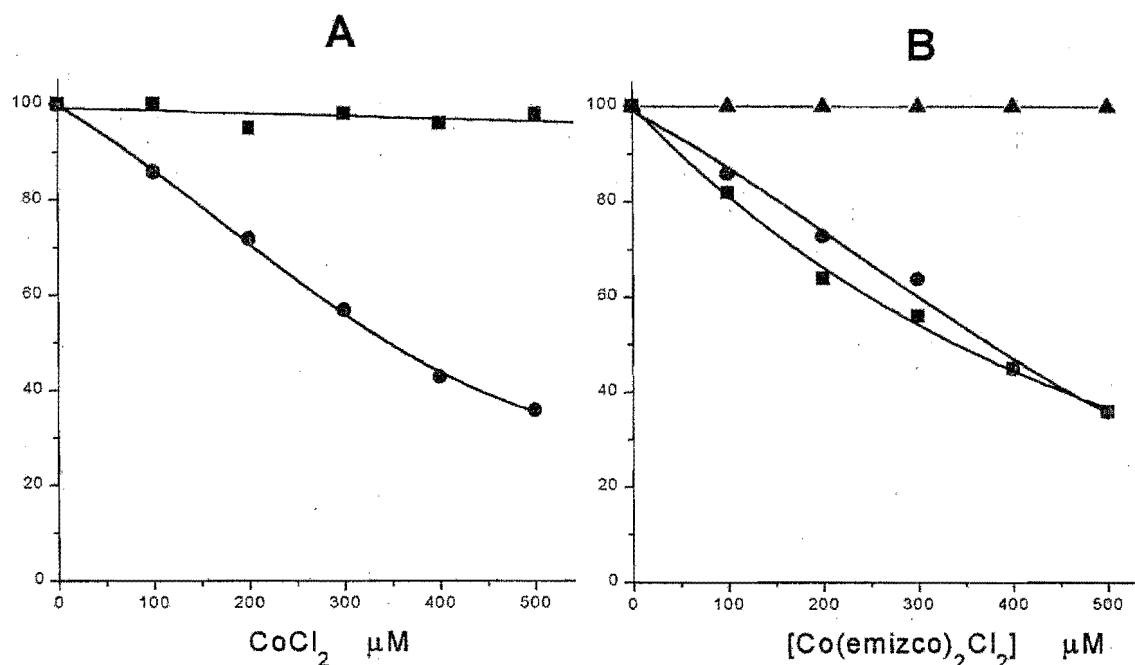


Figura 9. (A) Efecto de concentraciones crecientes de la sal de CoCl sobre el transporte de electrones desacoplado del FS II de H_2O a DCPIP y el transporte de electrones desacoplado del FS I de DCPIP reducido a MV (■), y sobre el transporte de electrones TMQH_2 a MV (●). Figura 9. (B) Efecto de concentraciones crecientes del compuesto $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ sobre el transporte de electrones desacoplado del FS II (■), el transporte de electrones del FS I de TMQH_2 a MV (●) y el transporte de electrones desacoplado del FS I de DCPIP reducido a MV (▲).

En la Figura 9A se muestra el efecto del CoCl_2 sobre los fotosistemas I y II. Se observa que $\text{Co}(\text{II})$ inhibe solamente el flujo de electrones de TMQH_2 a MV, pero no

afectan la actividad de DCPIP reducido a MV ni el flujo de electrones del FS II, indicando que el blanco de acción para las sales de cobalto se encuentra en el complejo b_6/f al no poder oxidar PQH_2 (Tabla 2).

En la figura 9B se muestra el efecto del $[Co(emizo)_2Cl_2]$ sobre el FS II. Los resultados muestran que los compuestos de coordinación de cobalto inhiben a nivel del FS II y al igual que las sales de cobalto, inhiben la oxidación de PQH_2 a nivel del b_6/f .

Los compuestos de coordinación de Ni(II) inhiben el transporte de electrones en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado, como se muestra en la Figura 10, el sitio de inhibición de los complejos se encuentra a nivel del FS II (Tabla 3), e inhiben la oxidación de PQH_2 a nivel del b_6/f , compartiendo este sitio de inhibición con las sales de níquel y cobalto (II) (Tabla 3 y Tabla 2).

Las sales de Níquel(II) inhiben la oxidación de PQH_2 a nivel del b_6/f (Tabla 3).

El $ZnBr_2$ presenta un ligero efecto inhibitorio en el FS I y en el FS II a $500 \mu M$ (Tabla 2). El $ZnBr_2$ inhibe los FS II y FSI en un 21 y 15 % respectivamente a las concentraciones ensayadas.

Para localizar el sitio exacto de inhibición de los compuestos de coordinación de cobalto (II), Ni(II) y Zn(II) en el FS II, se midió el transporte de electrones desacoplado de agua a SiMo en presencia de $10 \mu M$ de DCMU como inhibidor. Los resultados muestran que estos complejos no inhiben este segmento de la cadena redox, ya que la velocidad del transporte de electrones del control (sin compuesto), es igual a la velocidad del transporte de electrones en presencia de los compuestos de coordinación, aún a altas concentraciones

de electrones en presencia de los compuestos de coordinación, aún a altas concentraciones (500 μM) (Tabla 2). Así, se puede concluir que el sitio de acción de los complejos de cobalto (II), Ni(II) y Zn (II) esta localizado a nivel de la enzima $D_1\text{-}Q_B$. (Tabla 2 y Tabla 3).

Este sitio de inhibición se corroboró midiendo la fluorescencia de la clorofila *a* del FS II. La inhibición del transporte de electrones de FS II en el sitio Q_B por los compuestos de coordinación dio como resultado la acumulación de Q_A^- durante los primeros 2 ms de iluminación a 670 nm. Con los compuestos de coordinación, se observa la curva de inducción similar a la que se obtiene con DCMU (Figura 5) pero en menor proporción, es decir, con una inhibición del transporte de electrones menor. En la Figura 11, se observan las curvas de inducción de la fluorescencia, normalizadas, para cada una de las sales y de los compuestos de coordinación de cobalto y zinc.

El análisis de la curva de inducción de la fluorescencia de los cloroplastos expuestos a diferentes concentraciones de los complejos de Co(II)-emizco, Ni(II)-emizco y Zn(II)-emizco muestran una acumulación relativa al control de especies de Q_A^- (Figura. 11 y Figura 12) indicando que los acarreadores de electrones desde agua a Q_A no se afectaron y que la inhibición fue en Q_B . En cambio, las sales de CoCl_2 , CoBr_2 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y ZnBr_2 no afectan la capacidad de reoxidación de Q_A^- .

TABLA 2. Efecto de las sales y los compuestos de coordinación de Co(II) and Zn(II), en el transporte de electrones desacoplado, síntesis de ATP, FS II, FS I y las reacciones parciales a la concentración 500 μ M.

Compuesto	Transporte desacoplado		Síntesis de ATP		FS II		FSI		TMQH ₂ a MV		H ₂ O a SiMo	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Control	1346	100	1117	100	662	100	1750	100	1042	100	242	100
CoCl ₂	538	40	346	31	649	98	1750	100	375	36	242	100
[Co(emizco) ₂ Cl ₂]	202	15	0	0	238	36	1750	100	375	36	242	100
CoBr ₂	538	40	346	31	569	86	1750	100	375	36	242	100
[Co(emizco) ₂ Br ₂]	175	13	0	0	238	36	1750	100	375	36	242	100
Co(NO ₃) ₂	942	57	525	47	602	91	1750	100	521	50	242	100
[Co(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂] (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	269	20	0	0	311	47	1750	100	573	55	242	100
ZnBr ₂	767	70	1117	100	523	79	1488	85	1042	100	242	100
[Zn(emizco) ₂ Br ₂]	646	48	547	49	331	50	1750	100	375	36	242	100

a = μ equiv. e⁻ / hr x mg Chl

b = por ciento. Control = 100 % de actividad.

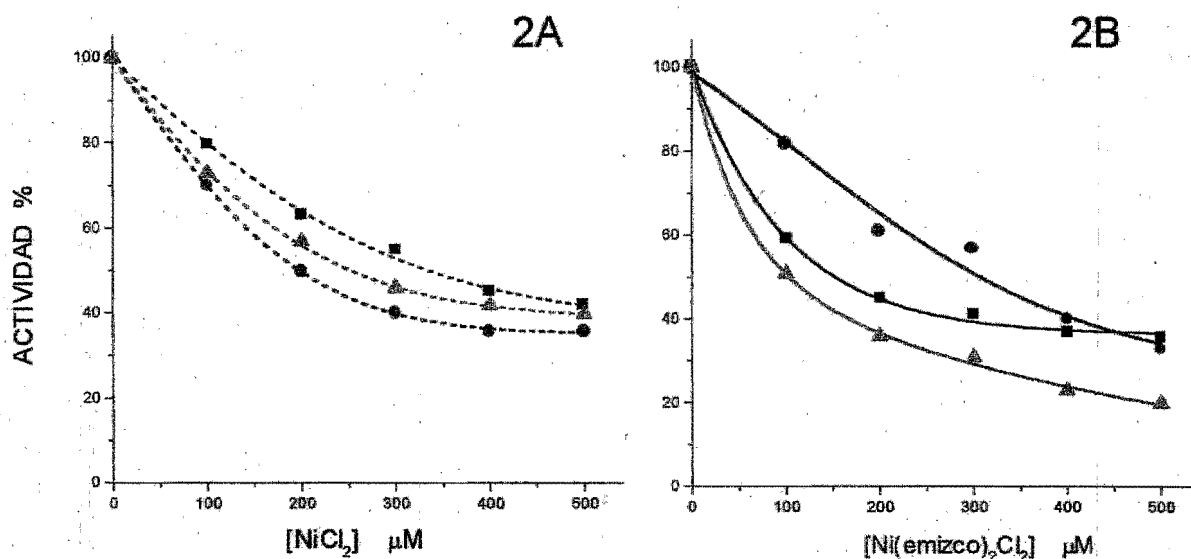


Figura 10. Transporte de electrones fotosintético de agua a MV: basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲) medido en presencia de: Panel A, NiCl₂ y Panel B, [Ni(emizco)₂Cl₂]. Los valores de los controles son 311, 640 y 1018 μequiv. de e⁻/mg de Chl x h.

Los resultados observados muestran que las sales de Co(II), Ni(II), Zn(II) y los complejos de Co(II)-emizco, Ni(II)-emizco y Zn(II)-emizco inhiben el flujo de electrones en sus tres condiciones, basal, fosforilante y desacoplado, además de inhibir la síntesis de ATP, lo que sugiere que, tanto las sales como los compuestos de coordinación se comportan como inhibidores de la reacción de Hill. El sitio de acción en la cadena redox para las sales

de cobalto es a nivel del complejo b_6/f . Los compuestos de coordinación presentan dos sitios diferentes de inhibición, uno localizado a nivel del FS II en el sitio Q_B y el otro a nivel del complejo b_6/f , evitando la oxidación de PQH_2 .

La sal de $ZnBr_2$ inhibe ligeramente el FS II y el FS I, pero a las concentraciones bajas con las que se trabajó no se pudo detectar el sitio de inhibición exacto.

Los aniones (Cl^- , Br^-) por sí solos, no son importantes para incrementar la potencia inhibidora en el transporte de electrones de la fotosíntesis de los compuestos de coordinación y de las sales. Sin embargo, el anión NO_3^- sí afecta esta potencia aumentándola. El ligante por sí mismo no presenta efecto en estas actividades. Sin embargo, al formar parte de la estructura de los complejos aumenta el efecto inhibitor del flujo de electrones en la fotosíntesis, siendo más potentes que las sales metálicas solas.

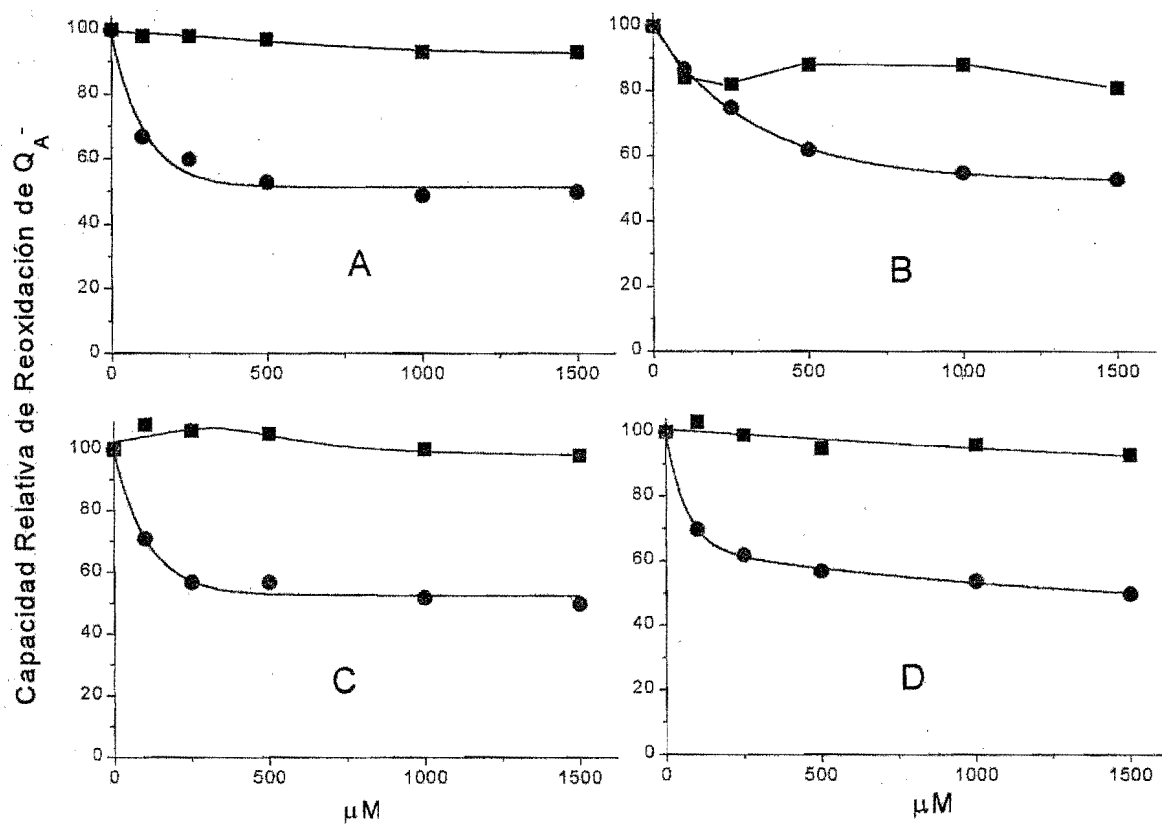


Figura 11. Fluorescencia variable relativa, $F(V)$, correspondiente a la transferencia de electrones de Q_A^- a Q_B en función del incremento de las concentraciones de: Panel A, $CoCl_2$ (■), $[Co(emizco)_2Cl_2]$ (●); panel B, $CoBr_2$ (■), $[Co(emizco)_2Br_2]$ (●); panel C, $Co(NO_3)_2$ (■), $[Co(emizco)_2(H_2O)_2](NO_3)_2 \cdot (H_2O)$ (●); panel D, $ZnBr_2$ (■), $[Zn(emizco)_2Br_2]$ (●).

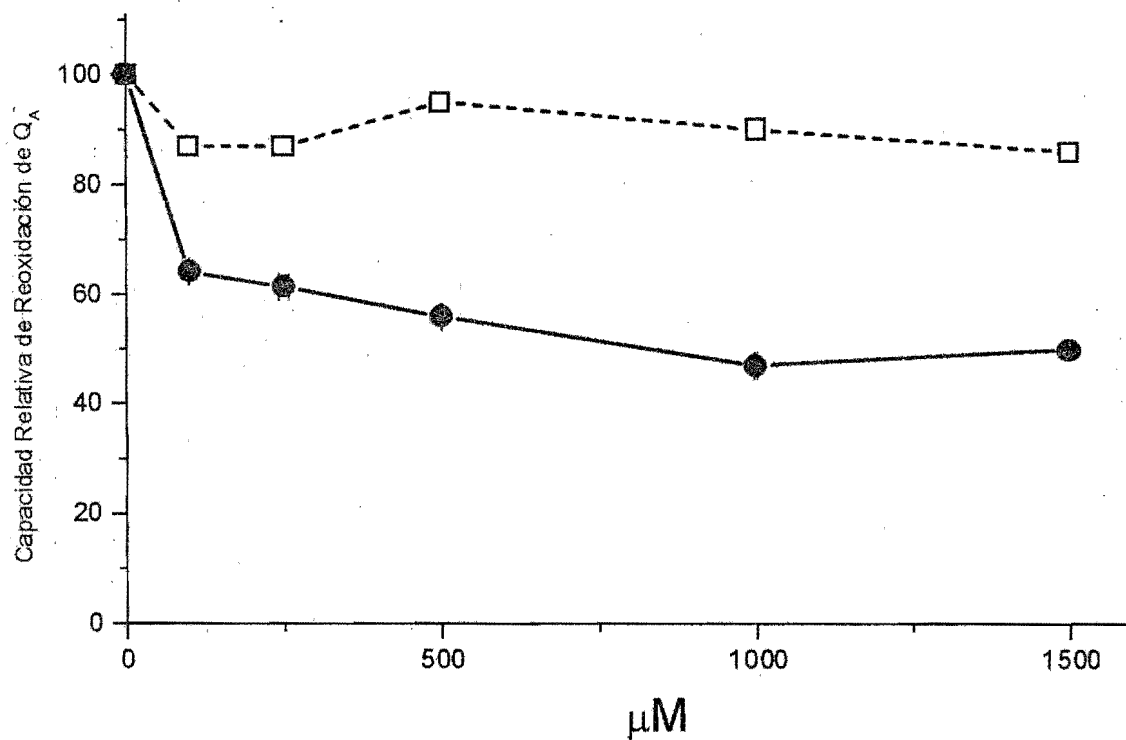


Figura 12. Fluorescencia variable relativa $F(V)$, correspondiente a la transferencia de electrones de Q_A^- a Q_B en función del incremento de las concentraciones de NiCl_2 (\square) y de $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ (\bullet).

TABLA 3. Efecto de las sales de níquel y de los compuestos de coordinación a 500 μM sobre la velocidad del transporte de electrones desacoplado, el FS II, el FS I y las reacciones parciales de los fotosistemas. A la izquierda de cada columna se dan los valores en $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg chl per h}$. A la derecha en porcentaje de inhibición.

	Desacoplado		FS II		FS I		TMQH ₂ a MV		H ₂ O a DCBQ		PMS → MV	
Control	1018	0%	467	0%	1800	0%	267	0%	356	0%	640	0%
NiCl ₂	407	60%	467	0%	1116	38%	134	50%	-		646	0%
[Ni(emizco) ₂ Cl ₂]	153	85%	234	50%	1800	0%	174	35%	178	50%	631	0%
NiBr ₂	407	60%	467	0%	1224	32%	134	50%	-		640	0%
[Ni(emizco) ₂ Br ₂]	163	84%	248	47%	1800	0%	166	38%	200	44%	633	0%
Ni(NO ₃) ₂	407	60%	467	0%	1350	25%	134	50%	-		640	0%
[Ni(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂]	204	80%	272	42%	1800	0%	187	30%	164	54%	633	0%
(NO ₃) ₂ ·H ₂ O												
Emizco	1025	0%	467	0%	1800	0%	266	0%	356	0%	633	0%

5.2 Efecto de los compuestos de coordinación de emizco con los metales de transición Ni (II), Co (II) y Zn (II), las sales y el ligante en la respiración de las semillas.

5.2.1 Efecto de los compuestos en las semillas de trigo (*Triticum vulgare*).

Los resultados del estudio de los compuestos en la respiración de semillas de trigo muestran que la sal de CoBr_2 activa la respiración, lo que sugiere que CoBr_2 desacopla la fosforilación oxidativa; estas observaciones son similares a las encontradas en levadura por Tuppy and Sieghart, 1973.

El compuesto $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ no presenta efecto en la respiración de estas semillas. El ligante emizco y la sal $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ inhiben ligeramente la respiración (20% y 30% a 400 μM en el quinto día respectivamente). Los compuestos de coordinación $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y las sales CoCl_2 , NiCl_2 , NiBr_2 y ZnBr_2 presentan mayor inhibición en la respiración, siendo la sal NiBr_2 la más activa (70% de inhibición a 400 μM en el quinto día) (Tabla 4). Estos resultados sugieren que el anión es importante en la actividad que muestran las sales de Co(II), ya que cuando el anión es Br^- desacopla, y con NO_3^- inhibe ligeramente la respiración. Cuando los iones metálicos están formando compuestos de coordinación se potencia la inhibición de la respiración (Tabla 4).

5.2.2 Efecto de los compuestos en la respiración de las semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*).

Emizco, ZnBr_2 , NiBr_2 , $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ presentan una ligera inhibición en la respiración de las semillas de *P. ixocarpa* (12%, 12%, 12%, 25% y 25% respectivamente a 400 μM en el quinto día de imbibición). Los compuestos más activos como inhibidores de la respiración son las sales CoBr_2 , CoCl_2 y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ con 87%, 75% y 75% de inhibición respectivamente a 400 μM . Nótese que en *Physalis ixocarpa*, las sales son las más activas para inhibir la respiración (tabla 4).

5.2.3 Efecto de los compuestos en la respiración de las semillas de *Lolium multiflorum*

$[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ y $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, son inactivos; en cambio, $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ y $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ inducen un incremento en la respiración de las semillas; $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ y $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ inhiben parcialmente la respiración (14% a 400 μM en el quinto día para ambos compuestos). Entre los compuestos ensayados, la sal de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ es la que presenta mayor efecto inhibitor, 80% a 400 μM en el quinto día (Tabla 4).

5.2.4 Efecto de los compuestos en la respiración de las semillas de trébol (*Trifolium alexandrinum*).

[Ni(emizco)₂Br₂] no afecta la respiración de las semillas de trébol. Los compuestos [Co(emizco)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O y CoCl₂ ligeramente inhiben la respiración, 17% y 25% de inhibición a 400 μM respectivamente. [Zn(emizco)₂Br₂] es el compuesto más activo como inhibidor de la respiración (67% de inhibición a 400 μM) (Tabla 4). Es interesante hacer notar que el compuesto de coordinación [Co(emizco)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O inhibe mas la respiración de las semillas de *Triticum vulgare* pero no afecta la respiración de las demás semillas estudiadas, indicando una selectividad en el efecto sobre *Triticum vulgare*. Sin embargo, Co(NO₃)₂ no es un inhibidor potente de la respiración de semillas de *Triticum vulgare* pero tiene un buen efecto inhibidor sobre la respiración de las otras tres semillas, lo que es de hacerse notar, pues no afecta al trigo que es una semilla agrícola y sí afecta a las otras semillas ensayadas (Tabla 4).

TABLE 4. Efecto de las sales y los compuestos de coordinacion a la concentración de 400µM, en la respiración de semillas, en los días 1, 3 y 5 en que se tomaron las lecturas. Control = 100%. Los valores en nanoátomos /hr x semillas se encuentran en los rangos de 1000 a 1600 nanoátomos, dependiendo del número de semillas y del tipo de semilla utilizada en cada caso.

Compuesto	<i>Triticum vulgare</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Trifolium alexandrinum</i>		
	dias			dias			dias			dias		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CoCl ₂	70	65	39	100	100	30	17	10	25	150	83	75
[Co(emizco) ₂ Cl ₂]	64	75	50	100	100	100	107	50	64	80	100	50
CoBr ₂	80	81	126	120	100	30	50	30	13	100	100	42
[Co(emizco) ₂ Br ₂]	80	90	55	75	140	133	100	100	55	80	100	58
Co(NO ₃) ₂	80	80	75	200	75	20	33	20	25	80	100	50
[Co(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂](NO ₃) ₂ ·H ₂ O	79	75	41	88	80	117	89	79	75	80	80	83
Emizco	33	40	80	100	100	60	83	54	88	89	40	54
ZnBr ₂	22	66	60	75	75	40	67	85	88	89	70	62
[Zn(emizco) ₂ Br ₂]	90	100	96	50	50	86	100	67	59	100	67	33
NiCl ₂	89	65	50	50	50	50	60	40	45	100	80	67
[Ni(emizco) ₂ Cl ₂]	50	40	34	100	120	121	71	63	55	100	108	67
NiBr	67	50	30	75	38	50	60	85	88	89	65	46
[Ni(emizco) ₂ Br ₂]	75	40	39	75	57	86	71	69	55	120	100	92
Ni(NO ₃) ₂	67	50	40	60	38	40	50	54	75	84	60	65
[Ni(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂](NO ₃) ₂ ·H ₂ O	27	38	44	63	71	64	86	85	64	90	117	50

5.3 Efecto de los compuestos (compuestos de coordinación, sales y ligante) en la germinación y desarrollo de la raíz y el tallo.

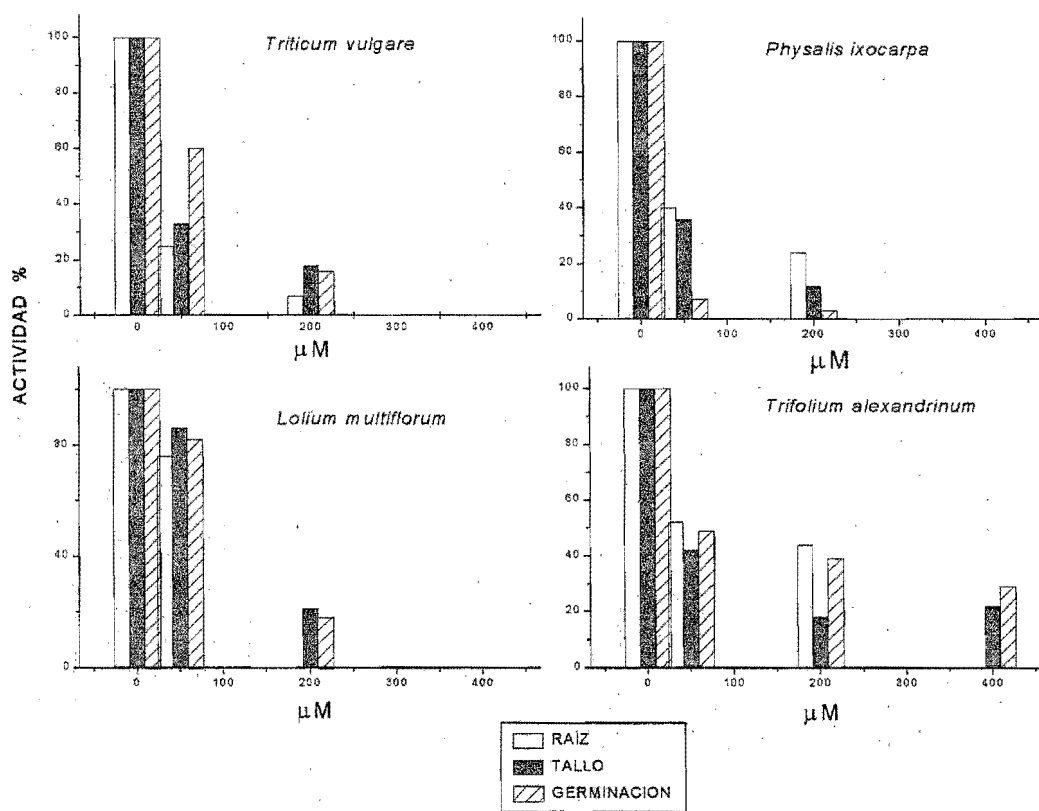


Figura 13. Efecto del ligante emizco en la germinación, desarrollo de la raíz y del tallo de las semillas, las concentraciones empleadas fueron 50, 200 y 400 μM

En la figura 13, se muestra el efecto del ligante emizco en la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas. Emizco fue el compuesto que presenta mayor inhibición, inhibe drásticamente la germinación y la elongación de la raíz y del tallo de las semillas de *Lolium multiflorum*, de *Triticum vulgare* y de *Physalis ixocarpa* a 400 μM . Hay que notar, que este compuesto inhibe completamente la germinación de semillas de *Lolium multiflorum* y además inhibe la germinación, la elongación de la raíz y del tallo de semillas de *Trifolium alexandrinum*, pero en menor grado que las semillas de *L. multiflorum*, ya que solo la elongación de la raíz se inhibió al 100 % a la concentración de 400 μM . Sin embargo, inhibió parcialmente la germinación y el desarrollo del tallo, aún a 400 μM . Hay que notar que el emizco afecta poco la respiración de las semillas, lo que sugiere un blanco de inhibición en la germinación y en el desarrollo del tallo, que probablemente no se deba a la inhibición de la fosforilación oxidativa, sino en otro sitio.

[Co(emizco)₂Cl₂] es el compuesto que, después del emizco, presenta mayor efecto inhibitorio en la germinación y en el desarrollo de la raíz y del tallo en las cuatro semillas ensayadas, siendo las semillas de *Physalis ixocarpa* las más afectadas a concentraciones de 400 μM (Figura 14). Comparado con emizco y [Zn(emizco)₂Br₂], [Co(emizco)₂Cl₂] es el compuesto de coordinación que inhibe parcialmente la germinación (47%), la elongación de la raíz (92%) y del tallo (51%) de las semillas de *Lolium multiflorum* a 400 μM , (Figura 14). [Co(emizco)₂Cl₂] inhibe también la germinación y la elongación de la raíz y del tallo de Trigo y de trébol, pero en menor grado que la inhibición que presento en *Physalis ixocarpa* (Figura 14).

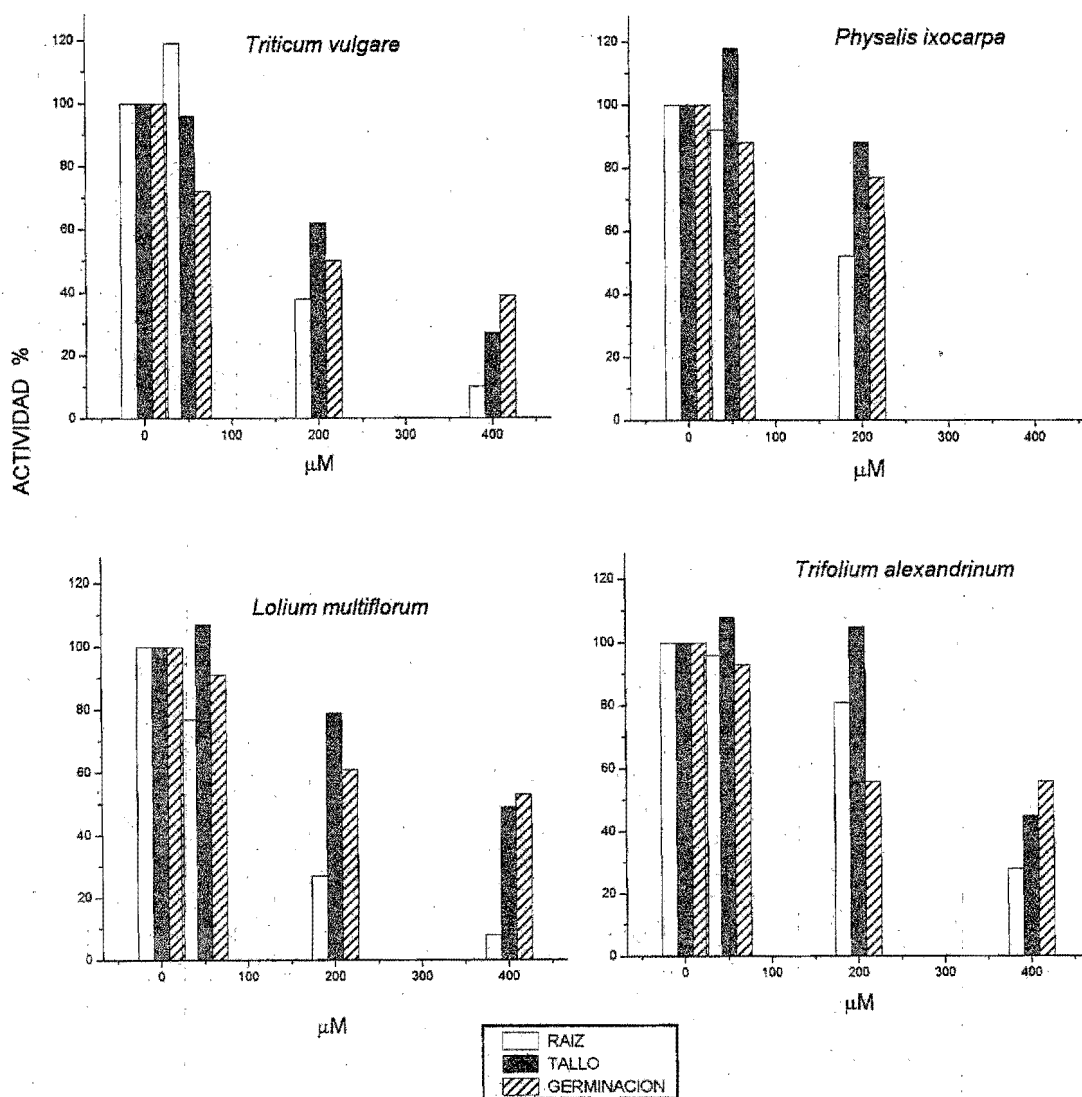


Figura 14. Efecto del $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ en la germinación, desarrollo de raíz y de tallo de las semillas. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 200 y 400 μM .

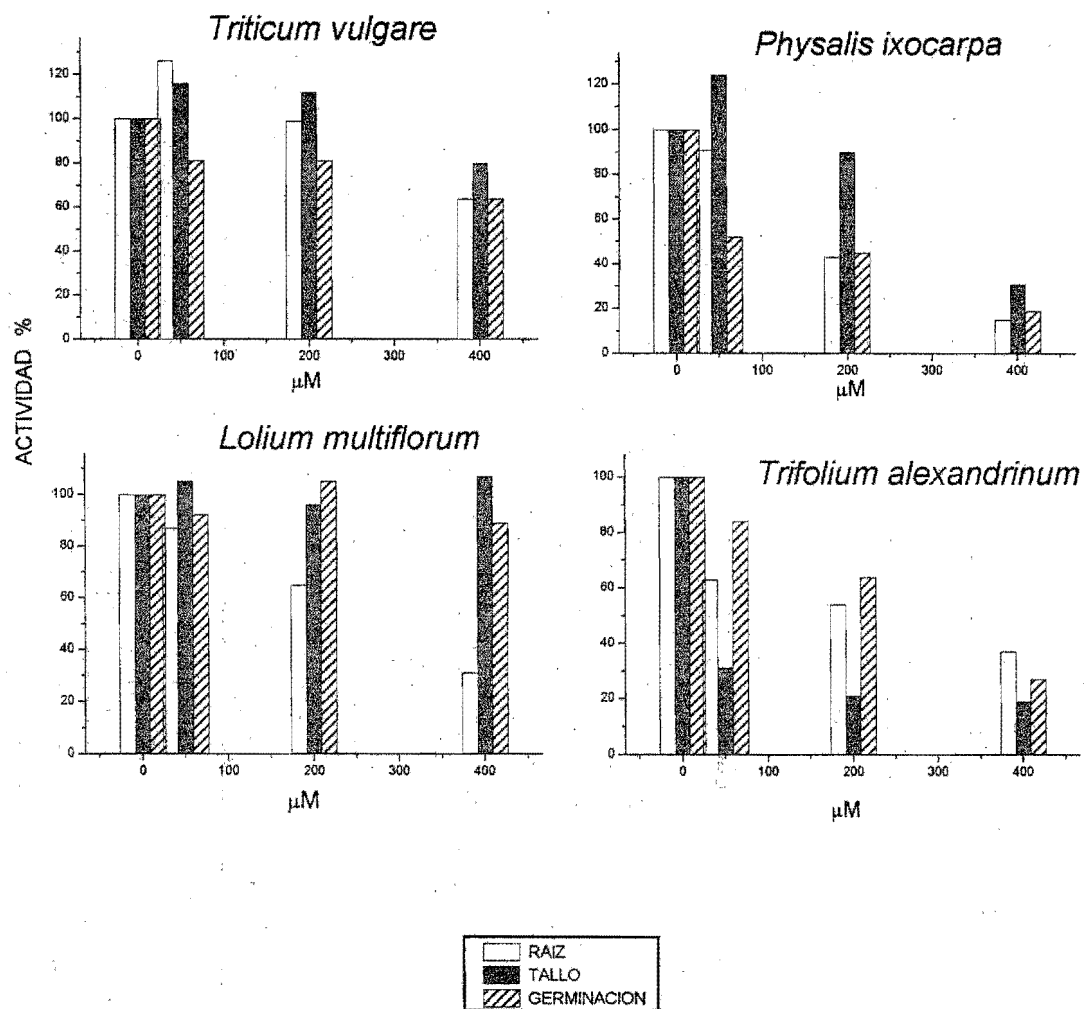


Figura 15. Efecto del $[Co(emizco)_2Br_2]$ en la germinación, desarrollo de la raíz y del tallo de las semillas. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 200 y 400 μM .

A 400 μM , el $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ inhibe parcialmente la germinación y el desarrollo de la raíz y del tallo de las semillas de *Triticum vulgare* y de *Lolium multiflorum* (Figura 15), y presenta una marcada inhibición en las mismas actividades de las semillas de *P. ixocarpa* y de *T. alexandrinum*. Estos resultados indican que este compuesto presenta cierta selectividad al tener mayor efecto en las semillas dicotiledoneas (*P. ixocarpa* y *T. Alexandrinum*) que en las monocotiledoneas (Figura 15).

El $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es el compuesto con menor efecto inhibitor en la germinación de semillas de *Trifolium alexandrinum*. En cambio, este compuesto inhibe la germinación de las semillas de *Triticum vulgare* y de *Physalis ixocarpa*, pero no afecta la germinación y el desarrollo del tallo en semillas de *Lolium multiflorum* (Figura 16). $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ son inhibidores menos potentes de la germinación y del desarrollo de la raíz y del tallo.

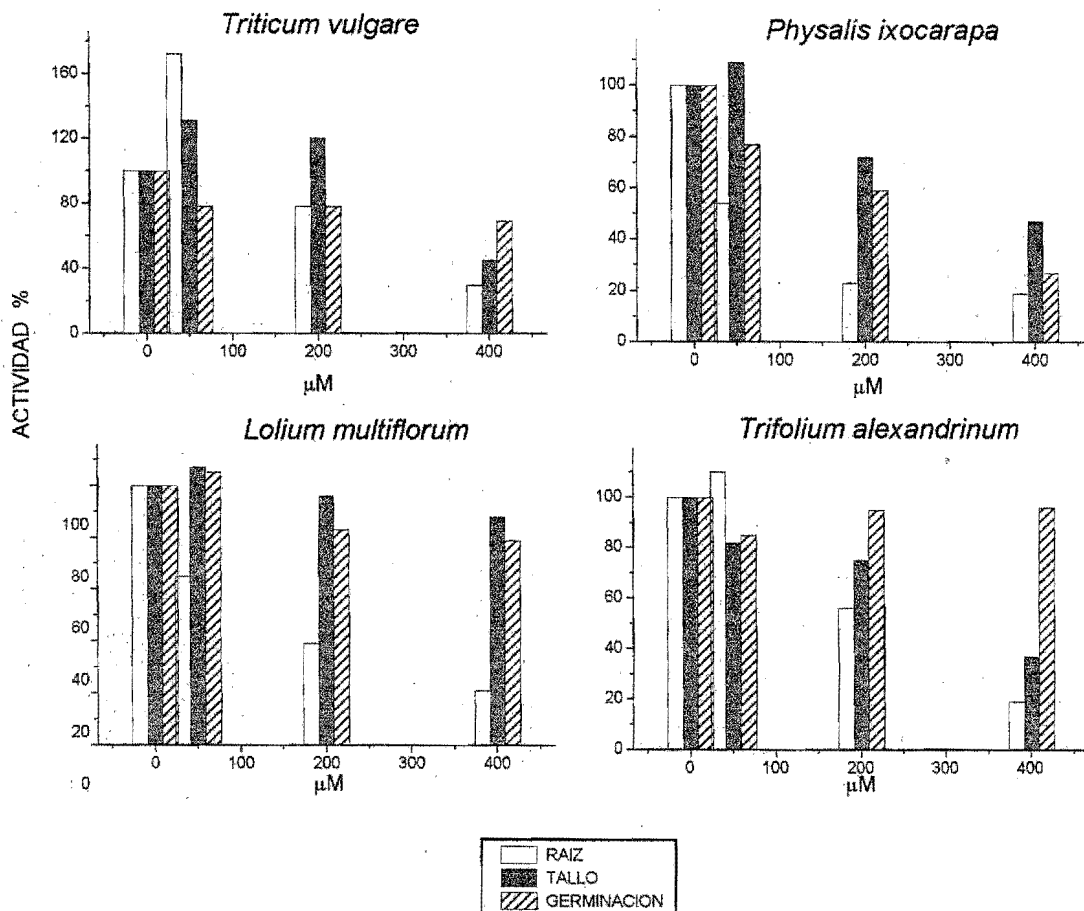


Figura 16. Efecto del $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{HO}$ en la germinación, desarrollo de raíz y de tallo de las semillas. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 200 y 400 μM

El crecimiento de la raíz y la elongación del tallo de las semillas de *Lolium multiflorum* se inhiben completamente en la presencia de 400 μM de $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$.

Las semillas restantes solo son afectadas parcialmente (Figura 17). Estos resultados indican que el compuesto presenta selectividad para inhibir *Lolium multiflorum*.

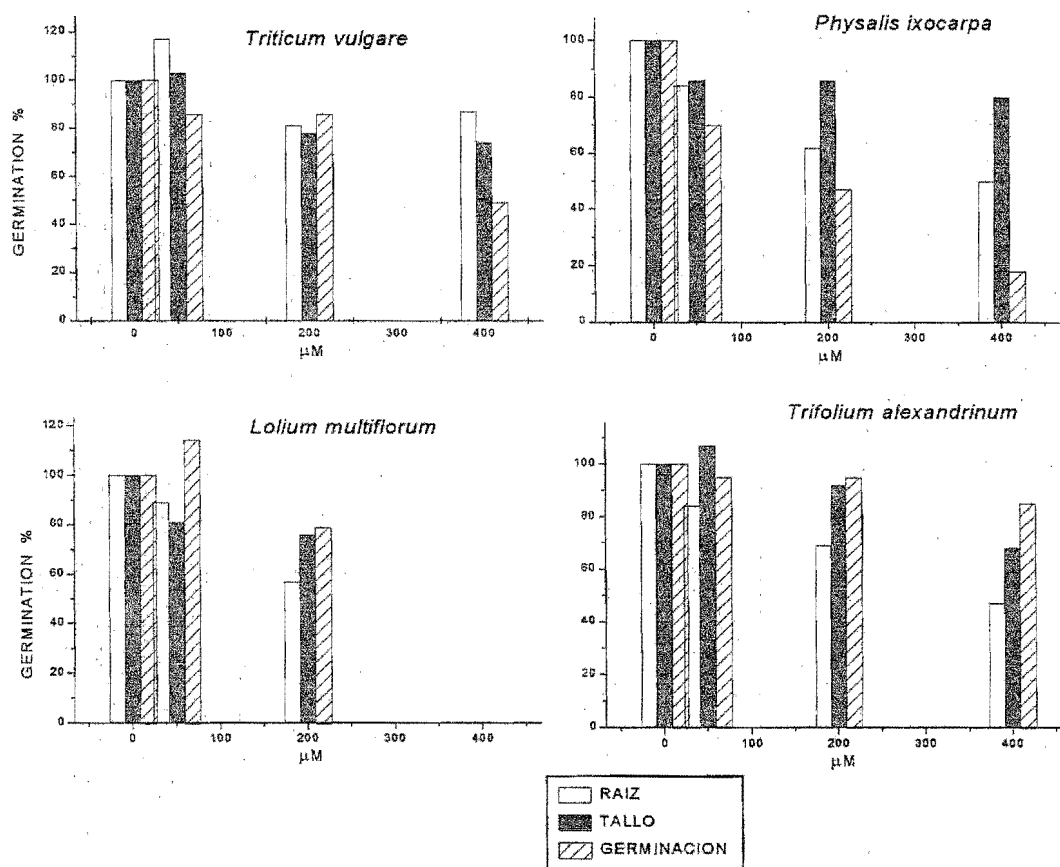


Figura 17. Efecto del $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ en la germinación, desarrollo de raíz y de tallo de las semillas. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 200 y 400 μM

La germinación de las semillas de *Triticum vulgare* y de *Physalis ixocarpa* es la

actividad mas inhibida por $[\text{Zn}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ (50% y 83% respectivamente a 400 μM), sin embargo, el crecimiento de la raíz y la elongación del tallo no se afectaron. Las semillas de *Trifolium alexandrinum* fueron las menos inhibidas en la germinación, desarrollo de la raíz y del tallo por el compuesto (Figura 17).

Los compuestos de coordinación de emizco con cobalto y zinc inhiben la germinación, el crecimiento de la raíz y la elongación del tallo de las semillas dicotiledóneas o el tallo de semillas monocotiledóneas, en mayor grado que las sales. Por ejemplo, la sal de CoCl_2 en algunos casos, en lugar de disminuir las actividades medidas las incrementa, (Figura 18). Por último, la potencia de inhibición de los compuestos de mayor a menor grado es la siguiente:

$\text{emizco} > [\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2] > [\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} > [\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2] > \text{sales de Co(II)}$.

El emizco y el $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ tienen mayor efecto en la germinación de las semillas pero no presentan selectividad (ver Tabla 5).

Después del ligante emizco y el $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, los otros dos complejos de coordinación de cobalto $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Co}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y el complejo de zinc mostraron mayor inhibición sobre la germinación, el desarrollo radicular y del tallo que sus sales (Tabla 5).

TABLA 5. Valores de IC₅₀ en µM, para cada uno de los compuestos en las diferentes semillas ensayadas. Crecimiento de la raíz (*r*), elongación del tallo (*s*) y la germinación de las semillas (*g*). *a* significa incremento. *ne* significa que no hubo efecto.

Compuesto	<i>Triticum vulgare</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Trifolium alexandrinum</i>		
	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>g</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>g</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>g</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>g</i>
CoCl ₂	339	396	400	465	ne	ne	>400	ne	ne	>>400	>400	ne
[Co(emizco) ₂ Cl ₂]	178	269	200	130	>400	394	208	270	287	314	>400	384
CoBr ₂	432	>400	>400	>400	<i>a</i>	<i>a</i>	322	384	>400	>400	<i>a</i>	>400
[Co(emizco) ₂ Br ₂]	>400	ne	ne	288	ne	ne	178	334	87	246	37	278
Co(NO ₃) ₂	517	593	ne	ne	<i>a</i>	ne	400	ne	<i>a</i>	355	295	>400
[Co(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂] (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	355	315	>400	135	ne	ne	68	254	369	232	331	ne
Emizco	33	36	85	102	122	133	41	41	27	78	55	46
ZnBr ₂	386	444	ne	ne	<i>a</i>	ne	<i>a</i>	<i>a</i>	ne	ne	<i>a</i>	ne
[Zn(emizco) ₂ Br ₂]	<i>a</i>	ne	400	223	267	276	400	ne	80	374	ne	ne
NiCl ₂	<i>a</i>	ne	ne	319	ne	ne	157	170	>400	363	ne	ne
[Ni(emizco) ₂ Cl ₂]	<i>a</i>	ne	<i>a</i>	252	ne	ne	370	167	281	400	<i>a</i>	ne
NiBr ₂	<i>a</i>	ne	ne	310	ne	ne	157	170	>400	400	ne	<i>a</i>
[Ni(emizco) ₂ Br ₂]	<i>a</i>	ne	<i>a</i>	327	<i>a</i>	ne	128	140	338	399	<i>a</i>	ne
Ni(NO ₃) ₂	<i>a</i>	<i>a</i>	>400	298	ne	ne	234	284	339	374	<i>a</i>	ne
[Ni(emizco) ₂ (H ₂ O) ₂] (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	<i>a</i>	<i>a</i>	336	307	<i>a</i>	ne	254	156	>400	375	ne	ne

Los compuestos de coordinación de níquel (II) con emizco mostraron menor potencia de inhibición sobre la germinación y el desarrollo de la plántula que sus sales como se observa en la tabla 5. Los I_{50} (concentración en μM del compuesto en la cual obtenemos el 50% de inhibición de la actividad medida) para estos compuestos, en algunos casos no se pudo determinar debido a que el efecto inhibitor que presentaron es muy bajo.

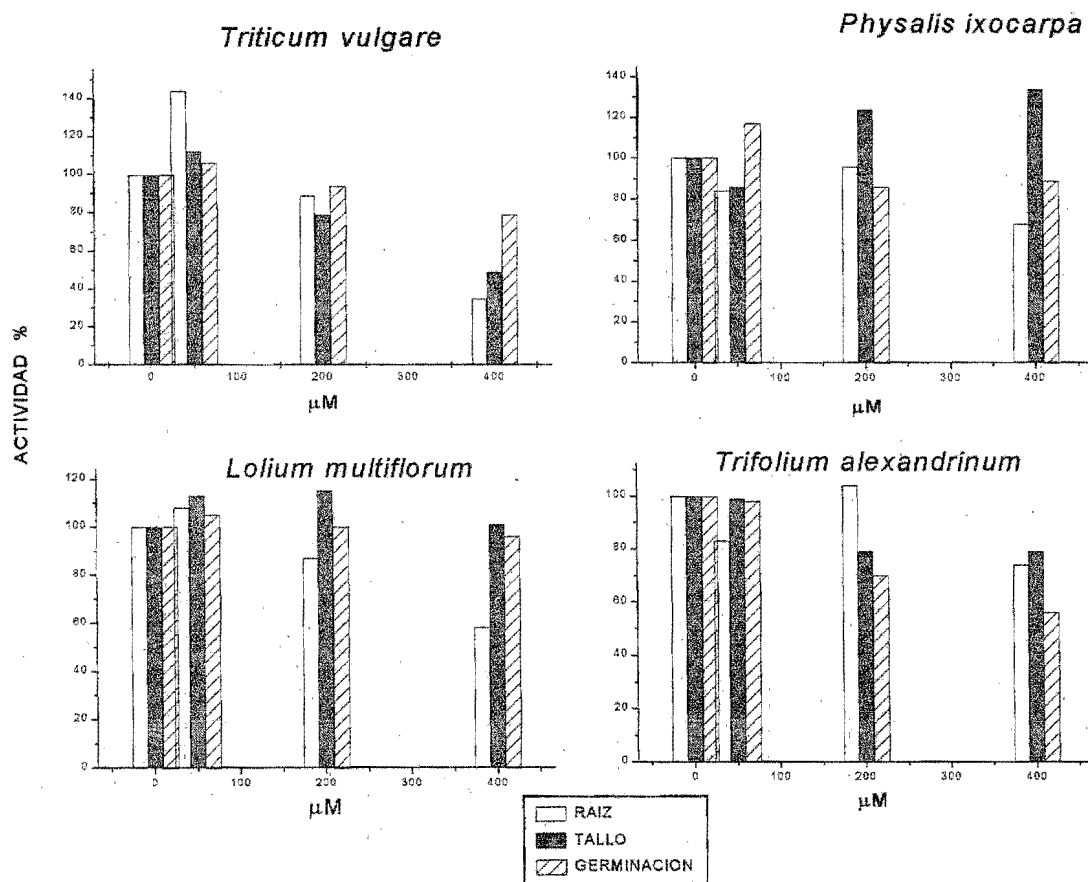


Figura 18. Efecto de la sal de CoCl_2 en la germinación, el desarrollo de la raíz y del tallo de las semillas. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 200 y 400 μM

Los resultados de la presente investigación se publicaron parcialmente en una revista internacional.

*Interference by Nickel (II) Salts and Their 5-Methylimidazole-4-carboxylate
Coordination Compounds on the Chloroplasts Redox Chain.*

Interference by Nickel(II) Salts and Their 5-Methylimidazole-4-carboxylate Coordination Compounds on the Chloroplast Redox Chain

Beatriz King-Díaz^a, Nórach Barba-Behrens^b, Josefina Montes-Ayala^b,
Silvia E. Castillo-Blum^b, Concepción Escartín-Guzmán^b, Roberto Iglesias-Prieto^c
and Blas Lotina-Hennsen^a

^a Depto de Bioquímica, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Coyoacán. México D. F. 04510, México

^b Depto de Química Inorgánica, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Coyoacán. México D. F. 04510, México

^c Estación de Investigaciones Marinas "Puerto Morelos", ICMYL-UNAM. Apartado Postal 1152, Cancún 77500 Quintana Roo, México

Z. Naturforsch. **53c**, 987–994 (1998); received April 21/June 22, 1998

Coordination Compounds, Photosynthesis, Ni(II), Emizco, Hill Reaction Inhibitors

Nickel(II) salts and their coordination compounds with ethyl 5-methylimidazole-4-carboxylate (emizco), [Ni(emizco)₂Cl₂], [Ni(emizco)₂Br₂], [Ni(emizco)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O, Ni(NO₃)₂, inhibit photosynthetic electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) and ATP-synthesis, therefore behave as Hill reaction inhibitors. Coordination compounds are more potent inhibitors than the salts. It was found that the target for NiCl₂, NiBr₂ and Ni(NO₃)₂ is at the b₆f level. On the other hand, the complexes [Ni(emizco)₂Cl₂], [Ni(emizco)₂Br₂] and [Ni(emizco)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O binding sites are located at Q_B(D1)-protein and b₆f level. Therefore, they have a common inhibition site located at b₆f avoiding the PQH₂ oxidation. The Q_B inhibition site was corroborated by variable chlorophyll *a* fluorescence yield [V(j)]. The emizco ligand has no activity on photosynthetic electron flow.

Introduction

Continuing our earlier work related with the study of the effect of transition metals ions coordination compounds on different photosynthetic activities (Barba-Behrens *et al.*, 1993; Fernández-Vargas *et al.*, 1995), we report the behaviour of

nickel coordination compounds with the ligand ethyl 4-methyl-imidazolecarboxylate (emizco) on photosynthesis. Their effect was compared with that of the ligand and nickel(II) salts. Recently, we found that quinic acid uncouples photophosphorylation from photosynthetic electron flow, while Co(II) coordination compounds enhance this activity (Barba-Behrens *et al.*, 1991). Emizco was chosen as a simple imidazolic derivative that may act as a chelate towards metal ions, similarly to 2-methyl-5-nitroimidazole (Barba-Behrens *et al.*, 1991). It is known that imidazole derivatives have biocidal properties, they are extensively used in the pharmaceutical (Bennett, 1990) and agrochemical industries (Garaboyes, 1982; Parsons *et al.*, 1990). Emizco derivatives present antiviral (Alonso *et al.*, 1985) and herbicidal (Beck *et al.*, 1979) activities. Nickel(II) is an essential micronutrient for legumes and suggested possible essentiality for all higher plants (Farago *et al.*, 1988). There is evidence that nickel is required in microbial urea-utilising plants (Farago *et al.*, 1988). It is reported to be mutagenic and carcinogenic causing chromosome aberrations and micronucleus formation (Leonard *et al.*, 1981) and it is toxic at 0.1–

Abbreviations: Chl, chlorophyll; PSII, Photosystem II, PS I, Photosystem I, Q_A, primary quinone electron acceptor of PSII; Q_A⁻, reduced Q_A; Q_B, secondary quinone electron acceptor of PSII; V(j), relative quantum yield of the transient phase J; F_m, maximum yield of Chl-*a* fluorescence when the PSII reaction centres are closed; F₀, minimum yield of Chl-*a* fluorescence when the PSII reaction centres are open; F(v), F_m-F₀; PQ, plastoquinone; emizco, ethyl 5-methylimidazole-4-carboxylate; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; DCBQ, dichloro-*p*-benzoquinone; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; PMS, phenazine methosulfate; TMOH₂, tetramethyl-*p*-benzohydroquinone; HEPES, (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); tricine, [N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine]; MV, methylviologen; SiMo, silicomolybdic acid hydrate.

Reprint requests to Dr. B. Lotina-Hennsen.

Fax: (525)622 5329.

E-mail: blas@servidor.unam.mx

1 M concentrations, which inhibited seed germination of *Helianthus annuus* (Chakravarty *et al.*, 1992). Photosynthesis and respiration of lichens have been shown to be affected by metals; it was found that nickel(II) is the less toxic one (Farago *et al.*, 1988). In this work we studied the effect of nickel(II) salts, emizco and their coordination compounds at lower concentrations (0–500 μM). Nickel(II) salts and emizco were used as control experiment in order to see if the ligand modified the potency of the salt. As far as we know the effects of these compounds on photosynthesis in chloroplasts in higher plants have not been investigated.

Materials and Methods

Freshly lysed chloroplasts isolation and chlorophyll determination

Intact chloroplasts were isolated from spinach leaves obtained from local markets as described earlier (Calera *et al.*, 1995; Mill *et al.*, 1980; Saha *et al.*, 1971). Chloroplasts were suspended in the following medium: 400 mM sucrose, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 and 30 mM tricine buffer (pH 8 with the addition of KOH). They were stored as a concentrated suspension in the dark for 1 hour at 0 °C. Intact chloroplasts were efficiently lysed to yield free thylakoids previous to each experiment by incubating them in the following medium: 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 and 30 mM tricine buffer (pH 8 with the addition of KOH) for electron transport measurements. For ATP synthesis determination the same medium was used but tricine buffer concentration was 1 mM (Dilley, 1972). Chlorophyll was determined according to the method of Arnon (1949).

Measurement of electron transport and ATP synthesis

ATP-synthesis was determined titrimetrically using a microelectrode Orion Mod. 8103 Ross connected to a Corning potentiometer Model 12, with expanded scale as reported by Dilley (Dilley, 1972). The pH changes were registered using a Gilson recorder. The ATP-synthesis reaction medium used contained 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM KCN, 50 μM MV, 1 mM

HEPES-KOH (pH 8.0) where the intact chloroplasts were freshly lysed.

Photosynthetic non-cyclic electron transport in the presence of methylviologen was monitored with YSI (Yellow Springs Instrument C) model 5300 oxygen monitor using a Clark electrode in a temperature regulated flask at 20 °C. The reaction medium contained 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 50 μM MV, 0.5 mM KCN, 15 mM HEPES-KOH, (pH 8.0), chloroplasts were added to give a Chl concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The sample was illuminated for 1 minute in presence or absence of 6 mM NH_4Cl (Calera *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1971).

PSII was measured by photoreduction of DCPIP supported O_2 evolution monitored polarographically. The reaction medium for assaying PSII activity contained the same whole-chain electron transport medium ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$) above mentioned without methylviologen, but in the presence of 1 μM DBMIB, 100 μM DCPIP, 300 μM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 6 mM NH_4Cl . Uncoupled electron transport from water to DCBQ (Yruela *et al.*, 1991) was measured with a reaction mixture as in photosystem II, with addition of 100 μM DCBQ, 1 μM DBMIB and 6 mM NH_4Cl without DCPIP and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Photosystem I electron transport was determined in a similar form to non-cyclic electron transport. The following reagents were added: 100 μM DCPIP, 300 μM ascorbate, 10 μM DCMU and 6 mM NH_4Cl (Allen *et al.*, 1974).

PS I electron transport from PMS/ASC to MV was measured using KCN-poisoned chloroplasts with 500 μM PMSred/1000 μM ascorbate as the electron donor to P700, MV as PS I electron acceptor, as well as 10 μM DCMU, 6 mM NH_4Cl and 1 μM DBMIB to fully inhibit any electron flow prior to PC. Cyanide-treated chloroplasts were prepared by incubating chloroplasts for 30 min at 0 °C in a 30 mM KCN and then centrifuged at 8000 $\times g$ (Sorvall Super T21) for 1 min and resuspended in the reaction medium (Ouirakul *et al.*, 1973). Moreover, EPR spectroscopy confirmed the ability of reduced PMS to interact directly with P₇₀₀ (Izawa *et al.*, 1973).

Chl a fluorescence measurements

Freshly lysed chloroplasts aliquots containing 15 μg of Chl were suspended in electron transport

medium and transferred by gravity onto filter paper with a dot-blot apparatus (Bio-Rad USA) to ensure an homogeneous and reproducible distribution of thylakoids in the filter paper. Thylakoids blots were transferred immediately to vials containing 3 ml of different solutions of the tested compounds and incubated for 5 min in the dark. Chl *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature with a Plant Efficiency Analyser (PEA)(Hansatech UK), as described (Strasser *et al.*, 1995).

Kinetic analyses of the relative variable fluorescence $[V(t)-(F_t-F_0)/F_m-F_0]$ were performed by deconvolution of normalised induction curves, employing a non-linear fitting procedure.

Preparation of Ni-emizco compounds

$[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ and $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ were prepared as described below.

The nickel(II) coordination compounds were prepared using methanol as solvent and 1:2 ligand:Ni molar ratio was employed (mmol scale). The metal salts, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiBr}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Baker) were dissolved in 15 cm³ of hot methanol and added to a solution of emizco (Aldrich) in 15 cm³ of hot methanol. The reaction mixture was refluxed for ca 5 h and then allowed

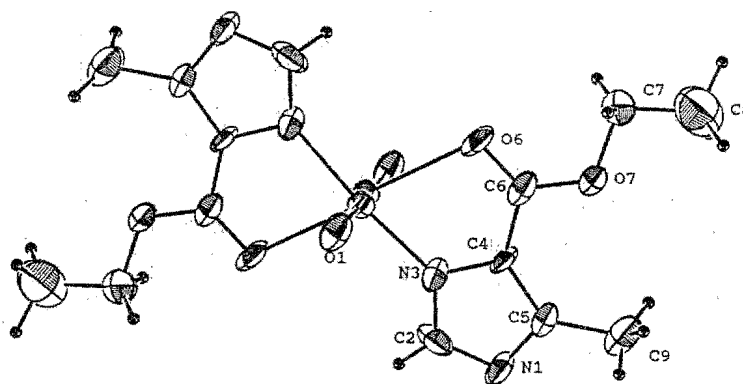
to stand at room temperature for 3 weeks. The resulting precipitates were filtered, washed and dried. Nickel(II) coordination compounds were characterised by elemental analyses, magnetic susceptibility, IR and UV-Vis spectroscopy.

Results and Discussion

Geometry and stability of nickel(II) coordination compounds with emizco

These coordination compounds have octahedral geometry in solid state and in aqueous solution as shown in Fig. 1. The emizco ligand is coordinated to nickel(II) through the imidazolic nitrogen and the oxygen from the ester group, behaving as a chelating ligand; therefore yielding a very stable compound. Consequently, the ligand is not substituted from the complexes; however the initially coordinated chloride and bromide anions were exchanged by water molecules as can be inferred from the UV-visible absorption spectra in solution and in solid state (diffuse reflectance). In the compound $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ the nitrate groups were not coordinated from the beginning.

It was shown that the buffer did not substitute any ligand from the nickel(II) coordination sphere. Experiments using different buffering sub-



$[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$

Fig. 1. Structure of octahedral nickel(II) coordination compounds.

stances: HEPES, tricine and Tris at various concentrations were carried out. The concentration of the buffer was varied from 20–40 mM, for two different pH, 7.0 and 8.0. The UV-visible spectra remained unchanged for solutions of increasing buffer concentration. Therefore, it is assumed that in the photosynthetic experiments the nickel(II) complexes are stable in aqueous media at least for two days, as determined from kinetic studies.

ATP formation and whole chain electron transports

The degree of inhibition of the entire electron transport chain rate of spinach thylakoids was measured with emizco, nickel(II) salts and their coordination compounds. Emizco lacks any effect on photosynthetic activities. Figure 2A shows the inhibiting effect of increasing concentration of NiCl_2 on methylviologen photoreduction with water as electron donor. Methylviologen photoreduction and its auto-oxidation with oxygen in the medium that results in O_2 uptake by isolated freshly lysed intact chloroplasts, was inhibited. The results obtained indicate that NiCl_2 act as Hill reaction inhibitors, since it inhibited basal, phosphorylating and uncoupled conditions. In order to know if emizco modifies the activity of the

nickel(II) ion in the coordination compound, the effect of its complexes on electron flow was tested. Figure 2B, shows the effect of increasing concentration of the $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ on basal, phosphorylating and uncoupled electron flow. Electron flow under all conditions was partially inhibited, and the extent of inhibition (up to 50%) increased with concentration from 0 to 500 μM . The extent of inhibition by the coordination compounds suggests that these compounds do not interact at the Q_B site of the D_1 protein interacting with another site of D_1 .

Electron flow is coupled to ATP-synthesis and the energy transduction theory of Mitchell (Mitchell, 1961) has been proposed to account for the mechanism of coupled electron transport and ATP-synthesis, therefore any chemical that inhibits electron flow will inhibit photophosphorylation, as is the case of the nickel(II) salts and their complexes. The ATP-synthesis inhibition order is as follows: 46% and 17% at 500 μM for $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ and for NiCl_2 respectively. It is possible that coordination compounds are more hydrophobic than the salts therefore allowing them to reach the target more easily. In order to localise the inhibition site of NiCl_2 , NiBr_2 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2$

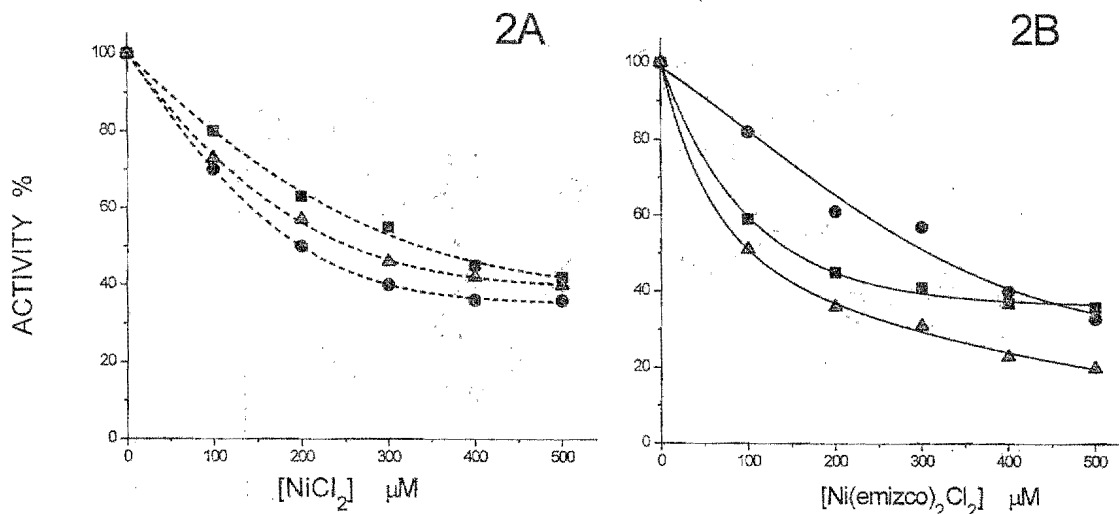


Fig. 2. Photosynthetic electron transport from water to MV on freshly lysed spinach chloroplasts: basal (■), phosphorylating (●) and uncoupled (▲) electron transport rates. In the presence of (A) NiCl_2 and (B) $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$. Control average rate values are 311, 640, 1018 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg chl per h.}$, for basal, phosphorylating and uncoupled electron flows, respectively. Other conditions as described in Material and Methods. Each curve is the average of three replicates.

$(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ on the electron transport chain, their effect on photosystem I and II were studied.

PSII-supported electron transport

$[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, partially inhibited uncoupled PSII electron flow from water to DCPIP or DCBQ (Table I). The PSII inhibition was 50% at $500 \mu\text{M}$ ($178 \mu\text{equiv. e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$, as compared with $356 \mu\text{equiv. e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$ for the control). Noteworthy, nickel(II) salts do not affect this span of the PSII electron transport chain, as the rate of electron transport from H_2O to DCBQ is the same in the presence or absence of the salts, *i.e.* $356 \mu\text{equiv. e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$.

To further localise the inhibition site of nickel complexes on PSII, electron transport from water to SiMo in presence of $10 \mu\text{M}$ DCMU, was measured. Results show that these complexes did not inhibit this span of the electron transport chain (Table I). It is known that SiMo accepts electrons through Q_A level, therefore, it is concluded that one of the targets for $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ is located at the Q_B -protein or D1-protein level.

PSI-supported electron transport

To determine the target of NiCl_2 and $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ beyond Q_B their effect on uncoupled PSI activity from reduced DCPIP to MV (plus $10 \mu\text{M}$ DCMU) were determined. PSI electron transport was partially inhibited, *i.e.* 38% at $500 \mu\text{M}$ by NiCl_2 suggesting that the inhibition site for these salts is on PSI, as well as in $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ (Table I).

Due to the fact that nickel(II) salts do not affect PSII activity and partially inhibit PSI on one hand, on the other, their emizco coordination compounds show only partial inhibition on PSII, their behaviour from PQ pool to F_x were tested. This was done adding TMQH_2 as electron donor. The results show that this activity was inhibited by the salts and their coordination compounds *i.e.* 50%, $500 \mu\text{M}$ which is the same inhibition percentage of electron flow from reduced DCPIP to MV, thus indicating that the interaction target is located at b_6f level.

The span of PSI electron transport from P_{700} to MV (adding PMS^- as electron donor) was studied for all compounds. The results show that this span of electron flow was not affected by the coordination compound or nickel(II) salt. Since PSI activity from DCPIPred to MV was inhibited by nickel(II) salts and coordination compounds, suggesting that their target is located at b_6f complex. Therefore, we may conclude that NiCl_2 have only one target. On the other hand, the $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ binding sites are located at Q_B -protein and b_6f level.

Effect of Ni^{2+} and their coordination compound on Chl fluorescence

Chl *a* fluorescence induction curves of thylakoids show the polyphasic sequence of transients (*OJIP*) described for plants, green algae and cyanobacteria (Iglesias-Prieto, 1995; Govindjee, 1995). This series of transients reflects the sequential reduction of the electron acceptor pool of PSII (Strasser *et al.*, 1995). Addition of $50 \mu\text{M}$ DCMU results in transformation of the regular *OJIP* sequence into an *OJ* sequence. Inhibition of PSII electron transport at the Q_B -protein site by

Table I. Treatment of nickel salts and their coordination compounds at $500 \mu\text{M}$ on electron transport rate uncoupled, PSII, PSI and partial reactions. Left in $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl per h}$. Right in per cent of inhibition.

	Uncoupled		PSII		PSI		$\text{TMQH}_2 \rightarrow \text{MV}$		$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCBQ}$		$\text{PMS}^- \rightarrow \text{MV}$	
Control	1018	0%	467	0%	1800	0%	267	0%	356	0%	640	0%
NiCl_2	407	60%	467	0%	1116	38%	134	50%	—	—	646	0%
$[\text{Ni}(\text{EMIZCO})_2\text{Cl}_2]$	153	85%	234	50%	1800	0%	174	35%	178	50%	631	0%
NiBr_2	407	60%	467	0%	1224	32%	134	50%	—	—	640	0%
$[\text{Ni}(\text{EMIZCO})_2\text{Br}_2]$	163	84%	248	47%	1800	0%	166	38%	200	44%	633	0%
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	407	60%	467	0%	1350	25%	134	50%	—	—	640	0%
$[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	204	80%	272	42%	1800	0%	187	30%	164	54%	633	0%
$(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$												
Emizco	1025	0%	467	0%	1800	0%	266	100%	356	0%	633	0%

DCMU results in the rapid accumulation of Q_A^- during the first 2 ms of the induction curve. In contrast, control thylakoids require approximately 900 ms to completely close all PSII reaction centres. Increases in the relative variable fluorescence yield at the transient $J[V(J)]$ as a function of $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ concentration are indicative of a loss in Q_A^- re-oxidation capacity similar to that observed in DCMU-treated thylakoids (Fig. 3). Consistent with the electron transport determinations, thylakoids exposed to different concentra-

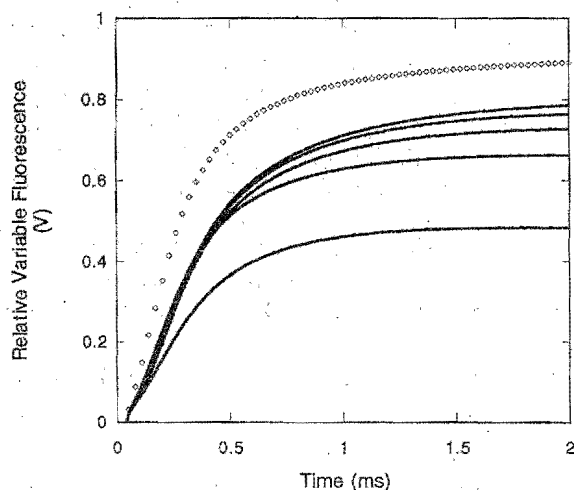


Fig. 3. Normalized relative variable fluorescence rise of the photochemical phase. The curve with the lowest fluorescence yield represent control thylakoids. Symbols represent controls with acceptor side impairment after infiltration with DCMU. The intermediate curves represent thylakoids exposed sequentially to 100, 250, 500 and 1500 μM $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$. Results are average of 4 replicates.

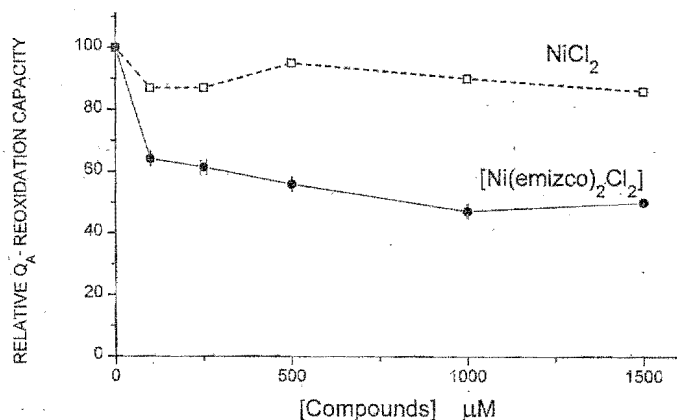


Fig. 4. Relative variable fluorescence, $F(V)$, corresponding to the electron transfer from Q_A^- to Q_B as a function of increased concentrations of NiCl_2 , or $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ treatment concentrations Nickel(II) chloride in open squares and coordination compound in solid circles.

tions of $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ showed a significant concentration-dependent reduction in their relative Q_A^- re-oxidation capacity (Fig. 4). Polarographic determinations of the inhibition of PSII electron transport activity from water to DCBQ as a function of $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$ (Table I), coordination compound concentration (up to 500 μM) is correlative with the accumulation of Q_A^- shown by the Chl *a* fluorescence analyses (Fig. 4). On the other hand, addition of various concentrations of metal salts did not result in any detectable variations in the fluorescence characteristics of the thylakoids. These observations strongly suggest that the target site of the coordination compound is located at the acceptor side of PSII at the Q_B -protein.

Further support for this interpretation was obtained by the kinetic analyses of Chl *a* fluorescence induction curves. The rise of V during the first 2 ms of the induction curve requires two components to be accurately described (Fig. 5A and 5B). An exponential component with rate constants between 0.500 and 0.730 ms^{-1} and a sigmoidal one with time constants close to 0.09 ms^{-1} (Table II). Kinetic analyses indicate that the increase in the fluorescence yield during the J transient after DCMU infiltration, results from increments in the relative amplitude of both components with major changes in their rate constants (Table II).

Analogous responses were obtained for $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Ni}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ and $[\text{Ni}(\text{emizco})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ infiltrated thylakoids. Although small variations in the rate constants were also detected, the main characteristics of the fluorescence raise during the J event are the dif-

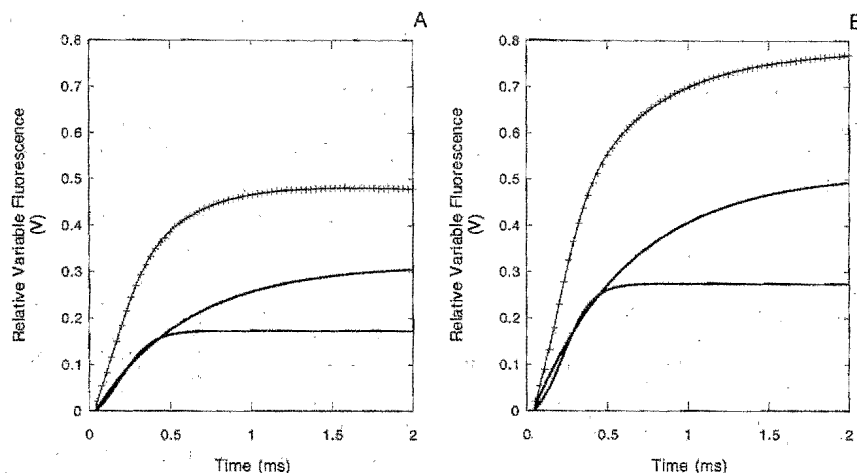


Fig. 5. Deconvolution of the photochemical phase of the induction curve of spinach thylakoids showing the two components (one sigmoidal and one exponential, solid line) needed to describe their fluorescence amplitude rise, crosses. For simplicity only one third of the data are presented. (A) Control thylakoids. (B) Thylakoids infiltrated with 1500 μM $[\text{Ni}(\text{Emizco})_2\text{Cl}_2]$.

Table II. Kinetic analyses of the relative variable fluorescence (V) yields during the first 2 ms of the induction curve. Values are means of 4 replicates. Values were obtained by numeric deconvolution. Residuals vary from -0.002 to 0.39.

	Sigmoidal	Component	Exponential	Component
	Amplitude (relative)	Time constant (ms^{-1})	Amplitude (relative)	Time constant (ms^{-1})
$[\text{Ni}(\text{Emizco})_2\text{Cl}_2]$				
Control	0.201	0.084	0.272	0.516
100 μM	0.251	0.084	0.345	0.504
250 μM	0.276	0.080	0.403	0.567
500 μM	0.280	0.088	0.433	0.615
DCMU (50 μM)	0.446	0.103	0.474	0.573
$[\text{Ni}(\text{Emizco})_2\text{Br}_2]$				
Control	0.206	0.098	0.264	0.592
100 μM	0.240	0.096	0.375	0.702
250 μM	0.252	0.096	0.391	0.725
500 μM	0.255	0.093	0.412	0.729
DCMU (50 μM)	0.446	0.099	0.508	0.509

ferential amplitude increases of both components. The concentration-dependent increases in the amplitude of the sigmoidal components are smaller than those observed for the exponential components. They appear to be saturated at concentrations above 100 μM . Exposure of thylakoids to solutions of the coordination compounds (concentrations higher than 700 μM) resulted in increments in the amplitude of the exponential components. The amplitudes are comparable to those observed for DCMU-infiltrated thylakoids. PSII heterogeneity has been interpreted as the result

of the presence of two populations of PSII with different optical cross-section and connectivities (Melis *et al.*, 1983), these two populations also have different distributions in the thylakoid membranes. The differential sensitivity of both types of PSII to Ni(II)-coordination compounds, suggest that the complexes can not infiltrate efficiently the regions of the thylakoids where the PSII with sigmoidal kinetics are located.

Apparently, neither the anions (Cl^- , Br^- , NO_3^-) nor emizco by themselves are important for the inhibition of electron transport (Table I), however

when the ligand is bound to nickel(II) the coordination compounds inhibit electron transport. The coordination compounds tested are more potent inhibitors on the photosynthetic electron flow than the salts, Table I.

Acknowledgements

This work was supported by grant DGAPA IN222096 and B. King-Díaz acknowledges the fellowship awarded by CONACyT, México. We also thank RP Fierro for technical support.

- Allen J. F. and Holmes N. G. (1986), Electron transport partial reactions. In: *Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach* (Hipkins M. F., Baker N. R., eds.). IRL Press: Oxford, U. K., pp 119–128.
- Alonso R., Andrés J. I., García-López M. T., De las Heras F. G., Herranz R., Alarcon, B. and Carrasco, L. (1985), *J. Med. Chem.* **28**(6), 834–838.
- Arnon D. I. (1949), Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1–15.
- Barba-Behrens N., Carrasco-Fuentes M. E., Castillo-Blum S. E., Mendoza J. L., Salazar F., Tovar A., Lotina-Hennsen B., Contreras R. and Flores-Parra A. (1993), Coordination compounds quinic acid as decouplers on photosynthesis. *Biophys. Chem.* **47**, 67–75.
- Barba-Behrens N., Montes-Ayala J. and Rosales-Hoz M. J. (1993), Interesting coordination behaviour of imidazole carboxylate towards copper(II). *J. Inorg. Biochem.* **51**, 66.
- Barba-Behrens N., Mutio-Rico A. M., Joseph N. P. and Contreras R. (1991), Preparation and characterization of new transition metal complexes of nitroimidazoles. X-Ray crystal structures of two copper complexes: bis[μ -chloro]chloro-bis-(1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole)copper(II). First observation of nitro group coordination to the metal ion in these heterocycles. *Polyhedron* **10**, 1333–1341.
- Beck G., Heitzer H., Eue L. and Schmidt R. R. (19 Dec. 1979), Halogenated derivatives of imidazolecarboxylic acids and their use as herbicides. (Bayer A.-G.) *Eur. Pat. Appl.* **31**, 086.
- Bennett, J. E. (1990), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman and Gilman's eds.), Pergamon Press, Inc. New York, pp 1169–1181.
- Caiera M. R., Soto F., Sánchez P., Bye, R., Hernández, B., Anaya A. L., Lotina-Hennsen B., and Mata R. (1995), Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Phytochemistry*. **40**, 419–425.
- Chakravarty B. and Srivastava S. (1992), Toxicity of some heavy metals *in vivo* and *in vitro* in *Helianthus annuus*. *Mutation Res.* **283**, 287–294.
- Dilley R. (1972), Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena) *Meth. Enzymol.* **24**, 68–74.
- Farago E. and Cole M. M. (1988), Nickel and plants, in: H. Sigel and Sigel (Eds), *Metal Ions in Biological Systems*, **23**, Dekker, New York, pp. 47–90.
- Fernández-Vargas J., Farfán N., Castillo B., Santillán R., Cárabez A. and Lotina-Hennsen B. (1995), OEC Complex enzyme and photophosphorylation inhibition behaviour of 1,1-diphenylboroxazolidone derivatives of α -aminoacids. *Proceedings of the Tenth International Congress on Photosynthesis* (Mathis, P. Eds.), **2**, Montpellier, France, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 839–846.
- Garaboyes H., Kasper T. J. and Vaidya, p. (1982), 5-Methyl-4-imidazolecarboxylic acid esters intermediate to cimetidine. *Eur. Pat. Appl. EP 49*, 638. U. S.
- Govindjee (1995), Sixty-three years since Kautsky. chlorophyll *a* fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 131–160.
- Iglesias-Prieto, R. (1995), The effects of elevated temperature on the photosynthetic responses of symbiotic dinoflagellates. In: *Proceedings of the Tenth Intern. Congress on Photosynthesis* (Mathis, P. Eds.), **4**, Montpellier, France, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 793–796.
- Izawa S. and Good N. E. (1972), Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Meth. Enzymol.* **24B**, Academic Press. New York., 355–377.
- Izawa S., Kraayenhof R., Ruuge E. K. (1973), The site of KCN inhibition in the photosynthetic electron transport pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 328–339.
- Leonard A., G. B. Gerber and P. J., (1981), Toxicity mutagenicity of nickel. *Mutation Res.* **87**, 1–5.
- Melis A. and Anderson J. M. (1983), Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. Antenna size, relative electron transport capacity and chlorophyll composition. *Biochim. Biophys. Acta.* **724**, 473–484.
- Mills, J. D. (1980), Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* **112**, 173–177.
- Mitchell P. (1961), Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature* **191**, 144–148.
- Ouitrakul R. and Izawa S. (1973), Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts a function of electron-acceptor. 2. Acceptor-specific inhibition by KCN. *Biochim. Biophys Acta* **305**, 105–118.
- Parsons J. H. and Simpson D. J., Dudfield, P. J., Hunt, R. G. (Jun 1990), 5-Methyl-4-imidazolecarboxylic acid esters intermediate to acylcyanoazoles as agrochemical fungicides. *Brit. UK Pat. Appl. GB 21*, 245, 565, pp. 27.
- Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., Good N. (1971), Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. *J. Biol. Chem.* Vol. **?** 3204–3209.
- Strasser R. J., Srivastava A. and Govindjee (1995), Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* **61**, 32–42.
- Yruela I., Montoya G., Alonso P. J. and Picorel, R. (1991), Identification of the pheophytin- Q_A -Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site. *J. Biol. Chem.* **266**, 22847–22850.

6. CONCLUSIONES

✓ Los compuestos de coordinación de níquel y sus respectivas sales se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, presentando mayor actividad los complejos que las sales. Los compuestos de coordinación de níquel presentan dos sitios de inhibición en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis, uno localizado en Q_B y el otro a nivel del complejo b_6/f , sitio que comparten con las sales, ya que estas inhiben este mismo sitio evitando la oxidación de PQH_2 .

Los compuestos de coordinación de $Co(II)$ y $Zn(II)$ también se comportan como inhibidores de la reacción de Hill. Los compuestos coordinados de $Co(II)$ tienen dos sitios de inhibición al igual que los complejos de níquel, inhiben en el FS II, sitio localizado en Q_B (corroborado por fluorescencia) y el otro sitio localizado en el complejo b_6/f .

✓ En trabajos realizados por otros investigadores se ha mostrado que las sales de $Co(II)$ inhiben el FS II, y existen varias controversias acerca del sitio de inhibición. En este trabajo, encontramos que el sitio de inhibición de este metal es a nivel del complejo b_6/f y se comporta como inhibidor de la reacción de Hill. La diferencia en resultados, se puede deber a las diferentes condiciones experimentales. Tripathy y Mohanthy (1983) utilizaron preparaciones de cloroplastos obtenidos de las hojas de plántulas de cebada (*Hordeum vulgare*) de 11 días, crecidas en cajas Petri; las concentraciones de sal utilizadas por estos

autores se encuentra en los intervalos de 3 a 8 mM y tiempos de incubación de 30 minutos, en este trabajo, las concentraciones utilizadas no son mayores a 0.5 mM.

Tiwari y Mohanty (1993) encontraron una estimulación en la velocidad del transporte de electrones en FS II en células cultivadas de *Synechocystis* sp. PCC 683 a concentraciones de CoCl_2 10 μM . La controversia entre los datos presentados aquí y los de Tiwari y Mohanty se debe probablemente a que ellos usaron cultivos de células crecidas a bajas concentraciones de cobalto y nosotros utilizamos cloroplastos aislados de hojas de espinaca. El efecto que ellos observan, puede ser fisiológicamente más complicado.

✓ A diferencia de los complejos de níquel y cobalto el complejo de Zn(II) solo presenta un sitio de inhibición localizado en Q_B y la sal ZnBr_2 presenta dos sitios de inhibición, uno en FS II y otro localizado en FS I. Dada la baja potencia de inhibición, no se efectuaron estudios para localizar el sitio de inhibición, pero estos resultados están de acuerdo con lo que se ha reportado anteriormente por otros autores (Trypathy, 1980; Miller and Cox, 1983) de que su sitio de inhibición es en FS II. Los compuestos de coordinación presentan mayor potencia inhibidora en la reacción de Hill, que las sales.

✓ Aparentemente, los aniones (Cl^- , Br^-) por sí solos, no son importantes para aumentar la potencia inhibidora de los compuestos, sólo el anión NO_3^- , influye ligeramente aumenta dicha actividad

✓ De los resultados obtenidos en respiración y germinación se puede concluir que

los compuestos de coordinación de Co(II) y Zn(II) son inhibidores de la germinación y del crecimiento de la raíz y del tallo.

✓ De todos los compuestos ensayados el $[\text{Co}(\text{emizco})_2\text{Br}_2]$ es el único que presenta selectividad ya que inhibe en mayor grado la germinación de las semillas dicotiledóneas (*Physalis ixocarpa* y *Trifolium alexandrinum*).

✓ La sal de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ también presentan selectividad al no afectar la respiración de semillas de trigo (*Triticum vulgare*) e inhibe la respiración de las otras semillas estudiadas, afectando más a las semillas de *Lolium multiflorum*.

✓ Los compuestos de coordinación de níquel presentan menor actividad inhibidora que sus respectivas sales en la germinación de semillas.

✓ Los resultados indican que la unión ligante-metal favorece la actividad inhibidora en la reacción de Hill de la fotosíntesis. La actividad de los complejos es más marcada que la actividad de las sales metálicas y que el ligante por sí solo, el cual no presenta efecto en ninguna de las actividades ensayadas.

✓ En la germinación y crecimiento de raíz y tallo, la unión metal-ligante disminuye la actividad inhibidora del ligante y aumenta dicha actividad en las sales de los metales.

✓ El ligante emizco es un inhibidor en la germinación de semillas y por los resultados obtenidos en respiración, se puede concluir que, la inhibición de la germinación no es por vía mitocondria, y tampoco afecta al transporte de electrones en la fotosíntesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

1) Allen J. F. and Holmes N. G. (1986). Electron transport partial reactions. In: Photosynthesis, Energy transduction. A practical approach (Hipkins M. F., Baker N. R., eds.). IRL Press: Oxford, U. K. pp 119-128.

2) Alonso R., Andrés J. I., García-López M. T., De las Heras F. G., Herranz R., Alarcón B. and Carrasco, L. (1985). Synthesis and antiviral evaluation of nucleosides of 5-methylimidazole-4-carboxamide. *J. Med. Chem.*, **28**(6), 834-838.

3) Arnon D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.

4) Baker N. R., Percival M. P. (1991). Herbicides and photosynthesis. In: Herbicides. (Baker N. R., Percival M. P. Eds.) elsevier Science Publishers. Netherlands., pp. 1-26.

5) Barba-Behrens N., Mutio-Rico A. M., Joseph N. P. and Contreras R. (1991). Preparation and characterization of new transition metal complexes of nitro imidazoles. X-Ray crystal structures of two copper complexes: bis[μ -chloro]chloro-bis-(1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole)copper(II). first observation of nitro group coordination to the metal ion in these heterocycles. *Polyhedron*, **10**, 1333-1341.

6) Bennett, J. E. (1990). The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman and Gilman's eds.), Pergamon Press, Inc. New York, pp. 1169-1181.

7) Black M. and Bewley J. D. (1994). Seeds: Germination, Structure, and

Composition. In: SEEDS. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, pp. 1-30.

8) Bolhár-Nordenkamp H. R. and Öquist G. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual. (Edited by Hall D.O, Scurlock J .M. O., Bolhár-Nordenkamp H. R., Leegood R. C. and Long S. P. Chapman and Hall, London, UK. pp. 193-205.

9) Brambila C. M. y González V. E. (1994). Zinc: Función e interacción con las moléculas de los sistemas biológicos. *Boletín de Educación Bioquímica*, **13**, 36-45.

10) Burca S. D., Cachita C. and Trifu. M. (1978). Morphological changes induced by four microelements, Mn, Zn, Co, and Cd in tomato seedlings (*Solanum lycopersicum*). *Stud. Univ. Babes-Bolyai. Biol.* **2**: 27-34.

11) Calera M. R., Soto F., Sánchez P., Bye R., Hernández B., Anaya A. L., Lotina-Hennsen B. and Mata R. (1995). Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Pytochemistry*. **40**, 419-425.

12) Chakravarty B. and Srivastava S. (1992). Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. *Mutation Research*, **283**, 287-294.

13) Delosme R. (1971). New results about chlorophyll fluorescence "in vitro". In: Proceedings of the 2nd. International Congress on Photosynthesis Research (Edited by G. Forti, M. Avron and A. Melandri), pp. 187-195.

14) Dilley R. (1972). Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^+ exchange phenomena) In: *Meth. Enzymol.* **24**, 68-74.

- 15) Einhelling F. A. (1995), Allelopathy: current status and future goals, In: Allelopathy. Organisms, Processes and Applications (K. Inderjit, M. Dakshini and F. A. Einhelling, eds.). ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, pp 2-25.
- 16) Farago E. and Cole M. M. (1998). Nickel and plants, in: Metal ions in Biological Systems, (H. Siegel and Siegel Eds.), Vol. 23, Dekker, New York, USA. pp. 47-90.
- 17) Garaboyes H., Kasper T. J. and Vaidya P. (1982). 5-Methyl-4-imidazolecarboxylic acid esters intermediate to cimetidine. Eur. Pat. Appl. EP 49, 630. US.
- 18) Hauska G. and Trebs A., (1977). Artificial acceptors and Donors. In: Enciclopedia of Plant Physiol. New Series. (Trebs, A., y Avron, M. Eds.), Vol. 5, Sringer-Verlag, Nueva York, USA. pp. 226-282.
- 19) Herich R. (1965). The effect of cobalt on the structure of chromosome and on the mitosis. *Chromosoma* 17, 194-198.
- 20) Hipkins M. F. and Baker N. R. (1986). Photosynthesis transduction a practical approach. IRL Press. Oxford Washington.
- 21) Hochman Y., Lanir A., Weber M. M. and Carmeli C. (1979). The effect of binding of cobalt(III)-nucleotide complexes on the kinetic properties of adenosine triphosphatase activity in coupling factor I from chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 192, 138-147.
- 22) Izawa S., Kraayenhof R., Ruuge E. K. (1973). The site of KCN inhibition in the photosynthetic electron transport pathway. *Biocim. Biophys. Acta*, 314, 328-339.
- 23) Jiménez A., Mata R., Lotina-Hennsen B. and Anaya A. L. (1998).

Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z. Naturforsch.*, **53c**, 55-59.

24) Kashes, T. M. & Dolobovskaya A. S. (1969). The effect of trace elements on the processes of division and extension of cells in connection with the germination of *Fraxinus excelsior* embryos. *Mikroelem. V. S-KH. Med. Resp. Mezhved SB 5*: 67-72.

25) Leonard, A., Gerber G. B. and Jacquet P. (1981). Toxicity mutagenicity and teratogenicity of nickel. *Mutation Res.*, **87**, 1-5.

26) Lipskaya P., Matvyeyentsava V.S. and Charkaskaya S.K (1973). Effect of various combination of cobalt with other trace elements on the change of activity of the Hill reaction. *Vyesty. Akad Navuk. B. SSR Syer. Biyal. Navuk.* **2**: 32-37.

27) Lukshene, Z. B., Zakharova N.I., Lukshev E. P., Kononenko A.A., Kolosova E. M. and Novodarova G. N.. Vol'pin. (1985). Effect of oi-phenantroline complexes of cobalt and copper on light induced electron transfer in chloroplasts and chloroplast fragments enriched with photosystem I. *Biokhimiya*, **50**, 1440-147.

28) Marschner H. (1988). Functions of mineral nutrients: Micronutrients. In: Mineral nutrition of higher plants. Institute of Plant Nutrition, University of Hohenheim, Germany. Academic Press Inc. San Diego California, USA. pp. 312-404.

29) McCarty R. E. (1980). Delineation of the mechanism of ATP synthesis in chloroplasts: Use of uncouplers, energy transfer inhibitors, and modifiers of coupling factor I. *Meth. Enzymol.* **69**, 719-727.

30) Miller M. and Cox P. R. (1983). Effect of Zn^{2+} on photosynthetic oxygen evolution and chloroplast manganese. *FEBS Letters*, **155**, 331-333.

- 31) Mills J. D. (1980). Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* **112**, 173-177.
- 32) Mohanty, N., Vass Y. and Demeter S. (1989). Impairment of photosystem 2 activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions. *Physiol. Pl.* **76**, 386-390.
- 33) Moreland, D. E. (1980). Mechanims of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiology*, **31**, 597-638.
- 34) Ouitrakul R. and Izawa S. (1973). Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts a function of electron-acceptor. 2. Acceptor-specific inhibition by KCN. *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 105-118.
- 35) Parsons J. H., Simpson D. J., Dudfield, P. J., Hunt R. G. (1990). 5-Methyl-4-imidazolecarboxylic acid esters intermediate to acylcyanoazoles as agrochemical fungicides. Brit. UK Pat. Appl. GB 21, 245, 565, pp. 27.
- 36) Patel, P. M., Wallace A. & Mueller R. T. (1976). Some effects of copper, cobalt, cadmiun, zinc, nickel and chromium on growth and mineral element concentration in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Horti. Sci.*, **101**: 553-556.
- 37) Palit S. and Sharma A. (1994). Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review.*, **60**, 149-181.
- 38) Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., Good N. (1971). Electron transport and phosphorylation in chloroplasts as function of the electron acceptor. *J. Biol. Chem.*, **246**, 3204-3209.
- 39) Strasser R. J., Srivastava A. and Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll *a*

Fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, **61**, 32-42.

40) Satsukyeovich & Lyashkyevich N. M. (1975). Changes of the physiological and biochemical indices and productivity of sugar beet under conditions of the after effect of copper and cobalt. *Vyestsi. Akad. Navuk. BSSR Ser. Biyal. Navuk.*, **5**: 554-558.

41) Siegel, S. M. (1977). The cytotoxic response of *Nicotiana* protoplasts to metal ions: A survey of the chemical elements. *Water, air Soil Pollut.*, **8**: 293-304.

42) Trebs A. (1980). Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods in Enzymology*, **69**, 675-715.

43) Tiwari S. and Mohanty P. (1993). Cobalt chloride induced stimulation of Photosystem II electron transport in *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells. *Photosynthesis Research*, **38**, 463-469, 1993.

44) Tripathy B. C. and Mohanty P. (1980). Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. *Plant Physiol.*, **66**, 1174-1178.

45) Tripathy B. C. and Mohanty P. (1983). Cobalt ions inhibited electron-transport activity of photosystem II without affecting photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, **722**, 88-93.

46) Vallee Bert L. and Auld D. S. (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, **29**, 5647-5659.

47) Volkorezov, V. Y. (1968). Pretreatment of *Pinus Sylvestris* seeds with cobalt sulfate. *Uch. Zap. Gor'k Univ.*, **90**: 114-117.

48) Yruela I., Montoya G., Alonso P. J. and Picorel, R. (1991). Identification of the pheophytin Q_A -Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II) inhibitory binding site. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22847-22850.