

20
2 Ejen



V N A M

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“ASPECTOS DE ACCION DEL SISTEMA FITOCROMO
EN GERMINACION”

T E S I S

Que para obtener el Título de
Q U I M I C O

p r e s e n t a

XOCHITL CRUZ NUÑEZ

Director de la Tesis:
M. C. OFELIA GRAJALES MUÑIZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CAPITULO I.	ANTECEDENTES.....	1
CAPITULO II.	FITOCROMO: LA MOLECULA.....	8
	2.1 Caracterización física y química.....	9
	2.2 Transformación.....	17
CAPITULO III.	GERMINACION.....	27
	3.1 Introducción.....	28
	3.2 Factores que afectan la germinación.....	33
	3.2.1 Factores Externos.....	33
	3.2.1.1 Agua.....	34
	3.2.1.2 Temperatura.....	35
	3.2.1.3 Gases.....	36
	3.2.1.4 Luz.....	38
	3.2.2 Factores Internos.....	41
	3.3 Eventos genético-metabólicos durante germinación y fitocromo.....	45
CONCLUSION.....		65
BIBLIOGRAFIA.....		67

CAPITULO I

ANTECEDENTES

El surgimiento y la evolución de la vida en este planeta tienen su base en la asociación molecular de los sistemas químicos -unitarios bajo condiciones adecuadas (i.e. contra un gradiente en trópico), así como en su capacidad de adaptación y aprovechamiento de los parámetros circundantes para su persistencia y evolución. La alta diferenciación celular ha implicado su interrelación coordinada para integrar los seres vivos que, a su vez, se organizan simbióticamente para formar un macrosistema en equilibrio con sus alrededores -equilibrio ecológico- en el que cada una de sus partes existe dinámicamente en la observación del mismo.

La función de los seres vivos en este proceso determina las características morfológicas, fisiológicas y -a nivel molecular-fisicoquímicas de los mismos.¹ Particularmente, los vegetales, -carentes de miembros que les permitieran actividades motrices, desarrollaron entidades químicas capaces de aprovechar las variables ambientales a su alcance, v.g., la energía solar. Las respuestas a la luz u oscuridad de las plantas implican necesariamente reacciones fotoquímicas, que básicamente se incorporan en tres clases: fotosíntesis, fototropismo y fotomorfogénesis, entendiéndose esta última como la sensibilización del vegetal hacia las señales luminosas para el control de procesos de desarrollo -del mismo.

La importancia de la fotomorfogénesis ha sido percibida a través del tiempo por la dependencia que los seres animales, en-

¹La idea puede ser planteada inversamente, i.e. en el sentido que "la estructura determina la función". El concepto se mantiene abierto.

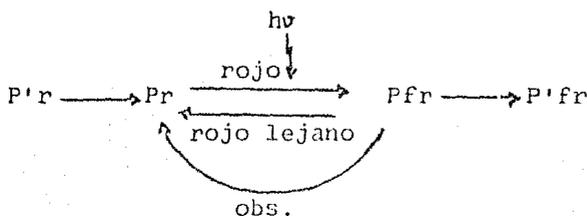
tre ellos el hombre, tienen de los vegetales en cuanto a alimentación, provisión de oxígeno y, en general, por su participación en el mantenimiento del equilibrio ecológico.

El estudio de la fotomorfogénesis ha sido realizado en varios niveles, aunque el descubrimiento, en 1959 (Butler et al, 1959) de un pigmento reversible por radiación rojo-rojo lejano (R-FR) bautizado como sistema fitocromo, ha canalizado el conocimiento de las reacciones fotomorfogénicas; así, en la actualidad ha sido profundizado el estudio de este sistema cromóforo-proteico en cuanto a: 1) sus propiedades físicas y químicas y 2) las respuestas bioquímicas y fisiológicas que produce, situándolo como el único pigmento claramente definido en las plantas potencialmente verdes que es capaz de percibir las señales luminosas del medio circundante y de traducir dichas señales en el lenguaje de las reacciones metabólicas que gobiernan el desarrollo, incluyendo morfogénesis (Schopfer, 1977). De esta manera, el estudio de la fisiología del fitocromo ha sido en la actualidad tomado como el estudio de la fotomorfogénesis.

El sistema fitocromo consiste de una cromoproteína en equilibrio entre dos formas, una que absorbe la energía radiante en la porción del rojo lejano (λ máx ca. 730 nm), simbolizada por Pfr y que es transformada por esta absorción en la forma Pr, la cual absorbe en la porción del rojo (λ máx ca. 660nm). Ambas formas de la molécula son inequívocamente reconocidas por su espectro de absorción y por su actividad biológica, correspondiendo la forma biológicamente activa a Pfr y la inactiva, a Pr. Puede decirse, entonces que la idea del sistema fitocromo es la de un interruptor maestro en la conexión y desconexión de respuestas metabóli-

co-fisiológicas por la acción de la energía radiante.

A la fotointerconvertibilidad de las dos formas del sistema fitocromo, se adicionan la "conversión oscura" de Pfr en Pr, lo que indica que esta última es la forma termodinámicamente estable del pigmento; la destrucción de Pfr y la síntesis de novo de Pr. Estos equilibrios se esquematizarían de la siguiente manera:



donde P'r y P'fr son las formas resultantes de la nueva síntesis y destrucción del fitocromo, respectivamente.

De acuerdo a la intensidad de irradiación aplicada, se han descrito dos tipos de reacciones inherentes al sistema fitocromo, las respuestas de inducción-reversión o de baja irradiación (LIR) y las reacciones de alta irradiación (HIR). Las primeras se producen por la irradiación de corto intervalo sobre el tejido vegetal y producen respuestas biológicas reversibles de acuerdo al rango de longitud de onda irradiado, i.e., un pulso en R produciría una respuesta biológica positiva y un pulso en FR revertiría la respuesta. Estas respuestas biológicas muestran espectros de acción que concuerdan ampliamente con aquellos obtenidos por el pigmento aislado, observándose una gran similitud entre los niveles de Pfr inducidos y el tamaño de la respuesta (Quail, 1976). De esta manera, la magnitud de la respuesta de LIR es proporcional al nú-

mero de cuantos incididos sobre la muestra y éstos son función de la intensidad de radiación por el tiempo que dura ésta a una longitud de onda determinada.

Las respuestas correspondientes a HIR, por otro lado, se producen cuando la muestra es irradiada intensamente por R hasta alcanzar el estado fotoestacionario² y, contrariamente a lo esperado, en este caso las respuestas son también dependientes de la intensidad de luz incidida aunque haya sido alcanzada la condición de saturación (Mohr, 1969). En este caso, la respuesta es mantenida el tiempo que dura la irradiación, llegando a su nivel basal -- cuando ésta es suspendida; ésto implica que la fotorreversibilidad no es aplicable en este tipo de reacciones (Quail, 1976; Kendrick y Spruit, 1977). Debido a que el nivel de Pfr en el estado fotoestacionario es independiente tanto de la longitud de onda como de la intensidad incididas, se ha sugerido que las HIR se relacionan con la velocidad de interconversión entre Pfr y Pr en ese estado, que contribuye a mantener un complejo Pfr-sustrato, el -- que a su vez dirigiría la respuesta HIR (Schäfer, 1975); esta velocidad de ciclación sería dependiente de aquellas variables.

Teniendo en cuenta las características de ambas respuestas -- LIR e HIR-- se ha visualizado una capacidad dual de acción del -- sistema fitocromo en la fotomorfogénesis, actuando en LIR como un fotosensor y en HIR como fotoacoplador (Quail, 1976). Esto impli-

² El estado fotoestacionario ha sido descrito por la relación

$$\Psi_{\lambda} = ([Pr, fr] / [Ptot])_{\lambda}$$

(Schäfer y Mohr, 1974); donde el subíndice λ indica la longitud de onda a la que se realiza la medición, bajo condiciones -- de saturación por irradiación R.

ca que en las reacciones de inducción-reversión la luz actúa como interruptor en la transformación de Pr en Pfr. El Pfr formado por esta transformación puede actuar en la obscuridad e independientemente de que el pulso haya sido suspendido. Obviamente, si los cuantos incididos son más, la respuesta observada será de mayor magnitud. En el otro lado, en HIR, el sistema Pr-Pfr se encuentra en directa relación con el estímulo aplicado; los despliegues biológicos consecuentes son dirigidos por la constante irradiación por lo que la suspensión de ésta origina el cese de la respuesta.

Gran parte de las reacciones morfogénicas atribuidas al sistema fitocromo se deben al hecho de ser inducibles-reversibles: los criterios de fotorreversibilidad y la similitud de los espectros de acción tanto para su inducción como reversión aseguran buenas bases de prueba del control del crecimiento y desarrollo por el fitocromo.

Entre las respuestas biológicas dirigidas por este pigmento se encuentran germinación de la semilla, inducción floral, desarrollo floral, coloración cuticular, respiración de la semilla, etiolación, síntesis de antocianinas, formación plumular, orientación de cloroplastos, formación de plástidos, abscisión foliar, epinastia, expresión sexual, formación de rizoides, bulbación, metabolismo CAM y latencia de brotes (Hendricks y Siegelman, 1967). Asimismo, se han estudiado fenómenos microscópicos como son el control de entrada de metabolitos en núcleo (Gupta et al, 1982), control de síntesis mitocondrial (Bajracharya et al, 1976), cambios de potencial eléctrico membranal (Jaffe, 1968; Racusen, 1976), control de la síntesis de RNA mensajero (Weidner y Mohr, 1967a; 1967b; Jaffe, 1969), síntesis y control de enzimas específicas --

(Bradbeer, 1973; Schopfer, 1977), protección contra radiaciones - UV (Wellman, 1976), control de transporte iónico (Kohler, 1969), etc.

El desarrollo de este trabajo tiene como objetivo la revisión de los experimentos realizados a la fecha sobre el papel que el sistema fitocromo juega en el mecanismo de la germinación y el análisis de las evidencias e hipótesis del mecanismo de acción en este proceso del pigmento. Para esto se hace necesaria la revisión de las características físicas y químicas de esta molécula, de sus propiedades dinámicas (i.e. estudios de transformación, --destrucción, síntesis, etc.) y la descripción de los fenómenos relevantes del proceso de la germinación.

CAPITULO II

FITOCROMO: LA MOLECULA

2.1 CARACTERIZACION FISICA Y QUIMICA

La diversidad de técnicas usadas en los laboratorios de investigación acerca de las propiedades fisicoquímicas del fitocromo han arrojado grandes diferencias en los resultados obtenidos, sobre todo en cuanto a peso molecular, estructura y número de cromóforos, subunidades constituyentes, etc.

En la estimación del peso molecular del fitocromo, el principal obstáculo a superar es la existencia de enzimas proteolíticas que degradan esta proteína en la manipulación para su aislamiento y purificación. Este problema ha originado una serie de reportes acerca del peso molecular del complejo tan amplia como diversa; - en la actualidad se ha generalizado el término de fitocromo degradado a aquella fracción obtenida en condiciones de proteólisis -- (Gardner et al, 1971; Cundiff y Pratt, 1973; 1975b; Fry y Mumford, 1971) en forma de unidades con resistencia a la degradación y asociación y con características de fotorreversibilidad de ca. --- 60 000 dalton.

El manejo de inhibidores de proteasas, así como el uso de -- técnicas más precisas y rápidas, ha permitido la separación y purificación de una forma más compleja de fitocromo, de aprox. --- 120 000 d (Cordonnier y Pratt, 1982; Hunt y Pratt, 1979; Rice y Briggs, 1973; Bolton y Pratt, 1980) cuya proteólisis limitada produce la forma degradada de 60 000 d (Cundiff y Pratt, 1975a; --- 1975b; Stocker et al, 1978; Grombein y Rüdiger, 1976). Kidd et al (1978) han concluido que el fitocromo no degradado de 120 000 d - contiene una subunidad proteica de 60 000 d idéntica a la forma - degradada y otra del mismo peso molecular y de estructura diferen

te a aquélla, de acuerdo a la evidencia inmunoquímica de Cundiff y Pratt (1975a; 1975b).

Es posible que el monómero de 120 000 dalton conocido como fitocromo no degradado carezca de 40 a 50 aminoácidos perdidos durante la proteólisis en la extracción y purificación del fitocromo; ésto se encuentra basado en dos líneas de evidencia (Pratt, 1982): a) la extracción de fitocromo en la forma Pfr aparentemente menos lábil que Pr frente a endoproteasas, exhibe una movilidad electroforética menor que fitocromo no degradado (Boeshore y Pratt, 1981), consistente con un tamaño mayor de cerca de 5000 dalton, b) la síntesis de fitocromo in vitro a través de RNAm aislado de avena, que muestra la misma movilidad electroforética anterior. Esta molécula de 40 a 50 aminoácidos más que el fitocromo no degradado, es convertida, por breve almacenamiento a temperatura ambiente, en el fitocromo de 120 000 d, con lo que se concluye que la molécula denominada fitocromo no degradado es ligeramente menor que el fitocromo nativo.

La determinación de la estructura primaria del fitocromo no se ha realizado debido al alto número de aminoácidos (ca. 1100) que hace improbable su secuenciación. Se sabe que aproximadamente 46% de los aminoácidos que forman el monómero de 120 000 d son polares (Pratt, 1982), consistente con la idea de una proteína globular, soluble en agua. Correll et al (1968) reportaron cierta composición de aminoácidos de fitocromo con un peso molecular de 42 000 carente de restos de cisteína; este trabajo ha sido refutado por Briggs y Rice (1972) quienes reportaron la presencia de al menos 11 cistinas por cada unidad de 60 000 d, así como alta proporción de treonina y serina que contribuyen a la alta reactivi-

dad de la proteína.

Aunque el primer intento en la determinación de carbohidratos en fitocromo arrojó resultados positivos (Roux et al., 1975) de -- ca. 4% por peso, reportes posteriores niegan la presencia de estos compuestos en fitocromo (Boeshore y Pratt, 1981; Keegstra y Quail, com. pers. a Pratt, 1982). En contraparte, la determinación de fosfatos ha sido claramente establecida (Pratt, 1982) en una molécula por monómero.

La estructura secundaria de la proteína ha sido determinada -- por métodos de dicroísmo circular en el intervalo de 190-250 nm. -- Los resultados de Tobin y Briggs (1973) son, para el fitocromo no degradado, 17% de alfa-hélice, que concuerda con los resultados de Chen et al (1972) de 20% de esta estructura; 50±10% de enrollamiento al azar y 30% de estructura beta.

La estructura terciaria es globular, aunque no esférica. La -- estructura cuaternaria de fitocromo es dimérica, apareciendo en -- las fotomicrografías electrónicas como material amorfo y como lo -- sugieren los trabajos de Kidd et al (1978) en cuanto a la presen-- cia de dos monómeros asimétricos (uno de los cuales contiene el -- cromóforo) y a la determinación de los aminoácidos N-terminales -- por el método de Sanger (Briggs y Rice, 1972) que mostraron la pre-- sencia de glutamato y aspartato.

La evidencia disponible (Kidd et al, 1978; Siegelman y Firer, 1964) señala la presencia de un cromóforo por cada unidad de --- 120 000 d; aunque Brandlmeier et al (1981) han reportado, por com-- paración de absortividades molares de fitocromobilín-péptidos y fi-- tocromo nativo (Pr), la presencia de una fitocromobilina por cada 60 000 d, se puede suponer que no se excluye la posibilidad que es

tos resultados se interpreten en el sentido de un cromóforo en un monómero del sistema proteico y es casi aceptada en la actualidad la existencia de un cromóforo por unidad de 120 000 dalton, a la luz del conjunto de resultados (Pratt, 1982).

La estructura del cromóforo fue propuesta a partir de la analogía observada en la extracción y comportamientos espectral y -- cromatográfico de los cromóforos de las ficocianinas (Hendricks y Siegelman, 1967) y el cromóforo del fitocromo. La figura II.1.1 - muestra los espectros de absorción de ficocianobilina y fitocromobilina, respectivamente.

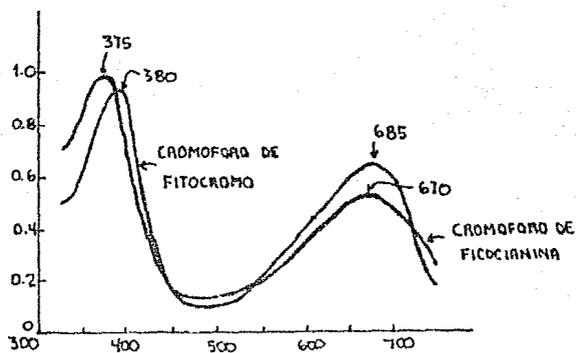
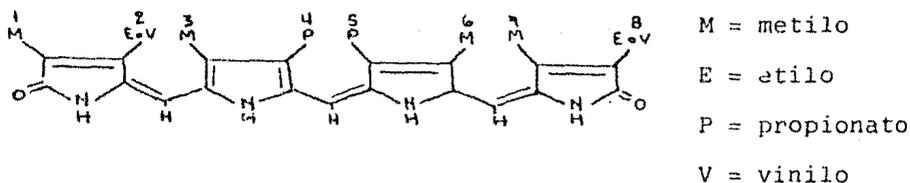


Figura II.1.1. Espectro de absorción de ficocianobilina y fitocromobilina (tomado de Hendricks y Siegelman, 1967).

La señal de un máximo de absorción en 650-660 nm indica una estructura de bilitrieno. La figura II.1.2 muestra las semejanzas y diferencias entre las ficocianobilinas y la fitocromobilina.

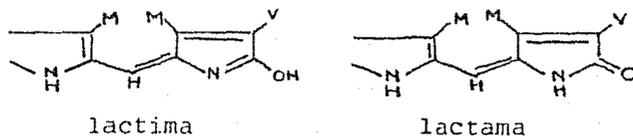


glucobilina, mesobiliverdina = bilitrieno-2,8-E

biliverdina, fitocromobilina = bilitrieno-2,8-V

Figura II.1.2. Analogía entre las estructuras de los cromóforos - de las ficocianinas, ficocianobilinas, y el de fitocromo, fitocromobilina. El esqueleto tetrapirrólico lineal común corresponde a la estructura denominada bilitrieno.

En base al desplazamiento en la longitud de onda máxima de absorción (λ máx) a 725 nm en la transferencia de Pr hacia Pfr, Hendricks y Siegelman (1967) propusieron cierto tipo de isomerización del cromóforo con el consecuente cambio en la conformación proteica del fitocromo; dicha isomerización se llevaría a cabo a través de cambios lactima-lactama en los centros nitrogenados de los anillos exteriores:



Los estudios en ficocianobilinas y su forma de enlace a ficocianina por resonancia magnética nuclear (NMR), condujeron a Crespi et al (1968) a la proposición de un modelo para el cromóforo - del fitocromo, en el que el enlace a la proteína se llevaría a cabo a través de un grupo etilideno, covalentemente unido al enla-

ce peptídico; la coplanaridad entre la bilina y el enlace C-N peptídico conducirían, a la absorción de luz, a un complejo de transferencia de carga, tal como se muestra en la figura II.1.3 (FR). El desplazamiento de la λ máx en la transferencia $Pr \longrightarrow Pfr$ fue explicado por estos autores en base a dos contribuciones, --

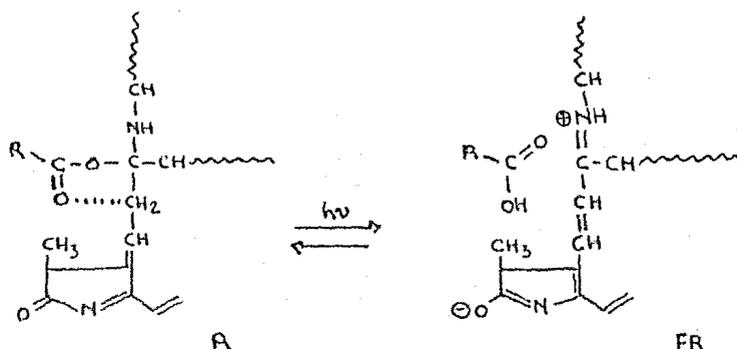


Figura II.1.3. Modelo del cromóforo de fitocromo en cuanto al grupo que se enlaza a la proteína, forma de enlace y fototransformación propuesto por Crespi et al (1968).

la formación de un complejo metaestable (λ máx 700 nm) y cambios conformacionales proteicos resultando la forma final, Pfr (λ máx 724 nm).

La estructura propuesta -y modelo más aceptado en la actualidad- por Rüdiger (en Briggs y Rice, 1972) basada en estudios de degradación química, señala la unión de la fitocromobilina a través del grupo propionato del tercer anillo y un reacomodo electrónico con migración protónica en la transformación ácido-base inducida. El modelo propuesto por este autor se esquematiza en la figura II.1.4. El desplazamiento en λ máx de Pfr con respecto a Pr fue interpretado como debido a la nueva estructura electrónica y a los cambios conformacionales proteicos procedentes de la ---

atracción electrostática cromoproteica.

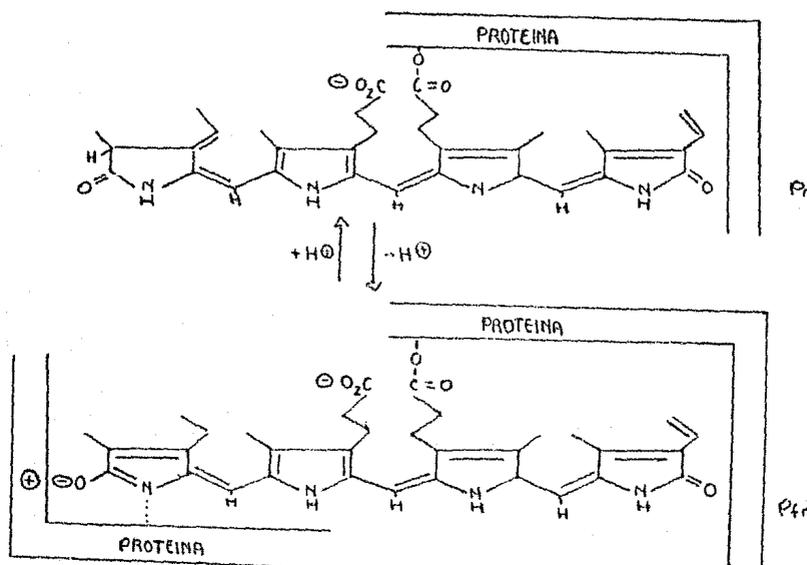


Figura II.1.4. Estructura del cromóforo del fitocromo propuesta por Rüdiger. La transformación ácido-base inducida fue tomada de base para la fototransformación del fitocromo (tomado de Briggs y Rice, 1972).

Fry y Mumford (1971) han aislado y estudiado la secuencia de aminoácidos unida al cromóforo por tratamiento de la cromoproteína con tripsina. Los resultados de estos autores indican que el tetrapirrol de fitocromo está enlazado covalentemente a un péptido de la siguiente secuencia: leucina-arginina-alanina-prolina-histidina-(serina, cisteína)¹-histidina-leucina-glutamina-tirosina. La obtención de cisteína se reportó en baja proporción; los autores suponen que esto es debido a que el cromóforo se encuen-

¹Orden no resuelto.

tra unido covalentemente al péptido por un enlace tioéter de este aminoácido con una lateral vinílica de la fitocromobilina. Esta observación está de acuerdo con el trabajo de Butler et al (1964) con agentes desnaturalizantes de fitocromo, al establecer la presencia de grupo (s) sulfhidrilo íntimamente ligado (s) al cromóforo, especialmente en la forma fr.

Como se mencionó atrás, una caracterización típica del fitocromo en sus dos formas, es a través de su espectro de absorción. Esta muestra, en adición a las dos bandas máximas en R y FR, bandas menores en el azul y UV cercano. El fitocromo en forma r purificado posee una longitud de onda máxima de absorción en 665 y 375 nm. mientras que la forma fr muestra λ máx en 725 y 390 -- (Hendricks y Siegelman, 1967). Además de éstas, se observa un máximo en 280 nm, absorción típica de proteínas, debida a la absorción de los aminoácidos aromáticos. El espectro de absorción para fitocromo purificado se muestra en la figura II.1.5. Es importante observar, en esta figura, que la irradiación con luz roja -- de una solución de fitocromo produce un espectro de absorción que

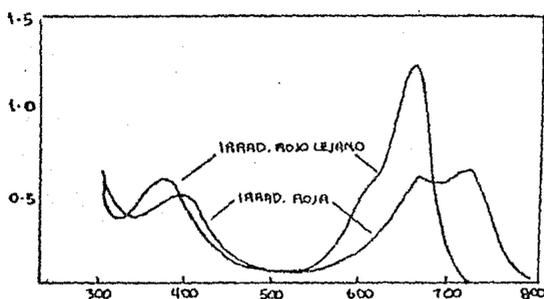


Figura II.1.5. Espectro de absorción de fitocromo purificado (Tomado de Butler et al, 1964).

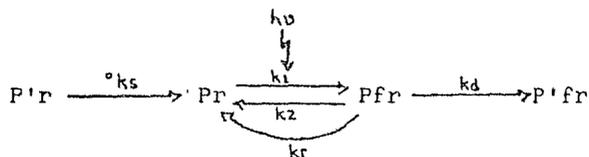
no se anula en el intervalo de 660 nm y alrededores, mientras que la irradiación de dicha solución con luz FR implica la desaparición de la absorción en 725 nm. Esto indica que la totalidad de Pfr es convertida en Pr ante la irradiación con luz FR, mientras que al irradiar Pr con R, una cierta proporción de P_{tot} se mantendrá como Pr en el estado fotoestacionario, que consiste de ca. 81% Pfr y 19% Pr (Butler et al, 1964).

El espectro de absorción para Pfr muestra -en general- cierto desplazamiento en la longitud de onda máxima de fitocromo degradado con respecto al fitocromo nativo (in vivo); Rice y Briggs (1973) han reportado un cambio de λ máx de 730 a 725 nm de Pfr -de 120 000 d frente a la degradación proteolítica hacia fitocromo de 60 000; el mismo desplazamiento ha sido observado en las observaciones espectrofotométricas de Everett y Briggs (1970) y Kendrick y Roth-Bejarano (1978) de Pfr in vivo e in vitro.

2.2 TRANSFORMACION

En los organismos superiores, la regulación del nivel de muchas proteínas funcionales se realiza a través de la combinación de los procesos de síntesis y degradación (Filner et al, 1969); -aparentemente, la regulación de los niveles de fitocromo en los -vegetales sigue tal mecanismo de regulación (Quail et al, 1973b); en el estudio de la regulación celular de este pigmento intervienen, principalmente, la existencia de ambas formas moleculares -- (Pr y Pfr), el hecho que el pigmento se sintetiza en la forma Pr y es degradado a partir de fitocromo fr y la dependencia que las partes del sistema individualmente y en su conjunto posean respec

to a la energía radiante a diferentes longitudes de onda. El sistema modelo en tal estudio ha sido propuesto por Schäfer et al -- (1972):



donde $\text{P}'\text{r} \xrightarrow{\text{}^{\circ}\text{k}_s} \text{Pr}$ representa la síntesis de novo; $\text{Pr} \xrightleftharpoons[\text{k}_2]{\text{k}_1} \text{Pfr}$ las reacciones luminosas; $\text{Pfr} \xrightarrow{\text{k}_d} \text{P}'\text{fr}$ la degradación y $\text{Pfr} \xrightarrow{\text{k}_r} \text{Pr}$ la reversión oscura.

La síntesis de novo del fitocromo se lleva a cabo durante el desarrollo de la semilla (Correll et al, 1968) con una cinética - de orden cero (Schäfer et al, 1972) hasta alcanzar un nivel de fi tocromo total (P_{tot}) constante. Durante crecimiento en presencia de luz y deetiología, la cantidad de P_{tot} decrece por debajo de cierto nivel crítico y la síntesis de novo se reinicia, siendo la velocidad de dicha síntesis independiente del tratamiento lumino- so empleado (Quail et al, 1973a, 1973b). Sin embargo, la síntesis nueva no es detenida cuando se han alcanzado los niveles de P_{tot} normales: el mecanismo regulatorio implica también la interconver- sión $\text{Pr} \rightleftharpoons \text{Pfr}$ de primer orden en ambos sentidos (Butler et al, 1964; Schmidt et al, 1973), la reversión oscura de primer orden $\text{Pfr} \rightarrow \text{Pr}$ (Marmé et al, 1971) y la destrucción de la forma Pfr - de primer orden (Marmé et al, 1971; Schäfer et al, 1972; Schäfer et al, 1973): La regulación de los niveles de fitocromo se reali- za contra la síntesis continua de orden cero y, bajo irradiación continua, conduce al estado fotoestacionario, con P_{tot} determina- do por la intensidad de luz incidente. (Schäfer y Mohr, 1974): en

el caso de plántulas etioladas, en las que Pfr se encuentra ausente, el establecimiento del estado fotoestacionario dependerá de la longitud de onda usada y determinará la proporción de las formas Pr y Pfr en ciclación (Butler et al, 1964). De esta manera, el concepto de fitocromo es el de aquel sistema dinámico en el que el fotorreceptor mismo regula sus niveles en respuesta a la presencia de luz, su ausencia y calidad.

La reversión oscura ha sido observada en dicotiledóneas tanto in vitro (Mumford, 1966; Taylor, 1968) como in vivo (Hillman, 1967) con una cinética de reacción de primer orden.² Este fenómeno ha contribuido a explicar la mayor estabilidad termodinámica de Pr con respecto a Pfr, aunque se ha reportado una reversión oscura inversa Pr \rightarrow Pfr in vitro (Augusto et al, 1978) a través de la transferencia energética de acetona en triplete hacia fitocromo en estado basal, originando, de Pr, la forma Pfr y viceversa; e in vivo en semillas en imbibición (Boisard, 1969; Kendrick et al, 1969; Spruit y Mancinelli, 1969). Aparentemente, un entorno reductor favorece la reversión oscura de Pfr (Mumford y Jenner, 1971); ditionita, NADH y ferredoxina incrementan drásticamente la velocidad de reversión inversa.

Se ha observado que la reversión oscura se encuentra íntimamente ligada al proceso de destrucción de Pfr. En dicotiledóneas, la desaparición de Ptot bajo continua irradiación es de primer orden, independiente de la intensidad de luz incidida y la velocidad es proporcional al estado fotoestacionario Ψ_{λ} establecido -

² Aunque se han observado cinéticas de reversión más complejas, en general, una fase rápida seguida de otra lenta (Taylor, 1968) ambas de primer orden.

(Kendrick y Frankland, 1968); en algunas semillas, la cinética de primer orden es antecedida por un período de reposo de corta duración en el cual la reversión oscura ocurre rápidamente (Mc Arthur y Briggs, 1971). Schäfer y Schmidt (1974) encontraron, asimismo, - que después de la saturación con R la cinética de destrucción sigue primer orden; la reversión es mayor que destrucción aunque absolutamente limitada, permitiendo el agotamiento de Pfr a través del proceso de destrucción. En las semillas monocotiledóneas, donde no se lleva a cabo la reversión oscura, la velocidad de destrucción de Ptot bajo irradiación continua es independiente de la longitud de onda empleada y semejante a la observada en dicotiledóneas (Butler y Lane, 1965). Bajo éstas y otras evidencias, Marmé et al (1971) han propuesto la existencia de dos "almacenes" de Pfr, cada uno de los cuales seguiría la reversión y degradación respectivamente; además sugirieron que la canalización de esta forma molecular a cada vía es inducida por la luz. El modelo de la figura II.2.1 muestra esquemáticamente el modelo anterior.

Los trabajos de Schäfer y Schmidt (1974a) demostraron que la canalización hacia ambas reacciones -destrucción y reversión oscura- son parte de un fenómeno post-fotoreaccionario, i.e. ocurre en la obscuridad después de un pulso en R, en concordancia con la hipótesis de Marmé et al (1971).

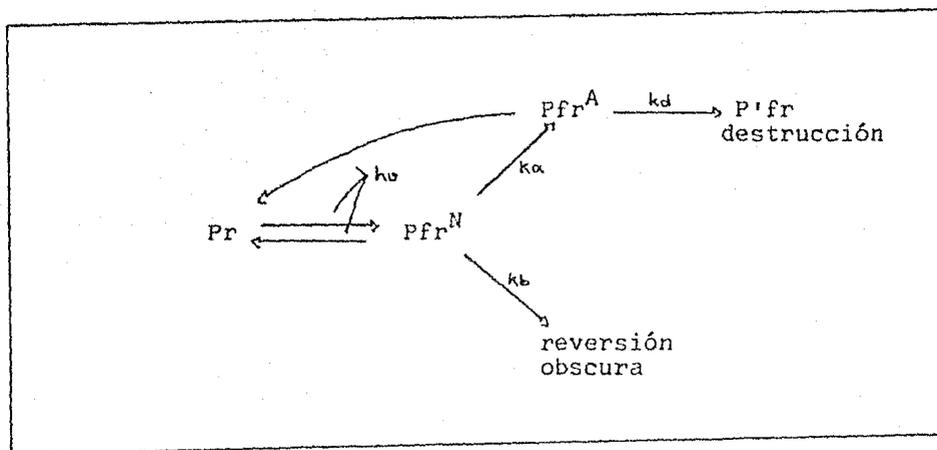


Figura II.2.1. Esquema de la cinética de reacción de fitocromo in vivo. Pfr^N = almacén de fitocromo en forma fr cuya desaparición - en oscuridad involucra tanto la reversión oscura con constante k_b como al almacén de degradación, con k_a ; Pfr^A = fitocromo aún - detectable canalizado hacia degradación, no sufre reversión oscura; P'fr = producto de degradación no detectable. (Tomado de Schäfer y Schmidt, 1974a).

Kendrick y Frankland (1968) mostraron que la constante de velocidad de destrucción de Pfr, k_d , es independiente del estado fotoestacionario establecido; Schmidt y Schäfer (1974b) observaron que la dependencia en el estado fotoestacionario se realiza en la razón k_b/k_a (reversión oscura/primer paso de destrucción); observaron que a valores bajos de Φ_λ , k_a y k_b aumentan al aumentar los estados fotoestacionarios, lo que indica un comportamiento -- cooperativo entre ambas reacciones, mientras que a estados Φ_λ -- mayores de 0.5 k_a y k_b decrecen al aumentar el valor de Φ_λ .

La dependencia de k_a y k_b con la temperatura (Schäfer y Schmidt, 1974) ha sido resuelta en dos componentes lineales con un cambio de pendiente en ca. 20° C (Figura II.2.2) donde la pendiente del gráfico indica la diferencia entre las energías de activa-

ción de Arrhenius para k_a y k_b ; el cambio en la pendiente a 20° -- indica un salto en la energía de activación para k_a y/o k_b . Se ha observado, asimismo, la independencia de k_d con la temperatura -- (Schäfer y Schmidt, 1974).

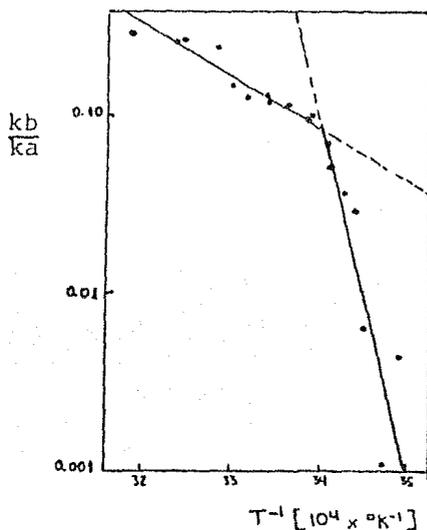
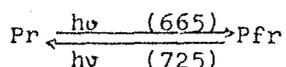


Figura II.2.2. Gráfica semilogarítmica de k_b/k_a contra el recíproco de la temperatura absoluta (tomado de Schäfer y Schmidt, 1974).

El análisis de la cinética de destrucción de la forma Pfr -- muestra a su vez dos fases (Brockmann y Schäfer, 1982), una rápida de primer orden seguida de otra mucho más lenta frente a un -- tratamiento pulsar con luz roja seguido de obscuridad. Un segundo pulso con R es seguido de la destrucción rápida del Pfr formado, mientras que aquella población de Pfr mantenida desde el primer -- pulso no es degradada. Esto implica que existen dos tipos de Pfr: aquél susceptible a degradación y otro que de alguna forma es protegido de este proceso. La existencia de una reacción rápida in--tercalada entre la fotorreacción y degradación (Schäfer et al, --

1976), que consistiría en la asociación de Pfr a algún sitio receptor podría contribuir a explicar este fenómeno. Además, la idea puede ser apoyada en los resultados de la figura II.2.2, ya que se sabe que las transiciones de fase membranales inducidas por un cambio en la temperatura se asocian con saltos en la energía de activación de procesos que se llevan a cabo en membranas (Schäfer y Schmidt, 1974). Quail et al (1978) han dado la evidencia de asociación membranal de Pfr in vivo. Más adelante será discutida la relación de fitocromo con membranas y sus implicaciones.

Los estudios por fotólisis instantánea (flash) y disminución de temperatura han permitido cierto progreso en el conocimiento de la cinética de interconversión de las dos formas del sistema fitocromo, así como de los intermediarios en dicha conversión. Esto implica que la reacción



se lleva a cabo a través de una serie de eventos que involucran la etapa física de absorción de un quantum de energía luminosa ($10^{-17} - 10^{-15}$ seg) (Quail, 1976) y la formación de estados electrónicamente excitados con tiempos de vida adecuados para permitir rearrreglos configuracionales atómicos que, secuencial y paralelamente, a través de diferentes compuestos intermediarios, conducen al producto final. Linschitz et al (1966) observaron por fotólisis instantánea que la transformación $\text{Pr} \xrightarrow{h\nu} \text{Pfr}$ a 0°C se lleva a cabo en un intervalo de 0.1 mseg a 5 seg después del flash, mientras que la reacción inversa $\text{Pfr} \xrightarrow{h\nu} \text{Pr}$ se observó en el intervalo de 0.1 a 10 mseg. Asimismo, los autores pudieron

detectar una serie de intermediarios en ambas reacciones, ninguno común a cada conversión. Pratt y Butler (1970) lograron, a través de estabilización de los intermediarios de las fototransformaciones de fitocromo a baja temperatura (+5 a -25°C) completar el esquema de conversión de Pr en Pfr, por lo que los modelos de transformación en cada sentido serían los mostrados en la figura II.2.3. En ambas fototransformaciones, Pr^* y Pfr^* serían los únicos intermediarios energéticamente excitados.

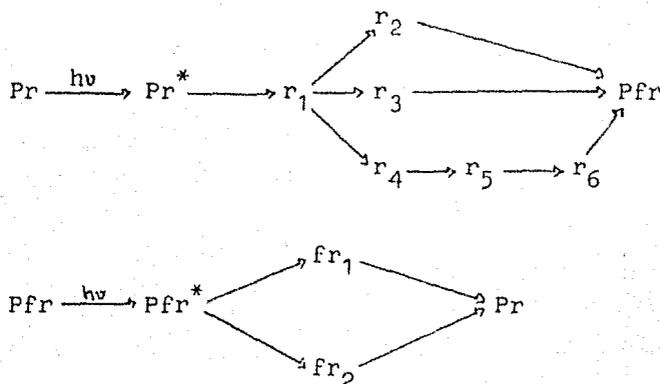


Figura II.2.3. Esquemas de fototransformación de fitocromo planteados por Linschitz et al (1966) y Pratt y Butler (1970). La cinética de cada reacción determinada por las constantes de velocidad, k_i , son de primer orden.

El modelo de fototransformación arriba esquematizado ha sido corroborado por medio de la estabilización de los intermediarios en ambas conversiones de fitocromo hasta -100°C (Pratt y Butler, 1968) y -19°C in vivo (Kendrick y Spruit, 1973) a través de la caracterización de algunos intermediarios. Además, Pratt y Butler -

(1970) determinaron entropías, entalpías y energías libres de activación para cada reacción; las entropías de activación resultaron todas positivas, siendo la mayor de 25 ue. Esto condujo a la sugerencia que las fototransformaciones entre Pr y Pfr consisten de procesos de relajación empezando con el intermediario producido inmediatamente de la absorción de un quantum de luz y terminando con Pr o Pfr y que el bajo valor de ΔS^* indica que no existirían cambios conformacionales proteicos durante las fototransformaciones.

Los estudios de dicroísmo circular de fitocromo se han adoptado como medios eficientes para la determinación de posibles cambios conformacionales proteicos. La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) efectuada por Hopkins y Butler (1970) entre 200 y 300 nm evidenciaron una diferencia entre los espectros de Pr y Pfr a 285 nm, donde la forma Pr muestra una banda negativa ausente en Pfr; ésto se encuentra en cierta medida de acuerdo con los espectros CD de Anderson et al (1970) donde la depresión se observó a 283 nm y para Pfr una banda adicional en 302 nm. Estos autores sugirieron que dichas diferencias indican cambios conformacionales en la vecindad de los residuos de aminoácidos aromáticos, aunque Tobin y Briggs (1973) afirman que el cromóforo absorbe considerablemente en la región estudiada (260-300 nm), siendo ésta, a 280 nm, hasta el 38% de la absorción total de la molécula. Estos autores concluyen que el cambio en el espectro UV de ambas especies de fitocromo no involucran cambios significativos en la conformación proteica, correspondiendo probablemente a a) los cambios en el cromóforo que originan a su vez cambios en los restos de tirosina y/o triptofano y cisteína vecinos a éste a través de

las diferencias de distribución de carga alrededor de estos residuos y/o b) la acción de encubrimiento o exposición de dichos aminoácidos provocada por la conversión de fitocromo en una u otra forma. Un apoyo a dichas observaciones, se ha dado a través de -- los trabajos de Song et al (1982), que observaron la fototransformación de fitocromo a través de los espectros de resonancia magnética nuclear protónica, sin encontrar diferencia en los H alifáticos de ambas formas (Pr y Pfr); sin embargo, el espectro de los H aromáticos y de la región de resonancia protónica -NH- cambian significativamente entre ambas formas de fitocromo. Además, Sarkar y Song (1982) sugieren, por luminiscencia de los residuos de triptofano, que el aumento en la fosforescencia de la forma fr se interpretaría en la base de la reorientación del cromóforo sobre la superficie proteica como resultado de la transformación Pr → Pfr, afirmando, además, la exposición preferencial de los residuos de trip en la forma Pfr, en concordancia con la hipótesis "b" de Tobin y Briggs (1973).

CAPITULO III

GERMINACION

3.1 INTRODUCCION

La semilla se ha definido como "el embrión latente rodeado - por un endospermo más o menos bien desarrollado y una cubierta" - (Hess, 1975); es un sistema vivo en reposo o estado de latencia, ya que sus procesos metabólicos se llevan a cabo muy lentamente o se encuentran detenidos.

Potencialmente posee la información genética necesaria para desarrollar, en condiciones espacio-temporales dadas, una plántula que manifestará las características fenotípicas de sus antecesores.

Estructuralmente, la semilla se encuentra constituida de tal manera que permite la existencia de solamente los medios necesarios para la germinación; estos medios son estructuras específicas que contienen material de reserva que será la fuente de nutrientes durante el desarrollo del eje embrionario. La calidad de las sustancias de reserva de las semillas se determina genéticamente, mientras que en la proporción de las diversas sustancias de reserva intervienen factores de tipo ambiental, principalmente climático;¹ de esta manera, la principal fuente energética de gran parte de las semillas angiospermas (entre ellas leguminosas, gramíneas, cereales, etc.) se encuentra como carbohidratos, pri--

¹ Debe recordarse que la especificidad genética surge como una -- adaptación, manifestada evolutivamente, a las condiciones externas (ambiente) e internas (existencia de material hereditario -- -DNA- y sus implicaciones) de las semillas, de tal manera que -- la resultante (en este caso el control de la cantidad y calidad de nutrientes de reserva) surge como una compleja combinación -- de los factores mencionados.

mordialmente almidón,² localizado en los cotiledones y en la porción "almidonosa" del endospermo, en cuerpos limitados denominados amiloplastos (Jacobsen et al., 1979). Por otro lado, las semillas de oleaginosas almacenan principalmente lípidos, en forma de triacilglicéridos³ en los esferosomas de las células del endospermo.

La reserva proteica en las semillas de las plantas superiores es mucho más compleja en cuanto a su función en la germinación que las anteriores, ya que tiene la finalidad de crear a) -- una fuente de nitrógeno para los nutrientes formados de novo durante el desarrollo embrionario,⁴ b) la maquinaria enzimática clave que, en forma de zimógenos, será activada en las primeras fases de la germinación y c) una fuente energética alternativa. Las proteínas son almacenadas en organelos denominados cuerpos proteicos. Muchas proteínas se depositan y almacenan en forma de glucoproteínas (Derbyshire et al., 1976; Ericson y Chrispeels, 1973). Asimismo, se han encontrado proteínas de almacén en forma de complejos, principalmente con fitatos de calcio y magnesio (Jacobsen et al., 1979) que constituyen la mayor forma de almacén de fosfato. Entre otros componentes importantes en el almacén de las semi

² Polímero complejo formado por dos tipos de cadenas glucosadas: amilosa, en la que las subunidades de glucosa se unen por enlaces alfa (1-4), formando una estructura lineal; y amilopectina, en la que los enlaces son de tipo alfa (1-4) y alfa (1-6) formando un polímero en forma de red. La proporción -- amilosa/amilopectina en semillas de cebada es de 20-30/80-70 (Briggs, 1973).

³ Los triacilglicéridos son las moléculas resultantes de la esterificación de glicerol con ácidos grasos, generalmente insaturados. Naturalmente los ácidos grasos esterificados más abundantes son oleico, linoleico y linolénico; en menor proporción --entre saturados e insaturados-- se encuentran acético, --butírico, palmítico, esteárico, láurico y mirístico (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

⁴ Esta finalidad puede explicar el alto contenido de prolina en las proteínas de almacén (Brohult y Sanderyren, 1954; Circle, 1950).

llas se encuentran nucleótidos, azúcares fosforados, fosfolípidos y nucleoproteínas.

La anatomía de la semilla es variable dependiendo de la especie vegetal que se trate. La forma estructural de una semilla generalizada se esquematiza en la figura III.1.1. El embrión es el cigoto desarrollado, producto de la fusión de las células germinales masculina y femenina de las plantas superiores o angiospermas.

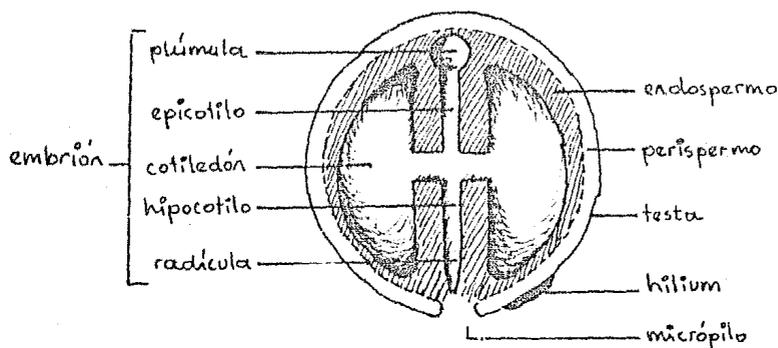


Figura III.1.1. Estructura generalizada de la semilla (tomado de Strafford, 1979).

Este sistema embrionario se desarrollará, en condiciones óptimas a expensas del material de reserva de la semilla, por división celular, elongación y diferenciación, dando lugar a una nueva planta. El embrión consiste de plúmula, que dará lugar al tallo y las hojas; epicotilo, cotiledones y radícula o primordio de raíz, comunicada a la plúmula por el hipocotilo. Las semillas pueden ser mono, di y policotiledóneas dependiendo del número de cotiledones que posean, determinado por la especie. Los materiales de reserva generalmente se encuentran almacenados en el endospermo, aunque -

en algunas especies dicha reserva puede encontrarse en los cotiledones. El endospermo es originado por la fusión triple de dos núcleos polares femeninos con un núcleo espermático, dando origen a un tejido triploide. Asimismo, se pueden observar diferentes grados de ploidia dependiendo de la región endospermica (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

La testa es la cubierta exterior de la semilla y se desarrolla de los integumentos del óvulo. La apertura inicial de éstos - para la entrada del tubo polínico origina el micrópilo. El hilum es la parte por la cual el óvulo se conectaba originalmente a la pared del ovario. Por último, el perispermo es un derivado del tejido parental del esporofito, formado a partir del nucelo (Stratford, 1979).

La germinación de las semillas de plantas superiores es un - proceso difícil de conceptualizar; Mayer y Pojakoff-Mayber (1975) lo definen como "el consecutivo número de pasos que causa que una semilla quiescente,⁵ con un bajo contenido de agua, muestre un --

⁵ Cabe definir aquí los términos de quiescencia y latencia, así como sus diferencias; quiescencia es la suspensión del crecimiento impuesta por condiciones ambientales adversas, es decir, una semilla quiescente será capaz de germinar cuando las condiciones del exterior sean óptimas. La latencia ha sido descrita como "la suspensión del crecimiento debida a una inhibición endógena activa" (Jann y Amen, 1980), de tal forma que una semilla latente en un medio favorable para su germinación será incapaz de realizarla, debido a las restricciones intrínsecas de ella misma. Estas condiciones son mecanismos de "defensa" para la semilla en el sentido que ésta germinara en condiciones externas que arriesgaran su existencia durante la germinación o el crecimiento. Los mecanismos inhibitorios de la semilla latente son principalmente a) inmadurez embrionaria, b) impermeabilidad de la cubierta de la semilla hacia agua y/o gases, c) necesidad de deshidratación, d) existencia de químicos inhibidores en la semilla (v.g. fitohormonas). En la semilla latente puede inducirse la germinación por la acción de ciertos agentes: disrupción mecánica, biológica o química de la cubierta de la semilla, estratificación, tratamientos luminosos, etc. En realidad el estudio del fenómeno de la latencia es un proceso complicado, debido a que los factores involucrados pueden formar combinaciones entre sí cuya acción puede dar un resultado excluyente, aditivo, etc., dependiendo de la especie que se trate sin excluir el medio externo.

aumento en su actividad metabólica general e inicie la formación de una plántula a partir del embrión"; Jann y Amen (1980) definen la germinación en tres niveles celulares: "Morfológicamente, germinación es la transformación de un embrión en una plántula. Fisiológicamente, germinación es la reanudación del metabolismo y crecimiento, los cuales fueron anteriormente deprimidos o suspendidos y la conexión de transcripción del genoma. Bioquímicamente, germinación es la diferenciación secuencial de rutas oxidativas y sintéticas". Los mismos autores simplifican la definición de tres niveles: "...germinación es la conducción del eje embrionario a un estadio que fue temporalmente suspendido durante latencia, y la iniciación de nuevos programas genéticos...". La dificultad en la definición de germinación, más que describir los procesos que se llevan a cabo en ella, reside en la especificación de los momentos de inicio y fin de ella: germinación se inicia por la incorporación en gran escala de agua (imbibición) por la semilla, y siendo éste un proceso físico, puede ser realizado por semillas no germinables; asimismo, de acuerdo a la definición de Mayer y Poljakoff-Mayber y Jann y Amen, involucra la formación de una plántula, mientras otros autores (Bewley, 1979; Hess, 1975; Jacobsen et al., 1976) indican el fin de la germinación por la protrusión de la radícula de la cubierta de la semilla. Especialmente, Bewley sostiene que cualquier evento posterior al mencionado, se asocia como proceso de crecimiento y no de germinación. En este trabajo se tratará la semilla en germinación desde el momento de incorporación acuosa por la semilla (imbibición) hasta el punto en que la radícula emerge de la cubierta de la misma.

En la existencia de la semilla, se realizan una serie de ---

eventos espacio-temporales determinados por factores intrínsecos de la misma (maduración embrionaria, existencia de nutrientes e -inhibidores, etc.) y externos a ella (condiciones de humedad, temperatura, luz, oxígeno, etc.) cuyas interacciones llevan al evento final denominado germinabilidad de la semilla. Este evento que determina la germinación no es al azar, está definido por las condiciones óptimas tanto del sistema semilla como del entorno, y la capacidad de la semilla para sobrevivir hasta la llegada de este estadio, es una de las adaptaciones más importantes de los organismos vegetales para llevar a cabo su propagación.

3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION

Como se mencionó anteriormente, existen una serie de factores cuya interacción favorece o impide la germinación de la semilla. Estos factores pueden ser externos o internos de ella. Los factores externos se denominan condiciones para la germinación.

3.2.1 Factores Externos.

Las condiciones para que se lleve a cabo la germinación de una semilla incluyen principalmente la disponibilidad de agua en el medio, temperatura adecuada a cada especie, una presión gaseosa determinada en la atmósfera y el requerimiento de luz para algunas especies vegetales.

3.2.1.1 Agua.

Agua es la *conditio sine qua non* (Hess, 1975); debido a que el proceso de incorporación acuosa es el primer paso en la germinación de una semilla, el requerimiento de agua es la variable -- primordial en el desarrollo embrionario. La incorporación de agua por la semilla deshidratada recibe el nombre de imbibición, llevándose a cabo a través de la testa y el micrópilo. Es dependiente de la composición de la semilla, la permeabilidad de la testa al agua y la disponibilidad de la misma en el medio (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

Debido a que la semilla se encuentra constituida en gran cantidad por proteínas que contienen grupos hidrofílicos (i.e. los grupos R laterales de los aminoácidos que las componen, así como las uniones peptídicas susceptibles de formar enlaces hidrógeno - con agua) exteriores, el proceso de la hidratación de la semilla puede ser asociado con la formación de geles coloidales, donde -- las moléculas de agua se acomodan en los intersticios micelares,⁶ solvatando aquellas moléculas afines; debido a las dimensiones de los conglomerados proteicos, que muestran una gran superficie en un volumen pequeño, la hidratación trae como consecuencia el hinchamiento de los sólidos de la semilla; el hinchamiento de ésta -- conduce a la formación de altas presiones de imbibición, que ocasionan la ruptura de la testa, además que aseguran espacio en el suelo para la futura plántula.

⁶ Durante las primeras fases de la imbibición, se ha observado desprendimiento de calor por el sistema semilla-agua. Esto ha sido interpretado en base a la absorción de agua por los sólidos de la semilla, que reduce la energía cinética de las moléculas de agua en su componente translacional (Jirgensons, -- 1958).

Los componentes de la semilla que intervienen primordialmente en la formación de las dispersiones coloidales son las proteínas. Participan en menor proporción los componentes celulósicos y pécticos. El hinchamiento de almidón sólo se lleva a cabo en pH ácido, por lo que, a pesar de su relativa abundancia en la semilla, no contribuye significativamente al hinchamiento de la semilla.

Aunque la imbibición es un proceso físico que se lleva a cabo tanto en semillas viables como en aquellas que han sido dañadas, se encuentra íntimamente asociada a procesos metabólicos importantes, v.g. la síntesis de RNAm en los primeros 30 min de imbibición en semillas de trigo y centeno (Sen et al., 1975; Spiegel et al., 1975).

3.2.1.2 Temperatura.

La temperatura es un parámetro importante en la germinación de las semillas. En la medida que se encuentra directamente asociada a la energía cinética de las moléculas, determinará los cambios conformacionales de las mismas en la semilla, así como su estabilidad. Esto adquiere importancia en el hecho que la actividad enzimática es función de la configuración espacial del conglomerado proteico: temperaturas bajas implican poca movilidad molecular, lo que quiere decir que existen pocas probabilidades que una enzima dada adquiriera la configuración óptima con respecto al sustrato. En el otro extremo, temperaturas altas conllevan la desnaturalización proteica (Laboriau, 1972). Otro efecto de temperatura puede ser tratado desde el punto de vista de comportamiento membranar -

(Koller, 1972); se ha postulado (Taylorson y Hendricks, 1971) que la inducción de germinación por la temperatura se puede interpretar en cambios en la permeabilidad membranal, remoción de inhibidores y los cambios conformacionales proteicos.

Se han reportado valores de temperatura en la germinación de diferentes especies de semillas en tres rangos, mínimo, óptimo y máximo (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975), que dependen de la estabilidad y actividad en conjunto de las diferentes isoenzimas existentes en cada especie. Obviamente, los valores óptimos de germinación se encuentran a temperatura ambiente, de acuerdo a la zona donde cada especie se desarrolle. Existen algunas especies vegetales que requieren para su germinación valores alternados de temperatura (Cohen, 1958; Thompson, 1969), que se han relacionado con las variaciones diurno-nocturnas originadas naturalmente. La explicación a este fenómeno se ha dado como un efecto acumulativo, a nivel de cambios macromoleculares en la estructura de la semilla, más que a reacciones secuenciales durante germinación.

3.2.1.3 Gases.

Debido a que la germinación es un proceso que requiere gran cantidad de energía en forma principalmente de ATP (Atkinson, --- 1968) que se produce a través del proceso de transporte electrónico y fosforilación oxidativa en mitocondria (respiración aeróbica⁷), se implica la necesidad de un entorno gaseoso rico en oxígeno

⁷ Se ha observado que las fases iniciales de la germinación involucran la obtención de energía en forma anaeróbica (Bidwell, 1979) y que el consumo de oxígeno aumenta a medida que el proceso avanza con el tiempo.

no. Esto puede no ser la regla general, ya que ciertas especies vegetales, v.g. semillas de arroz, son capaces de germinar en un medio completamente acuoso (Hess, 1975) ya que poseen una maquinaria glucolítica bastante eficiente. Edwards (1973) ha mostrado -- que una presión de O_2 de 0.01 atm permite la germinación siempre y cuando no existan barreras en la cubierta de la semilla. Hay -- evidencias que indican que la totalidad de oxígeno incorporado a la semilla en germinación no es aprovechado en procesos respiratorios clásicos: una porción es canalizada para su participación en la vía pentosa fosfato (Hendricks y Taylorson, 1972; Heydecker, 1977; Bewley, 1979) principalmente para cubrir las deficiencias -- en la máquina respiratoria de las semillas latentes en germina---ción.

Un producto gaseoso de las oxidaciones biológicas, el dióxido de carbono (CO_2) es una sustancia capaz de inhibir la germinación, aunque esta capacidad se observa a presiones mayores que la atmosférica. En semillas que tienen una cubierta impermeable, la producción de CO_2 resulta un problema debido a las altas presio--nes interiores que genera este gas, adicionando a ésto su alta so--lubilidad en medio acuoso.

Una atmósfera rica en hidrógeno (H_2) es favorable para la -- germinación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975), aunque el mecanismo de su acción es aún desconocido. Etileno es otro gas que favorece la germinación, a través del rompimiento del estado de latencia, al menos en cereales y oleaginosas (Taylorson y Hendricks, 1979). Durante germinación se ha detectado la producción de este gas, an--tes de la emergencia de la radícula (Esashi y Leopold, 1969). La interacción de etileno con CO_2 , luz y giberelinas en el rompimien

to del estado de latencia ha sido objeto de investigación por varios autores (Olatoye y Hall, 1973; Negm et al, 1973; Katob y Esashi, 1975; Bewley, 1979).

3.2.1.4 Luz.

El efecto de la radiación electromagnética en la porción del visible sobre germinación de las semillas ya había sido observado en las postrimerías del siglo pasado. Kinzel, en 1926, realizó una lista de cientos de vegetales afectados de alguna manera en su germinación por la luz, clasificando dichas especies en semillas que requieren luz para germinar, aquellas que requieren obscuridad para hacerlo y un tercer grupo cuyo comportamiento es indiferente a las dos condiciones.

La germinación dependiente de la luz en R es una evidencia típica de aquellas respuestas de inducción-reversión (LIR). La pulsación en R de semillas en imbibición promueve la germinación de una amplia gama de semillas, entre las cuales *Lactuca sativa* (var. Grand Rapids) corresponde al sistema modelo en estos estudios, mientras que la reversión del efecto se realiza por un tratamiento en FR inmediatamente después del primer pulso. El efecto en la transformación de Pr en Pfr es inmediato, ya que un período de obscuridad entre ambos tratamientos aumenta el porcentaje de germinación (Bewley et al, 1967). Se ha definido el tiempo de escape como el período después del cual el efecto de la luz roja no puede ser revertido por la irradiación en rojo lejano (Duke et al, 1977).

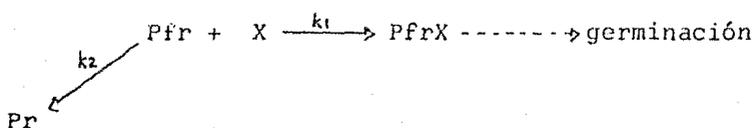
El estado de imbibición es un fenómeno determinante en la --

sensibilidad de las semillas a los tratamientos luminosos; se ha observado que esta sensibilidad se incrementa con el tiempo de imbibición, encontrándose el máximo en un intervalo de 60 a 75 min (Ikuma y Thimann, 1960); además, Duke et al (1977) notaron que -- una variación en el período de imbibición previo a irradiación resulta en diferentes niveles germinativos.

El aumento en la sensibilidad hacia la luz con el tiempo de incubación en obscuridad ha sido objeto de varias hipótesis; de esta manera, ha sido atribuido a la síntesis de fitocromo (Taylorson y Hendricks, 1971); a la hidratación del mismo, debida a imbibición (Karssen, 1970); y al aumento de cierto componente molecular X con el que supuestamente Pfr interacciona (Koller et al, -- 1964) para disparar las respuestas biológicas.

La hipótesis de hidratación de moléculas preexistentes de fitocromo cuando se imbebe la semilla ha sido ampliamente apoyada -- (Tobin y Briggs, 1969; Boisard y Malcoste, 1970; Taylorson y Hendricks, 1972; Zouaghi et al, 1972), sobre todo a través del cambio en el espectro de absorción in vitro (Tobin et al, 1973) durante deshidratación y rehidratación de fitocromo. En experimentos adicionales, se mostró que los gráficos de sensibilidad a la luz contra período de imbibición se agrupan en dos tipos de acuerdo a la semilla en tratamiento: a) aquellos en que la sensibilidad aumenta y se mantiene constante después de alcanzado cierto punto (Taylorson y Hendricks, 1971) y b) aquellos donde se observa aumento en la sensibilidad, se mantiene una meseta y decrece -- (Taylorson y Hendricks, 1973); además, se ha observado que el nivel de fitocromo total permanece constante a lo largo del período de preirradiación, lo que implica que no sucede nueva síntesis --

(Duke et al, 1977). Duke et al (1977) han desarrollado un modelo que se apoya en las dos evidencias anteriores y, sin desechar el planteamiento de hidratación de fitocromo, llegan a la conclusión que existe una substancia X que interacciona con fitocromo y cuyos niveles varían durante el período de preirradiación, iniciando germinación después que un nivel de interacción con fitocromo se ha llevado a cabo, de acuerdo al siguiente esquema:



En el modelo, la constante de inversión, k_2 y la concentración total de fitocromo permanecen constantes durante el período de preirradiación. Después del pulso en R, la inversión de Pfr en Pr compete con el equilibrio de formación de PfrX de acuerdo a las constantes k_1 y k_2 y a la cantidad disponible de X y Pfr. La inducción de germinación, por tanto, será una medida del período de preirradiación en tanto los niveles de X varíen y, obviamente, de la cantidad de Pr transformando en Pfr durante la irradiación con luz roja. Taylorson y Hendricks (1973) han señalado que el factor X con el cual Pfr interacciona es un componente sujeto a transiciones orden-desorden, a semejanza de los componentes membranales, sobre todo por la dependencia de germinación con la temperatura - (Takaki et al, 1981).

Por otro lado, la existencia de semillas capaces de germinar tanto en obscuridad como en presencia de luz y aún de aquellas cuya germinación es inhibida por luz, plantean un problema diferen-

te; la indiferencia a las condiciones luminosas ha sido atribuida a la existencia de fitocromo en la semilla deshidratada (Rollin y Maignan, 1967), que a través de hidratación durante imbibición, - sufre reversión inversa (Briggs y Rice, 1972) hacia Pfr activo, - capaz de disparar germinación.

En el último grupo de semillas, se ha observado una gran inhibición de germinación por la irradiación con luz en la porción del rojo lejano, mientras que la luz en rojo no produce cambios - en los niveles germinativos, o lo realiza ligeramente (Rollin y - Maignan, 1967). Este fenómeno, según el esquema de interacción -- PfrX, ha sido atribuido a la destrucción del complejo PfrX bajo - irradiación FR, debido a la transformación de Pfr hacia Pr, disminuyendo la concentración del complejo activo que conduce a germinación; la irradiación con R produce Pfr, pero éste es destruido enzimáticamente en seguida de su formación (Siegelman y Butler, - 1965); el almacén de fitocromo total disminuye y sólo es recuperado por nueva síntesis, en obscuridad (Rollin y Maignan, 1967).

3.2.2 Factores Internos.

Para que la germinación de la semilla se lleve a cabo, es necesario que existan las condiciones externas adecuadas para cada especie y, tan importante como éstas, es la condición de disponibilidad interna de la semilla para germinar. Et la condición relativa a las propiedades intrínsecas de la semilla es limitada por la existencia de la latencia orgánica.

Nikolaeva (1980) ha clasificado la latencia orgánica en exógena y endógena. La primera puede ser de tres tipos, física, quí-

mica y mecánica y se refiere a las propiedades de la cubierta de la semilla, excluyendo permeabilidad gaseosa, v.g. impermeabilidad de la cubierta al agua, existencia de inhibidores en el pericarpio y resistencia mecánica de las cubiertas al crecimiento del embrión.

La latencia endógena puede ser debida a factores morfológicos y fisiológicos; entre los factores morfológicos se encuentra principalmente la inmadurez del embrión: las semillas que presentan este tipo de latencia requieren de un cierto período de almacenamiento para completar el desarrollo embrionario; los factores fisiológicos que involucran la latencia son principalmente la existencia de inhibidores de germinación dentro de la semilla y la falta de integración entre las vías metabólicas responsables de este proceso. Los compuestos fenólicos en general se encuentran entre los inhibidores de germinación más abundantes naturalmente (Khan, 1980); asimismo, la cumarina, el ácido cinámico y sus derivados (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975) y el ácido abscísico, que actúa como regulador de latencia y germinación.

La acción del ácido abscísico (ABA) ha sido ampliamente estudiada en base a su interacción con giberelinas y citocininas en el control de la latencia. Aparentemente, la base del mecanismo se encuentra en el balance de los niveles de estas fitohormonas, según la hipótesis de promoción-inhibición del genoma, donde ABA actúa como represor y citocininas y giberelinas como promotores o desrepresores (Khan, 1980; Taylorson y Hendricks, 1977). Se ha discutido ampliamente el caso de las hormonas vegetales en cuanto a su analogía efectora con el sistema fitocromo; aunque si bien el ácido giberélico (GA_3) (Ikuma y Thimann, 1960; Taylorson, 1976)

y cinetina (Leff, 1964) en menor proporción son capaces de estimular germinación de semillas fotosensibles en obscuridad, se ha demostrado que fitocromo no realiza sus efectos metabólico-fisiológicos a través de estas sustancias, y que ambos efectores realizan su acción independientemente (Schopfer, 1977); existen evidencias de la acción sinérgica de giberelinas y Pfr (Bewley et al, - 1967) y aún del control del metabolismo de giberelinas por Pfr -- (Kohler, 1966).

La causa metabólica de la latencia se encuentra principalmente por la ausencia de balance entre las vías glucolítica (EM) y - pentosa-fosfato (PP) a través de los niveles de los piridín-nu--- cleótidos (NADPH y NADH) compitiendo por el uso de glucosa-6-fosfato (G-6-P) (Taylorson y Hendricks, 1977). En las semillas en la latencia predomina el uso de la vía glucolítica, de tal manera que la inducción de germinación se lleva a cabo por inhibidores respiratorios que reducen el consumo de O_2 por el ciclo de Krebs; éstos pueden ser aceptores de hidrógeno, inhibidores del ciclo, de glucólisis y del terminal citocromo oxidasa, entre éstos cianuro, axidas, hidroxilamina, nitratos, tiourea, etc. La inhibición de - catalasa, que descompone H_2O_2 , conduce a la oxidación de NADPH. - El $NADP^+$ formado desplaza la utilización de G-6-P hacia la vía PP por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, primera enzima del ciclo PP (Hendricks y Taylorson, 1975; Roberts, 1975; Roberts y Smith, --- 1980). La figura III.2.2.1 esquematiza las rutas PP y EM, así como sus puntos de interacción.

El esquema propuesto, que explica ampliamente la inducción - de germinación a través de la oxidación de NADPH por inhibición - de catalasa, incluye una sugerencia interesante de Hendricks y ---

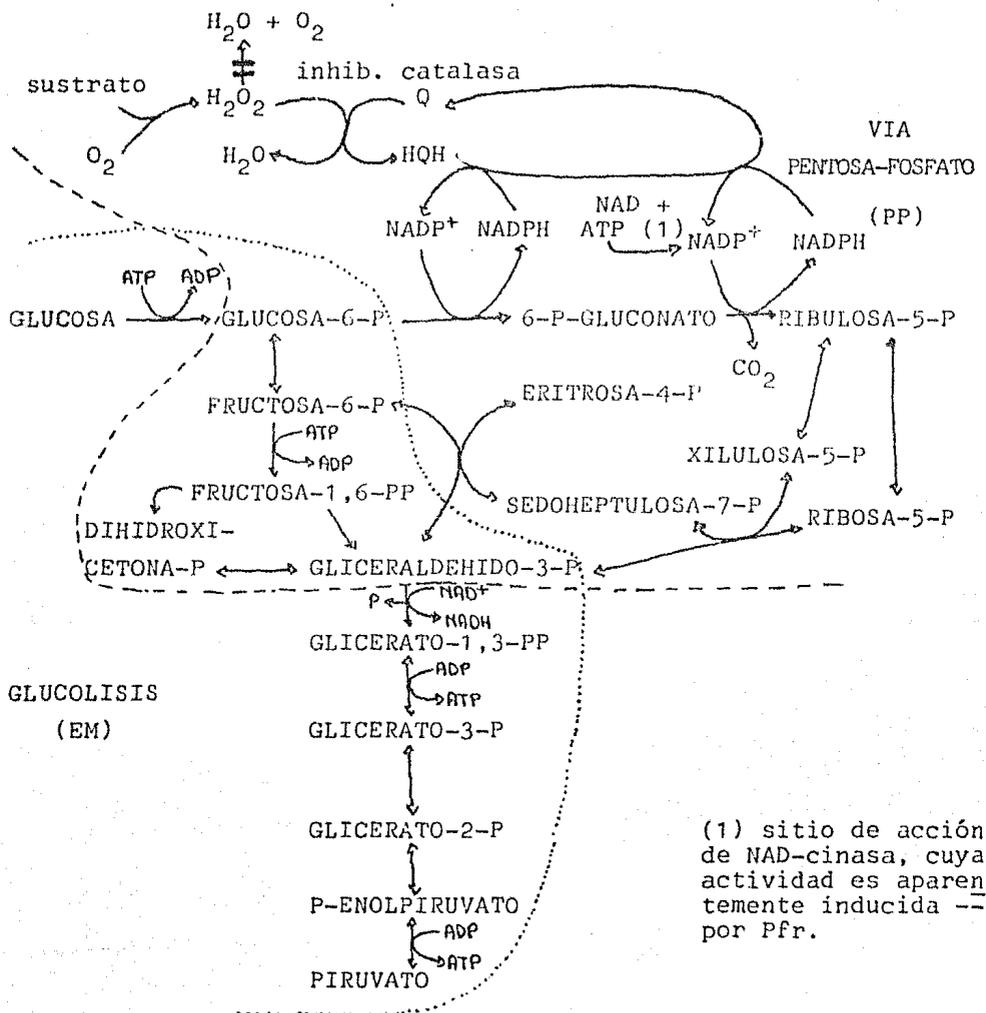


Figura III.2.2.1. Interacción de glucólisis y la vía pentosa-fosfato. El balance entre ambas rutas, que es favorable a glucólisis en latencia, es desplazado hacia la vía PP durante imbibición. La parte superior del esquema es un sistema de transporte electrónico dependiente de O_2 , cuyos componentes transportadores no han sido clarificados pero que contiene el punto de control en el rompimiento de latencia a través de la inhibición de catalasa. Q-HQH sistema quinona oxidada y reducida, respectivamente. Las líneas suspendidas delimitan las vías EM y PP.

Taylorson (1975a) en el sentido que la estimulación de germinación por Pfr activa NAD-cinasa proveyendo a la semilla de NADP^+ , ya que se ha observado el aumento en los niveles de NADP^+ en cotiledones estimulado por irradiaciones en el rojo, a través del proceso de inducción-reversión (Briggs y rice, 1972) por medio del efecto de Pfr. Sin embargo, la hipótesis tiene serios inconvenientes. Bewley (1979) cuestiona a) la conexión planteada de las enzimas en este sistema, b) que la reoxidación de NADPH sea necesaria para el rompimiento del estado de latencia y c) que la fuente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provenga de la beta-oxidación de ácidos grasos, ya que este evento ocurre en las fases tardías de germinación y durante el crecimiento de la plántula, por lo que no tendría sentido plantear esta fuente como involucrada en el rompimiento del estado de latencia.

3.3 EVENTOS GENETICO-METABOLICOS DURANTE GERMINACION Y FITOCROMO

La germinación, en los términos planteados anteriormente, se ha dividido en tres fases de estudio (Rodaway et al, 1979) que son realmente continuas pero se caracterizan por fenómenos genéticos y metabólicos diferenciados. Estas fases son imbibición, período quiescente y período de crecimiento. Durante éste culmina la salida de la radícula de la cubierta de la semilla.

La germinación es la reactivación del metabolismo generalizado de la semilla e implica los conceptos de crecimiento y diferenciación. Estos eventos se traducen en la promoción de un programa genético nuevo así como la reactivación o desrepresión de las zonas génicas antecedentes. La investigación de los mecanismos de

diferenciación y crecimiento en germinación conduce a los estudios del control de la expresión genética. Los estadios iniciales de germinación, i.e. imbibición, se caracterizan por la aparición, desde los primeros minutos, de una serie de proteínas y enzimas que pueden resultar de una síntesis de novo o de la activación de precursores preexistentes. La inducción de la síntesis proteica se regula a nivel genético o en el camino entre el RNAm y la proteína funcional.

La inducción genética de la síntesis proteica ha sido planteada en base al modelo del Operón propuesto por Jacob y Monod (1961) para sistemas bacterianos. La figura III.3.1. muestra el modelo del Operón generalizado para enzimas inducibles. Aunque este mode-

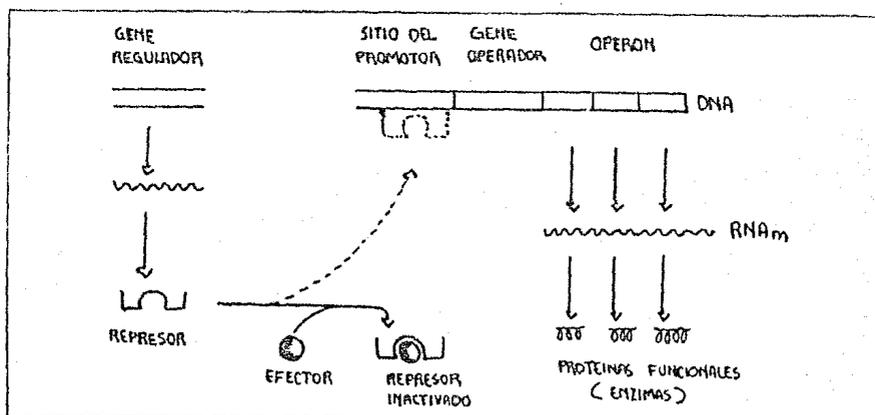


Figura III.3.1. Modelo del Operón para enzimas inducibles. La cadena de DNA posee, en el sitio del promotor, un lugar alostérico para el represor, proteína codificada por el gene regulador. Cuando el represor se encuentra complejo con el efector, algún metabolito indicador celular, la lectura, por RNA polimerasa de la cadena que originará el RNAm se produce y se traducirá posteriormente en proteínas funcionales. Cuando el represor no se inactiva por efecto del efector, ocupa el sitio del promotor, impidiendo la lectura genética por parte de la RNA-polimerasa; El RNAm no es producido y, por tanto, la síntesis proteica es impedida. (Tomado de Davidson, 1972).

lo ha sido planteado y probado en sistemas bacterianos, su extensión a sistemas vegetales y animales no es imposible. La realización de la inducción proteica en estos sistemas a través del modelo del Operón involucra la consideración de factores adicionales como resultado de la alta diferenciación evolutiva eucariótica -- respecto de los sistemas bacterianos. Uno de estos factores es la existencia del material genético -DNA- en forma de cromatina, es decir, complejado y estabilizado por proteínas básicas, histonas; de esta manera, la elaboración de un modelo de biosíntesis de RNA dependiente de DNA en eucariotes debería incluir mecanismos desestabilizadores de la cromatina para exponer la región de DNA que será transcrita. La inducción y regulación genética es una propiedad de las proteínas residuales contenidas en el núcleo eucariótico y no de las histonas (Gilmour, 1968); además, se ha especulado que la base de la actividad específica genética se encuentra en los mecanismos de fosforilación⁸ de las proteínas residuales (Alfrey et al, 1973). Aunque se ha mostrado que las proteínas nucleares fosforiladas se enlazan al DNA, Trewavas (1976) argumenta que no hay evidencias que indiquen que dicho enlace sea el producto de la fosforilación proteica, además que éste es tan débil que no es suficiente para desestabilizar el complejo DNA-histonas, altamente estable. En vegetales se han observado cambios en los perfiles electroforéticos de las proteínas nucleares fosforiladas durante germinación (Chapman et al, 1975); aunque la demostración -

⁸ La fosforilación proteica se lleva a cabo por las protein-cinasas (Rubin y rosen, 1975) transfiriendo el grupo gamma-fosfato de ATP hacia los grupos hidroxilo de los restos de serina o ---treonina de las proteínas.

de que la fosforilación proteica altere la actividad catalítica - no ha sido completamente evidenciada, se sabe que RNA polimerasa DNA-dependiente es una proteína nuclear cuya actividad catalítica resulta aumentada después de su fosforilación (Trewavas, 1976). - Este hallazgo se puede considerar importante ya que si es posible demostrar que la fosforilación proteica involucra la actividad ca talítica de las enzimas nucleares, el modelo de inducción y regulación de la síntesis proteica en sistemas eucarióticos consideraría factores que ayudarían a comprender un poco más el proceso de la actividad génica selectiva.

La regulación de la síntesis proteica entre el RNAm y la pro teína funcional se refiere a los procesos postranscripcionales co mo son transporte de RNA hacia citoplasma, corte de secuencias in trónicas, adición de secuencias poliadeniladas, etc. Las enzimas y demás proteínas pueden ser modificadas químicamente por metilación, acetilación, tiolación, ribosilación, adenilación, fosforilación, etc., y físicamente por asociación oligomérica, con metales o grupos funcionales específicos, etc.

La activación de precursores proteicos se podría llevar a ca bo de varias formas alternativas (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975), v.g. desenrollamiento espacial debido a rehidratación, asociación y disociación con membranas, asociación oligomérica, por adición o supresión de cadenas polipeptídicas a la proteína funcional, -- etc.

La regulación proteica por Pfr ha sido establecida en los ni veles anteriores a través de la inducción (represión) de algunas enzimas específicas. Para establecer los posibles mecanismos de - regulación por fitocromo, se simplifican los posibles sitios de -

regulación por fitocromo, se simplifican los posibles sitios de acción para efectuar el estudio de dicha regulación. De esta manera, Schopfer (1977) propone los siguientes: a) síntesis de la cadena polipeptídica a través de la reserva de aminoácidos (síntesis de novo), b) activación de una forma inactiva de la enzima -- c) degradación de la enzima y d) inactivación de la enzima por alteración reversible o bloqueo del sitio catalítico (Figura III.3.2).

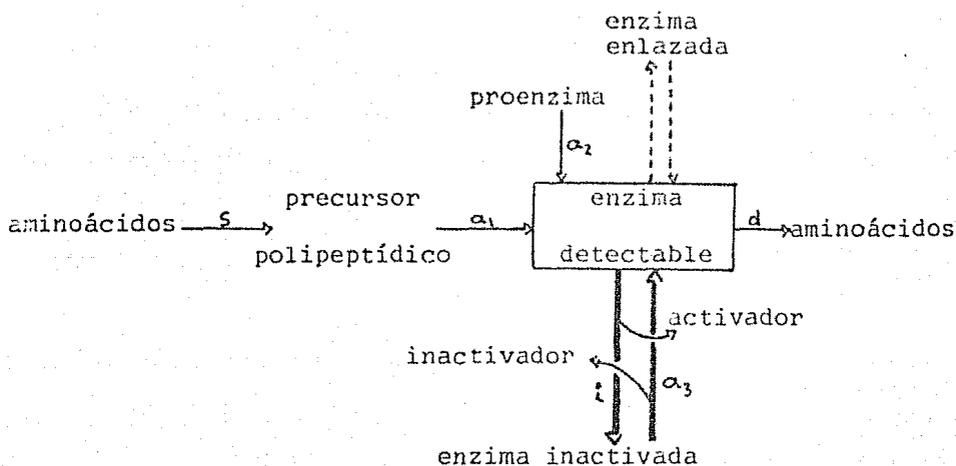


Figura III.3.2. Esquema ilustrativo generalizado de los posibles loci de control de una enzima. s = síntesis de novo; d = degradación; i = inactivación; a_i = tipos de activación. La asociación o disociación de estructuras celulares está señalada por líneas suspendidas (tomado de Schopfer, 1977).

Durante germinación, la aparición de proteínas sigue un orden secuencial; en éste se advierten cuatro clases principales de sistemas proteicos (Mayer, 1980); el primero concierne a la activación instantánea de enzimas con la incorporación acuosa de la -

semilla,⁹ ésto implica que son producidas durante la maduración - de la misma; el segundo grupo de enzimas aparecen un poco más tarde y requieren un tiempo de imbibición mayor, probablemente alguna modificación física o química o su dependencia de la integración membranal sean los procesos que se realicen para la restauración de su actividad; el tercer grupo de enzimas es producto de - síntesis proteica sin requerimiento de RNAm de novo, y el cuarto grupo, que se asocia a procesos tardíos de germinación y durante el crecimiento de la nueva plántula, aparece de síntesis proteica cuyos elementos primos son de nueva síntesis.

La activación proteica durante imbibición se lleva a cabo en la totalidad de la célula, sin embargo, los fenómenos de este tipo en membranas son de especial interés por la importancia que éstas tienen en el control y desarrollo de la germinación. Cuando - la semilla se encuentra deshidratada, presenta su sistema membranal empaquetado, con un alto grado de fragilidad y rigidez; esta condición limita los procesos metabólicos en gran medida. Durante imbibición la fluidez membranal aumenta hasta restaurar su condición fisiológica normal, ésta reactiva el metabolismo generalizado de la semilla permitiendo, como fase primordial de la germinación, la activación de sistemas enzimáticos membranales y el aumento de la permeabilidad de la membrana misma. Mayer (1980) sugiere que el cambio en la permeabilidad membranal podría ser consecuencia de la fosforilación de las proteínas membranales, a semejanza del fenómeno en tejidos animales, cuyas protein-kinasas -

⁹ Algunos ejemplos de enzimas de este tipo son triosa fosfato isomerasa y la interconversión isoenzimática de malato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa (Mayer, 1980).

actúan mediante la acción de AMPc (Rubin y Rosen 1975). Aunque se han detectado protein-cinasas en tejidos vegetales, éstas son independientes de este nucleótido (Keates, 1973; Keates y Trewavas, 1974). La existencia de AMPc ha sido ampliamente refutada por Trewavas (1976) en una recopilación de trabajos referentes.

En contraposición a la posición anterior, Wellburn et al (1973) encontraron la presencia de AMPc en etioplastos y en concentración mayor a éstos en etioplastos sometidos a tratamientos luminosos; además, en un trabajo posterior (Wellburn y Hampp, 1975) demostraron que las membranas de etioplastos son impermeables a GA_3 , ABA y AMPc y que la permeabilidad de dichas membranas fue considerablemente aumentada hacia estos metabolitos frente al tratamiento luminoso. Estos resultados contemplan la base a una posible hipótesis acerca de la regulación de la permeabilidad membranaral por fitocromo.

En la fase de imbibición la reestructuración membranaral ha sido apreciada a nivel microscópico por el patente desarrollo de los organelos celulares (Mayer y Shain, 1974; Mayer, 1980; Jann y Amen, 1980); los cambios membranarales se refieren tanto a reorganización (Schopfer et al, 1977) como síntesis nueva y recambio (Kagawa et al, 1973). Estos cambios han sido atribuidos a la acción de fitocromo (Schopfer et al, 1977; Hendricks y Borthwick, 1967; Hampp y Schmidt, 1977); fitocromo se encuentra presente en la semilla deshidratada (Spruit y Mancinelli, 1969; Boisard y Malcoste, 1970) que resulta rápidamente hidratado en imbibición y que es activo ante el 17 a 19% de incorporación acuosa por la semilla (Taylorson y Hendricks, 1972). La organización promitocondrial en mitocondrias es estimulada por fitocromo a través de la reacción de

alta energía (Bajracharya et al, 1976) observándose que la continua irradiación de FR cambia las propiedades estructurales de las membranas mitocondriales, sobre todo la interna. Además, los cambios membranales en proplastidios y promitocondrias son dependientes tanto de HIR como LIR, demostrándose en este caso que los efectos de luz roja son reversibles por pulsaciones en FR (Hampp y Schmidt, 1977).

Algunas enzimas que participan en la síntesis y recambio de los componentes membranales se encuentran presentes en la semilla deshidratada, resultando activadas tempranamente durante imbibición (Harwood y Stumpf, 1970), entre ellas se encuentran las responsables de la síntesis de los fosfolípidos membranales v.g. fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina. Entre las enzimas que se ha demostrado resultan activadas durante imbibición por el sistema fitocromo se encuentran succinato deshidrogenasa y el sistema citocromo oxidasa (Bajracharya et al, 1976) -arbas a Través de las reacciones de baja y alta energías; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Schöpfer, 1977) y NAD-cinasa (Briggs y Rice, 1972), ésta por inducción-reversión.

A partir de este momento de imbibición, i.e. primeros minutos, se hace necesario analizar el metabolismo de las moléculas -portadoras de energía química -nucleótidos- especialmente el adenosiltrifosfato o ATP; adenosildifosfato, ADP y adenosilmonofosfato, AMP; ya que los procesos precedentes (ensamblaje ribosomal, -síntesis proteica, síntesis de RNA, etc.) requieren energía a través de estos sistemas.

Un concepto útil que relaciona los tres nucleótidos de adenina es el de carga energética, que es una medida de la disponibili-

dad de energía química por las semillas, y ha sido definido por la siguiente relación (Atkinson, 1969):

$$CE = \frac{ATP + 1/2ADP}{AP_{total}}$$

En la semilla seca, la carga energética es muy baja. Los niveles de ATP son prácticamente nulos (Obendorf y Marcus, 1974) -- mientras que los adenilatos se encuentran en mayor proporción como AMP; sin embargo, en los primeros minutos de imbibición se observa un drástico aumento de ATP, disminución paralela de AMP y -- estabilidad en los niveles de ADP. Brooker et al, (1977) han re-- portado los cambios en CE durante las primeras etapas de la germinación. La semilla seca presenta CE = 0.12, a los 20 min de imbibición aumenta a 0.85 y a las 5.5 h el valor es de 0.95.

El gran aumento de ATP durante la primera fase de la germinación ha sido ampliamente estudiado, considerando que, a pesar de la hidratación de los sistemas membranales y citoplásmicos la síntesis proteica aún no se ha iniciado. Estos cambios en la carga energética, sin cambio esencial en la concentración total de AP -- también se lleva a cabo en semillas mantenidas en condiciones anaeróbicas o con glucólisis inhibida por iodoacetato (Taylorson y -- Hendricks, 1977); además, la adición de GA₃ y ABA no producen cambios en los niveles internos de ATP comparados con el testigo imbibido en agua (Bewley, 1979), lo que conduce a la suposición que el aumento de ATP en la fase de imbibición no se relaciona con -- los reguladores del crecimiento. Asimismo, aunque las mitocon---

drias aparecen reorganizadas a través de la incorporación de agua en esta etapa, no contienen todos los componentes para llevar a cabo el transporte electrónico completo ni el acoplamiento con la fosforilación oxidativa (Mayer, 1980); estos componentes proteicos y lipídicos se integran en las fases tardías de germinación, probablemente por migración desde citoplasma hacia la membrana mitocondrial y no involucra su síntesis de novo¹⁰; para el momento en que la función mitocondrial ha sido completamente integrada, la carga energética habría sido aumentada como anteriormente se describió, por lo que este sistema tampoco podría ser la fuente de ATP producido durante la primera hora de imbibición.

Actualmente existen dos hipótesis que tratan de explicar el fenómeno de aumento de la CE durante imbibición. La primera se debe a Morton y Raison (en Mayer y Shain, 1974) que sugieren que fitina (inositol-hexafosfato), que se encuentra en la semilla deshidratada, sirve como una reserva energética durante germinación a través de una reacción de transfosforilación vía cierta fosfoproteína para producir GTP o ATP. La cantidad de fitina presente en la semilla decrece a medida que transcurre la germinación; asimismo, la cantidad de una fosfatasa específica, fitasa, aumenta proporcionalmente a dicha desaparición (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975); la desventaja de esta hipótesis radica en que estos eventos ocurren al final de imbibición y en el período quiescente. Aparentemente gran parte de la fitasa es de nueva síntesis. Mayer

¹⁰ La incorporación de estos componentes al sistema mitocondrial podría requerir ciertas reacciones de transferencia; el mecanismo por el que se llevan a cabo es aún desconocido (Eldan y Mayer, 1974; Mayer, 1980).

y Shain (1974) concluyen que el rompimiento de inositol-hexafosfato y la transfosforilación son eventos temporalmente espaciados - que contribuyen al incremento energético mas no el ocurrido durante la primera fase de imbibición. La otra hipótesis ha sido propuesta por Mayer (1980), y propone que en la formación de la semilla son fosforiladas ciertas proteínas a través de ATP. Plantea - que a) esta reacción puede ser reversible, b) que dichas proteínas se encuentran endosadas en membranas, c) que la reacción es - catalizada por ATPasas membranales y d) que la energía requerida para la defosforilación proteica proviene de un potencial acuoso creado durante imbibición. Por otra parte, Thomas y Tull (1981) - encontraron en hipocotilos de Cucumis una ATPasa dependiente de - K^+ que resultó fotorregulada por tratamientos en R y FR cuando el tejido fue irradiado con luz roja in vivo, demostrando la regulación, por parte del sistema fitocromo, de la disponibilidad del - sustrato y la permeabilidad membranal. Además, los niveles de ATP han sido aumentados por el sistema fitocromo in vitro (White y Pike, 1974) drásticamente en tejidos vegetales después de un minuto de la irradiación con R, mostrando características de reversión - por irradiaciones FR.

Durante los primeros 30 min de incorporación acuosa se encuentra ya un sistema de síntesis de proteínas activo. El requerimiento principal es el suministro de ATP, tanto para el ensamblaje polirribosómico como para el funcionamiento del sistema de -- RNAs de transferencia (RNAt) (Taylorson y Hendricks, 1977). Apparently estos RNAt se encuentran formados y son potencialmente activos en la semilla deshidratada. Norris et al (1973) han reportado la presencia de aminoacilsintetasas para varios RNAt durante

la maduración de la semilla y germinación, a niveles constantes. Esta síntesis temprana de proteínas no cambia en presencia de inhibidores de transcripción (Spiegel y Marcus, 1975) de tal manera que aquélla se realiza a partir de RNA preexistente en la semilla seca (Payne, 1976). Esto indica que la síntesis proteica temprana es la lectura de información genética anterior (Jann y Amen, 1980).

El RNAM responsable de la traducción temprana se forma y funciona dirigiendo embriogénesis en el desarrollo de la semilla, -- permanece funcional, respondiendo por el mantenimiento de la misma hasta las primeras etapas de germinación (Dure, 1977); se denomina RNAM constitutivo, ya que dirige la síntesis de las proteínas necesarias en el transcurso del ciclo celular i.e. del metabolismo intermedio, de síntesis de RNA, de estructuración, etc., o RNAM residual, ya que es degradado en las primeras 24 h de imbibición (Dure, 1977); este RNA posiblemente se encuentra asociado a proteínas (informosomas) y es incorporado en ribosomas en los primeros minutos de imbibición.

Otro tipo de RNA que dirige la síntesis temprana de proteínas es el denominado RNAM de reserva. Se detecta como RNA heterogéneo nuclear (RNAhn) y es transportado hacia citoplasma en fracciones que contienen secuencias poliadeniladas de 200 a 250 nucleótidos en el extremo 3'OH (Osborne, 1980). Este RNA dirige la síntesis de las enzimas típicas de la germinación; su acción es -- más lenta que el RNA constitutivo debido a los cambios postranscripcionales. El mecanismo por el que se produce la activación de este RNA es desconocida. La asociación de polia-RNA con ribosomas libres se realiza a los 10-15 min de imbibición y se prolonga, -- llegando al máximo en el período quiescente (Rodaway et al, 1979).

El proceso de la transcripción es procedente a la síntesis - proteica temprana. La transcripción es un fenómeno que posee evidencias de control por el sistema fitocromo: se ha observado el control de la síntesis de un RNAm de plastidio que codifica una cadena polipeptídica de 35 000 d que es estimulada por luz a través de fitocromo en *Sinapis* (Link, 1982), así como en *Zea mays* -- (Bogorad et al, 1980), que produce una proteína membranal plastídica de 32 000 d. También el RNAm que codifica la cadena menor de ribulosa-difosfato carboxilasa, enzima clave en el ciclo de Calvin, tiene síntesis estimulada por fitocromo (Tobin, 1981) no --- siéndolo la cadena mayor de la misma enzima (Link, 1982).

El aumento de RNA mediado por tratamientos HIR (Weidner et al, 1965) ha sido interpretado en la concepción de la activación diferencial genética por Pfr (Mohr, 1966; Weidner, 1967). El aumento en la síntesis de RNA en cotiledones de *Sinapis* sometidos a irradiación FR ha sido nulificado por actinomicina D (Weidner y Mohr, 1967) demostrando la dependencia sobre la transcripción del sistema fitocromo.

Aparentemente la síntesis de RNA se produce a partir de DNA "viejo", ya que la replicación de DNA es un evento que transcurre durante el período quiescente (Chen y Osborne, 1970) y es función de la actividad de DNA-polimerasa de nueva síntesis; este proceso ha sido detectado asociado a membrana nuclear (Osborne, 1980). La síntesis de RNA ribosomal (RNAr) se incrementa rápidamente después de 6h de imbibición, mientras que la síntesis de RNAm se mantiene constante al menos en las primeras 18h (Taylorson y Hendricks, 1977). A las 24h de imbibición, la constitución de las células de la semilla ha sido renovada por completo: nuevas isoenzi--

mas, ribosomas y mitocondrias funcionan perfectamente y producen las ribonucleasas que destruyen la información genética precedente (Jann y Amen, 1980).

La incorporación de oxígeno por la semilla se ve enormemente aumentada en las últimas etapas de la imbibición, indicando que el sistema mitocondrial ha sido completamente ensamblado y que -- realiza el transporte electrónico completo. El control por parte del fitocromo no ha terminado; se ha sugerido la posible relación entre fitocromo y la estimulación de la intensidad de fosforilación mitocondrial (Bajracharya et al, 1976).

Probablemente la respiración¹¹ es llevada a cabo en los estadios iniciales de la germinación utilizando sustratos de bajo peso molecular de reserva; éstos pueden ser aminoácidos, mono, di y trisacáridos (Jann y Amen, 1980; Mayer, 1980). Los aminoácidos -- son desaminados oxidativamente y, a la par del tratamiento de los carbohidratos, son introducidos en las vías oxidativas. Existen -- amplias evidencias que indican que el ciclo de pentosas desplaza el uso de G-6-P en la vía EM. El papel de la vía PP en germina---ción no ha sido clarificado; quizá radique en la importancia de -- la producción de NADPH en la biosíntesis de macromoléculas para -- el crecimiento embrionario; asimismo, se ha manejado el posible pa--pel de esta ruta en la elongación celular en las primeras etapas de germinación, donde su actividad es evidentemente mayor que la de glucólisis (Roberts y Smith, 1979).

¹¹ Se denomina aquí respiración al proceso de oxidación de un sustrato con la participación de O₂ como último aceptor electrónico.

El período quiescente marca un descanso en la incorporación de O_2 y el nivel de ATP, estabilizando el metabolismo de la semilla. En este período, la replicación de DNA se lleva a cabo con vista hacia la pronta división mitótica; además, el nivel de proteínas no histónicas disminuye (Yoshida y Sasaki, 1977) quizá debido a la alta actividad genética (replicación y transcripción). Dicho estadio de la germinación probablemente corresponde al momento en que se han agotado las reservas no poliméricas; se reajustan los programas genéticos a través de la síntesis y acción de agentes hormonales germinativos y se producen las respuestas metabólicas correspondientes a dicha acción, v.g. la síntesis de enzimas hidrolíticas que trabajan las fuentes de nutrientes de reserva de alto peso molecular.

Durante el período de crecimiento, el papel de las enzimas hidrolíticas adquiere gran importancia debido a que su acción proporcionará los sustratos para la nueva síntesis de las macromoléculas de este estadio. La reserva de aminoácidos es ahora utilizada en la síntesis de nuevas proteínas, que también se lleva a cabo por la utilización del nitrógeno soluble por medio del sistema nitrato reductasa (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975), además, dicha reserva es alimentada por la acción enzimática sobre las proteínas de reserva. El control de la actividad de las enzimas proteolíticas puede deberse a inhibidores presentes en la semilla y/o a las fitohormonas (Mayer y Shain, 1974).

La hidrólisis de las reservas lipídicas se realiza principalmente cuando la disponibilidad de carbohidratos por la semilla es mínima v.g. en oleaginosas, y proporciona una poderosa fuente energética. Se lleva a cabo en primera instancia por la acción de

lipasas sobre los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos y glicerol. Cabe aquí mencionar el control del sistema fitocromo, a través de reacciones de inducción-reversión de la actividad de lipasa en cotiledones de Cucumis, así como de la degradación de lípidos neutros (Davies et al, 1981). El glicerol es probablemente convertido a través de triosa-fosfato en piruvato. Los ácidos grasos son tratados en el proceso de beta-oxidación para formar acetil-coenzima-A (AcetilCoA) en los glioxisomas, microcuerpos típicos de las semillas oleaginosas¹² que contienen, entre otras, las enzimas del ciclo del glioxilato (Breidenbach y Beevers, 1967; -- Breidenbach et al, 1968). Las enzimas del ciclo del glioxilato corresponden a algunas del ciclo de Krebs, exceptuando dos, isocitrato liasa y malato sintetasa¹³ y la importancia del mismo radica en el aprovechamiento de acetilCoA como fuente de carbono para la formación de precursores de carbohidratos para acceder la vía gluconeogénica. Ambas vías forman isocitrato a partir de acetilCoA en el ciclo del glioxilato, aquél es escindido para producir succinato y glioxilato, que se condensa con otra molécula de acetilCoA para formar malato. El succinato formado no es metabolizado en los glioxisomas por lo que es transportado hacia mitocondria donde es oxidado hasta oxalacetato y transportado hacia citoplasma se convierte en fosfoenolpiruvato y, en gluconeogénesis, en carbohidratos. La figura III.3.3 muestra la conexión del ciclo

¹² Se ha reportado la presencia de glioxisomas en semillas cuya mayor proporción de reserva es en forma de carbohidratos en los tejidos ricos en lípidos (Longo y Longo, 1970; Jones, 1972).

¹³ La actividad de estas enzimas no es controlada por el sistema fitocromo (Schopfer et al, 1977).

de Krebs y el ciclo del glioxilato en la gluconeogénesis a partir de acetilCoA.

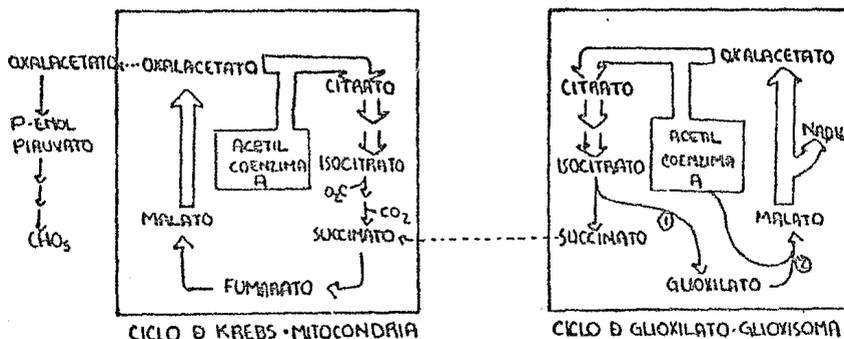


Figura III.3.3. conexión del ciclo de Krebs mitocondrial y el ciclo del glioxilato en mitocondria. Los ácidos unidos por líneas dobles simbolizan sistemas enzimáticos comunes a ambas vías. - Las líneas sencillas se relacionan con las enzimas de cada ciclo; las líneas suspendidas involucran sistemas de transporte interorganelar o entre organelo y citoplasma. Los pasos 1 y 2 corresponden a la acción de isocitrato liasa y malato sintetasa, respectivamente.

Se han detectado en los glioxisomas otros sistemas enzimáticos, v.g. los de beta-oxidación y del catabolismo de aminoácidos, entre otros (Breidenbach et al, 1968; Kinol y Ruis, 1971).

En la fase de crecimiento, los plástidos continúan desarrollándose, a nivel membranal y de síntesis de las enzimas necesarias para su posterior funcionamiento fotosintético. A la par de este mecanismo, se observan cambios fundamentales con respecto a la aparición de un nuevo tipo de microcuerpo, el peroxisoma, el cual poseerá la maquinaria metabólica para la remoción del glioxilato, producto secundario de la asimilación fotosintética de CO₂. La formación de los peroxisomas se realiza a expensas de los glioxilatos.

xisomas, por una transformación dependiente de la luz mediada por el sistema fitocromo (Schopfer et al, 1977). El esquema de la figura III.3.4. muestra la interrelación entre los organelos de la semilla oleaginosa en el desarrollo.

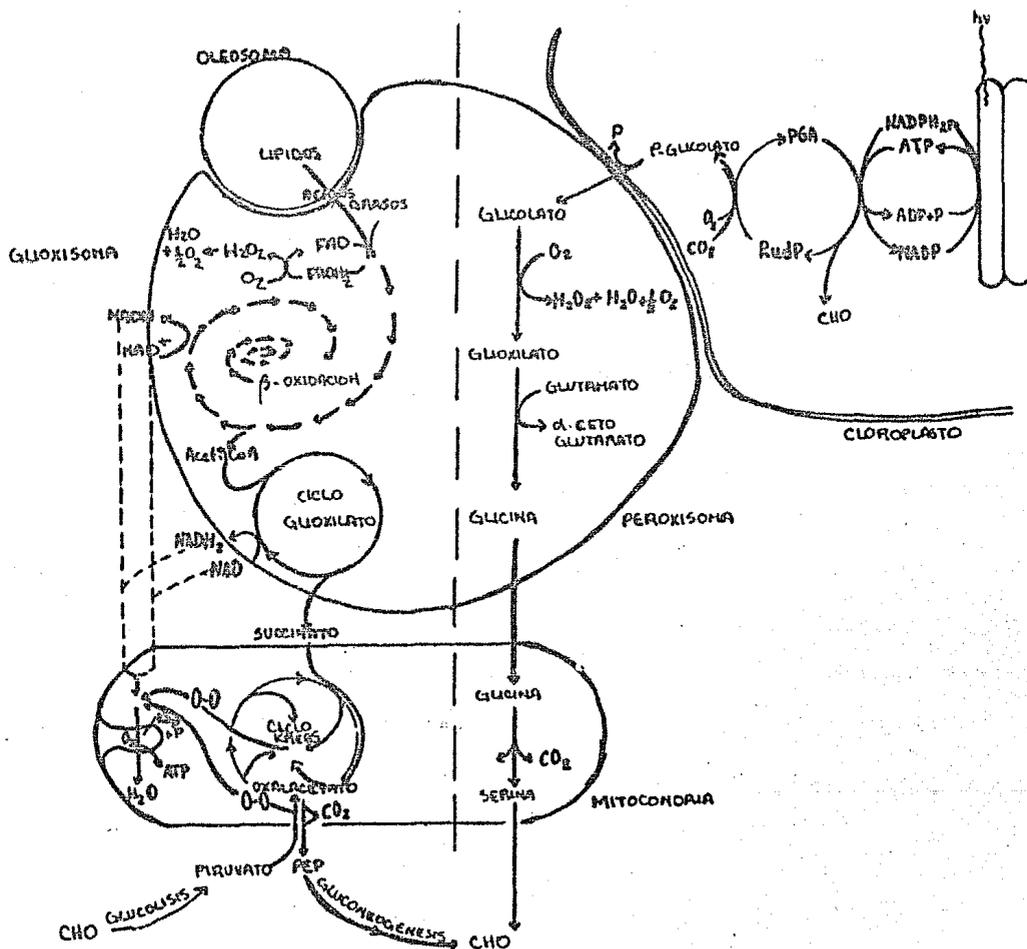


Figura III. 3.4. Esquema generalizado del metabolismo glicoxisómico y peroxisómico durante la morfogénesis de la semilla de oleaginosa en cotiledones. El \square microcuerpo que contiene, a la izquierda el metabolismo de glicoxisoma y a la derecha el de un peroxisoma, es un glicoxiperoxisoma, el microcuerpo intermedio en la transformación de glicoxisoma en peroxisoma mediada por la luz vía fitocromo. PEP = P-enolpiruvato; PGA = P-glicerato (tomado de Schopfer et al, 1977).

La luz en rojo lejano conduce a una marcada estimulación de las enzimas típicas de peroxisomas, a través de la reacción de alta irradiación, v.g. glucolato oxidasa y glioxilato reductasa -- (Van Poucke et al, 1970) y por medio de las reacciones de baja -- irradiación, v.g. malato deshidrogenasa y catalasa (Novikova et al, 1981). Schopfer et al (1977) han propuesto la transformación de glioxisomas en peroxisomas regulada en el retículo endoplásmico, sitio de nueva síntesis de las enzimas organelares, a través del sistema fitocromo en la síntesis de las enzimas y proteínas -- membranales del peroxisoma sin renovar aquellas del glioxisoma, -- las cuales, por el equilibrio de recambio alterado, desaparecen a medida que se integra el nuevo microcuerpo.

El rompimiento de las reservas de carbohidratos, v.g. almidón, se lleva a cabo mediante dos vías principalmente, la vía fosforolítica y la vía amilolítica (Strafford, 1979). La primera conduce a la formación de hexosa-monofosfato, que puede ser dirigida hacia la formación de celulosa, disacáridos y nuevas reservas poliméricas. La vía amilolítica comprende la acción de alfa y beta-amilasas y maltasas principalmente. Las amilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de los polímeros de glucosa. Beta-amilasa es almacenada como zimógeno y alfa-amilasa se forma por síntesis de novo en un proceso postgerminativo inducido por -- giberelinas, al menos en cereales a nivel transcripcional (Briggs, 1973). El proceso de dicha inducción ha sido ampliamente investigado y comprendido, aunque debido a que se realiza después de la germinación, no será discutido aquí.

En la última fase de germinación y después de ésta, el sistema fitocromo continuará controlando la expresión y los niveles de

algunos sistemas enzimáticos, como beta-fructosidasa (Zouaghi, -- 1976); de cloroplasto, v.g. ribulosa-difosfato-carboxilasa, fosfo glicerato-cinasa, triosa-fosfato-aldolasa, transcetolasa, ferredo xina-NADP-reductasa y fructosa-difosfatasa alcalina (Bradbeer, -- 1973) etc. La plántula inicia su período postgerminativo de creci miento tanto por expansión celular como por división mitótica (Ha ber y Luippold, 1960) para formar, en poco tiempo de la protru--- sión de la radícula, un sistema fotosintéticamente competente, un sistema autótrofo.

CONCLUSION

El sistema fitocromo controla muchos aspectos de la germinación de las semillas a través de las reacciones de alta irradiación (HIR) como a través de las respuestas de inducción-reversión o baja irradiación (LIR). Las respuestas germinativas contemplan dos tipos de acción, a saber, la alteración de la permeabilidad membranaral (Hendricks y Borthwick, 1967), que contribuiría a explicar el rompimiento del estado de latencia y los primeros estadios germinativos, quizá a nivel de la formación de un complejo Pfr-X (Koller et al, 1964) que podría ser el efector de los cambios membranales; y por otro lado, aquellas respuestas a largo plazo, dependientes de la inducción y represión enzimáticas a través de la regulación del RNAm, que sugieren la intervención del sistema fitocromo a nivel genético (Mohr, 1966). Ambas hipótesis han sido objeto de controversia, por lo que muchos autores, basados en sus evidencias experimentales, apoyan una de ellas, desechando la otra. Es posible que ambas hipótesis no sean mutuamente excluyentes, y que la acción del sistema fitocromo involucre un efecto primario sobre las propiedades membranales que pudieran conducir a la liberación de metabolitos importantes de ciertos compartimentos, los cuales entonces podrían interaccionar, ya sea directa o indirectamente, con el genoma y originar la desrepresión y represión de genes específicos.

Evidentemente, el mecanismo primario de acción del sistema fitocromo en la fotomorfogénesis no ha sido dilucidado; la lista de trabajos realizados en el tema -tanto al nivel de la estructura y caracterización del pigmento, como de sus respuestas biológicas- es muy amplia y éstos aún no terminan. La respuesta definitiva no puede tardar mucho.

BIBLIOGRAFIA

1. Allfrey VG, EM Johnson, J Karn, G Vidali en "Protein Phosphorylation in control Mechanisms", F Huijing, E Lee, C Lee eds, Academic Press, New York, 1973. pp. 217-44.
2. Anderson GL, El Jenner, FE Mumford. *Biochim Biophys Acta* 221: 69-72. 1970
3. Atkinson DE. *Biochemistry* 7:4030-34. 1968
4. Atkinson DE. *Ann Rev Microbiol* 23:47-68. 1969
5. Bajracharya D, H Falk, P Schpfer. *Planta* 131:253-61. 1976.
6. Bewley JD en "The Plant Seed", Academic Press, New York, 1979. pp. 219-39.
7. Bewley JD, M Black, M Negbi. *Nature* 215:648-49. 1967.
8. Boesshore ML, LH Pratt, *Plant Physiol* 68:789-97. 1981
9. Bogorad L, SO Jolly, G Kidd, G Link, L Mc Intosh en "Genome - Organization and Expression in Plants", CJ Leaver ed, Plenum Press, New York, 1980. pp. 291-304
10. Boisard J. *Physiol Veg* 7:119-33. 1969
11. Boisard J, R Malcoste. *Physiol Veg* 8:565-72. 1970
12. Boisard J, R Malcoste. *Planta* 91:54-67. 1970
13. Bolton GW, DC Pratt. *Plant Physiol* 65:2 (supl). 1980
14. Brandlmeier T, H Scheer, W Rüdiger. *Z Naturfosch Sect C Biosci* 36:431-39. 1981
15. Breidenbach RW, H Beevers. *Biochem Biophys Res Commun* 27:462. 1967
16. Breidenbach RW, A Khan, H Beevers. *Plant Physiol* 43:705. 1968
17. Briggs DE en "Biosynthesis and its Control in Plants", BV Milborrow ed, Academic Press, London, 1973. pp. 219-77
18. Briggs WL, HV Rice. *Ann Rev Plant Physiol* 23:293-334. 1972
19. Butler WL, KH Norris, HW Siegelman, SB Hendricks. *Proc Nat --*

- Acad Sci USA 45:1703-08. 1959
20. Butler WL, HW Siegelman, CO Miller. *Biochemistry* 3:851-57. -- 1964
 21. Butler WL, SB Hendricks, HW Siegelman. *Photochem Photobiol* 3: 521-28. 1964
 22. Bulter WL, HC Lane. *Plant Physiol* 40:13-17. 1965
 23. Chapman KSR, AJ Trewavas, LC VanLoon. *Plant Physiol* 55:293-96. 1975
 24. Chen D, DJ Osborne. *Nature* 226:1157-60. 1970
 25. Chen Y-H, JT Yang, HM Martínez. *Biochemistry* 11:4120-31. 1972
 26. Cohen D. *Bull Res Council Israel* 6D:111. 1958
 27. Cordonnier MM, LH Pratt. *Plant Physiol* 69:360-65. 1982
 28. Correl DL, JL Edwards, WH Klein Shropshire. *Biochim Biophys - Acta* 168:36-45. 1968
 29. Correl DL, E Steers, KM Towe, W Shropshire. *Biochim Biophys - Acta* 168:46-57. 1968
 30. Crespi HL, V Smith, JJ Katz. *Biochemistry* 7:2232-41. 1968
 31. Cundiff SC, LH Pratt. *Plant Physiol* 51:210-13. 1973
 32. Cundiff SC, LW Pratt. *Plant Physiol* 55:207-11. 1975a
 33. Cundiff SC, LH Pratt. *Plant Physiol* 55:212-17. 1975b
 34. Davidson JW, "The Biochemistry of Nucleic Acids", 7^a ed., --- Chapman & Hall, London, 1972
 35. Davies HV, V Gaba, M Black, JM Chapman. *Planta* 152:70-73. --- 1981
 36. Duke SO, GH Egley, BJ Reger. *Plant Physiol* 59:244-49. 1977
 37. Dure LS en "The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination", AA Khan ed, Elsevier/North Holland Biochemi cal Press. 1977. pp. 335-44

38. Edwards MM, en "Seed Ecology", w Heydecker ed, Butterworth, - London, 1973. pp. 169-88
39. Eldan M, AM Mayer. Phytochem 13:389-93. 1974
40. Esashi Y, AC Leopold. Plant Physiol 44:1470-72. 1969
41. Everett MS, WR Briggs. Plant Physiol 45:679-83. 1970
42. Filner P, JL Wray, JE Varner. Science 165:358-67. 1969
43. Fry KT, FE Mumford. Biochim Biophys Res Commun 45:1466-73. -- 1971
44. Gardner G, CS Pike, HV Rice, WR Briggs. Plant Physiol 48:686-93. 1971
45. Gilmour PJ. J Mol Biol 34:305-16. 1968
46. Gordon ME, PI Payne. Planta 130:269-73. 1976
47. Grombein S, W Rüdiger. Z Physiol Chem 357:1015-18. 1976
48. Gupta D, N Sen. Plant Sci Lett 24:61-66. 1982
49. Haber AH, HJ Luippold. Plant Physiol 35:168-73. 1960
50. Hampf R, HW Schmidt. Z Pflanzenphysiol 82:68-77. 1977
51. Harwood JL, PK Stumpf. Plant Physiol 46:500-08. 1970
52. Hendricks SB, HA Borthwick. Proc Nat Acad Sci USA 58:2125-30. 1967
53. Hendricks SB, HW Siegelman. Compr. Biochem 27:211-35. 1967
54. Hendricks SB, RB Taylorson. Proc Nat Acad Sci USA 72:306-09. 1975
55. Hess D, "Plant Physiology", Springer-Verlag, New York, 1975
56. Hillman WS. Ann Rev Plant Physiol 18:301-24. 1967
57. Hopkins DW, WL Butler. Plant Physiol 45:567-70. 1970
58. Hunt RE, LH Pratt. Plant Physiol 64:327-31. 1979
59. Ikuma H, KV Thimann. Plant Physiol 35:557-66. 1960
60. Jacobsen JV, TJV Higgins, JA Zwar en ref. 7. pp. 241-62

61. Jaffe MJ, Science 162:1016. 1968
62. Jaffe MJ. Physiol Plant 22:1033-35. 1969
63. Jann RC, RD Amen en ref. 38. pp. 7-25
64. Jirgensons B, "Organic Colloids", Elsevier, Amsterdam, 1958
65. Jones CL. Planta 103:95-99. 1972
66. Kagawa T, JM Lord, H Beevers. Plant Physiol 51:61-65. 1973
67. Karssen CM Acta Bot Neerl 19:187-96. 1970
68. Katob H, Y Esashi. Plant Cell Physiol 16:687-96. 1975
69. Keates RAB, Biochem Biophys Res Commun 54:655-61. 1973
70. Keates RAB, AJ Trewavas. Plant Physiol 54:95-99. 1974
71. Kendrick RE, B Frankland. Planta 82:317-20. 1968
72. Kendrick RE, N Roth-Bejerano. Planta 142:225-28. 1978
73. Kendrick RE, CJP Spruit. Photochem Photobiol 18:139-44. 1973
74. Kendrick RE, CJP Spruit. Photochem Photobiol 26:201-14. 1977
75. Kendrick RE, CJP Spruit, B Frankland. Planta 88:293-302. 1969
76. Khan AA en ref. 38. pp. 29-45
77. Kidd GA, RE Hunt, ML Boeshore, LH Pratt. Nature 276:733-35. -
1978
78. Kindl H, H Ruis. Phytochem 10:2633. 1971
79. Kohler D. Planta 70:42. 1966
80. Kohler D. Planta 84:158. 1969
81. Koller D en "Seed Biology II", TT Kozlowski ed, Academic ---
Press, New York, 1972. pp. 1-101
82. Koller D, M Sachs, M Negbi. Plant Cell Physiol 5:85-100. 1964
83. Laboriau LG, Ann Acad Brasil Sci 44:477-534. 1972
84. Leff J, Plant Physiol 39:299-303. 1964
85. Link G. Planta 154:81-86. 1982
86. Linschitz H, V Kasche, WL Butler, WH Siegelman. J Biol Chem -

241:3395-3403. 1966

87. Longo CP, GP Longo. *Plant Physiol* 45:249-54. 1970
88. Marmé D, B Marchel, E Schäfer. *Planta* 100:331-36. 1971
89. Mayer AM en ref. 38. pp. 357-81
90. Mayer AM, A Poljakoff-Mayber, "The Germination of Seeds", 2^a ed. Pergamon Press, New York, 1975
91. Mayer AM, Y Shain, *Ann Rev Plant Physiol* 25:167-93. 1974
92. McArthur JA, WR Briggs. *Plant Physiol* 48:46-49. 1971
93. Mohr H.Z *Pflanzenphysiol* 54:63-83. 1966
94. Mohr H en "Physiology of Plant Growth and Development", MB Wilkins ed, McGraw-Hill, London. 1969. pp. 509-16
95. Mumford FE. *Biochemistry* 5:522-24. 1966
96. Mumford ME, EL Jenner. *Biochemistry* 10:98-101. 1971
97. Negm FB, OE Smith, J Kumamoto. *Plant Physiol* 51:1089-94. 1973
98. Nikolaeva MG en ref. 38. pp. 51-71
99. Norris RD, PJ Lea Fowden. *J Exp Bot* 81:615-25. 1973
100. Novikova HM, TY Rokitina, AA Shakov. *Fiziol Rast* 28:503-09. - 1981
101. Obendorf RL, A Marcus. *Plant Physiol* 53:779-81. 1974
102. Olatoye ST, MA Hall en ref. 39. pp. 233-49
103. Osborne DJ en ref. 38. pp. 319-31
104. Payne PI. *Biol Rev* 51:329-63. 1976
105. Pradet A, P Raymond, A Narayanan. *Cr. Acad Sci D* 275:1987-88. 1972
106. Pratt LH. *Ann Rev Plant Physiol* 33:557-82. 1982
107. Pratt LH, WL Butler. *Photochem Photobiol* 8:477-85. 1968
108. Pratt LH, WL Butler. *Photochem Photobiol* 11:361-69. 1970
109. Quail PH en "Plant Biochemistry" 3^a ed. J Bonner, JE Varner -

- eds, Academic Press, New York, 1976. pp. 683-711
110. Quail PH, E Schäfer, D Marmé. *Plant Physiol* 52:124-47. 1973a
111. Quail PH, E Schäfer, D Marmé. *Plant Physiol* 52:128-31. 1973b
112. Racusen RH. *Planta* 132:25-29. 1976
113. Rice HV, WR Briggs. *Plant Physiol* 51:927-38. 1973
114. Rice HV, WR Briggs, CJ Jackson-White. *Plant Physiol* 51:917.
1973
115. Roberts EH en ref. 39. pp. 189-216
116. Roberts EH, RA Smith en ref. 38. pp. 385-406
117. Rodaway S, BF Huang, A Marcus en ref. 7. pp. 203-17
118. Rollin P, G Maignan. *Nature* 214:741-42. 1967
119. Roux SJ, SG Lisanzki, BM Stocker. *Physiol, Plant* 35:85-90. -
1975
120. Rubin CS, AM Rosen. *Ann Rev Biochem* 44:831-87. 1975
121. Sarkar HK, P-S Song. *Biochemistry* 21:1967-72. 1982
122. Schäfer E. *J Math Biol* 2:41-48. 1975
123. Schäfer E, H Mohr. *J Math Biol* 1:9-15. 1974
124. Schäfer E, W Schmidt. *Planta* 116:257-66. 1974
125. Schäfer E, T-U Lässig, P Schpfer. *Photochem Photobiol* 24:267
-72. 1976
126. Schäfer E, B Marchel, D Marmé. *Photochem Photobiol* 15:457-64.
1972
127. Schäfer E, W Schmidt, H Mohr. *Photochem Photobiol* 18:331-34.
1973
128. Schmidt W, D Marmé, PH Quail, E Schäfer. *Planta* 111:329-34.
1973
129. Schopfer P. *Ann Rev Plant Physiol* 28:223-52. 1977
130. Schopfer P, D Bajracharya, R Bergfeld, H Falk en "Cell Diffe

- rentiation in Microorganisms, Plants and Animals", L Nover, K Mothes eds, Elsevier/North Holland Inc., New York. 1977. - pp. 625-39
131. Sen S, PI Payne, DJ Osborne. *Biochem J* 148:381-87. 1975
132. Siegelman HW, WL Butler. *Ann Rev Plant Physiol* 16:383-92. -- 1965
133. Siegelman HW, EM Firer. *Biochemistry* 3:418-23. 1964
134. Song P-S, HK Sarkar, H Tabba, KH Smith. *Biochem Biophys Res Commun* 105:279-87. 1982
135. Spiegel S, A Marcus. *Nature* 256:228-30. 1975
136. Spiegel S, RL Obendorf, A Marcus. *Plant Physiol* 56:502-07. - 1975
137. Spruit CJP, AL Mancinelli. *Planta* 88:303-10. 1969
138. Stocker BM, SJ Roux, WE Brown. *Nature* 271:180-82. 1978
139. Strafford GA "Essentials of Plant Physiology", Heineman Educ Books, London, 1979
140. Takaki M, RE Kendrick, SMC Dietrich. *Planta* 152:209-14. 1981
141. Taylorson RB, SB Hendricks. *Plant Physiol* 47:619-22. 1971
142. Taylorson RB, SB Hendricks. *Plant Physiol* 49:663-65. 1972
143. Taylorson RB, SB Hendricks. *Plant Physiol* 52:475-79. 1973
144. Taylorson RB, SB Hendricks. *Ann Rev Plant Physiol* 28:331-54. 1977
145. Thompson PA. *J Exp Bot* 20:1. 1969
146. Tobin EM. *Plant Mol Biol* 1:35-51. 1981
147. Tobin EM, WR Briggs. *Plant Physiol* 44:148-50. 1969
148. Tobin EM, WR Briggs. *Photochem Photobiol* 18:487-95. 1973
149. Tobin EM, WR Briggs, PK Brown. *Photochem Photobiol* 18:497- - 503. 1973

150. Trewavas AJ. *Ann Rev Plant Physiol* 27:349-74. 1976
151. VanPoucke M, R Cerff, F Barthe, H Mohr. *Naturwiss* 56:132-33. 1970
152. Vandepute J, KC Huffacker, R Alvarez. *Plant Physiol* 52:278-82. 1973
153. Villiers TA, *Plant Physiol* 53:875-78. 1974
154. Weidner M. *Planta* 75:94-98. 1967
155. Weidner M, H Mohr. *Planta* 75:99-108. 1967a
156. Weidner M, H Mohr. *Planta* 75:109-15. 1967b
157. Weidner M, M Jakobs, H Mohr. *Z Naturforsch* 20b:689-93. 1965
158. Wellman E. *Photochem Photobiol* 24:659-60. 1976
159. Wellburn AR, R Hampp, *Planta* 131:95-96. 1976
160. Wellburn AR, JP Ashby, FAM Wellburn. *Biochim Biophys Acta* -- 320:363-71. 1973
161. White JM, Cs Pike. *Plant Physiol* 53:76-80. 1974
162. Yoshida K, K Sasaki. *Plant Physiol* 59:497-501. 1977
163. Zouaghi M. *Planta* 131:27-31. 1976
164. Zouaghi M, R Malcoste, P Rollin. *Planta* 106:30-43. 1972