

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Acción de los doseles simulados sobre el crecimiento de
*Trifolium repens***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Aránzazu Azpíroz Sánchez

Madrid, 2015

TP
1985
042

Aránzazu Azpiroz Sánchez



x - 53 - 014222 - 7

ACCION DE LOS DOSEES SIMULADOS SOBRE EL CRECIMIENTO
DE TRIFOLIUM REPENS

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1985



Colección Tesis Doctorales. Nº

42/85

© Aránzazu Azpiroz Sánchez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 28015 Madrid
Madrid, 1985
Xerox 9400 X 721
Depósito Legal: M-6315-1985

CARLOS VICENTE CORDOBA, TITULAR DE
LA CATEDRA DE FISILOGIA VEGETAL DE
LA FACULTAD DE BIOLOGICAS DE LA UNI-
VERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICO:

Que la licenciada D^a M^a Aránzazu Azpiroz
Sanchez ha realizado en la Cátedra de Fisiolo-
gía Vegetal de la Universidad Complutense de
Madrid el trabajo que presenta para optar al gra-
do de Doctor en Ciencias Biológicas, con el tí-
tulo de : " Acción de los doseles simulados sobre
el crecimiento de Trifolium repens ".

Y para que conste firmo la presente cer-
tificación en Madrid a 30 de Mayo de 1979.



Este trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba. A él y a todos mis compañeros del laboratorio les expreso mi agradecimiento.



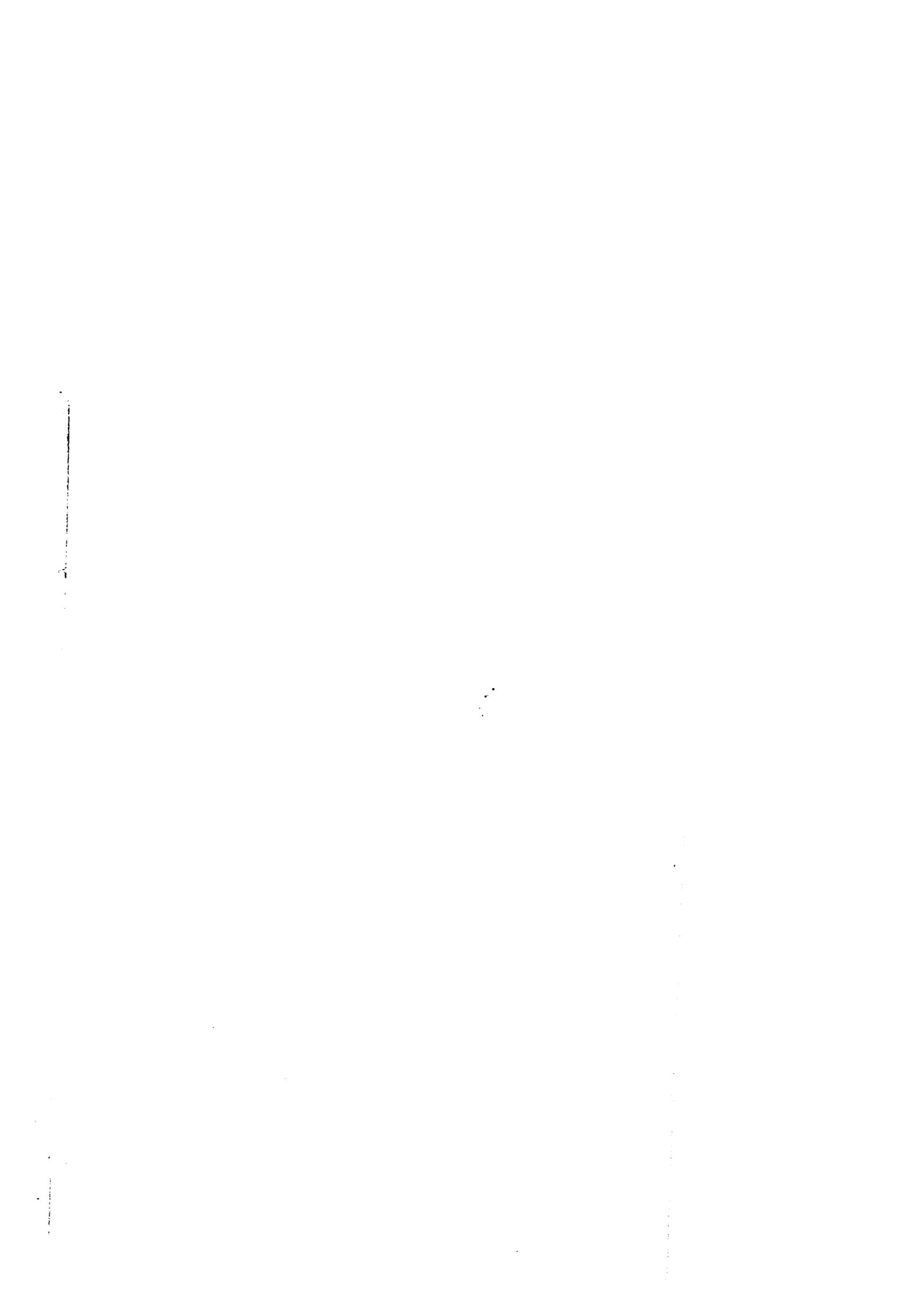
A Fidel

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Concepto de dosel	1
1.2. Efecto dosel y fotoequilibrio en las formas de fitocromo	6
1.3. Acción de los doseles simulados sobre el crecimiento vegetativo	7
1.3.1. Formación del aparato fotosintético y su control por fitocromo	7
1.3.2. Fotocontrol de la elongación de tallos	10
1.3.3. Fotoequilibrio y destrucción de fitocromo	13
2. MATERIALES Y METODOS	17
2.1. Organismo utilizado y condiciones de cultivo	17
2.2. Condiciones de iluminación	17
2.3. Medida de clorofilas	18
3. RESULTADOS	20
3.1. Influencia de los doseles sobre la germinación de <u>Trifolium repens</u>	20
3.2. Condiciones de elongación del hipocótilo	33
3.3. Crecimiento radicular	39
3.4. Evolución del peso frente a los diferentes tratamientos	48
3.5. Acumulación de clorofilas y efecto dosel	71
3.6. Posibilidad de una reacción de alta energía	71

	Página
4. DISCUSION	74
4.1. Acción del dosel sobre la germinación	74
4.2. Acción del dosel sobre la elongación	75
5. CONCLUSIONES	83
6. BIBLIOGRAFIA	85

1. INTRODUCCION



1. 1. - Concepto de dosel.

El desarrollo de una fisiología de la planta circunscrito al laboratorio ha proporcionado uno de los avances más espectaculares de las ciencias biológicas y es imprescindible el paso por esta metodología de cualquier investigador que pretenda especializarse en cualquier rama de este quehacer científico. Pero la reproductibilidad de las condiciones ambientales, o bien no se consideraba al reducir un problema fisiológico a sus aspectos meramente químicos, o bien solo se conseguía parcialmente.

Sin embargo, la variación de una única condición ambiental muy pronto puso de manifiesto los fallos que tales simplificaciones implicaban. Baste recordar que la validez plena del ciclo de Calvin se demostró para planta, o células, sometidas a muy altas concentraciones de dióxido de carbono. Sin embargo, si en algas se disminuía la concentración de dióxido de carbono hasta que la velocidad de la fotosíntesis fue proporcional a dicha concentración, apareció el ciclo glicólico como producto de la fotosíntesis (WHITTINGHAM y PRITCHARD, 1963); algo que ya había sido indicado por ZELITCH (1959) para hojas de tabaco. Claro es que la concentración de dióxido de carbono solo es uno de los factores ambientales a considerar. Esta situación tendría que sufrir la complicación de unas condiciones de temperatura, régimen hídrico, humedad, luz en último término.

Y aún en este punto, no se puede reducir el problema a un simple juego de intensidades luminosas incidentes, ya que la saturación en la fotosíntesis primaria puede lograrse a bajas intensidades e incluso con diversas fuentes, luz continua, destellos e incluso lasers. (BARBER, 1979). La influencia de la cualidad de la luz es algo que ya fue puesto de manifiesto en los comienzos del moderno conocimiento de la fotosíntesis (EMERSON y ARNOLD, 1933; EMERSON et al., 1957).

Nuestro trabajo versa sobre la reproductibilidad de las condiciones lumínicas ambientales y su utilización, para lo que vamos a partir de los ejemplos, que no inciden directamente sobre el proceso fotosintético.

La producción de filtros protectores de las células fotosintéticas sometidas a intensidades saturantes de luz es un hecho perfectamente conocido. En líquenes, como, Xanthoria parietina, puede ser puesto de manifiesto una gran simplicidad. Un talo líquénico expuesto a la luz directa del sol sintetiza alta cantidad de parietina que es excretada al cortex donde cristaliza, formando un filtro que retiene las luces de menor longitud de onda. El mismo talo, sometido a sombra, muestra una coloración mucho más débil (SCOTT, 1971). En este caso, estamos definiendo un efecto de intensidad.

Nuestro segundo ejemplo ha sido puesto de manifiesto por GORSKI (1975) al demostrar que la germinación de semillas de lechuga disminuye drásticamente cuando estas semillas

son pasadas de una iluminación difusa a una misma intensidad de iluminación filtrada a través de hojas de mibarbo. Sabiendo que estas semillas regulan su regulación por fitocromo, es sintomático notar que la disminución descrita es idéntica a la que se consigue cuando las semillas son iluminadas con luz roja seguida de infrarroja.

Con esto volvemos a centrar el problema bajo los dos aspectos de intensidad y cualidad, aunque no podemos pensar que tal separación sea absolutamente pura.

En ausencia de sombras y sin considerar la filtración por el aire y los cuerpos en él suspendidos, la variación de la intensidad vendrá dada exclusivamente por la altura del sol con respecto al cenit. En estas condiciones, la variación con la altura es un problema primariamente de intensidad (RIPLEY y REDMANN, 1976) aunque pueden observarse ciertas variaciones espectrales, más concretamente en la zona del azul, lo que conduciría a un cierto porcentaje de cualidad. (CURTIS y CLARK, 1950).

Si asumimos la existencia de interposiciones de cuerpos absorbentes entre el sol y la planta, preferentemente ó tra planta, tendremos una clara situación en la que se mezclan intensidad y cualidad en unos términos muy difícilmente separables (GATES, 1965). Si la luz solar incide sobre una planta de gran desarrollo vertical, parte de ella será absorbida, parte reflejada y parte transmitida. Por tanto, la intensidad de la luz -

filtrada que llegaría a una planta de desarrollo vertical inferior que crece a la sombra de la primera. Pero, al mismo tiempo, - la luz absorbida no lo ha sido uniformemente, sino en la distribución espectral que venga marcada por los componentes foliares de la planta más alta. Casi se podría vulgarizar este hecho diciendo que la sombra que da una planta sería una sombra verde. En estas condiciones, la eficiencia en la conversión de la energía absorbida daría una respuesta fotosintética (HUGHES, 1965), la eficiencia en la absorción de determinados λ daría una respuesta fotomorfogénica. Estos hechos nos introducen al concepto del término dosel que definiremos como aquella masa de - órganos vegetales que filtran la luz sobre otras plantas que crecen bajo ella.

Antes de iniciar su estudio bajo un punto de vista fisiológico, y la posibilidad de su sustitución experimental - por doseles simulados, vamos a introducir los mínimos conceptos físicos necesarios para su exacta comprensión.

Si representamos por S la cantidad de energía - radiante recibida por unidad de área y unidad de tiempo, la irradianción distribuida en el espectro para una λ será

$$(dS/d\lambda)_{\lambda}$$

El contenido cuántico de una radiación por unidad de λ será

$$Q = (dS/d\lambda)_{\lambda} (\lambda/hc)$$

La densidad del grupo cuántico para dos λ determinadas,

$\lambda_1 = 660\text{nm}$ $\lambda_2 = 730\text{nm}$, en términos de Q_1 y Q_2 será

$$= \frac{Q_1}{Q_2}$$

por lo que $= (\lambda_1 / \lambda_2) (dS/d\lambda)_1 / (dS/d\lambda)_2$

donde $\lambda_1/\lambda_2 = 660/730 = 0,90$ (MONTEITH, 1976).

Esta forma de expresar el flujo cuántico en función de la distribución espectral tiene su antecedente en HOLMES y SMITH (1975) que definen la razón E_{660}/E_{730} . Sin embargo lo más interesante de este parámetro es su posible relación con la forma infrarroja del fitocromo. En efecto, cuando se utiliza un do sel experimental, o simplemente, una fuente artificial de luz, el contenido energético, el contenido energético correspondiente a $\lambda_1 = 660\text{nm}$ y $\lambda_2 = 730\text{nm}$ proporcionará un fotoequilibrio ϕ definido por

$$Pr \frac{660}{730} \rightarrow Pfr$$

que estará tanto más desplazado hacia Pfr cuanto mayor sea la fracción de energía correspondiente a la fracción de $\lambda_2 = 730\text{nm}$. Como ejemplo, bastaría aducir el expuesto por HOLMES y SMITH (1975): una fuente de luz "preferentemente" roja proporciona un $\xi = 20,1$ que, a su vez, proporciona un fotoequilibrio $\phi = 0,80$, entendiendo $\phi = Pfr/P_{total}$; una fuente de luz "preferentemente" infrarroja proporciona un $\xi = 0,002$ que, a su vez, propicia $\phi = 0,04$.

1.2. Efecto dosel y fotoequilibrio en las formas de fitocromo.

La relación antes expuesta puede ser cuantificada con vistas a la interpretación de experimentos de una manera simple. Aunque las medidas directas del fotoequilibrio no son en ningún caso sencillas, siempre resultan más fáciles de hacer en un tejido blanco que en uno verde ya que en aquel caso, no existen solapamientos de absorción en la zona 660-730 nm entre fitocromo y clorofilas. La relación entre ζ y ϕ para estos órganos ha sido estimada por SMITH y HOLMES (1977) para hipocótilos de Cucurbita pepo y *Chenopodium album*.³ En ambos casos, para un rango de ζ que va desde 0 a 16, ϕ describe una cinética hiperbólica que se puede asimilar fácilmente a sus dos tangentes, de tal manera que, con un margen de error mínimo, se puede establecer una relación lineal entre ζ y ϕ en márgenes de 0-1 y 1-16 de ζ . Esto proporcionaría un fácil método de estimación de ϕ en aquellos tejidos verdes en los que la medida directa de Pfr no es posible por las razones expuestas anteriormente.⁴

Pero este método de enfocar la medida del fotoequilibrio presenta, además, la ventaja de establecer una relación directa entre el estado de fotoequilibrio y la respuesta fisiológica. MORGAN y SMITH (1976) demuestran que, para plántulas de Chenopodium album mantenidas en condiciones de iluminación constantes y distribuciones espectrales de flujo diferentes, es posible es

tablecer una relación perfectamente lineal entre los diferentes valores de ϕ , calculados a partir de ξ , y la velocidad de extensión del tallo. Esto haría que, prácticamente, todas las respuestas fisiológicas que se sospeche puedan estar controladas por fitocromo sean evaluables fácilmente mediante la aplicación de doseles simulados, cuyos valores ξ hayan sido previamente establecidos.⁴

1.3.- Acción de los doseles simulados sobre el crecimiento vegetativo.

Los niveles de actuación del fitocromo en la conducta general de desarrollo de una planta son muy variados, afectando a muy diversos parámetros. Por su importancia, y por la atención que se les ha prestado en el presente trabajo experimental, se hará referencia específicamente a dos de ellos.

1.3.1.- Formación del aparato fotosintético y su control por fitocromo.

La formación del aparato fotosintético depende de la luz tanto para la conversión de protoclorofilida en clorofilida como para la síntesis y ensamblamiento de varios factores cloroplásticos. Si bien aquella es una reacción fotoquímica, independiente en sí misma del fitocromo, estos parecen estar bajo control directo de Pfr.⁴

La síntesis de clorofilas es controlada por fitocromo en muchas plantas.² Este control ha sido descrito para Glycine, Lupinus y Cannabis (SIRONVAL, 1958), Lolium multiflorum (REYSS y BOURDU, 1971), cebada AUGUSTINUSSEN y MADSEN, 1965) etc.³ La razón clorofila a/ clorofila b está también controlada por fitocromo (SIRONVAL et al.³, 1961; REYSS y BOURDU, 1971; MCLAREN y SMITH, 1978).²

Las acciones del fitocromo sobre la síntesis de clorofilas son todavía discutidas.¹ VIRGIN (1958) sugiere que el fitocromo regula preferentemente la síntesis de protoclorofilida en hojas de plántulas etioladas de trigo.³ Más tarde, MOHR (1972) afirma que, en plántulas de mostaza, Pfr controla tanto la síntesis de protoclorofilida como el tamaño del conjunto de la misma.⁴ FOWDEVILLE (1975) puntualiza que Pfr controla la síntesis de la proteína holocromo siendo el pigmento sintetizado en oscuridad, mediante suplemento de ácido δ -aminolevulínico exógeno (GRANICK, 1967) como una forma no holocrómica la cual no es fotoconvertible.¹ La irradiación de las plántulas con luz roja induce la formación de la proteína holocromo, lo cual permite la fotoconversión.⁴ Por otra parte, MASONER y KASEMIR (1975) han demostrado que la acumulación de clorofilas en plántulas de mostaza es regulada por Pfr a nivel de la formación de 5-aminolevulinato.⁴

Un caso algo controvertido ha sido descrito por SUNDQUIST (1978) al demostrar que la acumulación de protoclorofilida en hojas de trigo creciendo en oscuridad y suplementadas con AIA

incrementa después de una corta irradiación con luz roja, aunque tal estimulación no era revertida por infrarroja.

Otros aspectos de la fotomorfogénesis de los cloroplastos han sido también estudiados. BOARDMAN et al., (1971) han demostrado que la reacción de HILL en plastidios de guisante se consigue desarrollar mediante un régimen de luz roja continua. Paralelamente, los cuerpos prolamelares se transforman en lamelas constituidas. La luz roja también incrementa el contenido en grana de los cloroplastos de cebada (BUSCHMANN et al., 1978). No obstante, BRADBEER y MONTES (1976) afirman que tanto la transformación como la dispersión de los cuerpos prolamelares no están controlados por fitocromo; antes bien, Pfr lleva a cabo su acción previniendo la recondensación de tales cuerpos así como controlando la transcripción de SHIBATA.

Quizá sea la síntesis de enzimas el aspecto de la fotodiferenciación de los cloroplastos que más atención ha recibido por parte de los investigadores. La nitrato reductasa (VILLALOBOS, 1974) y nitrito reductasa (RAMIREZ y VICENTE, 1979) son controladas positivamente por Pfr en cotiledones de Citrullus vulgaris, así como en plántulas de arroz (GANDHI y NAIR, 1974). La ferredoxin-NADP⁺-reductasa, alternativa fisiológica de la nitrito reductasa, también es controlada positivamente por Pfr en cloroplastos de cotiledones de sandía (RAMIREZ, et al. 1979). Enzimas cruciales en el ciclo de Calvin, como son la ribulosa 1,5-diP-carboxilasa y la gliceraldehído-P-deshidrogenasa (MOHR y

KASEMIR, 1976) o enzimas cloroplásticas de síntesis de aminoácidos, como serían la glutamato deshidrogenasa (WELANDER, 1974; VICENTE et al., 1975) y algunas transaminasas (HEDLEY y STODDART, 1971; WELANDER, 1974) son también regulados por Pfr.

1.3.2.- Fotocontrol de la elongación de tallos.

La elongación de tallos está sometida a un control hormonal que ha sido estudiado de una forma suficiente. Sin embargo, los datos que se conocen respecto a su fotocontrol son la mayor parte de las veces fraccionarios. Una primera indicación sobre la existencia de una regulación por Pfr fue suministrada por DOWNS y BORTHWICK (1956) al demostrar que la elongación de los internodos de Weigela florida, así como su número, aumentaba la longitud del fotoperiodo al que las plantas eran sometidas, variando aquella entre 8 y 16 horas de luz diaria.

Este tratamiento puede ser substituído por breves exposiciones a veces roja o infrarroja seguidos de un periodo de obscuridad. Así, DOWNS et al., (1957) encuentran que la elongación internodal de Phaseolus vulgaris disminuye de una manera paralela al aumento en el número de horas de obscuridad que siguen a una irradiación inicial de 5 minutos con luz infrarroja, mientras que tal longitud aumenta cuando la irradiación inicial ha consistido en 5 minutos de luz infrarroja seguidos de 5

minutos de luz roja.

Estos datos no son, en modo alguno, suficientemente de finitorios para decidirse por un control de la elongación por fitocromo, sea en sentido positivo (esto sería lo indicado por las ex periencias hasta aquí descritas) como en sentido negativo.

Más definitivos son los datos aportados por HARTMANN (1966 y 1967) al demostrar que luces de 720nm muestran efectos inhibitorios sobre el desarrollo del hipocótilo de lechuga mientras que longitudes de onda superiores o inferiores no muestran efectos apreciables. Se trataría, posiblemente, de un control negativo por Pfr, existente en baja proporción de fotoequilibrio en las condiciones descritas. La pequeña proporción de Pfr, biológicamente activo y estable durante tiempos prolongados, patentizaría el efecto inhibitorio sobre la elongación.

En los mismos términos se expresan MOHR (1972) en un detallado resumen bibliográfico, y más tarde VINCE-PRUE - (1975), aportando sus propias experiencias sobre la especie Fus- chia hybrida, por no recordar los datos descritos por HOLMES y SMITH (1976) para Chenopodium album, que han sido comenta- dos en el apartado 1.2 de esta misma introducción.

HOLMES y SMITH (1977) han estudiado las condicio- nes de irradiación que promueven la elongación del hipocotilo de Cucurbita pepo. Estos autores describen que dos tipos de luces, luorescente o incandescente, promueven tanta más elongación hi- pocotilar cuanto más bajo es el valor de ϕ en esas condiciones.

Los mismos resultados obtienen cuando simulan luz solar con lám para incandescente y aún una más acentuada elongación cuando se simula una filtración a través de dosel utilizando lámparas incandescentes a las que se les suma una fuente de luz infrarroja. No solo la longitud del hipocótilo se ve afectada por estos tratamientos, sino también su peso seco y su peso fresco, el desarrollo de los cotiledones en peso y en superficie, el contenido de los cotiledones en clorofilas tanto a como b, y la razón clorofila a/b.

Más recientemente ha sido estudiado el fotocontrol del crecimiento del tallo de una planta caulescente de día largo Fuchsia híbrida. Según VINCE-PRUE, (1977) F. híbrida muestra dos tipos de respuesta a la luz. En la primera, la longitud del internodo aumenta por irradiación infrarroja dada al final de un fotoperiodo de 5 horas, siendo este efecto revertido por un tratamiento de luz roja. La longitud del internodo era inversamente proporcional a ϕ , cuando ϕ se establece antes de pasar al periodo de obscuridad, sin que se hayan podido detectar pérdidas de Pfr durante las 16 horas del nictoperiodo. Con el desarrollo de los sucesivos internodos aparece un segundo tipo de respuesta por la cual los tallos elongan después de prolongadas exposiciones diarias a luz roja o infrarroja o a una mezcla de los dos tipos de luces. La longitud del internodo aumenta en cuanto aumenta el número de horas diarias de luz.

En algunos casos, como ha sido descrito para hipocótilos de lechuga (STUART et al., 1977), la inhibición de la

elongación por luz puede ser revertido por el tratamiento con ácido giberélico.

El fitocromo también controla la elongación de hipocótilo de Brassica oleracea var. capitata. En efecto, OTTO (1978) demuestra que el efecto relativo sobre el crecimiento del hipocótilo de esta planta muestra un comportamiento relativamente complejo. Así, mientras que cortos tiempos de irradiación con luz roja son mucho más efectivos que con infrarroja, largos tiempos de irradiación infrarroja son más efectivos que los equivalentes con luz roja.

1.3.3. - Fotoequilibrio y destrucción de fitocromo.

La utilización de doseles experimentales proporciona dos tipos cinéticos de respuesta en cuanto al estado fotoestacionario se refiere.

a) Respuestas de orden cero, aquellas que se dan respondiendo a "concentraciones" mínimas de Pfr. En este contexto pueden integrarse prácticamente todas las inducciones enzimáticas por Pfr. Por no hacer un sinnúmero de referencias, una buena cantidad de éstas han sido recopiladas por MOHR (1972). En resumen, un régimen de iluminación que proporciona un estado fotoestacionario bajo ($\phi = 0,03$) puede provocar una respuesta de síntesis máxima de un enzima.

b) Respuestas de orden uno, aquellas que se dan en paralelo a las "concentraciones" diferentes de Pfr en función del

tiempo. Un ejemplo muy concreto ha sido descrito por MORGAN y SMITH (1976) para la velocidad de elongación caular de Chenopodium album.

No es fácil reconciliar ambos tipos de respuesta en un modelo único. Puede que ambos sean ciertos, aunque lo más probable es que se trate de un problema de concentraciones relativas de fitocromo. Un $\phi = 0,03$ al que se ha aludido puede llevar emparejado, y de hecho lo lleva, una progresiva disminución de P_{tot} .

BUTLER et al. (1963), trabajando con Zea, y más tarde CHORNEY y GORDON (1966) con Avena, demostraron que una exposición continua de los tejidos a luz infrarroja continua da como resultado una apreciable velocidad de destrucción de Pfr. CLARKSON y HILLMAN (1967a) demostraron, no obstante que ni en plántulas intactas de Pisum sativum, Phaseolus aureus y Sinapis alba, ni en tejidos escindidos se observaba disminución en la cantidad de fitocromo como resultado de la exposición a luz infrarroja, aunque confirmaron su destrucción para Zea mays. Según estos autores, la estabilización observada para las primeras especies podría ser debida a un mecanismo de reversión lo bastante activo como para hacer desaparecer todo el Pfr antes de que el mecanismo de destrucción pueda atacarlo.

Todos estos hechos experimentales dan por sentido que Pfr es una forma lábil e inestable, datos que se han confirmado para un buen número de plantas. En Amaranthus la desaparición de la forma inestable Pfr no envuelve reversión de Pr. La constan-

te de velocidad de descenso en la cantidad de fitocromo total está directamente relacionada con la proporción de la forma Pfr (KENDRICK y FRANKLAND, 1968). Por esto, la utilización de la luz roja en los programas de irradiación provocaban el mayor descenso en la cantidad de fitocromo total para Amaranthus.

Normalmente, esta destrucción de fitocromo lleva aparejado un proceso de neosíntesis con características de autocatalisis. Hasta donde hoy sabemos, la síntesis de novo del fitocromo es una función compleja dependiente de tres parámetros: cantidad de Pr Inicial, P_{tot} susceptible de ser sintetizado y la concentración de un precursor que, en principio, podría identificarse con el producto de degradación de Pfr. (BOISARD y BALAWGE, 1972).

Según estos datos, es posible explicar la aparente paradoja descrita para cotiledones de Citrullus vulgaris por RAMIREZ y VICENTE (1976). Según estos autores, la más rápida destrucción del fitocromo, seguida de su más rápida neosíntesis, se lograba para programas de irradiación roja continua o de oscuridad continua, mientras que la más lenta destrucción era propiciada por programas de iluminación infrarroja continua. La paradoja surge si se piensa que el sometimiento de las plántulas a oscuridad continua debe proporcionar los más bajos valores de ϕ . Esto es cierto. Lo que sucedía era que se partía de plántulas cuyo ϕ era de 0,48. La reversión oscura, en el periodo de medida rebajaba este nivel a 0,33 mientras que la irradiación infrarroja proporcio

na rápidamente un valor $\phi = 0,05$. Este hecho, con el planteamiento realizado por BOISARD, explicaba la rápida destrucción en oscuridad.

Poco se conoce, realmente, del mecanismo de destrucción. SCHAFFER (1978) demuestra, para Cucúrbita pepo, que el proceso puede ser dependiente de la edad. FURUYA y HILLMAN (1966) demostraron, en Pisum sativum, la existencia de un compuesto de bajo peso molecular, que destruye rápidamente Pfr en extractos celulares, incluso a 0°. Más tarde, CLARKSON y HILLMAN (1967b) encontraron, para la misma planta, que el proceso de destrucción era irreversiblemente inhibido por cicloheximida y actinomicina D así como por fenoles de tipo auxínico. Estos hechos, junto con el absoluto requerimiento de oxígeno, parecen indicar que el proceso de destrucción podría ser una oxidación enzimática que utilizara cofactores (¿ fenoles?) de bajo peso molecular.

Así pues, todo programa de irradiación propicia un fotoequilibrio constante y al mismo tiempo, unas variaciones en el contenido en fitocromo total, que, si no se controlan, pueden dar lugar a difíciles interpretaciones de los datos experimentales.

1. 7

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.- Organismo utilizado y condiciones de cultivo.

El organismo utilizado ha sido Trifolium repens R. B. prod. nº 2.

Las semillas se esterilizaron en superficie por lavado durante medio minuto con cloruro mercurico al 1% y, a continuación, con alcohol absoluto durante un minuto. Inmediatamente eran lavadas con abundante agua destilada esteril hasta que ésta no daba reacción de cloruros.

500 mg de estas semillas eran dispersadas sobre un papel de filtro contenido en una placa Petri, previamente esterilizada en autoclave, a 1 atmósfera durante 30 minutos y secadas durante dos horas a 120°C. Las semillas eran entonces regadas con 6 ml de disolución nutritiva HOAGLAND (HELLER, 1969) y se incubaban a 26°C.

2.2.- Condiciones de Iluminación.

Como fuente de luz blanca se utilizó una batería de tubos fluorescentes Philips day light, 40 W, de tal manera que a nivel de la planta proporcionaban una densidad de flujo de 12.000 erg. cm⁻² s⁻¹.

Como fuente de luz roja se utilizó una batería de tubos fluorescentes Magda 59, 40 W con un sistema de filtros compuestos por una capa de cinemoid nº 1 y otra de cinemoid nº14 con idéntica densidad de flujo (SMITH, 1975). En estas condicio-

nes se ha calculado el valor de \mathcal{S} como de 13,4 (HOLMES y SMITH, 1975; MONTEITH, 1976).

Como fuente de luz infrarroja se han utilizado lámparas incandescentes Philips HP 3608, 150 W, y como sistema filtro, una capa de 10 cm de agua circulante y debajo una capa de cianemoid 20. El valor de \mathcal{S} calculado en estas condiciones fue de 0,001.

La luz verde se obtuvo mediante filtración de luz blanca a través de filtros de gelatina Kodak, nº 61, que presentan una transmitancia de 39,6% a 530 nm. En este caso, el valor de \mathcal{S} era cero para dos densidades de flujo distintas, 4.000 y 12.000 $\text{erg. cm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se utilizó además, un tipo de dosel experimental reconstituido a partir de un extracto acetónico de Cedrus atlántica var. glauca, preparado por trituración en batidora de 30 g de acículas en 500 ml de acetona al 80%. Este dosel tenía las siguientes características espectrales: máxima absorbancia en la zona 300-500 nm y 630-690 nm y máxima transmitancia en la zona 500-630 nm. La luz blanca era filtrada a través de este dosel, refrigerado durante todo el tiempo de iluminación mediante agua circulante.

2.3.- Medida de clorofilas.

Las plántulas completas se trituraron en un mor-

tero con arena de cuarzo, disolviendo el triturado en 10 ml de acetona al 80% y manteniendo en oscuridad hasta que el residuo aparecía completamente blanco. Los residuos se separaron por centrifugación a 3.600 x g durante 10 minutos a 4°C. Las densidades ópticas a 649 y 665 nm se midieron en un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL, calculándose la cantidad de clorofilas mediante las fórmulas

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}) = 11,63 \times (A_{665}) - 2,39 \times (A_{649})$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/ml}) = 20,11 \times (A_{649}) - 5,18 \times (A_{665})$$

según describen STRAIN, H.H., COPE, B.T., SVEC, W.A. (1971).

11

3. RESULTADOS

3.1.- Influencia de los doseles sobre la germinación de *Trifolium repens*.

Lotes de 500 mgs. de semillas de *Trifolium repens* esterilizadas fueron sembrados sobre papel de filtro suplementado con medio Hoagland base como se describe en métodos. El porcentaje de germinación se midió a lo largo de 12 días en condiciones de iluminación continua como se especifica en la figura 1. En ella se observa que el 100% de germinación se consigue en el tiempo más breve, cuando las semillas, desde su siembra, son irradiadas con luz infrarroja continua. En estas condiciones, al 6º día de la siembra todas las semillas han germinado. En la irradiación de luz roja desde el principio de la siembra retrasa en un día la consecución del 100% de germinación y en otro día más la irradiación con luz blanca continua. El mayor retraso en la germinación se observa para las semillas control que crecen en condiciones de oscuridad continua, ya que el 100% de germinación se logra al 11º día de la siembra.

Se ha estudiado la modificación que en esta conducta pudiera aparecer cuando en lugar de un sistema de iluminación continua se utilizan alternancias fotoperiódicas. Para ello se escogió la alternancia fotoperiódica de 11 horas de luz blanca y 13 horas de oscuridad diarias. En estas condiciones como se observa en la figura 2, el 100% de germinación se obtiene a un tiempo aun menor que el óptimo antes descrito. Las semillas sometidas

Figura 1.- Porcentaje de germinación de semillas de T. repens bajo regímenes de iluminación continua blanca (○), roja (▲) e infrarroja (△), y oscuridad continua (●).

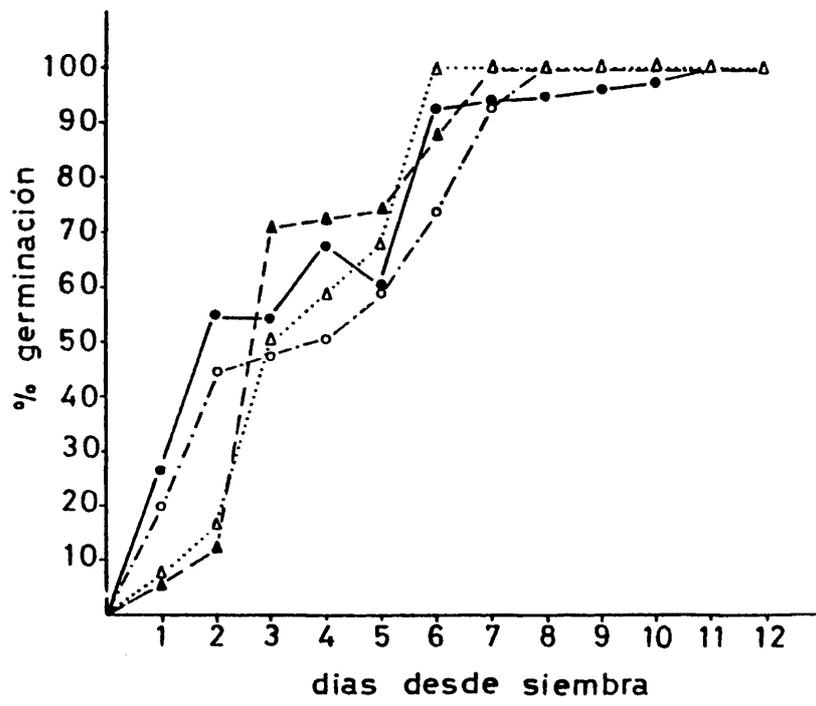
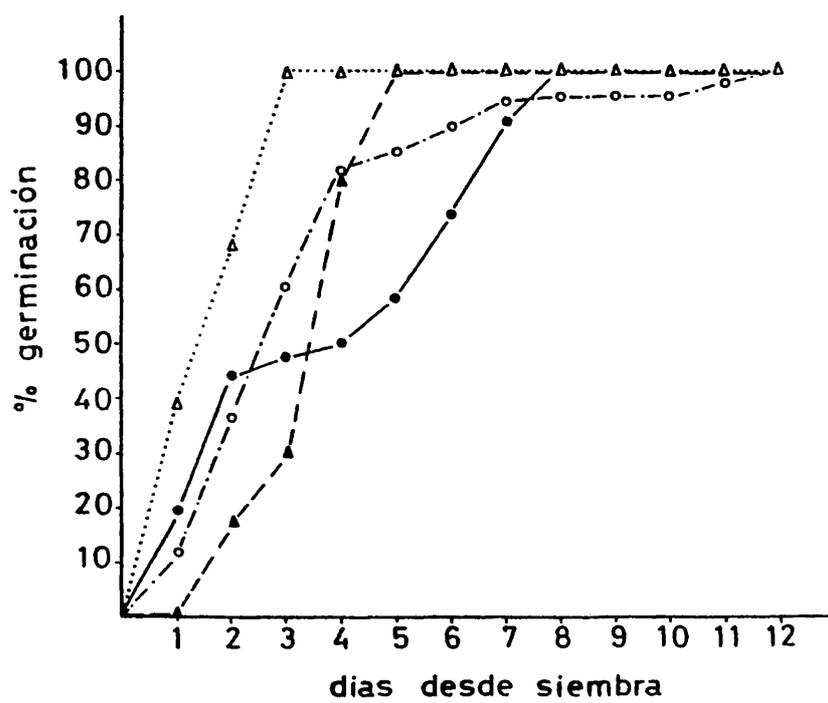


Figura 2.- Porcentaje de germinación de semillas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: luz blanca continua (●), Fotoperíodos (▲), 1h de luz filtrada a través del dosel experimental + luz blanca continua (○) o + fotoperíodos (△).



das a este fotoperiodo, germinan en su totalidad al 5º día de la siembra.

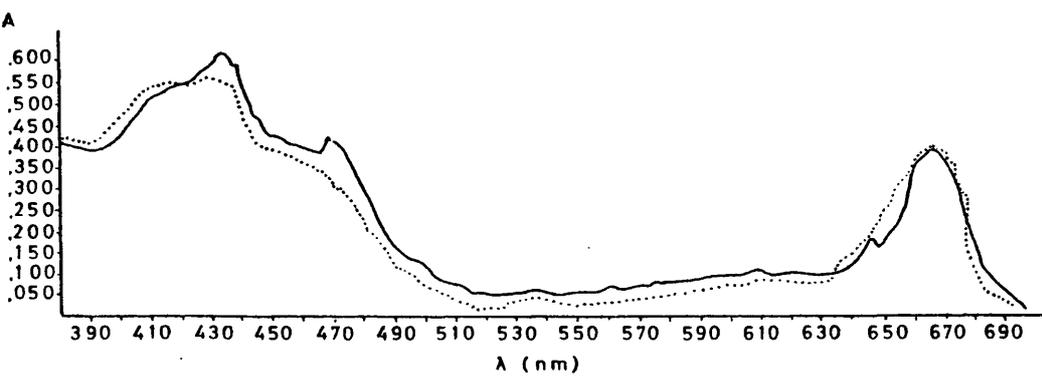
En este punto se introduce por primera vez, la iniciación del periodo con una corta irradiación filtrada a través de un dosel experimental constituido por un extracto acetónico de hojas tal como se describe en métodos. En la figura 2 y comparándolos con los resultados obtenidos con irradiación blanca continua o alternancia fotoperiódica se muestra la modificación que en ambos casos es provocada al iniciar el programa de irradiación con 1 hora de luz filtrada. Cuando a esta hora de luz filtrada a través del dosel sigue una iluminación blanca continua para los 12 días controlados experimentalmente, la germinación se retrasa ya que el 100% sólo es obtenido en el último día de la experiencia. Por comparación con el tratamiento con luz continua sin irradiación previa, el 100% de germinación ha sufrido un retraso de 5 días.

Por el contrario, cuando a la irradiación filtrada sigue un programa de alternancias fotoperiódicas, la germinación se acelera notablemente ya que el 100% de germinación se consigue al tercer día de la siembra.

En este punto se juzgó necesario analizar la distribución espectral de la luz transmitida por el dosel, para tratar de simular mediante filtros dichas características espectrales.

La figura 3 muestra el espectro de absorción del extracto acetónico en la zona comprendida entre los 380 y 700 nm.

Figura 3.- Expectro de absorción de un extracto acetónico de ací-
culas de Cedrus atlántica var. glauca.



La línea continua muestra que dicho dosel absorbe principalmente en la zona del azul, con un pico máximo a los 435 nm, y secundariamente en la zona del rojo a los 665 nm. Como se ha dicho anteriormente, este dosel filtra luz blanca durante 1 hora de tiempo en las experiencias descritas. Para verificar si existía algún cambio notable en sus características de absorción debido a la posible fotooxidación de los pigmentos en ausencia de estructuras celulares, se midió el espectro de absorción al cabo de esta hora de iluminación. Dicho espectro que se muestra en la figura 2 mediante una línea de puntos, no sufre ninguna modificación en la zona del rojo y una pequeña modificación en la zona del azul, por lo que la distribución espectral de la luz filtrada a lo largo de la hora de iluminación se estima como invariante.

La figura 4 muestra el espectro de transmisión de dicho dosel, encontrándose lógicamente una transmisión mínima (25%) en la zona del azul y en la zona del rojo (45%), mientras que la máxima transmisión (90%) se logra a 520-630 nm., y en la zona del infrarrojo superior a los 700 nm.

En estas condiciones se procedió a simular la hora de preirradiación mediante las luces monocromáticas, identificadas como mayoritariamente filtradas a través del dosel. La figura 5 muestra que una hora de irradiación roja o infrarroja seguida de oscuridad continua durante los 12 días de experimentación, no modifica prácticamente la germinación por comparación con los datos obtenidos para las siembras sometidas a oscuridad continua,

Figura 4. - Espectro de transmitancia de un extracto acetónico de acículas de Cedrus atlántica var. glauca.

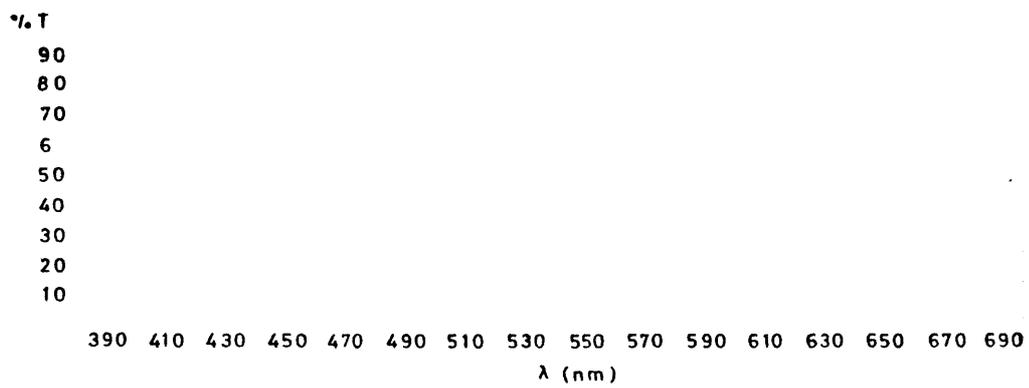
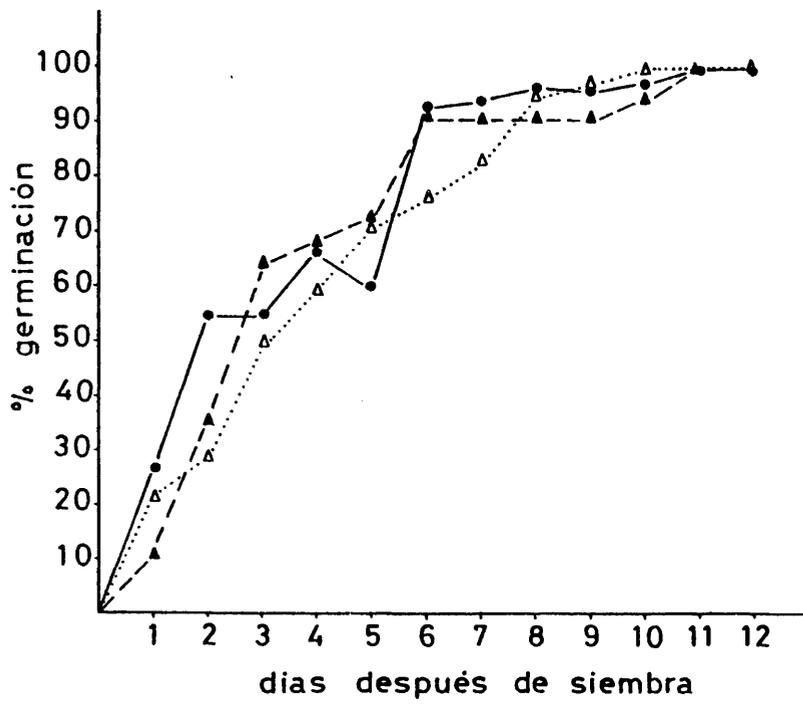


Figura 5. - Porcentaje de germinación de semillas de T. repens en condiciones de oscuridad continua (●) y pretratadas durante 1h con iluminación roja (▲) o infrarroja (△). † oscuridad.



así el pretratamiento con luz roja, provoca un 100% de germinación al 11º día de la siembra mientras que el pretratamiento con luz infrarroja lo consigue al 10º. Una aceleración de la germinación es conseguida cuando la preirradiación es de luz verde de 520 nm. En la figura 6 se observa que el 100% de germinación en estas circunstancias, se consigue al 7º día de la siembra. En la misma figura se observa que cuando la preirradiación es luz filtrada a través de dosel seguida de oscuridad continua, el 100% de germinación se obtiene al 4º día de la siembra, de aquí podría concluirse que los efectos del dosel no pueden simularse por las dos luces filtradas individualmente consideradas. La simulación más cercana posible se obtiene cuando las semillas son irradiadas mediante dos focos laterales, uno de luz infrarroja y otro de luz verde, que se superponen sobre la siembra, en estas condiciones la germinación de la totalidad de las semillas se logra al 5º día de la siembra.

Un resumen de estos resultados se ofrece en la tabla 1.

3. 2. - Condiciones de elongación del hipocótilo.

Utilizando los mismos programas de irradiación descritos en el apartado anterior, se ha estimado la elongación del hipocótilo como parámetro de crecimiento. En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos con tratamientos de oscuridad o iluminaciones continuas. La mayor elongación hipocotilar para los 12

Figura 6.- Porcentaje de germinación de semillas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: 1h de luz filtrada a través de dosel experimental + oscuridad (o), 1h de luz verde de alta intensidad + oscuridad (▲), 1h de luz verde de baja intensidad + oscuridad (Δ), Oscuridad continua (●).

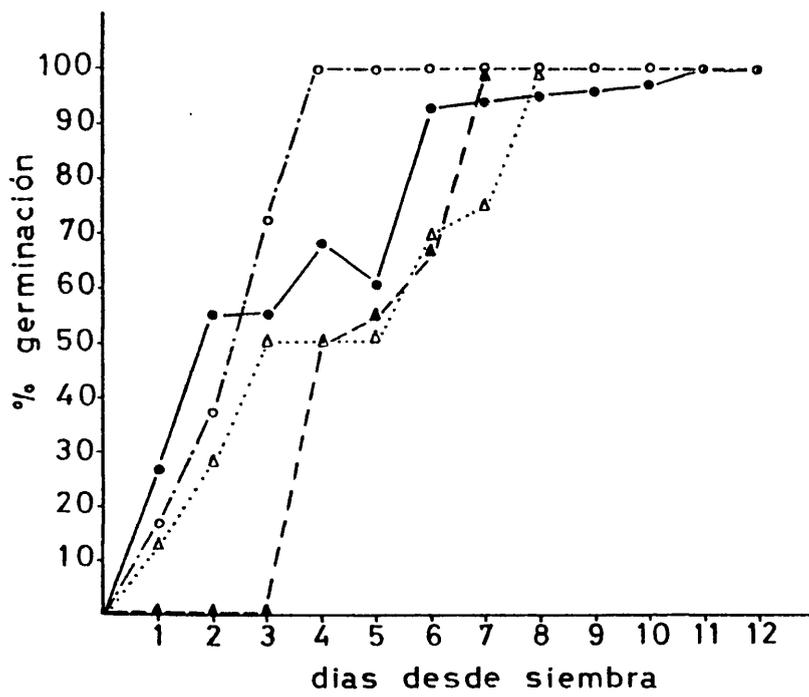
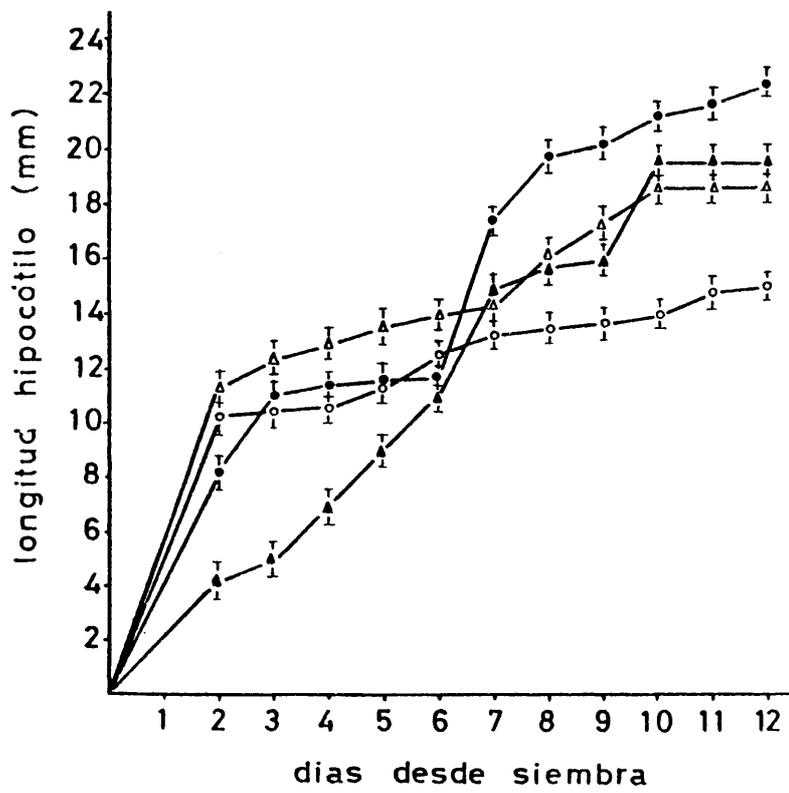


TABLA 1

Efecto de los doseles sobre la germinación de Trifolium repens.

Tratamiento	Día en el que se alcanza el 100% de germinación.
Oscuridad continua	11
Luz blanca continua	8
Luz roja continua	7
Luz infrarroja continua	6
Fotoperíodos	5
1 h dosel ↓ fotoperíodos	3
1 h dosel ↓ blanca continua	12
1 h dosel ↓ oscuridad	4
1 h luz roja ↓ oscuridad	11
1 h luz infrarroja ↓ oscuridad	10
1 h luz verde (a. i) ↓ oscuridad	7
1 h luz verde (b. i) ↓ oscuridad	8
1 h (IR ↓ V (a. i)) ↓ oscuridad	5

Figura 7.- Longitud del hipocótilo de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: Luz blanca continua (o), roja continua (▲) e infrarroja continua (Δ) y oscuridad continua (●).



días de experimentación se logra en condiciones de oscuridad continua mientras que la mayor velocidad de crecimiento viene provocada por la iluminación blanca continua. Las iluminaciones roja e infrarroja proporcionan resultados muy similares, intermedios entre los dos descritos.

Al contrario de lo que sucedía en la germinación, el sometimiento de las plantas a iluminaciones fotoperiódicas, no acelera la elongación del hipocótilo, ni siquiera la preirradiación durante 1 hora con luz filtrada a través de dosel. La máxima velocidad de elongación se logra cuando se utilizan bien preirradiaciones con luz verde o bien con luz filtrada a través de dosel. Pero en este caso, la máxima elongación se logra cuando la preirradiación se realiza con luz verde más infrarroja seguida de oscuridad continua (figuras 8 y 10).

3.3. - Crecimiento radicular.

El crecimiento radicular estimado como la longitud de la raíz primaria muestra una moderada independencia frente a cualquiera de los tratamientos anteriores, así la figura 11 muestra que las plántulas desarrolladas en condiciones de iluminación continua, alcanzan su mayor crecimiento radicular a partir del 4º día de crecimiento, mostrándose invariable a partir de ese momento. La irradiación infrarroja continua y más aún la roja, dan valores superiores a los obtenidos en oscuridad pero de igual mane

Figura 8. - Longitud del hipocótilo de plántulas de *T. repens* sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: luz blanca continua (●). Fotoperíodos (▲). 1h de luz filtrada a través del dosel experimental + luz blanca continua (○) o + fotoperíodos (△).

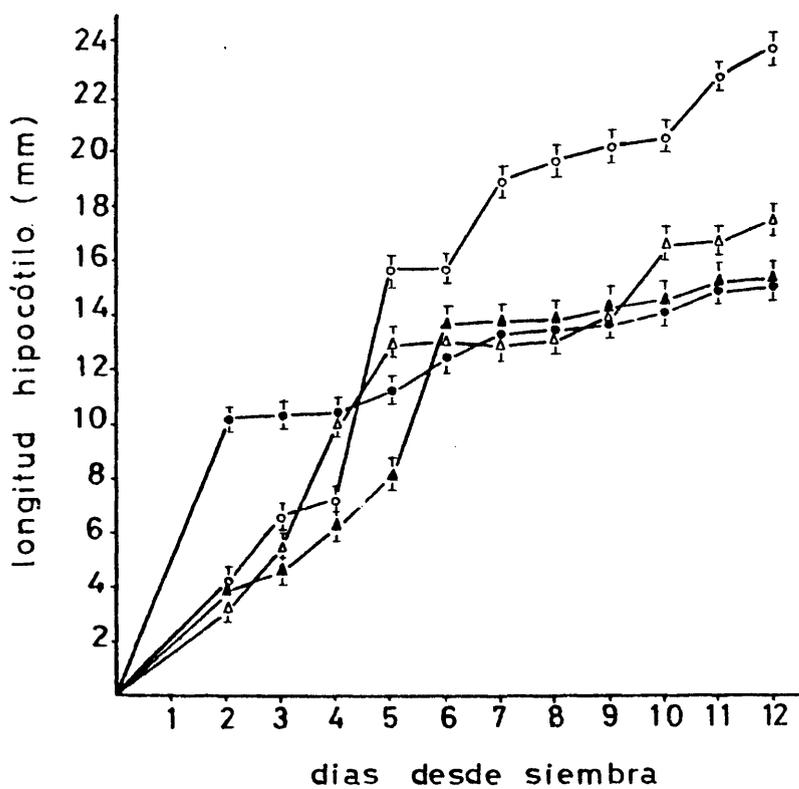


Figura 9.- Longitud del hipocótilo de plántulas de T. repens en condiciones de oscuridad continua (●) y pretratadas durante 1h con iluminación roja (▲) o infrarroja (△). † oscuridad.

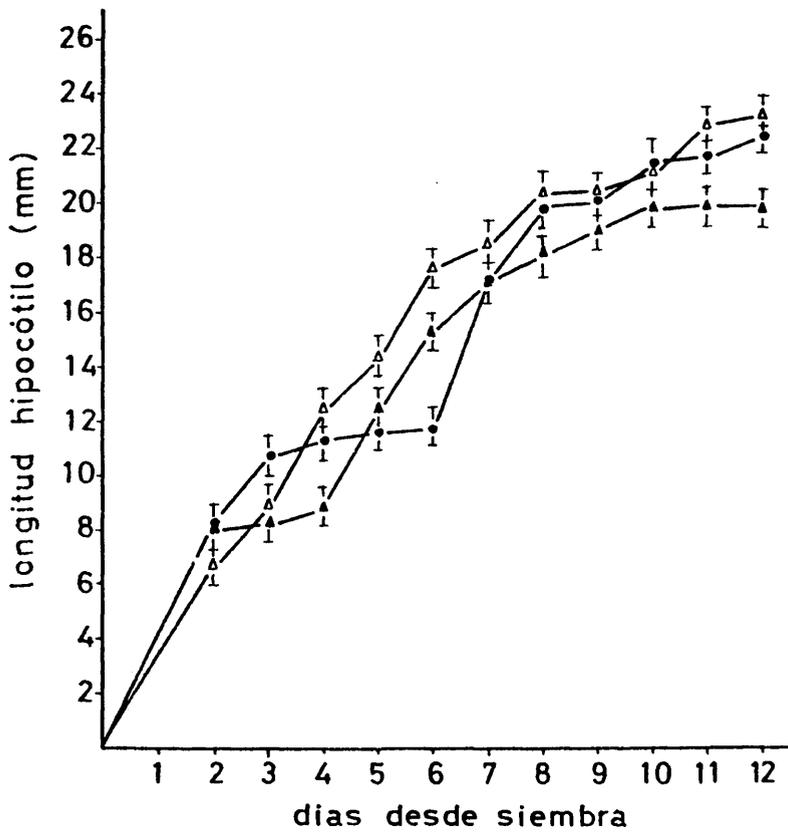


Figura 10.- Longitud del hipocótilo de plántulas de *T. repens* sometidas a los siguientes tratamientos desde el momento de la siembra: 1h de luz filtrada a través del dosel experimental + oscuridad (o). 1h de luz verde de alta intensidad + oscuridad (▲). 1h de luz verde de baja intensidad + oscuridad (△). Oscuridad continua (●). 1h de luz (infrarroja + verde de alta intensidad) + oscuridad (□).

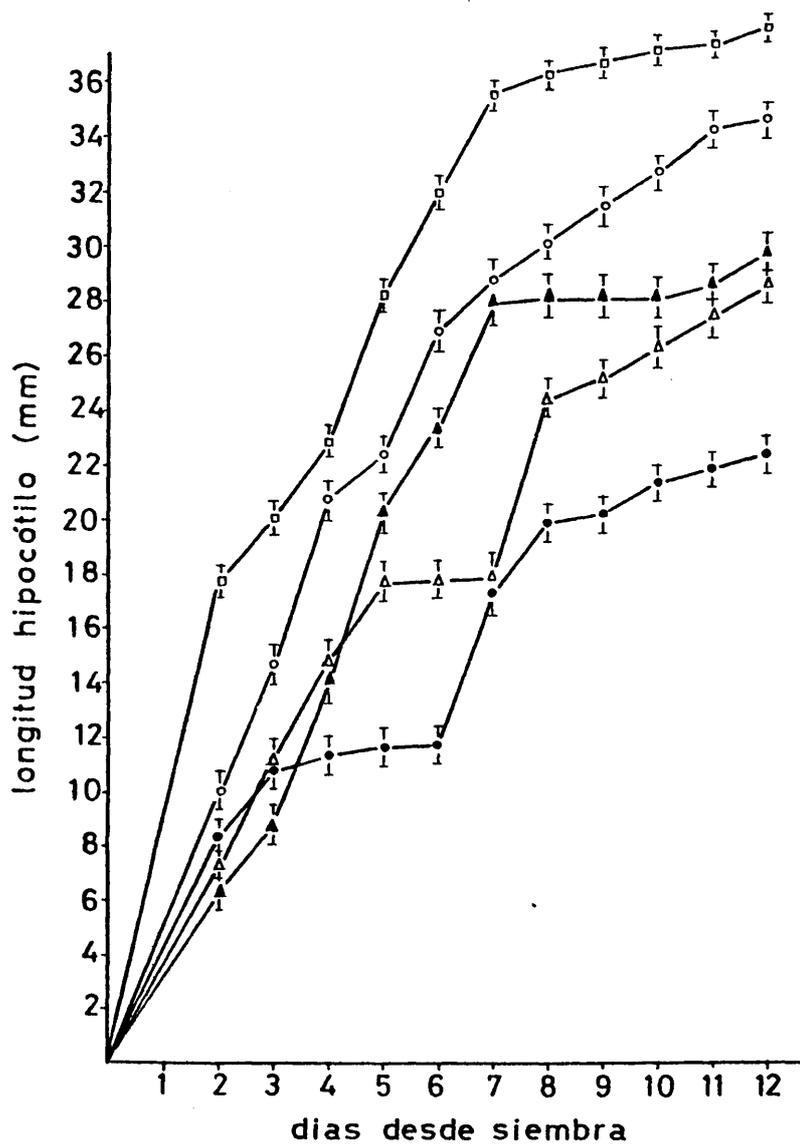
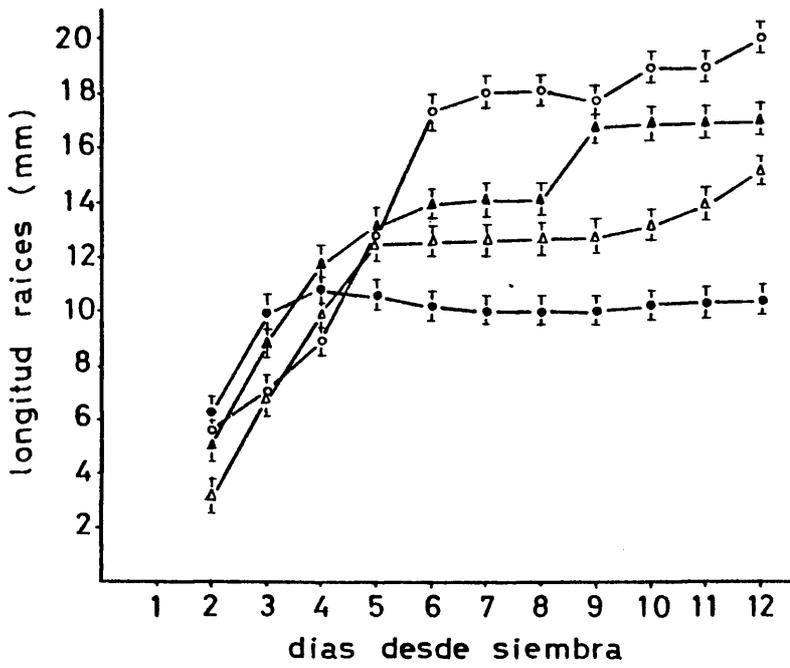


Figura 11.- Longitud de la raíz primaria de plántulas de T. repens bajo regímenes de iluminación continua blanca (o), roja (▲) e infrarroja (Δ), y oscuridad continua (●).



ra que en estas últimas condiciones el crecimiento parece detense entre el 5º y 8º día después de la siembra. Variaciones aun menores se observan cuando en condiciones de oscuridad continua se preirradiaban las plantas tanto con luz roja como infrarroja, verde o luz filtrada a través del dosel como muestran las figuras 12 y 13. Ni aun la alternancia fotoperiódica muestra incrementos significativos en la elongación radicular (figura 14).

3.4. - Evolución del peso frente a los diferentes tratamientos.

La interposición de doseles experimentales tanto si son continuos o iniciales del tratamiento no muestran un efecto marcado sobre la evolución del peso fresco de las plantas. Los tratamientos con irradiaciones blanca, roja o infrarroja continua a lo largo de los 12 días de experimentación dan tanto valores finales como velocidad en el incremento del peso fresco muy similares al igual que sucede cuando a una hora de irradiación en sus diferentes variantes sigue un período de oscuridad continua.

Solamente los tratamientos con fotoperíodos, bien sean simples o bien iniciados a través de dosel experimental muestran una evolución más lenta en el peso fresco y unos valores finales más bajos (figuras 15, 16, 17 y 18).

La evolución del peso seco muestra unos resultados estrictamente paralelos a los descritos para el peso fresco como se observa en las figuras 19, 20, 21 y 22.

Figura 12.- Longitud de la raíz primaria de plántulas de *T. repens* en condiciones de oscuridad continua (●) y pretratadas durante 1h con iluminación roja (▲) o infrarroja (Δ) ↓ oscuridad.

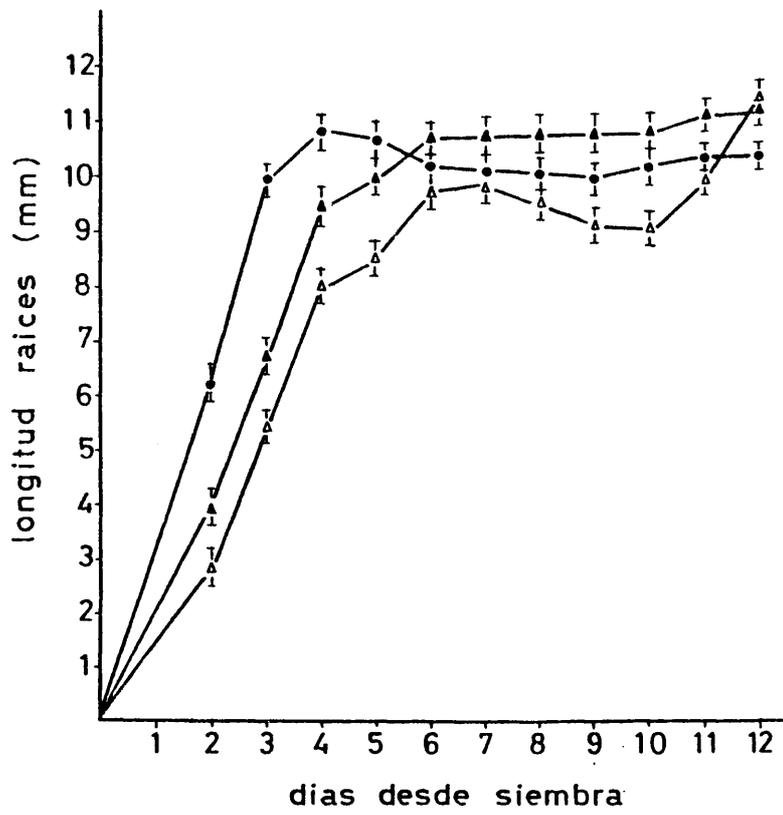


Figura 13. - Longitud de la raíz primaria de plántulas de T. repens en las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: 1h de luz filtrada a través del dosel experimental † oscuridad (o), 1h de luz verde de alta intensidad † oscuridad (▲), 1h de luz verde de baja intensidad † oscuridad (Δ), Oscuridad continua (●), 1h de luz (infrarroja † verde de alta intensidad) † oscuridad (□).

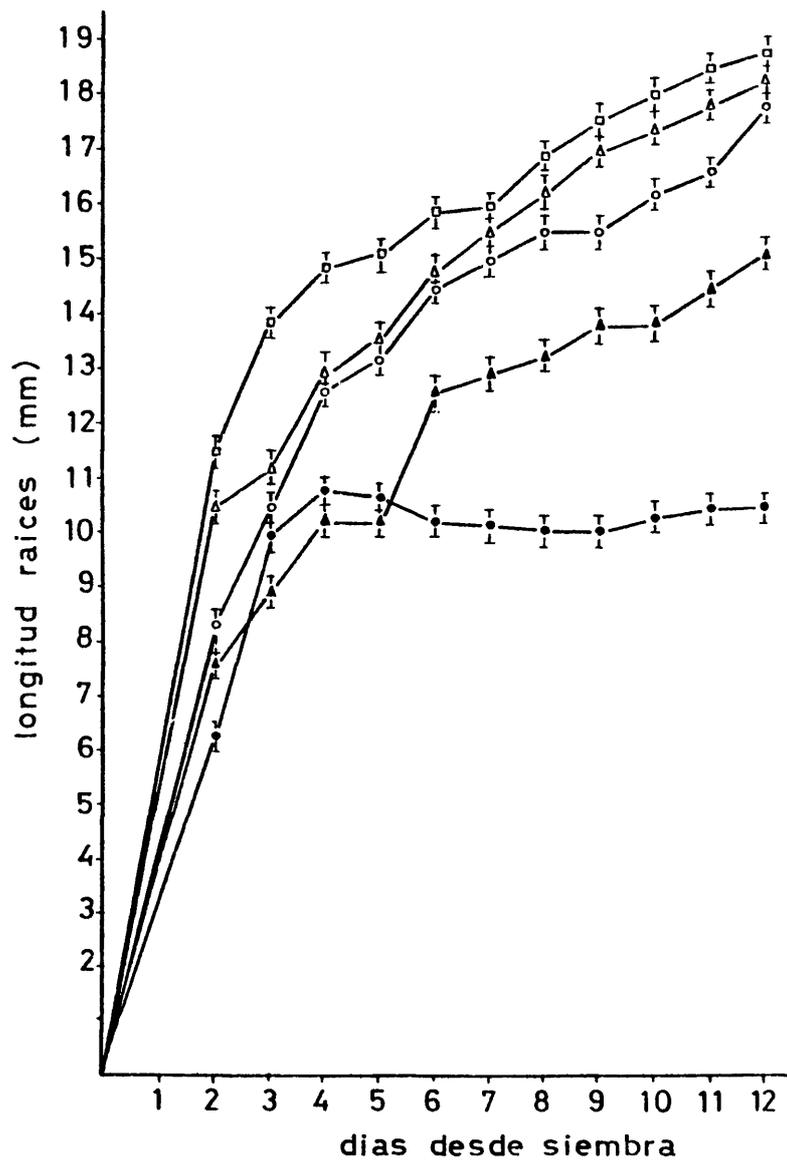


Figura 14. - Longitud de la raíz primaria de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: luz blanca continua (●), Fotoperíodos (▲), 1h de luz filtrada a través del dosel experimental ↓ luz blanca continua (○) o † fotoperíodos (△).

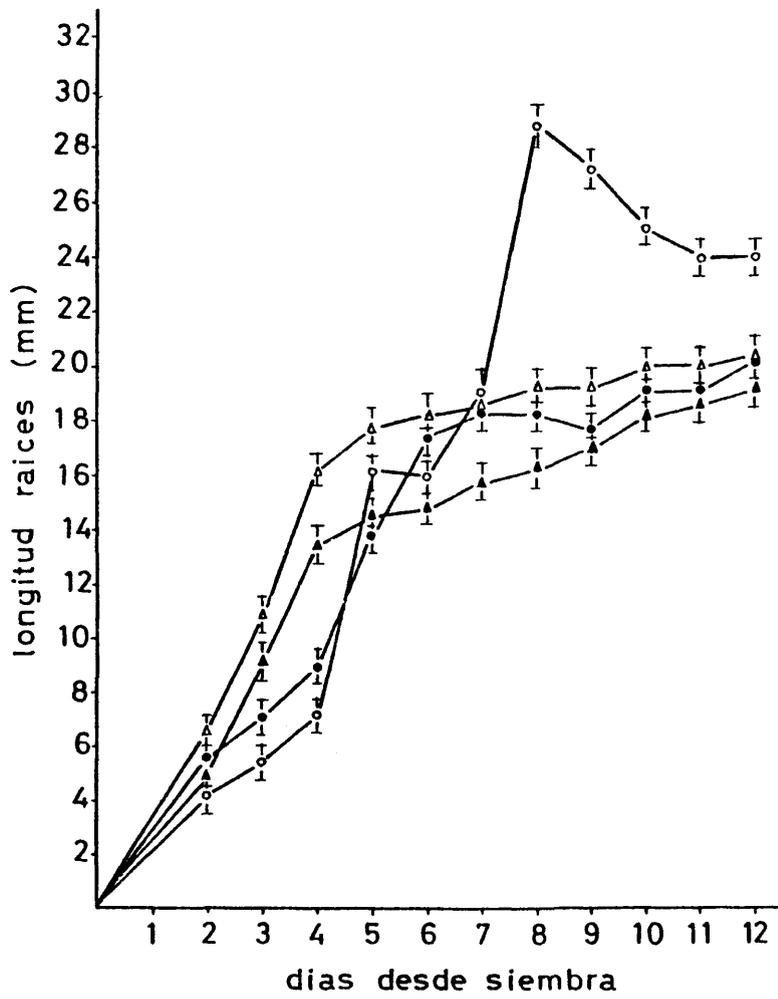


Figura 15.- Peso fresco de plántulas de T. repens bajo regímenes de iluminación continua blanca (o), roja (▲) e infrarroja (△), y oscuridad continua (●).

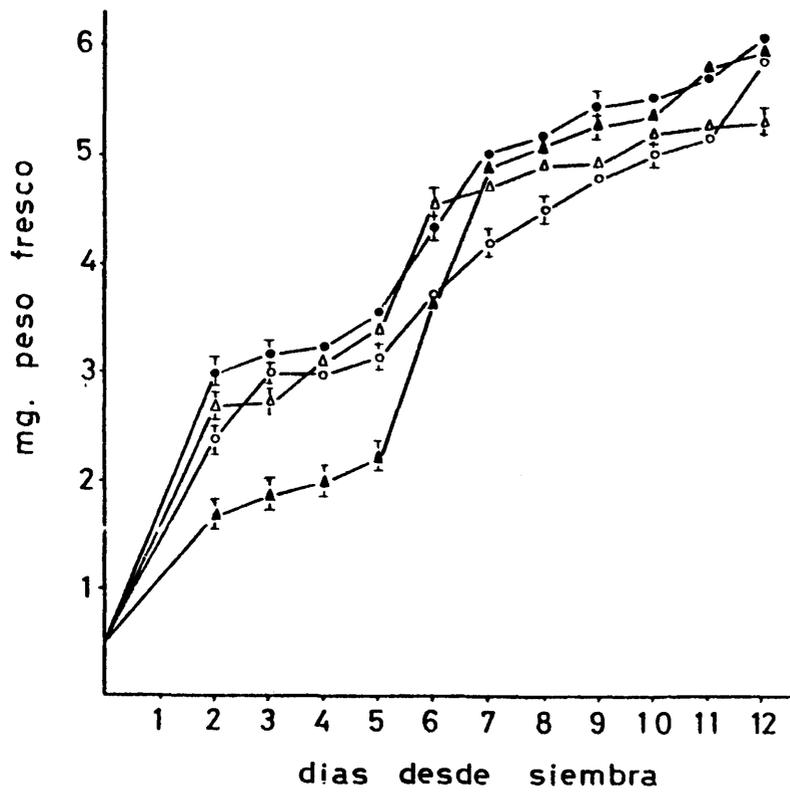


Figura 16. - Peso fresco de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: luz blanca continua (●), Fotoperíodos (▲), 1h de luz filtrada a través del dosel experimental † luz blanca continua (○), 1h de luz filtrada a través del dosel experimental más fotoperíodos (Δ).

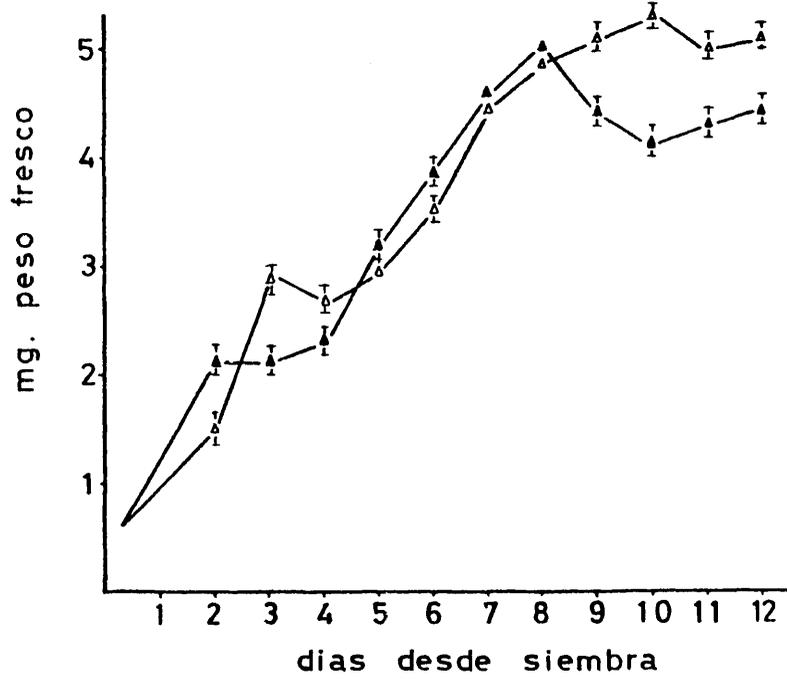


Figura 17. - Peso fresco de plántulas de *T. repens* prtratadas durante 1h con iluminación roja (▲) o infrarroja (△) + oscuridad.

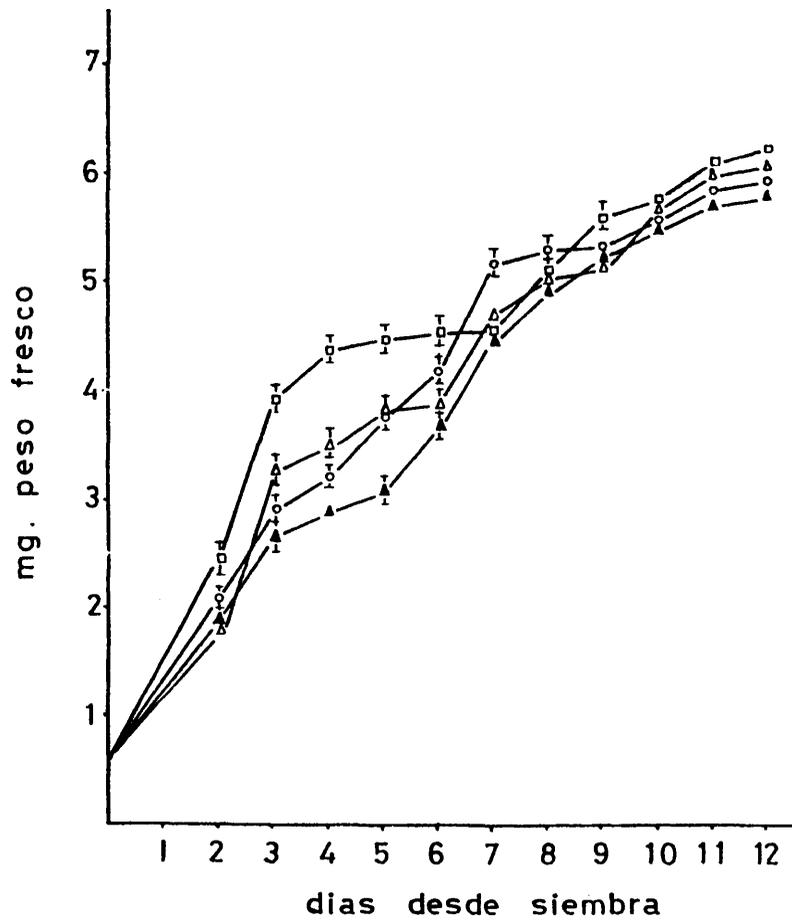


Figura 18.- Peso fresco de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: 1h de luz filtrada a través del dosel experimental + oscuridad (o), 1h de luz verde de alta intensidad + oscuridad (▲), 1h de luz verde de baja intensidad + oscuridad (Δ), 1h de luz (infrarroja + verde de alta intensidad) + oscuridad. (□)

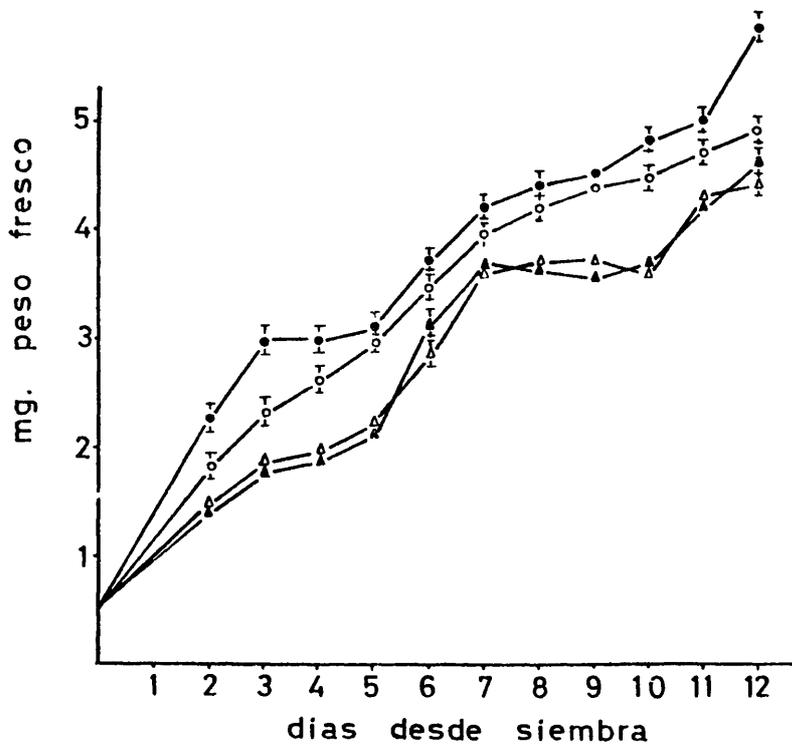


Figura 19.- Peso seco de plántulas de T. repens bajo regímenes de iluminación continua blanca (o), roja (▲) e infrarroja (△), y oscuridad continua (●).

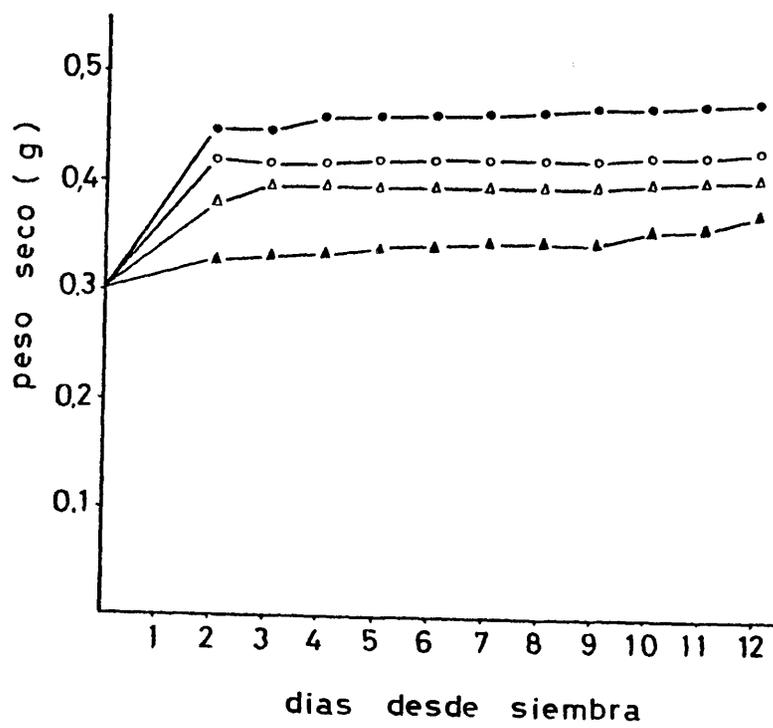


Figura 20.- Peso seco de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: luz blanca continua (●). Fotoperíodos (○). 1h de luz filtrada a través del dosel experimental ↓ luz blanca continua (▲) o ↓ fotoperíodos (△).

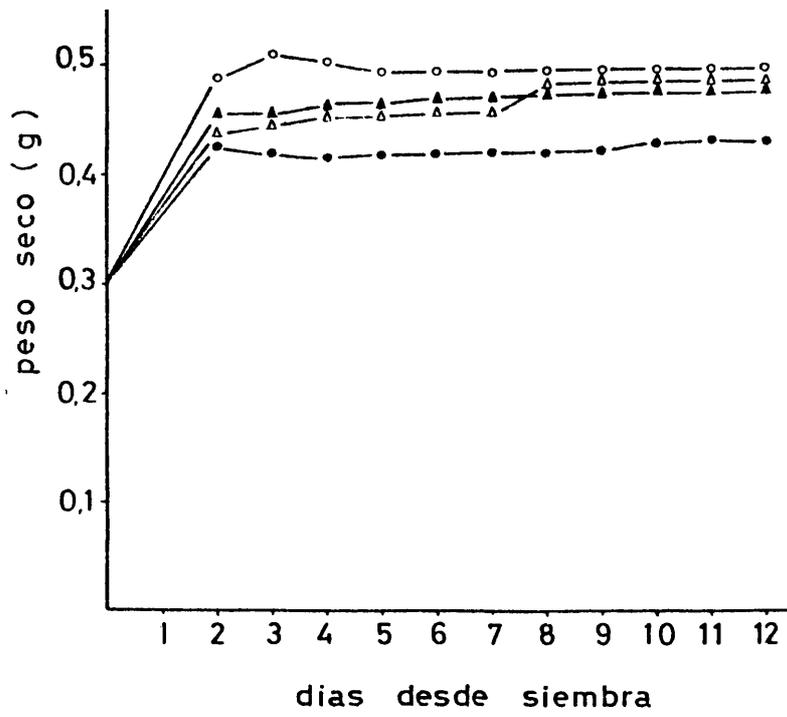


Figura 21.- Peso seco de plántulas de T. repens en condiciones de oscuridad continua (●) y pretratadas durante 1h con iluminación roja (▲) o infrarroja (Δ) + oscuridad.

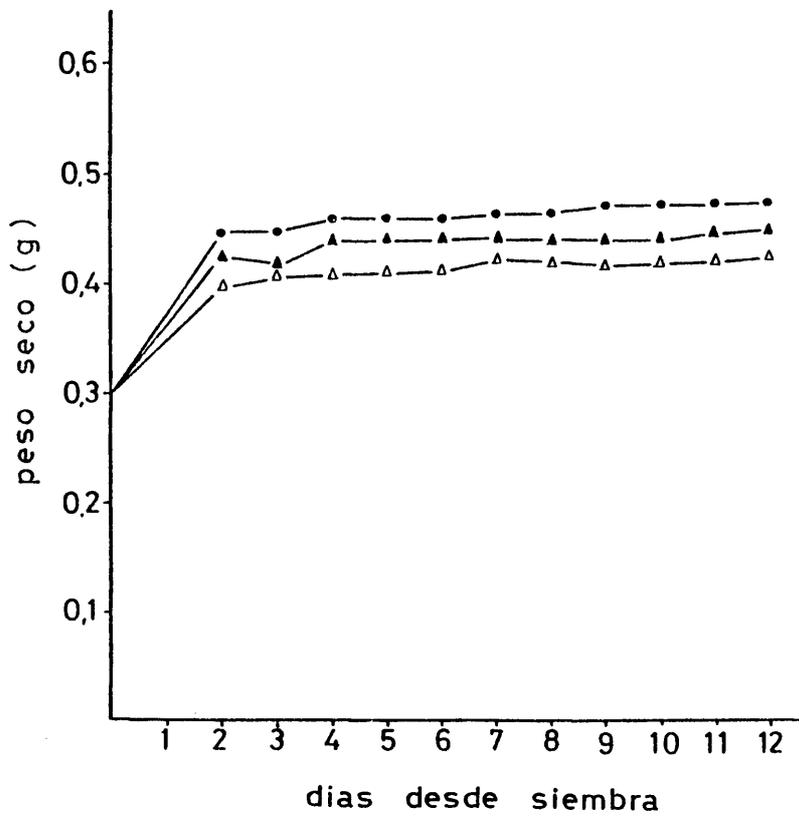


Figura 22.- Peso seco de plántulas de T. repens sometidas a las siguientes condiciones desde el momento de la siembra: 1h de luz filtrada a través del dosel experimental + oscuridad (o), 1h de luz verde de alta intensidad + oscuridad (▲), 1h de luz verde de baja intensidad + oscuridad (△), Oscuridad continua (●), 1h de luz (infrarroja + verde de alta intensidad) + oscuridad (□).

3.5. - Acumulación de clorofilas y efecto dosel.

El contenido en clorofilas tanto a como b en la planta completa ha sido estimado en el 12º día de crecimiento. En todos los casos se ha utilizado la planta completa dado el pequeño tamaño de los cotiledones y la dificultad de ser escindidos sin arrastrar parte del hipocótilo que reverdece paralelamente. En la tabla 2 se exponen los resultados obtenidos. Como se puede observar la mayor acumulación de clorofilas tanto a como b se da para los tratamientos que incluyen fotoperíodos y para el tratamiento de luz blanca continua previamente irradiadas durante una hora con luz filtrada a través del dosel experimental, siendo en este caso en el que se obtienen los valores más altos. Los tratamientos con luces continuas dan valores medios obteniéndose más altos cuando la irradiación es con luz roja. El tratamiento con oscuridad que sigue a cualquier tipo de irradiación practicamente anula la síntesis de clorofilas.

3.6. - Posibilidad de una reacción de alta energía.

Como se ha dicho en el apartado 3.2 el pretratamiento con luces infrarroja y verdes previo al tratamiento con oscuridad continua da valores de longitud del hipocótilo similares a los obtenidos cuando se utilizaba el dosel experimental y en todo caso los más altos por comparación con el resto de los tratamientos. Por el contrario las luces infrarrojas, y verde por separado, daban valores más bajos. Aparentemente entonces parecía existir un efecto cooperativo similar a los descritos en la bibliografía como reacción de

alta energía donde parecen sumarse las informaciones fotomorfogénicas debidas al Pfr con la percepción de luz verde por el mismo o distinto fotorreceptor.

Para tratar de resolver esta disyuntiva se utilizó un lote de semillas que fué irradiado durante una hora simultaneamente con luces verdes e infrarrojas e inmediatamente después con una hora de luz roja y posteriormente sometidas a oscuridad continua hasta completar el 7º día de la siembra. En la tabla 3 se expresan estos resultados. En ella se observa que el 100% de germinación se obtiene en ambos casos en el 5º día de la siembra. La irradiación roja no varía la longitud hipocotilar, al menos significativamente aunque si disminuye significativamente la longitud radicular. El contenido en clorofilas tanto a como b no muestra una diferencia significativa en ambos tratamientos.

En la tabla 4 se observan los resultados obtenidos al 7º día de la siembra de semillas que fueron irradiadas con una hora de luz filtrada a través del dosel experimental e inmediatamente después a una hora de luz roja y posteriormente sometidas a oscuridad continua. Los resultados no muestran diferencia significativa con respecto al mismo tratamiento sin luz roja, salvo en el caso de la longitud radicular que resulta significativamente menor.

TABLA II

Contenido en clorofilas a y b de Trifolium repens medidas al doceavo día desde la siembra.

Tratamiento	Clorofilas Ug/g peso fresco	
	a	b
Luz blanca continua	23,42	19,02
Luz roja continua	15,93	13,71
Luz infrarroja continua	5,51	6,42
Fotoperíodos	73,37	43,76
1h dosel † fotoperíodos	56,37	36,82
1h dosel † blanca continua	77,76	51,24
1h dosel † oscuridad	0, 5189	1,21
1h luz roja † oscuridad	2,76	2,70
1h luz infrarroja † oscuridad	1,42	2,98
1h luz verde (a.i) † oscuridad	0,27	0,05
1h luz verde (b.i) † oscuridad	1,91	3,31
1h (IR† V(a.i)) † oscuridad	0,54	0,83

TABLA III

Efecto de una irradiación roja inmediata a una conjunta infrarroja más verde sobre el crecimiento de Trifolium repens.

	Tratamiento	
	(IR ± V)	(IR ± V) ± R
Día en que se alcanza el		
100% de germinación	5	5
Peso fresco (g)	4,63	3,98
Peso seco (g)	0,42	0,44
Longitud hopocótilo (mm)	33,80	33,34
Longitud raíz (mm)	15,95	11,56
Clor. a (ug/g peso fresco)	0,67	0,85
Clor. b (ug/g peso fresco)	1,49	1,49

medidas realizadas al 7º día de la siembra.

TABLA IV

Efecto de una irradiación roja inmediata a una iluminación a través del dosel experimental sobre el crecimiento de Tifolium repens.

	Tratamiento	
	1hD ↓ obs.	1hD ↓ R ↓ obs.
Día en que se alcanza el 100% de germinación.	4	4
Peso fresco (g)	5,20	5,59
Longitud hipocótilo (mm)	28,8	34
Longitud raíces (mm)	15,0	11,5

medidas realizadas al 7º día de la siembra.

73/62

4. DISCUSSION

La discusión de los datos obtenidos es excesivamente compleja al tratar con órganos enverdecidos en los que, con el equipamiento que se posee, no es posible realizar una medida directa del fotoequilibrio para el fitocromo. Por esta razón, algunos de los parámetros fisiológicos estudiados no podrán tener una explicación clara.

4.1. - Acción del dosel sobre la germinación.

La posible acción del fitocromo como controlador del proceso de germinación es muy discutible. Aparentemente podría pensarse en una aceleración de la germinación por Pfr, ya que las semillas irradiadas con luz roja continua germinan en su totalidad cuatro días antes que un lote de semillas control sometidas a oscuridad continua. Sin embargo, cuando el tiempo de oscuridad se inicia con una hora de irradiación roja o infrarroja, no se obtienen variaciones significativas con respecto a las semillas control. Así, una hora de irradiación roja seguida de oscuridad continua proporciona un 100% de germinación al onceavo día de la siembra (igual que si no hubiera habido irradiación previa) mientras que una hora de irradiación infrarroja seguida de oscuridad proporciona el 100% de germinación al décimo día, lo cual no representa una diferencia significativa (Tabla I).

Mucho más claros son los datos obtenidos utilizando un dosel experimental. Una hora de irradiación a través de este do

sel provoca que el 100% de germinación se obtenga al cuarto día de la siembra, si la irradiación va seguida de oscuridad. La luz filtrada a través del dosel tiene un componente infrarrojo, pero también posee un importante componente verde. Este componente acelera la germinación, pero los mejores resultados se obtienen cuando el dosel es simulado por adición de luz infrarroja y luz verde. En este caso, el 100% de germinación se logra al quinto día de la siembra.

Es interesante notar que este tratamiento no se anula por la irradiación posterior con luz roja. Este hecho podría ser interpretado en el sentido de una cooperatividad entre fitocromo y un receptor de alta energía, atribuyendo a éste el papel de desencadenante del proceso (Tabla 3). De otro modo, el efecto debería ser revertido por la irradiación roja dada inmediatamente después de la infrarroja más verde.

4.2.- Acción del dosel sobre la elongación.

Los resultados obtenidos al estudiar la acción del dosel sobre la elongación del hipocótilo como de la raíz son muy similares a los discutidos anteriormente. La longitud del hipocótilo aumenta siempre con el tiempo de siembra, pero los tratamientos con luces infrarroja, roja o blanca siempre dan velocidades de elongación más bajas que los obtenidos para los controles en oscuridad continua. En principio, esto podría interpretarse, en términos de fitocromo, como una inhibición de la elongación por Pfr, tal y como

se ha mostrado en todas las experiencias descritas en la bibliografía (MORGAN y SMITH, 1976; MCLAREN y SMITH, 1978; VINCE-PRUE, 1977; OTTO, 1978; DUKE et al., 1977).

Sin embargo, los tratamientos de irradiación a través de dosel cambian notablemente este punto de vista. En efecto, la irradiación con luz verde de dos densidades de flujo distintas, 4.000 y 12.000 $\text{erg. cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante una hora seguida de oscuridad continua, dan velocidades de elongación para el hipocótilo notablemente más altas que las obtenidas en oscuridad (2,36 mm/día para la irradiación inicial verde de 4.000 $\text{erg. cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) 2,49 mm/día para la irradiación verde de 12.000 $\text{erg. cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ frente a 1,87 mm/día en oscuridad continua. La irradiación durante una hora a través de un dosel experimental proporciona una velocidad de elongación aún más alta, 2,89 mm/día, y todavía más alta cuando la irradiación se realiza mediante un dosel simulado mediante irradiación IR+V, siendo su valor en este caso de 3,16 mm/día. La velocidad de elongación obtenida cuando las plántulas se irradian durante una hora con luz infrarroja seguida de oscuridad fue sólo de 1,92 mm/día.

En este caso, (Tabla 3) una irradiación roja posterior a la irradiación infrarroja más verde, no modifica en ninguna extensión la elongación del hipocótilo. Por ello, para la elongación de este órgano podría excluirse completamente la cooperatividad entre fitocromo y un receptor de alta energía.

La situación es prácticamente idéntica por lo que

conciene a la elongación radicular. La mayor velocidad de elongación se obtiene para la irradiación previa de una hora con luz infrarroja más verde y por irradiación a través del dosel experimental (1,625 mm/día y 1,48 mm/día: respectivamente ; algo superior con luz verde de baja densidad de flujo, 1,5 mm/día). Las irradiaciones previas con luces infrarroja o roja seguidas de oscuridad continua dan valores muy similares a los obtenidos para los controles en oscuridad continua (R= 0,92 mm/día; IR= 0,95; oscuridad= 0,88 mm/día).

Sin embargo, en este caso, el tratamiento con luz roja durante una hora, dado inmediatamente después de la irradiación compuesta con luces infrarroja y verde, revierte en parte los resultados obtenidos (véase tabla 3). La disminución, en este caso, se muestra como significativa, por lo que sería presumible una auténtica interacción entre Pfr y receptor de alta energía.

Una acción singularizada del fitocromo no está clara. Aunque los tratamientos con luces continuas roja o infrarroja, que presumiblemente proporcionan fotoequilibrios inductivos, dan mayores velocidades de elongación radicular, la luz blanca continua proporciona valores aún mayores. Si esta luz blanca promueve un fotoequilibrio intermedio a los proporcionados por los dos tratamientos anteriores, no sería lógico el valor hallado para la velocidad de elongación. Por ello, quizá una respuesta de este tipo podría entenderse antes como una mayor disponibilidad de fotoasimilados (los cotiledones enverdecen ya desde el primer día de ilumina-



nación) que como un proceso fotomorfogénico. Una situación de este tipo ha sido descrita para otros procesos fisiológicos en los que claramente está involucrado el fitocromo. En efecto, SCHNEIDER y STIMSON (1971) han sugerido que algunas de las respuestas fotomorfogénicas a prolongadas irradiaciones con luz infrarroja se llevan a cabo a través de la activación de, al menos, dos receptores fotoquímicos, fitocromo y pigmentos fotosintéticos.

Los datos obtenidos, tanto por la evolución del peso seco como fresco, no aprtan resultados concluyentes sobre los fenómenos de fotorregulación discutidos hasta ahora. Por el contrario, los resultados expuestos en la tabla 2 sobre la evolución de las clorofilas según los diferentes tratamientos son relativamente fáciles de interpretar.

Aunque los mayores rendimientos en clorofilas a y b se obtienen mediante la aplicación de alternancias fotoperiódicas, no cabe ninguna duda acerca de la regulación positiva por Pfr de la síntesis de clorofilas. Así, los tratamientos con luz blanca continua y luz roja continua dan valores relativamente altos para el contenido en clorofilas, siendo menores los encontrados para una irradiación con luz infrarroja continua. En otras palabras, los valores más altos en pigmentos se corresponden con los más altos valores de O. Esta interpretación se vería confirmada por los resultados obtenidos cuando el período de oscuridad continua se inicia con una hora de irradiación roja.

Sin embargo, hay varios puntos que requieren una

más amplia discusión. ¿Por qué el tratamiento fotoperiódico proporciona valores más altos en la clorofila acumulada que los tratamientos con luces continuas?. ¿Por qué una irradiación previa a través del dosel experimental disminuye los valores de clorofila encontrados en los tratamientos fotoperiódicos?. Aún estas dos cuestiones no tienen una interpretación relativamente difícil.

La respuesta a la primera pregunta puede ser referida, exclusivamente, a términos de disponibilidad de fitocromo total. Efectivamente, un estado fotoestacionario mantenido en altos porcentajes implica siempre destrucción de fitocromo (BOISARD y BALAN-GE, 1972; RAMIREZ y VICENTE, 1976; SHÄFER, 1978) lo cual trae como consecuencia que, aunque P_{fr}/P_t se mantenga invariante, P_{fr} en términos absolutos disminuye. Esto proporcionaría niveles de respuesta menores (RAMIREZ y VICENTE, 1979) aunque un proceso de neosíntesis impediría la aparición de valores nulos. Sería una forma modificada del mantenimiento de la ley de reciprocidad.

La segunda pregunta formulada requiere un planteamiento previo. De la tabla 2 se puede deducir la serie $D \neq B \gg F > D \neq F$ siendo D una hora de irradiación a través de dosel experimental, B, luz blanca continua y F alternancias fotoperiódicas. En otras palabras, el valor de acumulación de clorofilas logrado por el tratamiento fotoperiódico disminuye por la interposición de una irradiación a través de dosel y se recupera cuando los fotoperíodos son substituidos por una irradiación blanca continua.

Los fotoperíodos pueden modificar drásticamente el proceso de destrucción de fitocromo por establecimiento de los procesos alternativos de fotorreversibilidad, lo cual evitaría el mantenimiento de altos valores de ϕ continuos. La acción del dosel previa a los fotoperíodos puede ser interpretada en términos de dos fotorreceptores para la síntesis de clorofilas. El fitocromo actuará preferentemente regulando los sistemas de síntesis de δ -aminolevulínico (MASONER y KASEMIR, 1975; BALANGE y ROLLIN, 1979), pero la transformación protoclorofilida \rightarrow clorofilida vendrá mediada por la misma protoclorofilida como fotorreceptor de luz preferentemente roja. La luz infrarroja, como han descrito KLEIN et al. (1971) para hojas de plántulas etioladas de maíz, no causan conversión de protoclorofilida en clorofilida. Como se ha descrito, el mayor porcentaje de transmisión a través de dosel está constituido por luces verde e infrarroja, por lo que el sistema de fototransformación quedaría excluido en la primera hora de irradiación. Un suplemento continuo de luz roja (incluida en la luz blanca) revertiría esta situación.

El resto de los tratamientos, siempre seguidos de oscuridad, dan valores de clorofilas muy poco significativos.

Para terminar esta discusión quedaría por interpretar los efectos de la luz verde, sola o mezclada, sobre los diferentes parámetros del crecimiento estudiados. En primer término podría hablarse de una reacción de alta energía. Una reacción de este tipo podría implicar al fitocromo como único fotorreceptor (HARTMANN

1966) según el modelo desarrollado por SCHÄFER (1976) por el cual los tratamientos de irradiación inductiva, al aumentar la reasociación del fitocromo, indica que Pfr puede unirse a un receptor X para dar el complejo PfrX. El tamaño del complejo PfrX, que es transiente y dependiente de la irradiación y de la longitud de onda, es el efector bajo condiciones de HIR. El tamaño del complejo aumenta cuando la planta es irradiada con luces desde 660-720 nm para descender desde 720-800 nm. Bajo irradiación con luces de alto contenido energético, el tamaño de PfrX aumenta desde 350-410 nm para descender desde 410-450 nm. Reacciones de alta energía, mediadas por fitocromo, han sido descritas en múltiples ocasiones (HARTMANN, 1967; SERRANO et al., 1969; BARCELO, 1972).

Sin embargo, el papel de la luz azul en estos fenómenos fisiológicos puede presentar analogías con aquellos que, como los fototropismos, involucran un fotorreceptor flavínico, evidentemente distinto del fitocromo (BRIGGS, 1976), por lo que, a veces, podría invocarse un proceso cooperativo mediante el cual un solo efecto podría ser el resultado de la percepción de luz azul por una flavina y de luz roja por el fitocromo.

De hecho, una hipótesis de este tipo podría venir avalada por los resultados obtenidos en el presente trabajo al lograr restablecer los valores encontrados por irradiación a través del dosel cuando se irradia con luces infrarroja más verde. Una manera de poner de manifiesto la posible cooperatividad de los dos sistemas sería irradiar a las semillas con luz roja inmediatamente después de la

irradiación con luces infrarroja más verde. Como se observa en la tabla 3, uno sólo de los parámetros, la longitud radicular, es revertido por la irradiación roja en un nivel significativo, y otro, el peso fresco, en un nivel poco significativo, mientras que los demás, día en el que se alcanza el 100% de germinación, longitud hipocotilar y contenido en clorofilas, no se ven afectados. Podría tratarse de que estos fenómenos muestran una reacción a longitudes de onda bajas, independientemente del fitocromo, aunque la luz verde es muy poco absorbida por los compuestos flavínicos (PRESTI y DELBRÜCK 1978) mientras que el crecimiento radicular sea un efecto cooperativo entre ambos fotorreceptores (la disminución por el tratamiento rojo correspondería al porcentaje de influencia de Pfr), o bien una auténtica reacción de alta energía, siendo PfrX parcialmente revertido por una irradiación roja, posibilidad apuntada por SCHÄFER (1976).

826

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se han estudiado los diferentes tratamientos de luz para algunos parámetros de crecimiento de Trifolium repens. Se ha demostrado que las semillas sometidas a oscuridad continua durante todo el período de experimentación presentan la variación más lenta del índice de germinación. Esta velocidad no es afectada si el período de oscuridad se inicia con una hora de irradiación roja o infrarroja. El índice de germinación se acelera cuando las semillas son sometidas a iluminaciones continuas blanca, roja o infrarroja lográndose la máxima aceleración para tratamientos fotoperiódicos.
- 2.- La oscuridad promueve la elongación hipocotilar frente a los tratamientos que incluyen iluminaciones continuas o iluminaciones fotoperiódicas. Esta conclusión no es modificada si el período de oscuridad se inicia con una hora de irradiación roja o infrarroja.
- 3.- Los mayores de elongación hipocotilar se obtienen cuando el período de oscuridad es iniciado por una hora de irradiación a través de un dosel experimental de Cedrus Atlántica var glauca o a través de un dosel simulado con irradiación infrarroja más verde.
- 4.- La elongación radicular muestra valores más altos bajo irradiaciones continuas que en oscuridad. Al igual que sucedía en hipocótilos, la máxima elongación se obtiene cuando un período de oscuridad continua es precedido por una hora de irradiación mediante un dosel simulado superponiendo luces infrarroja y verde.
- 5.- La síntesis de clorofilas es máxima bajo regímenes fotoperiódicos.

o bajo un régimen de una hora de irradiación a través de dosel seguido de un tratamiento con luz blanca. Los tratamientos con luces continuas dan valores moderadamente altos. Por ello parece que la síntesis de clorofilas en Trifolium repens estaría dirigida por Pfr siendo una especie particularmente sensible a la destrucción de fitocromo.

- 6.- La síntesis de clorofilas no procede cuando a un período de una hora de irradiación sea cual sea le sigue un período prolongado de oscuridad continua.
- 7.- Una irradiación roja posterior a una irradiación mezcla de infrarroja y verde no modifica los valores obtenidos para la germinación ni para la elongación hipocotilar. Sin embargo la elongación radicular es inhibida significativamente por este tratamiento.
- 8.- Una hora de irradiación roja posterior a una irradiación a través del dosel experimental y seguida de un período prolongado de oscuridad disminuye la elongación radicular sin variar sensiblemente el resto de los parámetros considerados.
- 9.- Se postula una reacción de alta energía que utiliza preferentemente luz verde, reacción que puede tener al fitocromo como fotorreceptor al menos por lo que concierne a la elongación radicular.
- 10.- La reacción de alta energía postulada podrá tener como base cooperatividad entre el fitocromo y otro tipo de fotorreceptor por lo que concierne a la elongación hipocotilar, posibilidad en la que en la actualidad se trabaja.

33

6. BIBLIOGRAFIA

- AUGUSTINUSSEN, E., MADSEN, A., (1965): Regeneration of protochlorophyll in etiolated barley seedlings following different light treatments. *Physiol. Plant.*, 18, 828-837.
- BALANGE, A.P., ROLLIN, P. (1979): Régulation de la δ -amino lévulinate déshydratase par le phytochrome dans les cotylédons de Radis. *Physiol. Vég.*, 17, 153-166.
- BARBER, J. (1979): Primary processes of photosynthesis: structural and functional aspects. *Photochem. Photobiol.*, 29, 203-207.
- BARCELO, J. (1972): Biosíntesis de nicotina y metabolismo nitrogenado en Nicotiana rustica bajo el influjo de ciertas luces monocromáticas y del frío. *Circular Farmacéutica*, 206, 257-308.
- BOARDMAN, N.K., ANDERSON, J.M., KAHN, A. THORNE, S.W., TREFFRY, T.E. (1971): Formation of photosynthetic membranes during chloroplast development. En BOARDMAN, N. K., LINNANE, W., SMILLIE, R.M. eds.: *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*. North Holland, Amsterdam, 70-84.
- BOISARD, J., BALANGE, A.P., (1972): Disparition du phytochrome en lumière rouge lointain. *C.R. Acad. Sc. Paris.*, 275, D, 2655-2658.

- BRADBEER, J. W., MONTES, G., (1976): The photocontrol of chloroplasts development. Ultrastructural aspects and photosynthetic activity. En SMITH, H. : Light and Plant Development, Butterworths, London, 213-227.
- BRIGGS, W.R. (1976): The nature of the blue light photoreceptor in higher plants and fungi. En SMITH, H. (ed.): Light and Plant Development., Butterworths, London, pag. 7-18.
- BUSCHAMMANN, C., MEIER, D. KLEUDGEN, H.K., LICHTESTHALER, H.K. (1978): Regulation of chloroplasts development by red and blue light. Photochem. Photobiol., 27, 195-198.
- BUTLER, W.L., LANE, H.C., SIEGELMAN, H.W. (1963): Non-photochemical transformation of phytochrome in vivo. Plant Physiol., 38, 514-519.
- CHORNEY, W., GORDON, S.A., (1966): Action spectrum and characteristics of light activated disappearance of phytochrome in oat seedlings. Plant Physiol., 41, 891-896.
- CLARKSON, D.T., HILLMAN, W.S. (1967a): Stability of phytochrome concentration in dicotyledoneous tissues under conditions far-red light. Planta, 75, 286-290
- CLARKSON, D.T., HILLMAN, W.S., (1967b): Modification of apparent phytochrome synthesis in Pisum by inhibi-

- tors and growth regulators. *Plant Physiol.*, 42, 933-940.
- CURTIS, O.F., CLARK, D.G. (1950): An Introduction to Plant Physiology. Mc Graw-Hill, New York.
- DOWNES, R.J., BORTHWICK, H.A. (1956): Effect of photoperiod upon the vegetative growth of Weigela florida var. variegata. *Proc. Ann. Soc. Hort. Sci.*, 68, 518-521.
- COWNS, R.J., HENDRICKS, S.B., BORTHWICK, H.A. (1957): Photo-reversible control of elongation of pinto beans and other plants under normal conditions of growth. *Bot.*, 118, 199-208.
- DUKE, S.O., NAYLOR, A.W., WICKLIFF, J.L. (1977): Phytochrome control of longitudinal growth and phytochrome synthesis in maize seedlings. *Physiol. Plant.*, 40, 59-68.
- EMERSON, R., ARNOLD, W. (1933): The photochemical reaction in photosynthesis. *J. gen. Physiol.*, 16, 191-205.
- EMERSON, R., CHALMERS, R., CEDERSTRAND, C. (1957): Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis *Proc. Nat. Acad. Sci.* 43, 133-143.
- HOMES, M.G., SMITH, H. (1975): The function of phytochrome in plants growing in the natural environment. *Nature*, 254, 512-514.

- FURUYA, M., HILLMAN, W.S. (1966): Rapid destruction of the Pfr form of phytochrome by a substance in extracts of Pisum tissue. Plant Physiol., 41, 1242-1244.
- GANDHI, A.P., NAIR, M.S., (1974): Role of roots, hormones and light in the synthesis of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. FEBS Letters, 40, 343-345.
- GATES, D.M. (1965): Radiant energy, its receipt and disposal. Meteor. Monogr. 5, 1-26.
- GORSKI, T. (1975): Germination of seeds in the shadow of plants. Physiol. Plant., 34, 342-346.
- GRANICK, S., (1967): The Heme and chlorophyll biosynthetic chain. In T.W. GOODWIN ed.: Biochemistry of chloroplast. Academic Press, London, 2, 373-410.
- HARTMANIV, K.M. (1966): A general hypothesis to interpret high energy phenomena of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. Photochem. Photobiol., 5, 349-366.
- HARTMANN, K.M. (1967): Ein Wirkungsspektrum der Photomorphogenese unter Hochenergiebedingungen und seine (Hypokotylwachstumshemmung bei Lactuca sativa) Z. Naturforsch., 22b, 1172-1175.
- HEDLEY, C.L., STODDART, J.L. (1971): Factors influencing alanine aminotransferase activity in leaves of Lolium temulentum. J. Exp. Bot., 22, 239-248.

- HOLMES, M.G., SMITH, H. (1977): The function of phytochrome in the natural environments. IV. Light quality and plant development. *Photochem. Photobiol.*, 25, 551-557.
- HUGHES, A.P. (1965): Plant growth and the aerial environment. VI. The apparent efficiency of conversion of light energy of different spectral compositions by *Impatiens parviflora*. *New. Phytol.*, 64, 48-54.
- KENDRICK, R.E., FRANKLAND, B. (1968): Kinetics of phytochrome decay in *Amaranthus* seedlings. *Planta*, 82, 317-320.
- KLEIN, S., KATZ, E., NEEMAN, E. (1977): Induction of δ -amino-levulinic acid formation in etiolated maize leaves controlled by two light systems. *Plant Physiol.*, 60, 335-338.
- MASONER, M., KASEMIR, H. (1975): Control of chlorophyll synthesis by phytochrome. I. The effect of phytochrome on the formation of 5-aminolevulinate in mustard seedlings. *Planta*, 126, 111-117.
- MCLAREN, J.S., SMITH, H. (1978): Phytochrome control of the growth and development of *Rumex obtusifolius* under simulated canopy light environment. *Plant, Cell and Environment*, 1, 61-67.
- MOHR, H., KASEMIR, H. (1976): Control of chloroplast development

and chlorophyll synthesis by phytochrome. En CASTELLANI, A. (ed.): Research in Photobiology. pag. 501-509. Plenum Press. New York.

- MONTEITH, J.L. (1976): Spectral distribution of light in leaves and foliage. En H. SMITH ed.: Light and Plant Development. Butterworths, London, 447-460.
- MORGAN, D.C., SMITH, H. (1976): Linear relationship between phytochrome photoequilibrium and growth in plants under simulated natural radiation. Nature, 262, 210-212.
- OTTO, K.R. (1978): The connection between high energy and low energy responses to red and far-red light of hypocotyl elongation in red cabbage seedlings (Brassica oleracea, var. capitata). Physiol. Plant, 43, 177-180.
- PRESTI, D., DELBRÜCK, M. (1978): Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision. Plant, Cell and Environment, 1, 81-100.
- RAMIREZ, R., VICENTE, C. (1976): Condiciones de destrucción y neosíntesis de fitocromo en cotiledones de Citrullus vulgaris. Lagasalia, 6, 33-38.
- RAMIREZ, R., VICENTE, C. (1979): Photocontrol of nitrite reductase in Citrullus vulgaris cotyledons. Phyton, 37, 25-28.

- RAMIREZ, R., BODELON, J.C., VICENTE, C. (1979): Acquisition of reducing function by chloroplasts of Citrus vulgaris cotyledons and its control by phytochrome. Photochem. Photobiol. En prensa.
- REYSS, A., BOURDU, R. (1971): Influence des héméroperiodes très courtes sur la croissance de Lolium multiflorum, sa composition pigmentaire et l'ultrastructure chloroplastique. Planta 97, 230-244.
- RIPLIY, E. A., REDMANN, R.E. (1976): Grassland. En J.L. MONTEITH ed.: Vegetation and the atmosphere, vol. 2. pag. 351-398. Academic Press, London.
- SCHÄFER, E. (1976): The "High Irradiance Reaction". En SMITH, H. (ed.): Light and Plant Development, pag. 45-59, Butterworths, London.
- SCHÄFER, E. (1978): Variation in the rates of synthesis and degradation of phytochrome y cotyledons of Cucurbita pepo during seedling development. Photochem. Photobiol., 27 775-780.
- SCHEIDER, M. J., STIMSON, W. R. (1971): Contributions of photosynthesis and phytochrome to the formation of anthocyanin in turnip seedling. Plant Physiol., 48, 312-315.
- SCOTT, G.D. (1971): Plant symbiosis. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- SERRANO, M., RADUA, P., BARCELO, J. (1969): Influencia de las

luces azul y roja sobre el crecimiento y contenido de aminoácidos libres y proteicos de Nicotiana rustica. An. Edaf. Agrobiol., 28, 665-675.

SIRONVAL, C., (1958): Daylength and haematin compounds in plants. Nature, 182, 1170-1171.

SIRONVAL, C. VERLY, W.G., MARCELLE, R. (1961): Radioisotopic study of chlorophyll accumulation in soybean leaves, in the conditions of a transfer from one daylength to another (transfer effect). Physiol. Plant., 14, 303-309.

SMITH, H., HOLMES, M.G. (1977): The function of phytochrome in the natural environment. III. Measurement and calculation of phytochrome photoequilibrium. Photochem. Photobiol. 25, 547-550.

STUART, D.A., DURNAM, D.J., JONES, R.L. (1977): Cell elongation and cell division in elongating lettuce hypocotyl sections. Planta, 135, 249-255.

VICENTE, C., VILLALOBOS, M.N., JIMENEZ, M.J. (1975): Photocontrol of glutamate dehydrogenase, NADPH-linked, in Citrullus vulgaris cotyledons along the greening. Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.) 73, 29-33.

VILLALOBOS, M.N. (1974): Utilización de fuentes nitrogenadas por cotiledones de Citrullus vulgaris durante las

primeras fases de germinación. Acta Salmant.,
247-260.

VINCE-PRUE, D. (1977): Photocontrol of stem elongation in light-grown
plants of Fuchsia hybrida. Planta, 133, 210-212.

VIRGIN, H.I. (1958). Studies on the formation of protochlorophyll and
chlorophyll a under varying light treatments.
Physiol. Plant., 11, 347-362.

WELANDER, M. (1974): Enzyme activities in Urtica dioica : effects
of daylength and leaf age on glutamate dehy-
drogenase, aspartate aminotransferase and ala-
nine aminotransferase. Physiol. Plant. 30, 192-199.

WHITTINGHAM, C.P., PRITCHARD, G.G. (1963): The production of
glycolate during photosynthesis in Chlorella.
Proc. Roy. Soc. B, 157, 366-380.

ZELITCH, Q. (1959): The relationship of glycolic acid to respiration
and photosynthesis in tobacco leaves. J. biol.
Chem., 234, 3077-3081.

