Treb. Soc. Cat. Biol., Vol. 41 (1990) 63-70

INFLUÈNCIA DE LA GIBBEREL·LINA I LA QUINETINA SOBRE LA GERMINACIÓ I EL METABOLISME NITROGENAT DE *NICOTIANA RUSTICA*

M. GALOBARDES, R.M.ª CUSIDO, T. ALTABELLA i C. MORALES

Laboratori de Fisiologia Vegetal. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

SUMMARY

The seeds treated with gibberellin 10^{-6} M have RNA and protein levels higher than those of control seeds and have a greater germinative capacity.

The kinetin 10^{-6} M increases the RNA levels mainly of the poly A^+RNA fraction and of the seed proteins, which will have higher levels than the control seeds and than those treated with gibberellin. The kinetin treatment will give the higher germinative capacity.

Gibberellin and kinetin treatments stimulate the primary metabolism but they do not stimulate the secondary metabolism, because the control seeds have higher nicotine levels than the treated seeds.

Key words: Gibberellin, kinetin, germination capacity, nucleic acids, proteins.

INTRODUCCIÓ

L'origen de quasi totes les substàncies utilitzades com a medicament es troba en la planta. Algunes d'aquestes, ja caracteritzades són fàcils de sintetitzar i s'obtenen al laboratori, però d'altres, degut a la seva complexitat, no resulta econòmicament rendible la seva síntesi. Per això, novament, es torna a la planta de la que s'extreuen els principis actius medicamentosos, ja sigui directament o bé després d'establir un cultiu de teixits, amb l'objectiu d'enriquir el substrat en la substància activa.

La germinació és un procés aparentment senzill del que encara queden per aclarir importants aspectes en relació amb les causes de la pèrdua de viabilitat de les llavors, dels factors que l'indueixen a iniciar la germinació i les bases per les que llavors aparentment iguals mostren diferències en el seu creixement. Diversos autors atribueixen aquests fets als canvis metabòlics experimentats per les llavors durant el seu estat de repós i germinació.

Moltes plantes farmacològicament interessants, són tropicals i les seves llavors tenen una baixa capacitat germinativa. Aquest fet ens ha induït a intentar millorar

el vigor de les llavors sotmetent-les a tractaments hormonals per observar els efectes d'aquests tractaments vigoritzants sobre el metabolisme nitrogenat (àcids nucleics, proteïnes i alcaloides).

RAUMOVA i colab., en 1978 (13), varen tractar amb hormones llavors embegudes amb aigua, i observaren en les tractades amb quinetina un marcat estímul de la germinació, acompanyat d'un augment dels nivells de RNA. STRUGALA i BUCHOWICZ (17) varen observar en embrions de blat durant la germinació un augment de DNA, encara que retardat amb relació al augment observat també, de RNA.

KHAN (9) va proposar que la quinetina actuava neutralitzant l'efecte de les substàncies inhibidores que es podrien haver acumulat durant l'estat de repòs i d'imbibició. El nostre equip d'investigació ha aconseguit demostrar recentment que les llavors de *Vicia faba,* sense capacitat per germinar, si s'embevien amb una solució de quinetina 10^{-2} M, eren induïdes a iniciar la germinació. KHAN i TAO (10) van observar que dilucions de quinetina de 20 a 50 µM activaven la germinació encara que en diferents graus.

VAN DER WALLE i colab. (20) van observar un augment de mRNA i la formació de polisomes en les llavors germinades sota la influència de quinetina. L'efecte hormonal més universal sobre la germinació es deu a la gibberel·lina, la qual és capaç d'anul·lar l'efecte inhibidor degut a la manca de tractament tèrmic, de post-maduració i lluminós.

En aquest treball s'estudia l'efecte de la gibberel·lina 10^{-6} M i quinetina 10^{-6} M sobre la capacitat germinativa de llavors de *Nicotiana tabacum,* al mateix temps que estudiem les seves repercussions sobre el metabolisme nitrogenat en fraccions primàries i secundàries.

MATERIAL I MÈTODES

L'experiment es va realitzar amb llavors de *Nicotina rustica* de la collita de l'any anterior en els nostres cultius.

Per desenvolupar aquesta investigació s'han utilitzat els següents mètodes ja comprovats i estandarditzats en el nostre departament.

Anàlisi d'àcids nucleics

Els àcids nucleics s'extreuen, segons BYRNE i SETTEFIELD (4) amb una solució

TAULA I

Capacitat germinativa

Dies	*CONTROL*		*GA 10^{-6} M*		*Q 10^{-6} M*	
	N.º llavors germinades	*N.º llavors capaces de germinar i continuar el creixement*	*N.º llavors germinades*	*N.º llavors capaces de germinar i continuar el creixement*	*N.º llavors germinades*	*N.º llavors capaces de germinar i continuar el creixement*
1r a 4t	0	0	0	0	0	0
5è	42	42	60	60	0	0
6è	274	274	503	503	590	590
7è	330	282	337	293	365	328
8è	120	0	30	0	5	0
Successius	0	0	0	0	0	0
Total	766	598	930	856	960	918
%	76,6	59,8	93,0	85,6	96,0	91,8

GA = Gibberel·lina
Q = Quinetina

tamponada a pH 9 a la qual s'afegeix un volum igual de fenol-cloroform. Els extrets se centrifuguen i es reextreuen dues vegades més, separant cada vegada les fases aquoses, a les que s'hi afegeix 2.5 volums d'etanol i es guarden 24 h a −20 °C. Se centrifuga a 20.000 rpm i en el residu resten el RNA i el DNA.

El RNA s'hidrolitza amb KOH 0,4 N durant 24 hores a 37 °C segons OGUR i ROSEN (12), i després de neutralitzar amb HCl 0,5 N i clarificar la solució, es llegeix l'absorció a 260 nm i es compara amb una corba patró. El DNA no queda hidrolitzat per KOH i resta insoluble. El residu s'hidrolitza amb $HClO_4$ 2N a 70 °C durant una hora, segons MAYER i POLJAKOFF-MAYBER (11). Seguidament es realitza una reacció vermellejada segons el mètode de SCHNEIDER (14) modificat per BURTON (3), i es llegeix l'absorció a 600 nm comparant-la amb una corba patró. Els extrets per al fraccionament del RNA i RNA poliA$^+$ s'obtenen per el mètode de BYRNE i SETTEFIELD (4). Els residus obtinguts després de la centrifugació abans exposada es tracten amb LiCl 2N, per dissoldre el DNA i es centrifuguen a 20.000 rpm durant 15 minuts. El residu obtingut per centrifugació es renta amb etanol, es porta a sequetat en una estufa de buit, es dissol en tampó pH 7.6 i es cromatografia en oligo-dT-cel·lulosa, segons VAN DER WALLE I BERNIER (19). S'obtenen així dues fraccions: RNA poliA$^-$ i RNA poliA$^+$.

Les fraccions obtingudes per cromatografia es precipiten amb 2,5 volums d'etanol a −20 °C durant 24 hores. Se centrifugan a 20.000 rpm i el residu es porta a sequetat a una estufa de buit i es dissol amb aigua. Es mesura l'absorció a 260 nm i es compara amb una corba patró.

Extracció de la fracció proteica

Es va realitzar segons el mètode de VAN LOON i VAN KAMEN (18) amb algunes modificacions. Es tritura el material vegetal fresc en un morter de vidre envoltat de gel. Es va homogeneitzant amb una solució de Tris-HCl 0,5 M, àcid ascòrbic 0,1 % i HCl-cisteïna 0,1 % a pH 8. L'homogeneïtzat es deixa en maceració durant 24 hores en cambra frigorífica (0-4 °C). Passat aquest temps se sotmet a centrifugació a 1.000 g durant 10 minuts, separant el sobrenedant, el qual es torna a centrifugar a 5.000 g durant 20 minuts. Se separa el sobrenedant i al residu se li afegeix solució amortidora per extreure la possible proteïna soluble que encara resta en ella. Es torna a centrifugar a 5.000 g durant 20 minuts i el sobrenedant es reuneix amb el obtingut abans i se centrifuga a 15.000 g durant 15 minuts. Se separa el sobrenedant i es torna a centrifugar a 30.000 g, i el sobrenedant es fa servir per a les anàlisis de proteïna soluble.

Determinació de proteïnes

La determinació de proteïnes es va realitzar pel mètode de BRADFORD (2). La solució problema es dilueix convenientment; 1,6 ml d'aquesta solució es tracten amb 0,4 ml de reactiu de Bradford i la reacció es llegeix a l'espectrofotòmetre a 595 nm després de 2 minuts de produir-se i abans d'una hora.

Determinació de nicotina

Per a la determinació d'aquest alcaloide es va usar el mètode de WERLE i BECKER (21). Un volum determinat d'homogeneïtzat es porta a sequedat. El residu es posa en un matràs per a destil·lació en corrent de vapor, junt amb 15 ml de solució de carbonat sòdic a saturació amb clorur sòdic. S'aconsegueix en aquestes condicions que la nicotina destil·li a 180 °C arrossegada per vapor d'aigua. El destil·lat

es recull en una proveta que conté 2 ml de solució d'anilina al 10 % amb tampó fosfat a pH 6,1. Es destil·la fins arribar a un total de 9 ml, és a dir es recullen 7 ml de destillat. S'afegeix als 9 ml, 1 ml de solució de BrCN al 10 % i es llegeix a 259 nm.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capacitat germinativa

Les llavors control van iniciar la germinació des de el 5è dia de sembrades fins el 8è, no observant-se cap germinació en dies posteriors tot i mantenint les llavors en condicions idònies durant 10 dies més.

Les llavors que van germinar sobre solució de gibberel·lina 10^{-6} M mostraren una velocitat de germinació semblant a la de les llavors control, però s'observa un augment significatiu de la seva capacitat germinativa (Taula I).

L'adició de quinetina 10^{-6} M al substrat de germinació de les llavors de *Nicotiana tabacum,* exercí un efecte quelcom diferent. Les llavors manifestaren un petit retard en la iniciació del procés de germinació, ja que el 5è dia després de sembrades no havien germinat tot i que aquest tractament hormonal va induir un més gran augment de la capacitat germinativa de *Nicotiana tabacum* (Taula I).

És destacable que les llavors embegudes en quinetina mostraven una menor elongació els primers dies de creixement. Aquest fenomen es podria explicar per què la quinetina afegida exògenament inhibeix el creixement de l'arrel (6) i el primer signe visible de la germinació és l'emergència radical. L'augment real de la capacitat germinativa és superior al que indiquen percentatges de germinació, puix que cap de les llavors germinades al 8è dia, ja sigui en condicions control o activades per hormones, continuen el seu creixement amb posterioritat. Tot i així, a diferència de les dades trobades per nosaltres, per a altres llavors, com *Triticum* o *Lupinus,* les llavors que germinaven el 7è dia, tenien diferents comportaments, ja que el 87,5 % de les germinades en aigua, el 86,9 % de les germinades amb gibberel·lina 10^{-6} M i el 89,9 % de les germinades amb quinetina 10^{-6} M continuen el creixement. Aquest fet augmentava les diferències entre les capacitats germinatives de les llavors control i les tractades.

Contingut de RNA

Les llavors control de *Nicotiana tabacum* encara no germinades mostraven un contingut en RNA que seguia un curs ascendent els 3 primers dies; això sembla indicar síntesi de RNA anterior a l'aparició dels primers signes visibles de la germinació. DATTA i colab. (5) arribaren a conclusions semblants treballant amb diferents espècies de dicotiledònies.

A partir del 5è dia, es poden observar augments altament significatius en els continguts de RNA en les llavors germinants, contrariament, en les llavors no germinants es va observar nivells més baixos en RNA fins el final del experiment (Taula II).

Els continguts en RNA en les llavors germinants sobre gibberel·lina 10^{-6} M i sobre quinetina 10^{-6} M mostraven un curs semblant al de les llavors control (Taula II). Els continguts de RNA van augmentar abans de començar la germinació i sempre van ésser de l'ordre: quinetina > gibberel·lina > control.

Les llavors germinades el 5è dia sobre gibberel·lina 10^{-6} M mostraren nivells significativament més alts que els de les plantes control.

Els nivells assolits per les llavors germinades en solució de quinetina 10^{-6} M eren significativament més alts que els obtinguts en les plantes control, tot i que eren

tant més petits com més gran era el retard en la germinació.

HOCK en 1984 (7) ja va observar que els tractaments hormonals tenien menys acció sobre les llavors que mostraven deficient capacitat germinativa.

Contingut de DNA

Les llavors control i germinades sobre gibberel·lina 10^{-6} M o sobre quinetina 10^{-6} M tenien nivells de DNA similars que augmentaven significativament en manifestar-se els primers signes de la germinació (emergència de la radícula). Els nivells de DNA eren semblants per a tots els tractaments, independentment del dia de germinació (Taula II).

Els nivells de DNA, ja siguin de les llavors control o sotmeses a tractaments hormonals, eren significativament més grans en les llavors germinades que en les no germinades.

Contingut en RNA poli A+

Tal com es pot observar en la Taula III, els nivells de RNA poliA$^+$ en les llavors de *Nicotiana tabacum* no germinades tant a les proves control com sotmeses a tractaments eren baixos, encara que els nivells de RNA poliA$^+$ de les llavors tractades amb quinetina 10^{-6} M eren sempre superiors als de les llavors control.

Les llavors germinades posseïen nivells de RNA poliA$^+$ molt superiors als de les llavors no germinades. Les llavors sotmeses a tractament de gibberel·lina 10^{-6} M posseien nivells similars als de les llavors control, mentre que les tractades amb quinetina 10^{-6} M posseïen nivells superiors de RNA poliA$^+$ (Taula III).

Aquesta dada confirma les observacions de VAN DER WALLE i colab. (20), i les diferències significatives existents entre els nivells de RNA de les plantes control i les sotmeses a quinetina semblen degudes essencialment al RNA poliA$^+$

Contingut de proteïnes

Les llavors germinades en condicions control experimentaven un augment en el seu contingut en proteïnes del 23 % en passar de no germinades a germinades. Els nivells obtinguts, amb excepció del vuitè dia, son més petits com més gran és el retard en la germinació (Taula IV).

TAULA II

Nivells d'àcids nucleics (µg/llavor)

	CONTROL				*GA 10^{-6}M*				*Q 10^{-6}M*			
	RNA		*DNA*		*RNA*		*DNA*		*RNA*		*DNA*	
Dies	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
1r	−	2,35	−	0,29	−	2,94	−	0,26	−	3,84	−	0,27
2n	−	2,55	−	0,27	−	2,47	−	0,22	−	5,10	−	0,32
3r	−	4,64	−	0,24	−	7,52	−	0,38	−	11,84	−	0,32
4t	−	12,41	−	0,27	−	28,66	−	0,36	−	24,92	−	0,25
5è	59,08	2,85	0,42	0,13	65,39	11,05	0,41	0,16	−	47,64	−	0,29
6è	57,29	3,55	0,38	0,16	53,40	12,35	0,38	0,15	69,80	11,81	0,36	0,15
7è	53,51	4,00	0,38	0,14	53,54	8,15	0,38	0,14	54,66	12,13	0,41	0,13
8è	37,80	2,40	0,38	0,15	38,75	5,96	0,37	0,10	48,43	9,64	0,38	0,10
9è	−	9,43	−	0,15	−	3,90	−	0,11	−	6,01	−	0,11
10è	−	9,27	−	0,11	−	8,67	−	0,11	−	9,22	−	0,09

+ = Llavors germinades
− = Llavors no germinades
GA - Gibberel·lina
Q - Quinetina

TAULA III

Nivells de RNA poliA⁺ i RNA poli⁻ (expressats en μg/llavor)

	CONTROL				*GA 10^{-6} M*				*Q 10^{-6} M*			
	RNA poli A⁻		*RNA poli A⁺*		*RNA poli A⁻*		*RNA poli A⁺*		*RNA poli A⁻*		*RNA poli A⁺*	
Dies	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
2n		1,83		0,41		2,37		0,46		4,00		0,79
4t		17,20		0,39		19,95		0,52		32,45		3,60
5è	46,23	1,90	8,70	0,28	50,00	11,45	8,56	0,45		14,55		2,80
6è	44,30	2,40	8,70	0,40	49,40	12,42	8,57	0,42	56,01	9, 76	13,11	2,60
7è	42,00	3,80	8,00	0,31	45,80	12,64	8,58	0,41	43,00	7, 50	10,85	0,80
8è	29,07	4,40	6,40	0,38	28,00	10,81	7,49	0,40	34,11	10,00	8,60	0,85
9è		3,90		0,28		9,64		0,38		11,65		0,80
10è		4,80		0,28		7,77		0,24		10,10		0,65

+ = Llavors germinades
− = Llavors no germinades
GA - Gibberel·lina
Q - Quinetina

TAULA IV

Valors de proteïnes i nicotina (expressats en mg/g pes sec)

	PROTEÍNES						*NICOTINA*					
	Control		*Gibberel·lina*		*Quinetina*		*Control*		*Gibberel·lina*		*Quinetina*	
	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
1r		99,10		189,90		342,90		0,35		0,14		0,06
2n		95,40		184,40		341,80		0,41		0,20		0,19
3r		95,15		183,15		330,99		0,44		0,29		0,35
4t		93,12		180,12		320,18	0,48	0,50	0,29	0,32		0,35
5è	128,42	89,42	236,61	174,15		310,88	0,51	0,54	0,30	0,34		0,33
6è	125,31	89,31	226,40	170,74	344,00	291,15	0,53	0,56	0,34	0,35	0,30	0,32
7è	117,11	86,40	216,51	171,15	327,32	270,49	0,56	0,60	0,39	0,40	0,28	0,32
8è	117,20	80,66	196,01	144,91	316,30	266,66	0,64	0,70	0,40	0,44	0,28	0,31
9è	110,54	64,72	190,02	140,66	287,00	254,15	0,65	0,79	0,41	0,44	0,31	0,31
10è	111,13	57,50	190,00	136,72	170,00	210,44	0,65	0,79	0,42	0,45	0,33	0,30

+ = Llavors germinades
− = Llavors no germinades

El tractament hormonal provoca una resposta activadora de la síntesi de proteïnes i per això les llavors germinades sobre gibberel·lina 10^{-6} M experimenten un augment en el nivell de proteïnes del 35 % en front de les llavors no germinades. Aquest fet va ésser constatat per altres investigadors con AKAZAWA i MIYATA (1) ja el 1982. És destacable que els nivells de proteïnes son més petits com més gran és el retard en la germinació.

Amb quinetina 10^{-6} M s'obtenen efectes més marcats, ja que provoca un augment en els nivells de proteïnes, en passar les llavors de no germinades a germinades, del 50 %, i de manera semblant amb els resultats de la gibberel·lina, els nivells són tant més petits com major és el retard en la germinació.

És destacable el fet que les llavors no tractades amb gibberel·lina 10^{-6} M i quinetina 10^{-6} M no germinants tenien valors de proteïnes superiors als de les llavors control germinants.

Ja SEN i OSBORNE en 1977 (15), intentaren relacionar en embrions de sègol les diferències de viabilitat amb la capacitat de síntesi de proteïnes i trobaren que els embrions amb alta capacitat germinativa eren capaços de transcriure totes les espè-

cies de RNA d'alt pes molecular i també de traduir-los, però les llavors de baixa capacitat germinativa no eren capaces de transcriure tots els RNA d'elevat pes molecular i per això la síntesi de proteïnes és baixa. SPIEGEL i MARCUS (16) demostraren també en sègol que les llavors sense capacitat germinativa són capaços de sintetitzar RNA de baix pes molecular, però tenien molt poca capacitat de síntesi de proteïnes.

Estudis realitzats per JONES i JACOBSEN (8) sobre la qualitat de les proteïnes semblen demostrar que proteïnes enzimàtiques i no enzimàtiques sorgien de manera simultània, però no s'aconseguia demostrar si la hormona que influeix en aquests procesos es la gibberel·lina o es deu a interaccions hormonals.

Contingut de nicotina

Segons pot observar-se en la Taula IV, els nivells de nicotina, expressats en mg per g de pes sec de les llavors control augmentaven en el curs de l'experiència, mostrant-se sempre inferiors en les llavors germinades que en les no germinades. Aquest fet semblava indicar que les llavors germinants utilitzaven les seves reserves per a la síntesi de substàncies primàries (proteïnes i àcids nucleics) necessàries per al creixement, mentre que les llavors que no tenien signes de germinació, en no requerir substàncies primàries per al seu creixement, utilitzaven les reserves per a la síntesi de metabòlits secundaris.

Les llavors tractades amb gibberel·lina, ja siguin germinades o no, presentaven un comportament similar al de les llavors control, tot i que els nivells d'alcaloides obtinguts per les llavors son inferiors, en tots els casos, al de les plantes control.

És destacable el baix contingut alcaloídic existent en les llavors tractades amb quinetina el primer dia després de sotmetre-les a condicions idònies per a la germinació. Sembla evident que la síntesi d'alcaloides queda inhibida per afavorir la formació d'àcids nucleics i proteïnes que porten a la germinació i el posterior creixement. També és destacable el fet que els nivells de nicotina en les llavors tractades amb quinetina 10^{-6} M augmentaven fins el tercer dia i es mantenien el quart dia, per disminuir després fins al final de l'experiment. Aquest fet podria explicar-se perquè la quinetina indueix a germinar llavors vives però amb metabolisme lent.

Amb una visió general, les llavors, degut al tractament hormonal augmentaven la capacitat germinativa i el seu contingut en substàncies primàries, pero disminuien en el contingut en substàncies secundàries. Tot i que aquests fets no induien a que les plantes resultants d'aquesta germinació millorada estiguessin mancades en el decurs del seu desenvolupament de capacitat per la síntesi d'alcaloides.

Creiem, per tant, que el tractament hormonal podria ajudar a l'obtenció de plantes per al seu aprofitament en la formació de substàncies farmacològicament actives.

Agraïments

Aquest treball s'ha realitzat amb el suport econòmic donat per la Secretaria de la CIRIT (Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya).

BIBLIOGRAFIA

1. AKAZAWA, T. i MIYATA, S. (1982) Gibberellin Action in the Aleurone Laver. En: Progress in Botany, 45. Springer Verlag, Berlín. pp. 145-148.
2. BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
3. BURTON, K. (1956) A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for

the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acids. *Biochem. J.*62:315.

4. BYRNE, H. i SETTEFIELD, G. (1977) Activation of ribosomal and messenger RNA synthesis in excised Jerusalem Artichoke tuber slices. *Planta,* 136:203-210.
5. DATTA, K., MARSH, L. i MARCUS, A. (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol.* 72:(2), 394-397.
6. HALL, R.H. (1973) Cytokinins as a probe of developmental processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:415-444.
7. HOCK, B. (1984) Developmental Physiology. En: Progress in Botany, 46, Springer Verlag, Berlin. pp.140-171.
8. JONES, R.L. i JACOBSEN, J.V. (1983) Calcium regulation of the secretion of α-amilase isoenzymes and other proteins from barley aleurons layers. *Planta,* 158:1-9.
9. KHAN, A.A. (1971) Cytokinins: Permissive role in seed germination with other plant hormones, cytokinins regulate germination and dormancy by a novel mechanism. *Science,* 171:853-859.
10. KHAN, A.A. i TAO, K.L. (1978) Phytohormones, Seed dormancy and Germination. En: Phytohormones and related compounds. A comprehensive Treatise. Vol. II. (Lethman, D.S., P.B. Goodwin, i T.J.V. Higgins). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. New York, pp. 371-412.
11. MAYER, A.M. i POLJAKOFF-MAYBER, A. (1962) Quantitative changes in nucleic acids during germination of lettuce seeds. *Physiol. Plant.* 15:283-292.
12. OGUR, M. i ROSEN, C. (1960) The nucleic acids of plant tissues. The extraction and estimation of RNA and DNA. *Arch. Biochem.* 25:262-276.
13. RASUMOVA, M.V., NIKOLAEVA, M.C. i DALETSAKAYA, T.V. (1978) En: Phytohormones and related Compunds. A comprehensive Treatise. Vol. II. (Letham, D.S., P.B. Goodwin i T.J.V. Higgins). Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam. pp. 377.
14. SCHNEIDER, W.C. (1945) Phosphorous compounds in animal tissues I. Extraction of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 161:293-303.
15. SEN, S. i OSBORNE, D.J. (1977) Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of inhibition of rye (*Secale cereale* L.) *embryos. Biochem. J.* 166:33-38.
16. SPIEGEL, S. i MARCUS, A. (1975) Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* 256:228-230.
17. STRUGALA, K. i BUCHOWICZ, J. (1984) The use of (^{3}H) Deoxyadenosine to measure the rate of DNA synthesis in germinating wheat embryos. *Plant Sci. Lett.* 34:17-23.
18. VAN LOON, L.C. i VAN KAMEN, A. (1968) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsum" and *"Samsum NN". Phytochem.* 7:1727-1735.
19. VAN DER WALLE, C. i BERNIER, G. (1976) Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. *Plant Physiol.* 157:632-639.
20. VAN DER WALLE, C., DELTOUR, R. i FORGEUR, G. (1983) Species of RNA synthesized during early germination in the radicle of the lentil embryo. *Physiol. Plant.* 57:181-188.
21. WERLE, E. i BECKER, H.N. (1942) Uber eine Mikromethode zur Beshimmung von Nicotin und ihre Anwendung zur Untersuchung der fermentativen Nicotinent giftung durch Treisches Gewebe. *Biochem.* 31:182.