



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

"Captación del carbono y movimientos orientados
de los cloroplastos en *Egeria densa* Planch."

T E S I S

Que para obtener el Título de :

B I O L O G O

P r e s e n t a :

David Benavides Velázquez



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Introducción	1
Antecedentes	2
Ubicación taxonómica	9
Metodología	
Colecta y tratamiento	10
Observaciones generales	10
Movimientos de los cloroplastos	11
Adaptaciones relacionadas con la captación del carbono	13
Resultados	
Observaciones generales	14
Movimientos de los cloroplastos	14
Adaptaciones relacionadas con la captación del carbono	17
Discusión	25
Apendice	34
Bibliografía	35

INTRODUCCION

La asimilación del carbono en las plantas mediante el proceso fotosintético ha sido motivo de gran interés científico debido a que constituye la base de la productividad primaria de toda la biósfera y prácticamente todos los compuestos orgánicos proceden directa o indirectamente de la fotosíntesis.

La captación del carbono en las plantas afronta diversos obstáculos relacionados con el ambiente en el que éstas se desarrollan. Algunas plantas tropicales de alta productividad han desarrollado un sistema de captación que les permite satisfacer las demandas de carbono de su metabolismo mediante la formación de un gradiente de concentración del bióxido de carbono favorable a la parte mas interna de la hoja, y con ello han logrado, además, una notable disminución en la pérdida de agua mediante un aumento en la resistencia estomática. En las plantas acuáticas, los principales obstáculos para la captación del carbono incluyen la baja velocidad de difusión del bióxido de carbono en el agua y la variabilidad en la concentración de este compuesto de acuerdo con la temperatura y la salinidad.

En el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México se han realizado diversos estudios espectrofotométricos en tejidos vegetales vivos y se han encontrado algunos efectos relacionados con los movimientos orientados por la luz en los cloroplastos de *Egeria densa* Planch. (Hydrocharitaceae) que, de acuerdo con observaciones preliminares, pueden ser inhibidos parcialmente con altas concentraciones de bióxido de carbono.

Al ponderar la importancia de la presión selectiva que implica la captación del carbono en plantas acuáticas y su relación con los movimientos de los cloroplastos, se realizó el proyecto que dió origen al presente trabajo y que tuvo como objetivo determinar los principales cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en *Egeria densa* Planch. de acuerdo con las condiciones de temperatura y fotoperiodo en las que se le cultiva, y establecer la relación que guarda todo esto con los movimientos orientados de los cloroplastos.

ANTECEDENTES

Los movimientos de los cloroplastos son un fenómeno ampliamente difundido en los vegetales. Se reconocen en general dos tipos de movimientos: la fotodinesis, que depende de la intensidad de la luz pero no de su dirección de propagación; y la fotorientación de los cloroplastos o movimiento fototáctico, en el que los cloroplastos se orientan de acuerdo con la intensidad y la dirección de la luz, alterando el patrón de distribución de los organelos dentro de la célula (12). La luz también puede ocasionar cambios en la centrifugabilidad de los cloroplastos debido a la alteración que ocurre en la viscosidad del citoplasma en función de la intensidad del flujo luminoso (26, 30).

En algas marinas propias de zonas de intermareas, se ha podido demostrar que la orientación de los cromatóforos no ocasiona cambios en el desprendimiento de oxígeno ni en la actividad de los fotosistemas, por lo que su función podría restringirse a la prevención de la fotooxidación de los pigmentos (19). Por otra parte, en algunos casos, los cromatóforos de las algas se mueven de acuerdo con ciclos circadianos bien establecidos y no de acuerdo con los cambios inmediatos en la intensidad o la dirección de la luz (18). No obstante, tanto en las algas como en las plantas superiores, los movimientos de los cloroplastos o cromatóforos ocasionan cambios en la capacidad de los tejidos fotosintéticos de absorber la luz (12, 18). Existe particularmente una orientación propia de la iluminación intensa y prolongada que se manifiesta como un agrupamiento de los cloroplastos, y que puede ser detectada espectrofotométricamente como una disminución en la transmitancia o un aumento en la absorbancia del tejido en el rango de la luz visible (18). En las plantas superiores no se ha podido determinar la importancia adaptativa de los movimientos de los cloroplastos, pero se considera que los movimientos fototácticos son, probablemente, un mecanismo regulador para el control de la fotosíntesis (26).

El espectro de acción de los movimientos de los cloroplastos de diversos vegetales presenta picos en 366, 450 y 680 nm, que parecen

indicar la participación de varios receptores para el proceso (12): los picos en el ultravioleta y en el azul se atribuyen a la participación de flavinas, mientras que el pico en 680 nm (rojo) se atribuye a la clorofila.

Tanto los cambios en la viscosidad del citoplasma, que afectan la sujeción de los cloroplastos a éste, como los movimientos fototáticos, parecen ser una consecuencia del flujo citoplasmático y éste, a su vez, requiere de energía química en forma de trifosfato de adenosina (ATP) debido a que el mecanismo que lo mueve se basa en filamentos contráctiles, que se localizan en el límite entre el endo y el ectoplasma, y que posiblemente están formados por actina y miosina. De hecho, el flujo citoplasmático puede detenerse con inhibidores de la actina o de las enzimas encargadas de la ruptura del ATP (ATPasas), y en el caso de *Egeria densa* se ha comprobado directamente la presencia de miosina mediante su aislamiento (12, 20).

En 1972, Konrad Seitz (26) propuso un mecanismo transductor para el movimiento de los cloroplastos, basado en la formación de gradientes de ATP. Según esta proposición, la intensidad y la longitud de onda de la luz actúan sobre la fosforilación oxidativa y sobre la fotofosforilación para que, por efecto de ambas, se regule la disponibilidad de ATP en la capa de contacto entre los cloroplastos y el ectoplasma. El mecanismo que se propone es el siguiente: cuando la intensidad luminosa es baja, la luz ultravioleta y la luz azul estimulan la fosforilación oxidativa de las mitocondrias por medio de la excitación de flavinas; esto sucede primero en la parte cercana a las paredes de la célula que reciben mayor cantidad de luz. A medida que aumenta la intensidad luminosa, la fosforilación oxidativa llega a un máximo de saturación en toda la célula, mientras que los cloroplastos utilizan a la luz azul y a la luz roja para activar, en primer lugar, la fotofosforilación acíclica, ya que cuentan, para ello, con suficiente fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido oxidado (NADP^+), capaz de recibir electrones para pasar a su forma reducida (NADPH). Durante la fijación inicial del bióxido de carbono se consume más ATP del que se sintetiza por medio de la fotofosforilación

acíclica y, por lo tanto, los cloroplastos se ven forzados a tomar ATP del citoplasma circundante ocasionando una disminución del movimiento del flujo citoplasmático y un incremento en la viscosidad. Con un aumento mayor en la intensidad luminosa, se llega a un rango en el que se satura la reducción del NADP^+ ; en estas circunstancias, la luz puede ser utilizada plenamente para la fotofosforilación cíclica, con lo cual se produce un exceso de ATP que pasa al citoplasma activando su flujo, disminuyendo su viscosidad y aumentando el movimiento de los cloroplastos. Cuando la intensidad luminosa es muy alta y el ATP se ha acumulado en el citoplasma, aumenta la fuerza cortante que dirige a éste y a los cloroplastos, en los cuales disminuye la sujeción que los mantiene unidos al citoplasma cortical (12), de modo que la orientación de los cloroplastos que ocurre después de varios minutos de iluminación intensa corresponde a condiciones en las que el ATP se encuentra en exceso.

Si se considera el mecanismo descrito anteriormente para explicar los movimientos de los cloroplastos de acuerdo con la formación de gradientes de ATP, se debe tomar en cuenta que la disponibilidad del dióxido de carbono puede ser un factor limitante para el proceso. Cuando la concentración del dióxido de carbono es muy baja, las plantas acuáticas incrementan su punto de compensación de la luz, esto es, requieren de una mayor intensidad luminosa para llevar a cabo el proceso fotosintético; y cuando la cantidad de luz que reciben estas plantas es muy baja, incrementan su punto de compensación del dióxido de carbono (16). Se sabe también que la intensidad de la luz afecta como factor limitante de la fotosíntesis en cualquier concentración de dióxido de carbono, y se piensa que la explicación de esto se relaciona con una probable actividad fotoinducida (directa o indirectamente) de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBPCasa), por ser ésta la principal enzima encargada de la captación del dióxido de carbono y de su incorporación en compuestos orgánicos mediante la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) (29).

Tomando en cuenta todo lo anterior, resulta evidente que la relación entre la disponibilidad de la luz y la disponibilidad del bióxido de carbono es una parte importante de la regulación del proceso fotosintético. Es también claro que los movimientos de los cloroplastos, al ocasionar cambios en la absorbancia de los tejidos fotosintéticos de las plantas acuáticas, afectan la disponibilidad de la luz, y de esto se infiere que existe una probable relación entre la disponibilidad de bióxido de carbono y los movimientos de los cloroplastos.

Para las plantas acuáticas existen barreras especiales que disminuyen la disponibilidad del bióxido de carbono: la principal de ellas es la baja velocidad de difusión de los gases en el agua, que es miles de veces menor que en el aire. De acuerdo con J. A. Browse y colaboradores (6), existe una capa de agua inmóvil en torno a las hojas de *Egeria densa*, denominada capa limítrofe, que mide por lo menos unas 50μ de espesor y representa una resistencia a la transferencia del bióxido de carbono de casi 30 000 s/m. Esta resistencia es entre cien y mil veces mayor que la resistencia de la capa limítrofe de aire en hojas de plantas terrestres, y además de ella, *Egeria densa* presenta una resistencia a la carboxilación de 3 800 s/m y una resistencia a la transferencia del bióxido de carbono en el mesófilo 9 000 s/m. Todos estos valores fueron obtenidos en condiciones experimentales en las que se mantenía el medio en agitación, pero se calcula que en condiciones naturales, en los estanques, la resistencia a la transferencia del bióxido de carbono podría ser entre cinco y siete veces mayor (6). Si a todo esto se añade que los cuerpos de agua naturales presentan una notable variabilidad en la concentración del bióxido de carbono de acuerdo con la temperatura, la concentración de sales y la ecología general de los organismos que los habitan, resulta evidente que la captación del carbono en plantas acuáticas afronta una intensa presión selectiva que requiere de adaptaciones especiales para ser superada. Dentro de estas adaptaciones se puede citar la capacidad de las plantas acuáticas para uti

zar al ion bicarbonato como fuente directa de carbono para la fotosíntesis (6,16), pero en algunas monocotiledoneas acuáticas de la familia Hydrocharitaceae se ha demostrado el desarrollo de procesos más complicados para la captación del bióxido de carbono que incluyen la formación de malato como ocurre en la vía C-4, que consiste básicamente en la carboxilación del fosfoenol piruvato (PEP) y la producción de oxalacetato, que inmediatamente es transformado en malato o en aspartato. Esta vía metabólica requiere de la participación de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCasa) para la captación del bióxido de carbono en el citoplasma de las células del mesófilo, y fué descrita originalmente para plantas terrestres de muy alta productividad como la caña de azúcar y el maíz. Además de tener una alta productividad, las plantas C-4 se caracterizan por tener una anatomía foliar poco usual, asociada con la presencia de cloroplastos dimórficos, una reducción en la pérdida de agua por unidad de materia seca producida, una mayor proporción de ^{12}C respecto al ^{13}C , y, como se dijo antes, por incorporar el bioxido de carbono formando compuestos de cuatro carbonos (3). La presencia de cloroplastos dimórficos se explica como una compartimentalización del proceso fotosintético: mientras los cloroplastos de las células del mesófilo presentan una gran cantidad de apilaciones membranales y realizan las reacciones luminosas de la fotosíntesis, los cloroplastos de las células que rodean las nervaduras carecen de apilaciones membranales, poseen menor cantidad de pigmentos fotosintéticos, y se especializan en realizar las reacciones oscuras de la fotosíntesis, para lo cual reciben el NADPH y el ATP producido en los cloroplastos de las células del mesófilo y los ácidos de cuatro carbonos producidos en el citoplasma de las mismas a partir de la carboxilación del PEP. Los cloroplastos especializados en las reacciones oscuras descarboxilan al malato o al aspartato que reciben, y liberan bióxido de carbono, el cual, de este modo, alcanza las altas concentraciones que se requieren para satisfacer los requerimientos de la elevada productividad de las plantas C-4.

La mayoría de las plantas que no siguen la vía C-4 captan casi todo su carbono inorgánico por medio de la RuBPCasa (vía C-3), en la cual se presenta una mayor afinidad por el ^{12}C respecto al ^{13}C . Aunque la PEPCasa también capta el ^{12}C en forma preferente, presenta una eficiencia para diferenciar isótopos de carbono menor que la que se observa en la RuBPCasa, y es por ello que las plantas C-4 presentan una mayor relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, en comparación con las plantas C-3. (28).

La mayor eficiencia de las plantas C-4 para captar el carbono, influye también en su punto de compensación del bióxido de carbono. Las plantas C-3 requieren de cierta concentración de bióxido de carbono para que se pueda llevar a cabo la fotosíntesis; por debajo de esta concentración, la RuBPCasa no es capaz de captar y fijar suficiente carbono y, además, sufre una inhibición competitiva por parte del oxígeno que ocasiona una oxidación de la RuBP en lugar de su carboxilación; esta reacción da lugar al fenómeno conocido como fotorespiración que, aunado con la respiración mitocondrial, da como resultado que el bióxido de carbono captado por la fotosíntesis, en estas condiciones, sea equivalente o menor que el bióxido de carbono liberado por estos procesos, y por lo tanto no se obtenga una fijación neta del bióxido de carbono. La compartimentalización de la fotosíntesis en las plantas C-4, permite formar gradientes de bióxido de carbono favorables al estroma de los cloroplastos especializados en reacciones oscuras, y con esto evita la fotorrespiración y hace más efectiva la captación del carbono, por lo que el punto de compensación del bióxido de carbono se reduce a concentraciones muy bajas, y en ocasiones tan cercanas a cero que son indetectables (3).

En las monocotiledoneas acuáticas de la familia Hydrocharitaceae, como *Egeria densa*, *Hydrilla verticillata* y *Elodea canadensis*, el punto de compensación del bióxido de carbono varía a lo largo del año: Durante el verano, los valores son muy bajos (aunque no tanto como en las plantas C-4), y durante el invierno son tan altos como los de las plantas C-3 (2, 23). En el caso de *Egeria densa*, si se le cultiva a una temperatura de 16°C muestra un punto de compensación del

bióxido de carbono de 48 $\mu\text{l/l}$, mientras que si se le cultiva a 32°C. reduce su punto de compensación del bióxido de carbono a 13 $\mu\text{l/l}$ por efecto de la aclimatación (2). Estas variaciones podrían explicarse como cambios en la estrategia de asimilación del carbono por los cuales dominará la vía C-3 en invierno y la vía C-4 en verano (13).

En diversas macrofitas acuáticas se ha demostrado la incorporación de bióxido de carbono radiactivo en compuestos de cuatro carbonos, pero el porcentaje de esto respecto al carbono captado via C-3 es muy variable (13). En el caso de *Egeria densa*, se ha propuesto que la producción de ácido málico como resultado de la captación de bióxido de carbono no obedece a un mecanismo tipo C-4, sino que se debe solamente a que la planta fué mantenida en concentraciones muy bajas de bióxido de carbono (4), y su probable función es balancear los excesos de captación de cationes en presencia de luz (7). Estas proposiciones, sin embargo, no toman en cuenta la aclimatación de la planta ni explican la función posterior del malato cuando la relación de iones vuelve a cambiar en el citoplasma. Un estudio amplio en torno a éste tema, que se realizó en *Hydrilla verticillata*, demostró suficientes características de la vía C-4 en esta planta como para considerar que ella, y tal vez otras hidrocaritaceas, no se ajustan a ninguna de las categorías fotosintéticas actuales, y deben de ser ubicadas en un nuevo grupo caracterizado por presentar variabilidad estacional en el punto de compensación del bióxido de carbono (13).

Uno de los estudios más avanzados en este campo demostró, en el año de 1983, que la PEPCasa de *Hydrilla verticillata* cambia su velocidad máxima y su sensibilidad al cloruro de sodio de acuerdo con las condiciones de aclimatación en las que se cultivó la planta, y se propone que, en el verano, no solo cambia el punto de compensación del bióxido de carbono y la relación RuBPCasa/PEPCasa, sino también el tipo de isoenzimas de la PEPCasa presentes en el citoplasma, lo cual implica que los cambios en la capacidad de captar el bióxido de carbono a lo largo del año se relacionan con cambios a nivel de síntesis de proteínas (1).

De acuerdo con todo lo anterior, un metabolismo parecido a la vía C-4 podría ser una adaptación que, en lugar de permitir el ahorro de agua y favorecer una productividad muy elevada, como ocurre en las plantas terrestres, podría satisfacer, en las plantas acuáticas, las exigencias que derivan de la alta presión selectiva que implica la dificultad para captar el bióxido de carbono en el medio acuático.

En pruebas preliminares realizadas en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se demostró que en *Egeria densa* se presenta una acumulación de los cloroplastos como resultado de una iluminación prolongada e intensa, y que esta orientación se puede inhibir parcialmente con altas concentraciones de bióxido de carbono. Como resultado de todo ésto, se realizó el proyecto que dió origen al presente trabajo y que parte de la hipótesis de que existe una estrecha relación entre los movimientos fototácticos de los cloroplastos y la asimilación del carbono en la macrofita acuática *Egeria densa* Planch. (Hydrocharitaceae), y que esta planta, en la que se ha demostrado variabilidad en el punto de compensación del bióxido de carbono (2), presenta una forma especial de fotosíntesis C-4 facultativa durante el verano.

UBICACION TAXONOMICA (8, 10)

División : Magnoliophyta
Clase : Liliatae
Orden : Hydrocharitales
Familia : Hydrocharitaceae
Género : *Egeria*
Especie : *Egeria densa* Planch.

METODOLOGIA

Colecta y tratamiento:

Los ejemplares de *Egeria densa* empleados en los experimentos fueron colectados a mediados de verano (el 3 de agosto de 1984) en el Jardín Botánico del Instituto de Biología (UNAM). Se colectaron en total 30 ápices sanos de 30 cm de longitud, sin ramificaciones y sin flores; en cada uno de ellos se midió la longitud promedio de los entrenudos desde el 4º cm a partir del extremo distal y a lo largo de 10 cm; este valor se promedió para los 30 ejemplares con el fin de determinar el grado de espigamiento original.

Se realizó una separación de los ejemplares en forma aleatoria para formar 2 lotes iguales de 15 ejemplares cada uno. El primer lote se mantuvo dentro del laboratorio, en un recipiente cilíndrico de vidrio de 27 litros de capacidad que contenía 20 litros de solución Hoagland al 5% v/v; para este lote, el periodo de iluminación fue de 14 h y el de obscuridad de 10 h; la temperatura se mantuvo a 30°C (aclimatación de verano). El segundo lote se mantuvo en un recipiente idéntico al del primero y con el mismo tipo de solución, pero el fotoperiodo fue de 10 h de iluminación y 14 h de obscuridad con una temperatura de 12°C, para lo cual fue necesario utilizar una cámara de incubación marca Fisons, modelo 600G3 THTL (aclimatación de invierno). El tratamiento de ambos lotes duró 4 semanas.

Observaciones generales:

Después del periodo de aclimatación, se volvió a determinar el grado de espigamiento medido como longitud promedio de entrenudos para los 15 ejemplares de cada aclimatación.

Se determinó en un ejemplar de cada tratamiento la concentración de clorofila a, clorofila b, clorofila total y relación clorofila a/clorofila b; para ello se realizó una extracción de los pigmentos fotosintéticos en una mezcla de acetona y agua en proporción 8:2 y se determinó espectrofotométricamente la concentración de las clorofilas mediante la técnica descrita por A. San Pietro (24) empleando un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer, modelo 552 de doble haz con un registrador de la misma marca, modelo 561.

Movimientos de los cloroplastos:

Se buscaron los diferentes tipos de orientaciones de los cloroplastos descritas en la literatura (12, 18, 19, 26, 31) mediante el empleo de un microscopio de polarización marca Meopta, modelo 155732, y se determinaron las condiciones de iluminación en las que se presentan las orientaciones detectables con esta técnica.

Para evaluar los cambios en la orientación de los cloroplastos se determinó su efecto en la absorbancia de las hojas; para esto se emplearon celdas desechables de polipropileno marca Kartell, en las que se colocaba una hoja de *Egeria densa* adherida a una de las paredes; la hoja se sujetaba con una lámina de vidrio delgado dispuesta a lo largo de la pared de la celda y sostenida por un trozo de hule en la parte superior. La celda se llenaba de agua y la hoja se ajustaba de modo que su superficie fuera perpendicular a la dirección del haz de luz del espectrofotómetro para que fuera atravesada por él (en todos los experimentos se utilizó el espectrofotómetro descrito anteriormente). La absorbancia se midió siempre a 682 nm debido a que en esta longitud de onda se observó una banda de absorción en las hojas vivas de *Egeria densa* que puede ser atribuida a las clorofilas.

La orientación propia de iluminación intensa y prolongada se estudió mediante el empleo de las celdas antes descritas; una vez que las hojas eran ajustadas en la celda, se les daba un período de obscuridad total de 2 h y, posteriormente, se aplicaba en ellas un haz de luz blanca de 3 600 lux de intensidad; el haz de luz procedía de una lámpara incandescente para microscopio, marca Bausch & Lomb con un filtro azul para eliminar el exceso de luz roja e infrarroja. La lámpara se colocaba a 4 cm de la hoja, y la intensidad luminosa para estas condiciones se determinó con un detector marca Tectronix, modelo J6511, con fotodiodo de silicio y adaptado a un fotómetro digital marca Tectronix, modelo J16 Option 2.

Se realizaron mediciones de absorbancia a 682 nm cada minuto durante un período de iluminación de 30 min y se obtuvieron

gráficas de absorbancia contra tiempo de iluminación para hojas con aclimatación de verano e invierno y, en cada caso, se probaron medios carentes de bióxido de carbono y medios con una concentración 2 mM de bióxido de carbono. Estas concentraciones se determinaron por titulación con hidróxido de sodio y, para mantenerlas constantes, se aplicó una capa de parafina sobre el medio, de modo que la celda quedara sellada. En todos los experimentos se emplearon hojas tomadas a 7 cm del extremo distal de cada planta.

Para determinar la relación entre el bióxido de carbono presente en el medio y la orientación de los cloroplastos, se obtuvieron curvas de dosis contra respuesta para cada aclimatación. Dado que la orientación estudiada se asocia con una disminución de la absorbancia, su magnitud fue evaluada como un cambio porcentual de la absorbancia de las hojas después de 30 min de iluminación, empleando ahora luz directa de sol. Estos valores se obtuvieron como:

$$C\%A = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

En donde C%A representa el cambio porcentual de la absorbancia a 682 nm, A_i representa la absorbancia inicial en 682 nm y A_f representa la absorbancia final en la misma longitud de onda.

Para cada curva de dosis contra respuesta se empleó un mínimo de seis concentraciones diferentes de bióxido de carbono pero, debido a la dificultad para emplear una misma hoja, en virtud de los daños que la técnica ocasionara, se emplearon diferentes hojas para cada concentración y se minimizaron algunas diferencias entre las hojas utilizando sólo las de dos verticilos contiguos (se presentan de cuatro a cinco hojas en cada verticilo). De este modo, cada curva fue elaborada con hojas de una misma planta y muy similares entre sí, aunque, a pesar de todo, la variabilidad en los valores de absorbancia inicial entre las hojas y la magnitud de la incertidumbre en el cálculo de las concentraciones, impidieron comparar datos de experimentos diferentes, de modo que cada curva se obtuvo de una sola determinación para cada concentración, aun cuando en todas las

pruebas se observara una misma tendencia.

Adaptaciones relacionadas con la captación del carbono:

Como primera aproximación experimental para determinar la vía de captación del carbono en *Egeria densa*, se observó la anatomía foliar de los ejemplares de cada aclimatación a través del mismo microscopio de polarización mencionado anteriormente y empleando la técnica de tinción del almidón de los cloroplastos descrita por J. Coombs y D. O. Hall (9); en la que se aplica lugol a tejidos previamente fijados en alcohol. Estas observaciones se hicieron en plantas con 4 y 8 semanas de tratamiento para cada aclimatación y fueron complementadas por medio de la técnica de microscopía electrónica de transmisión, empleando para ello un microscopio electrónico marca Jeol, modelo 100B.

Otra determinación relacionada con la vía de captación del carbono, fue la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Para ello se realizó la combustión de una muestra de material de cada aclimatación previamente secado y pulverizado. El bióxido de carbono producido por la combustión se corrió en un espectrómetro de masas marca Finnigan, modelo Mat 250 con triple colector. La relación se calculó como:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = \left[\frac{\text{R de la muestra}}{\text{R estandar}} - 1 \right] \times 1000$$

donde R representa la relación masa 45/ masa 44 del bióxido de carbono. Se tomó como referencia el estandar internacional PDB, formado por carbonato de calcio de una muestra de belemnita procedente de Carolina del Sur.

La parte experimental de este trabajo contó con la colaboración del Dr. Roberto Ortega para la determinación de la intensidad luminosa; del Dr. Alfonso Cárabez, Jorge Sepúlveda y Rodolfo Paredes para lo que corresponde a microscopía electrónica; y del Dr. Rolando Castillo, el Dr. Pedro Morales y el Quím. Salvador Ramos para las determinaciones de la $\delta^{13}\text{C}$. En el tratamiento de aclimatación y la espectrofotometría se recibieron aportaciones del Dr. Barbarín Arreguín y del Quím. René Villena. A todos ellos: Gracias.

RESULTADOS

Observaciones generales: Las muestras originales de *Egeria densa* presentaron una longitud promedio de entrenudos de 4.52 mm con una desviación estandar de 1.19 mm; después de 4 semanas de aclimatación de verano, las muestras redujeron esta longitud a 2.75 mm con una desviación estandar de 0.35 mm. Con el mismo tiempo de aclimatación, pero a condiciones de invierno, la longitud promedio de entrenudos aumentó a 6.08 mm con una desviación estandar de 0.84 mm. En otras palabras, se observa una tendencia al arrosamiento en verano y al espigamiento en invierno.

Para los ejemplares de verano se encontró una cantidad total de clorofilas de 0.532 mg/g de peso fresco, que representaban 0.358 mg/g de peso fresco para la clorofila a, y 0.174 mg/g de peso fresco para la clorofila b, con una relación clorofila a/clorofila b de 2.05.

En los ejemplares de invierno, la cantidad total de clorofilas fue de 0.659 mg/g de peso fresco, con 0.440 mg/g de peso fresco para la clorofila a, 0.219 mg/g de peso fresco para la clorofila b, y una relación clorofila a/clorofila b de 2.01.

Movimientos de los cloroplastos: Se observaron principalmente 3 tipos de orientación: la orientación de obscuridad, en la que los cloroplastos se encuentran dispersos aleatoriamente por toda la célula; la orientación de luz tenue o de poco tiempo de iluminación intensa (alrededor de 1 min), en la que los cloroplastos giran alrededor del citoplasma, en las partes cercanas a las paredes perpendiculares a la superficie de la hoja; y la orientación de iluminación intensa y prolongada, en la que los cloroplastos se acumulan en la parte central de la célula. Como por lo general se utilizó iluminación intensa (de más de 3 600 lux), la orientación de luz tenue o de poco tiempo de iluminación intensa, que se muestra en el esquema 1, se designó como "la orientación temprana", y la orientación de iluminación intensa y prolongada, que aparece en el esquema 2, se designó como "la orientación tardía".

Las hojas de *Egeria densa* presentan dos capas de células en el limbo, y en cada capa, los cloroplastos se mueven en forma independien

te. Los cambios en el tipo de orientación son más rápidos en la capa adaxial, en la que, además, las células son más grandes. A lo largo de la hoja, y para cada capa de células, los cambios de orientación son más rápidos en la parte distal que en la parte proximal.

Cuando la iluminación es muy tenue, los cloroplastos no inician su rotación de inmediato, sino que se alinean en las paredes perpendiculares a la superficie de la hoja y ahí permanecen quietos. Cada cloroplasto presenta una forma ovalada o casi circular si se le ve en planta, pero en una vista lateral, su forma se muestra muy alargada. Esta forma alargada se observa claramente en las orientaciones de luz tenue, pero cuando los cloroplastos adoptan la orientación tardía, muestran una forma casi circular (esquemas 1 y 2).

Los movimientos de los cloroplastos ocasionan cambios en la absorbancia de las hojas vivas de *Egeria densa*. Durante el primer minuto de iluminación intensa, se observa un pequeño aumento en la absorbancia cuya magnitud es variable debido a que la absorbancia en condiciones de obscuridad depende de una dispersión aleatoria de los cloroplastos y es, por lo tanto, muy variable. La gráfica 1 muestra los cambios típicos en la absorbancia de acuerdo con la orientación de los cloroplastos. Después del primer minuto de iluminación intensa, se observa un decaimiento brusco de la absorbancia debido a que los cloroplastos se agrupan y proyectan sombra unos sobre otros. Después de 10 min con esta iluminación, se empieza a estabilizar la absorbancia tendiendo a un cierto límite pero, si en este momento se vuelve a condiciones de obscuridad, la absorbancia aumenta gradualmente debido a que los cloroplastos tienden a dispersarse.

Después de 30 minutos de iluminación intensa, los cloroplastos se encuentran densamente agrupados en las células de la capa adaxial y tienden a ocultar las agrupaciones de los cloroplastos de la capa abaxial, por lo que, en estas condiciones, la absorbancia ya casi no disminuye con mayor iluminación.

En las gráficas 2, 3, 4 y 5, se observan las variaciones de la absorbancia en función del tiempo de iluminación intensa de las hojas

vivas de *Egeria densa* de cada aclimatación, en presencia o en ausencia de dióxido de carbono. En todas estas gráficas se observa un comportamiento similar, aunque el rango de variación en la absorbancia es variable. Cada gráfica se obtuvo del promedio de 3 repeticiones y, a partir de ellas, se determinó el cambio porcentual de la absorbancia en 30 min de iluminación intensa respecto a la absorbancia máxima para los 4 tipos de condiciones experimentales mencionados; estos resultados se muestran en la gráfica 6, en la que se puede apreciar que el máximo cambio en la absorbancia corresponde a las muestras de verano en las que el medio consistía de una solución 2 mM de dióxido de carbono (con un cambio en la absorbancia de 45.44%). A este cambio en la absorbancia le siguen, en orden decreciente de magnitud, el cambio observado en las muestras de verano en un medio libre de dióxido de carbono (44.97%) y, con poca variación, el cambio en los ejemplares de invierno en un medio similar al anterior (43.37%). Por su parte, los ejemplares de invierno en una solución 2 mM de dióxido de carbono muestran un cambio en la absorbancia notablemente menor que los otros (34.51%).

Al evaluar el cambio porcentual en la absorbancia de las hojas de *Egeria densa* en diversas concentraciones de dióxido de carbono, se observa una relación dosis-respuesta casi lineal para las 2 aclimataciones (gráficas 7 y 8) en la que, a mayor concentración de dióxido de carbono, el cambio en la absorbancia es menor. En los ejemplares de verano (gráfica 7), se obtuvo una correlación de -0.9883 para la relación dosis-respuesta cuya fórmula es:

$$C\%A = -2.995X + 43.879$$

en donde C%A es el cambio porcentual de la absorbancia a 682 nm y X es la concentración milimolar de CO_2 (las unidades de la ordenada son relativas y se dan como porcentaje).

En los ejemplares de invierno (gráfica 8) se obtuvo una correlación de -0.9609 para la relación dosis-respuesta cuya fórmula es:

$$C\%A = -2.190X + 39.522$$

con la misma simbología descrita anteriormente.

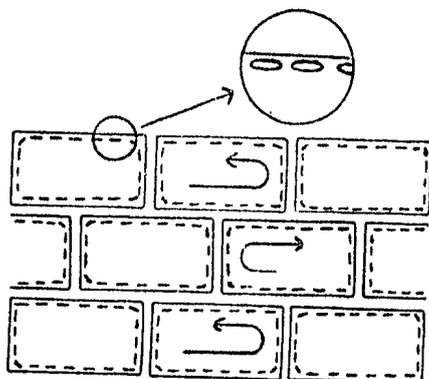
En la orientación temprana, la rotación de los cloroplastos se

realiza principalmente en sentidos contrarios entre células contiguas que presentan grán superficie de contacto. Por otra parte, si la iluminación intensa es muy prolongada, la orientación tardía no sólo permite que los cloroplastos de una célula se eclipsen entre sí, sino que, además, los cúmulos de cloroplastos de las dos capas de células de la hoja tienden a eclipsarse y se agrupan en una dirección similar.

Adaptaciones relacionadas con la captación del carbono: Las hojas de *Egeria densa* muestran una forma alterada del síndrome Kranz (propio de las plantas C-4) durante el verano y en las primeras siete semanas de aclimatación de invierno. Este síndrome se caracteriza básicamente por la presencia de dos tipos de cloroplastos: en comparación con las células del limbo, las células que rodean la nervadura central de las hojas de *Egeria densa* presentan cloroplastos de mayor tamaño, con menor pigmentación y con un contenido muy alto de almidón, que se manifiesta por una coloración muy intensa con lugol; por una desviación del plano de la luz muy similar a la que ocurre en gránulos de almidón, y por la observación de grandes espacios para almidón a través del microscopio electrónico. Por su parte, las células del limbo presentan cloroplastos de apariencia normal, ricos en pigmentos, y con poco contenido de almidón, aunque algunas de las células de la base de la hoja suelen presentar cloroplastos ricos en almidón.

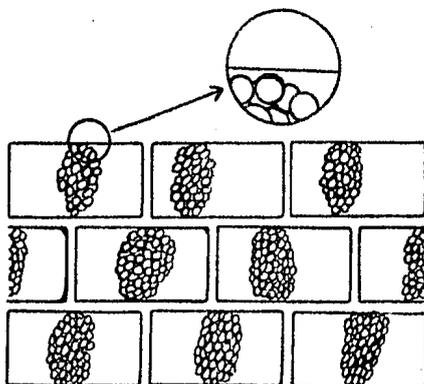
La distribución de los dos tipos de cloroplastos presenta variaciones de acuerdo con la aclimatación. A lo largo de todo el tratamiento de verano, los cloroplastos ricos en almidón se presentan en la décima parte de la nervadura central, en la posición cercana a la base, y rara vez aumentan lo suficiente para presentarse en más de la quinta parte de la nervadura. A las cuatro semanas de aclimatación de invierno, los cloroplastos ricos en almidón se presentan a lo largo de toda la nervadura, pero desaparecen por completo a las ocho semanas de aclimatación.

En la espectrometría de masas se obtuvieron los siguientes resultados: en las muestras de verano, la $\delta^{13}\text{C}$ fue de -25.13‰ ; en las muestras de invierno la relación fue de -34.97‰ .



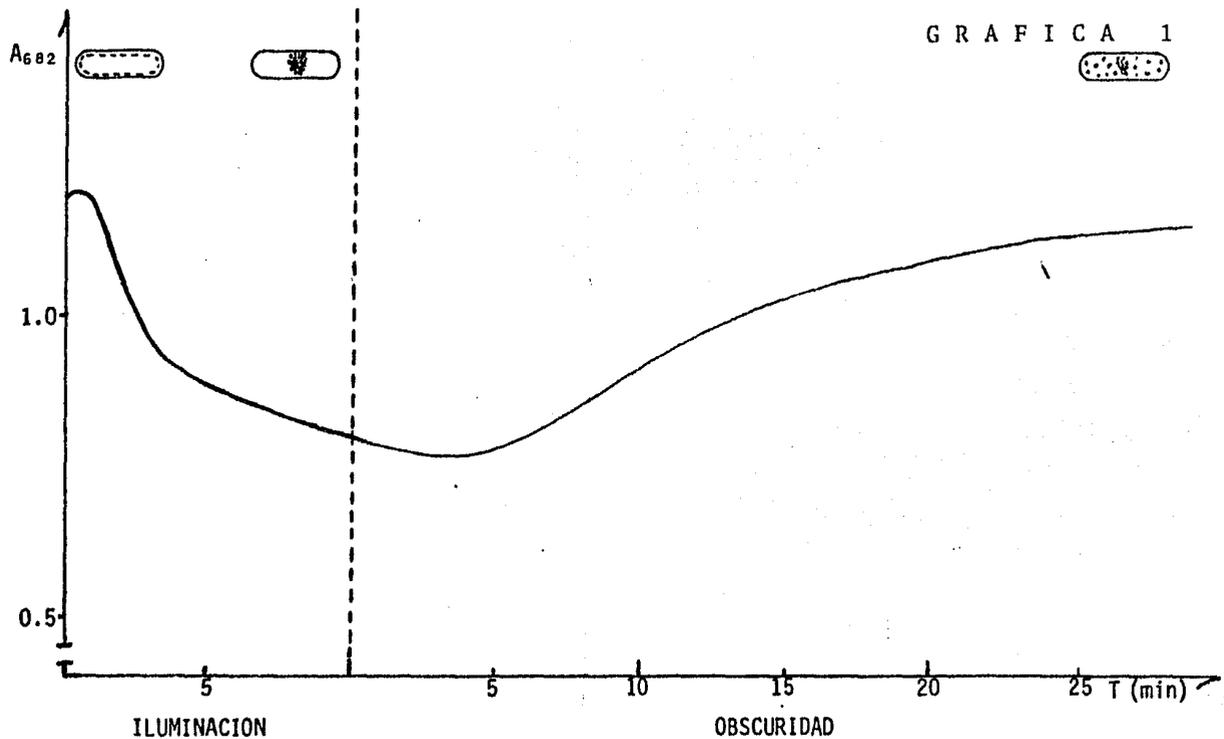
ESQUEMA 1:

Orientación de los cloroplastos de *Egeria densa* después de 1 min de iluminación. Se observa un giro ordenado a lo largo de las paredes perpendiculares a la superficie de la hoja.



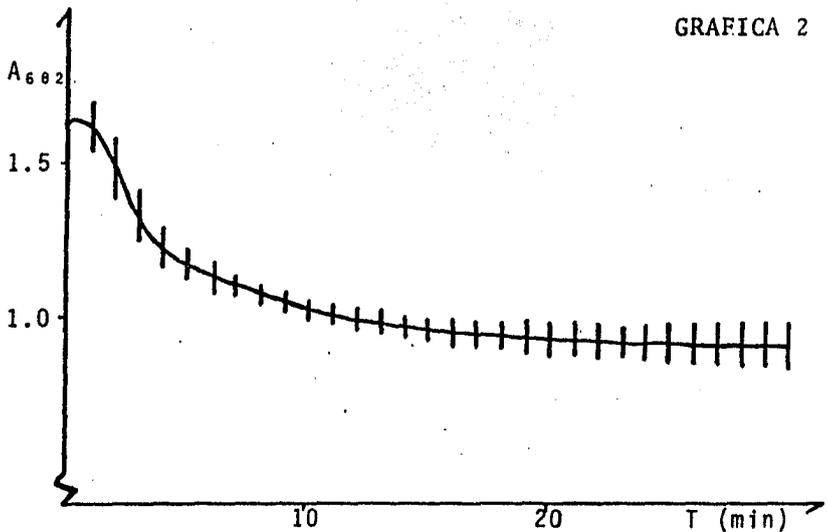
ESQUEMA 2:

Orientación de los cloroplastos de *Egeria densa* después de 30 min de iluminación. Se observa su agrupación inmóvil y densa.



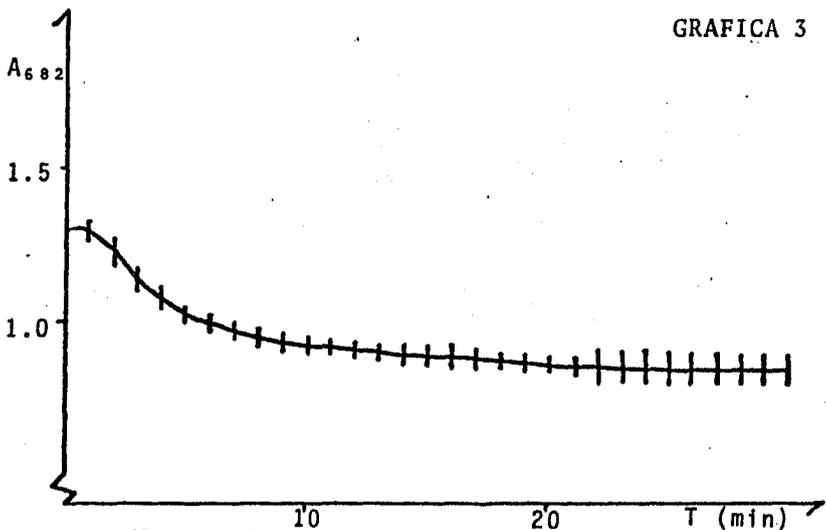
Variaciones en la absorbancia a 682 nm de una hoja viva de *Egeria densa*, aclimatada a condiciones de invierno, en función del tiempo de iluminación o de obscuridad. En la parte superior se muestra, en forma esquemática, la orientación de los cloroplastos que corresponde a las condiciones indicadas en la abscisa.

GRAFICA 2



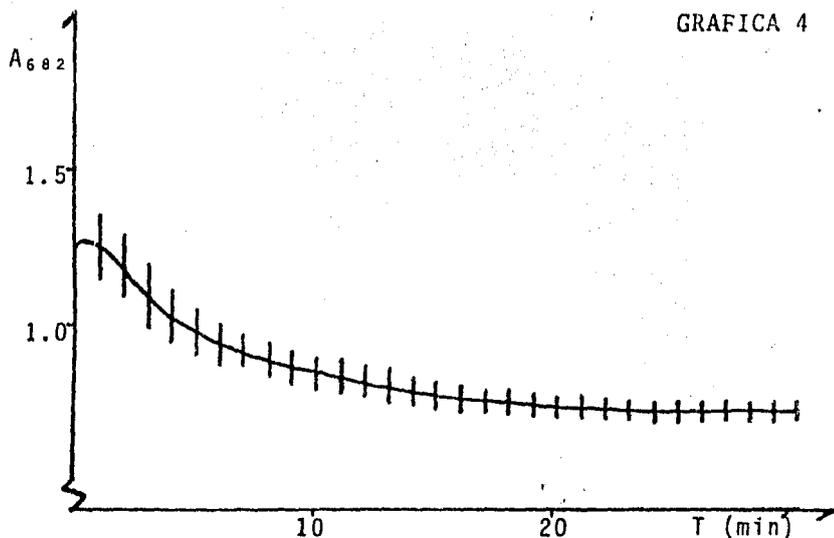
Absorbancia a 682 nm en función del tiempo de iluminación en hojas vivas de *Egeria densa* aclimatadas a condiciones de verano y mantenidas en un medio libre de CO_2 .

GRAFICA 3



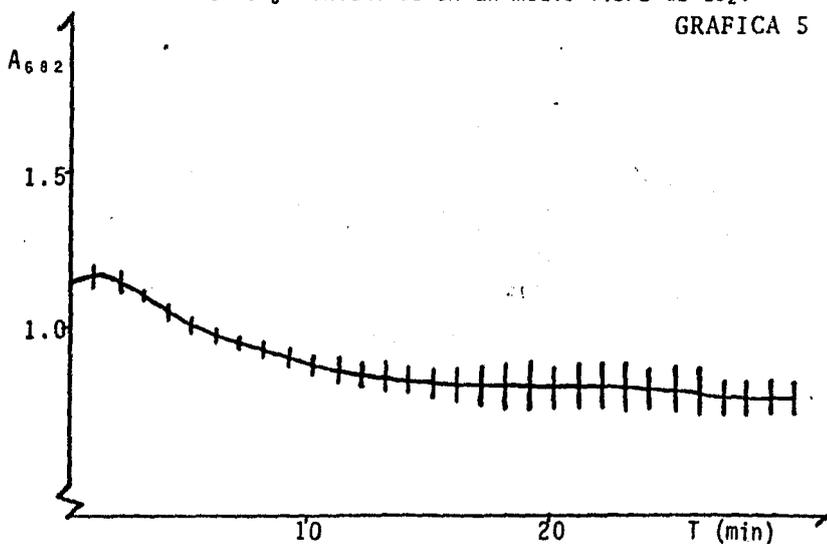
Absorbancia a 682 nm en función del tiempo de iluminación en hojas vivas de *Egeria densa* aclimatadas a condiciones de verano y mantenidas en una solución 2 mM de CO_2 .

GRAFICA 4

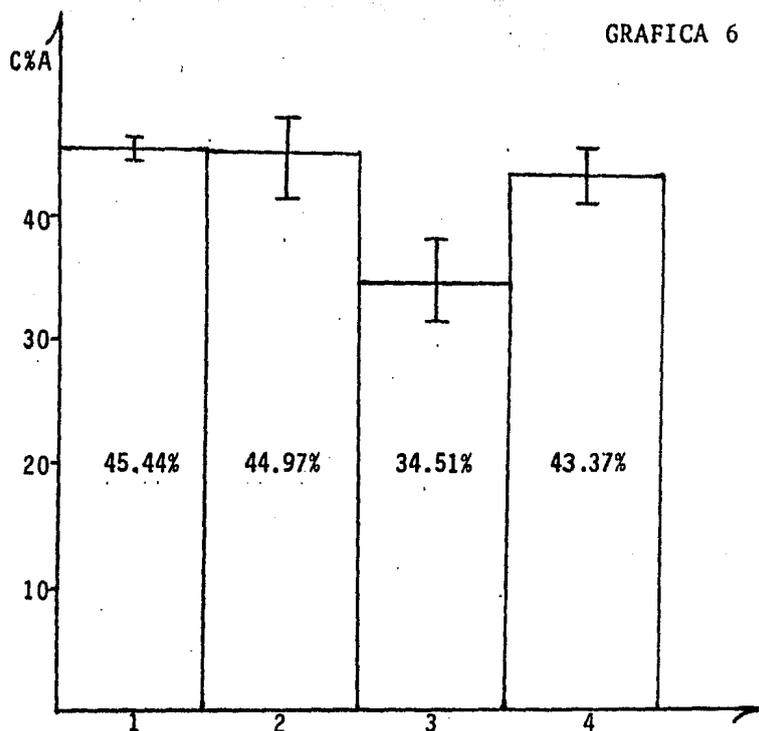


Absorbancia a 682 nm en función del tiempo de iluminación en hojas vivas de *Egeria densa* aclimatadas a condiciones de invierno y mantenidas en un medio libre de CO_2 .

GRAFICA 5



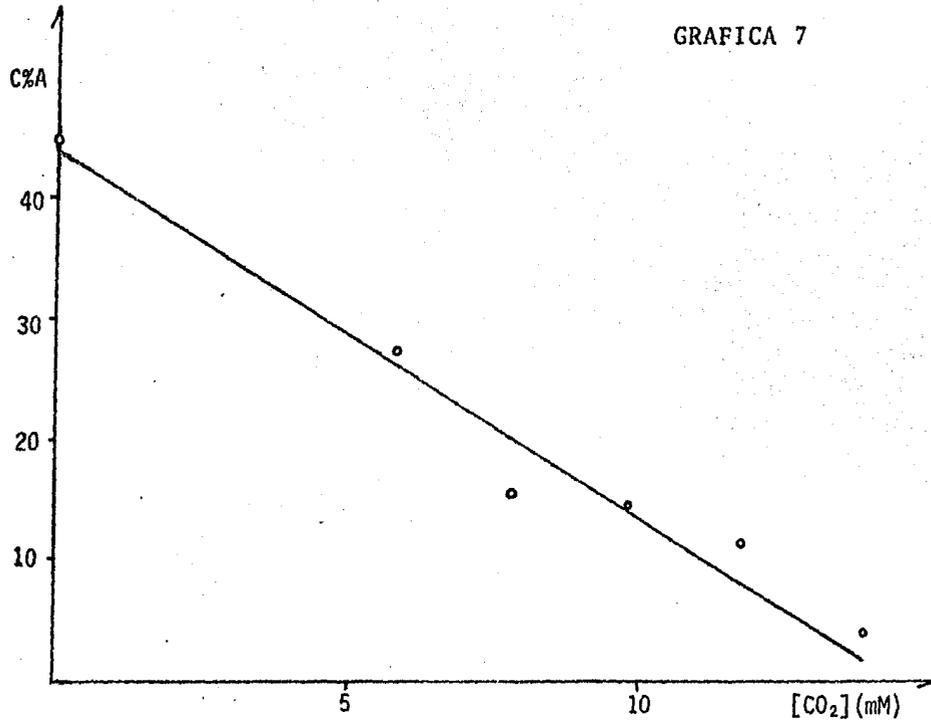
Absorbancia a 682 nm en función del tiempo de iluminación en hojas vivas de *Egeria densa* aclimatadas a condiciones de invierno y mantenidas en una solución 2 mM de CO_2 .



Cambio porcentual de la absorbancia a 682 nm de hojas vivas de *Egeria densa* aclimatada a condiciones de verano o de invierno. Cada barra corresponde al promedio de 3 experimentos en condiciones iguales y en el centro se indica la desviación estandar.

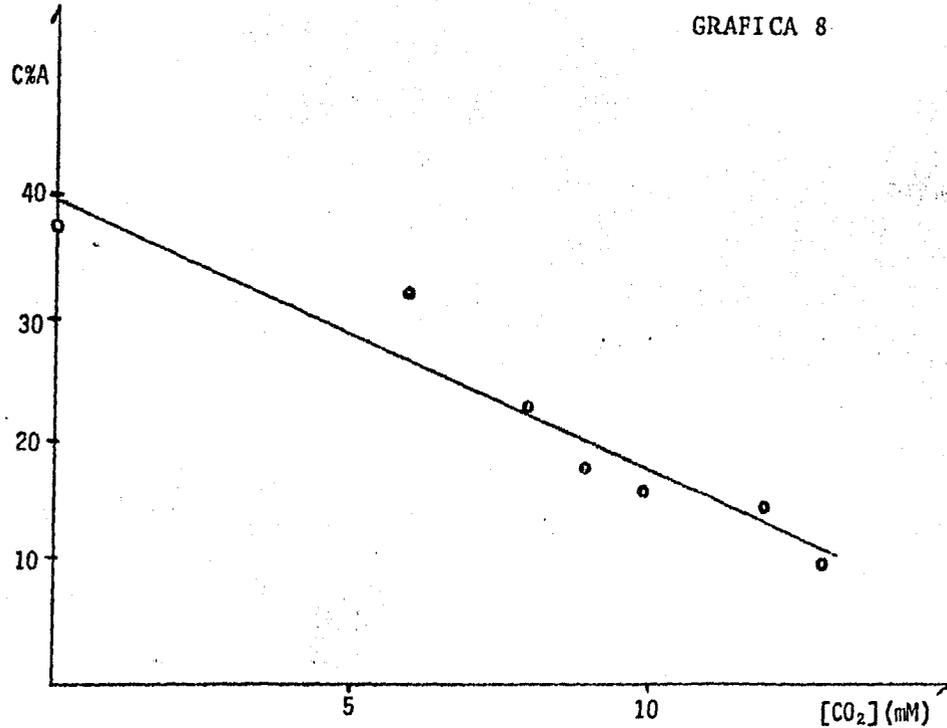
- 1.- Acclimatación de verano en un medio 2 mM de CO₂.
- 2.- Acclimatación de verano en un medio libre de CO₂.
- 3.- Acclimatación de invierno en un medio 2 mM de CO₂.
- 4.- Acclimatación de invierno en un medio libre de CO₂.

GRAFICA 7



Relación dosis contra respuesta entre el cambio porcentual de la absorbancia a 682 nm de hojas vivas de *Egeria densa*, aclimatada a condiciones de verano, y la concentración de bióxido de carbono.

GRAFICA 8



Relación dosis contra respuesta entre el cambio porcentual de la absorbancia a 682 nm de hojas vivas de *Egeria densa*, aclimatada a condiciones de invierno, y la concentración de bióxido de carbono.

DISCUSION

Las técnicas desarrolladas en este trabajo para el estudio de los movimientos orientados de los cloroplastos, aunque fueron efectivas, presentan algunas limitaciones. El principal problema en la práctica fue la formación de burbujas entre la pared de la celda y la lámina de vidrio que sujeta a la hoja; estas burbujas pueden ocasionar el desprendimiento de la hoja y, al desajustarla, conduce a lecturas incorrectas de absorbancia. Cuando el haz de luz del espectrofotómetro no incide sobre la misma región de la hoja en cada lectura, los datos que se obtienen no pueden ser comparados y, además, cuando el haz incide sobre la nervadura o queda incidiendo parcialmente fuera de la hoja, las lecturas se distorsionan y aparecen picos de absorbancia en regiones que no permiten explicarlos por la acción de los pigmentos (debido a efectos de difracción), o bien aparecen mínimos de absorbancia demasiado pronunciados cuando el haz cubre zonas en las que no hay tejidos. La aparición de estos efectos indica que los datos obtenidos deben ser desacartados, y esto, unido a los problemas descritos en la metodología, impide tener un gran número de repeticiones por cada experimento.

A pesar de los problemas descritos, las tendencias y el comportamiento general de los cloroplastos ante la iluminación intensa mostró patrones claros y reproducibles.

La gráfica 1, para cuya elaboración se emplearon simultáneamente las técnicas de espectroscopía y microscopía, demuestra que los movimientos de los cloroplastos tienden a disminuir la absorbancia del tejido cuando la iluminación es intensa y a incrementarla en la obscuridad. Esto implica una notable disminución en la disponibilidad de luz para la fotosíntesis después de una iluminación prolongada; de hecho, en los resultados que se muestran en las gráficas 2, 3, 4 y 5 se observa que después de 10 min de iluminación, la absorbancia de las hojas disminuye en un 30 o 40% aproximadamente, lo cual sería equivalente a reducir la concentración de pigmentos en la misma proporción. Sin embargo, cuando se aplica bióxido de carbono en el medio (gráficas 3 y 5),

el decaimiento de la absorbancia es más lento y, en el caso particular de las muestras de invierno, se observa que la máxima absorbancia no se da antes de 1 min de iluminación, como en los otros casos, sino un poco después. Si los movimientos de los cloroplastos no fueran parte de la regulación de la fotosíntesis y sólo dependieran de la iluminación diurna, como lo sugieren W. Nultsch y colaboradores (19) para los cromatóforos de algas, entonces no deberían variar los resultados al aplicar bióxido de carbono. Debe tomarse en cuenta que *Egeria densa* está muy lejos de ser un alga, y puede ser considerada como una planta muy avanzada en la escala evolutiva, ya que pertenece a la clase Liliatae (monocotiledoneas), que se cataloga en general como la clase más avanzada del reino Plantae (10). Con estas consideraciones, la influencia del bióxido de carbono en los movimientos de los cloroplastos resulta de particular importancia debido a que éste es uno de los tres factores primarios que requiere el cloroplasto para realizar la fotosíntesis (los otros son la luz y el agua). Aunque la bioenergética de este proceso se complica por la presencia de pigmentos antena, además de los centros de reacción, es evidente que se requiere de un equilibrio entre la cantidad de luz que se capta y la cantidad de bióxido de carbono que se fija para la producción de azúcares (16, 29), y cualquier proceso que tiende a mantener este equilibrio debe ser considerado como un mecanismo de regulación de la fotosíntesis; tal es el caso de los movimientos orientados de los cloroplastos que, como se observa en las gráficas 7 y 8, conducen a un decremento notable de la absorbancia (que allí se expresa como cambio porcentual de la absorbancia) cuando la concentración de bióxido de carbono es baja, y de este modo reducen la disponibilidad de la luz para la fotosíntesis. Cuando, por el contrario, la disponibilidad del bióxido de carbono es alta, se mantiene la absorbancia inicial (esto es, casi no hay cambio en la absorbancia ante la iluminación) y por lo tanto se favorece una gran disponibilidad de luz.

Respecto al uso de los términos "alta" y "baja" disponibilidad de bióxido de carbono, es conveniente hacer algunas consideraciones:

la concentración 2 mM de dióxido de carbono utilizada en las pruebas de absorbancia en función de la iluminación, cuyos resultados se muestran en las gráficas 2, 3, 4, 5 y 6, fue elegida debido a que, de acuerdo con J. A. Browse y colaboradores (6), en esta concentración se alcanza más del 80% de la productividad fotosintética de saturación de dióxido de carbono, sin embargo, los experimentos de estos autores fueron hechos con agitación, mientras que en las celdas empleadas en el presente trabajo puede esperarse la formación de gradientes de dióxido de carbono debido a que la captación de éste por la hoja es más rápida que su difusión en un medio estancado, con lo que se acentúa el efecto de las barreras que mencionan los mismos autores y que obstruyen el trayecto del dióxido de carbono desde el medio hasta la carboxilación de la RuBP. De este modo, después de va rios minutos de iluminación, la concentración del dióxido de carbono en el medio cercano a la hoja habrá disminuido y resultará insuficiente para el buen funcionamiento de la fotosíntesis, por lo que se necesitarán concentraciones mayores para una saturación del proceso fotosintético realmente efectiva. De acuerdo con lo anterior, sólo pueden considerarse "altas" las concentraciones mayores de 2 mM; y alrededor de la concentración 15 mM, donde las gráficas 7 y 8 muestran poco o ningún cambio en la absorbancia, se puede hablar de concentraciones "muy altas" y, quizá, de una saturación efectiva de dióxido de carbono para la fotosíntesis.

Otra consideración importante se refiere a los medios que se mencionan en la metodología y en los resultados como "libres de dióxido de carbono". Para lograrlos, se mantuvo agua destilada en ebullición durante 20 min y se enfrió en una atmósfera libre de dióxido de carbono que se consiguió haciendo pasar aire por una solución 1 M de hidróxido de sodio. Para llenar las celdas con esta solución se usaron jeringas y después se selló cada celda con parafina (esto último se hizo también en las soluciones con dióxido de carbono), pero el simple hecho de tener la hoja de *Egeria densa* adentro, implica la liberación de dióxido de carbono por las mitocondrias y, además, pue

de haber una cierta cantidad de bióxido de carbono unido a la RuBPCasa de los cloroplastos y que difícilmente podría evaluarse *in vivo*, pues solo se manifiesta como un cambio en el pH esperado teóricamente en los cloroplastos (27). Por todo lo anterior, los medios "libres de bióxido de carbono" no lo son en forma absoluta, sino que solo se mantienen con la mínima cantidad de bióxido de carbono que la técnica permite.

Una vez hechas todas estas consideraciones básicas, se pueden relacionar los resultados del presente trabajo con el modelo propuesto por Konrad Seitz (26) que se menciona en los antecedentes. De acuerdo con este autor, la orientación que adopten los cloroplastos dependerá de la disponibilidad de ATP en diferentes partes del citoplasma, y esta disponibilidad, a su vez, dependerá de la formación de gradientes de ATP con la participación de mitocondrias y cloroplastos. Para la orientación tardía, es necesaria la acumulación de una gran cantidad de ATP en la célula, y esto se logra cuando la fotofosforilación acíclica se ha saturado. Aunque este autor menciona la participación del bióxido de carbono en este proceso, su atención se centra en la disponibilidad de NADP^+ y se toma a éste como el factor limitante: cuando no hay NADP^+ , el ATP se acumula y los cloroplastos adoptan la orientación tardía. Es obvio que cuando no hay bióxido de carbono, el NADP^+ pasará a su forma reducida por las reacciones luminosas de la fotosíntesis y ya no se oxidará, por lo que el ATP comenzará a acumularse. Sin embargo, si se considera al NADP^+ como factor principal, la orientación de los cloroplastos dependería de la concentración de esta sustancia en los cloroplastos, y sus implicaciones ecológicas o adaptativas no serían muy claras. Los resultados del presente trabajo demuestran que el factor externo determinante para los movimientos de los cloroplastos (además de la luz, por supuesto) es la concentración del bióxido de carbono, y al considerar a ésta como el factor principal del proceso no se contradice el modelo de Seitz, pero sí se permite ampliarlo y darle un sentido más ecológico. Para cualquier vegetal es importante evitar la fotooxidación de sus pigmentos, y la reducción de

la absorbancia por la orientación tardía de los cloroplastos en las hojas de *Egeria densa* podría ser un mecanismo asociado a esto. Mientras la fotosíntesis se encuentra saturada de bióxido de carbono, no tendría sentido disminuir la absorbancia, y esto es precisamente lo que se evita en *Egeria densa* de acuerdo con las gráficas 7 y 8, en las que se demuestra que las altas concentraciones de bióxido de carbono conducen al mantenimiento de una alta absorbancia evitando la formación de la orientación tardía. De este modo, resulta claro que los movimientos de los cloroplastos forman parte de la regulación de la fotosíntesis en *Egeria densa* (y probablemente en todas las hidrocaritaceas) y que con ellos se logra mantener un equilibrio entre la cantidad de luz y la cantidad de bióxido de carbono disponibles.

El buen éxito que muestran las hidrocaritaceas en los cuerpos de agua ha llamado la atención a lo largo de mucho tiempo, pero es hasta hace relativamente poco que se ha ponderado al bióxido de carbono como fuente de una grán presión selectiva. R. A. Hough, por ejemplo, describe una disminución en la tasa de fotosíntesis de *Elodea canadensis* durante la tarde, pero no toma en cuenta la orientación de los cloroplastos ni las variaciones de la concentración del bióxido de carbono en el agua (14), por lo que sus observaciones resultan incompletas y podrían simplificarse mucho si sólo se diera al bióxido de carbono la importancia que tiene como factor limitante.

Un aspecto interesante en los resultados del presente trabajo es la aparente coordinación que existe entre los movimientos de los cloroplastos de varias células. El hecho de que los cloroplastos de una célula tiendan a eclipsar a los de otra podría explicarse fácilmente si la sombra que proyecta el cúmulo de cloroplastos de cada célula de la capa adaxial influyera en el gradiente de ATP de las células de la capa abaxial, pero esto es poco probable debido a que, en estas condiciones, todo el citoplasma se encuentra prácticamente saturado de ATP. Es posible que la coordinación entre células diferentes se relacione con la participación de los plasmodesmos. En los experimentos realizados por A. Witzum, en los que se aplicó 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) a hojas de *Elodea densa*, se observó

que los cúmulos de cloroplastos se alinean a lo largo de varias células para formar un patrón de bandas bien definido (31). Este patrón de bandas, que requiere de una iluminación muy prolongada, no ha sido observado en condiciones naturales, pero en *Egeria densa* resulta evidente que una iluminación muy intensa y prolongada conduce a la formación de patrones en los que los cloroplastos de diferentes células se agrupan en una misma dirección respecto a la hoja en su conjunto. Si se considera que todas las células de la hoja de *Egeria densa* se encuentran comunicadas para formar parte de un solo simplasto (11), debe considerarse también que la orientación de los cloroplastos podría estar coordinada entre las diferentes células, pero para aclarar esto se requiere de mayor investigación en este campo.

Otro aspecto en el que se requiere de mayor información es el efecto de los reguladores del crecimiento en los movimientos de los cloroplastos. Se sabe que las giberelinas, heteroauxinas, cumarina y otros reguladores del crecimiento pueden afectar la orientación de los cloroplastos en forma variable de acuerdo con su concentración (22), y ya que en el presente trabajo se observó una variación en el grado de espigamiento de las muestras de acuerdo con la aclimatación, la participación de los reguladores del crecimiento, que probablemente varía de verano a invierno, podría ser importante. Sin embargo, este tipo de apreciaciones no se ajusta a los objetivos que se plantean en la introducción del presente trabajo, y la interpretación de las variaciones relacionadas con la aclimatación se hará sólo en función de las estrategias de captación del carbono.

Las limitaciones que se han descrito para la técnica empleada en el estudio de la captación del carbono en *Egeria densa*, impiden la comparación de las pendientes de las relaciones dosis-respuesta de las diferentes aclimataciones, y la mayor inclinación de la recta en la relación de invierno respecto a la de verano puede atribuirse a que, en ésta última, se utilizó un intervalo mayor para las concentraciones de dióxido de carbono. Sin embargo, en los experimentos realizados con soluciones 2 mM de dióxido de carbono (gráfica 6) resulta claro que esta concentración solo es suficiente en el invierno

para causar una inhibición detectable en la orientación tardía de los cloroplastos. Esto indica que, en concentraciones medianas o relativamente bajas, la tendencia a la saturación en la captación de bióxido de carbono para la fotosíntesis se inicia primero en las muestras de invierno, y esto resulta de particular interés si se considera que las plantas C-3 alcanzan muy fácilmente su saturación en la captación del bióxido de carbono, pues cuentan con menor cantidad de enzimas para ello, mientras que las plantas C-4 difícilmente llegan a saturarse en este proceso, aun cuando las concentraciones de bióxido de carbono sean elevadas.

La presencia de cloroplastos dimórficos en las hojas de *Egeria densa* durante el verano, que no se ha descrito en la literatura para ninguna planta acuática, y cuya distribución es parecida a lo que se denomina "síndrome Kranz", apoya la hipótesis de que esta planta sigue una forma alterada de la vía C-4 en verano, sin embargo, los cloroplastos dimórficos en *Egeria densa* se presentan en forma muy notoria durante las primeras semanas de aclimatación a invierno, cuando se supone que la planta sigue la vía C-3. Una posible explicación a esto es que los cloroplastos ricos en almidón cumplan con una doble función: mientras en verano participan en la captación de carbono por la vía C-4, en invierno actúan como reservorios de almidón. Incluso es posible que esta segunda función haya sido, evolutivamente, una preadaptación para el desarrollo posterior de la vía C-4. En *Elodea canadensis* se ha descrito la acumulación de almidón durante el invierno, que le permite cierto grado de latencia a los ápices (15), por lo que resulta factible pensar que las hidrocariáceas requieren de una buena reserva de almidón para las condiciones críticas de invierno, en las que la productividad es menor. De este modo, al iniciarse el período de baja temperatura, los cloroplastos de *Egeria densa* tienden a transformarse en amiloplastos pero, después de ocho semanas de aclimatación de invierno, la reserva de almidón se agota y ya no se observan cloroplastos dimórficos.

Los cambios en la estructura de los cloroplastos se observan

en todo tipo de plantas y suelen ser muy rápidos. En la papa, por ejemplo, los amiloplastos se transforman en cloroplastos con aproximadamente 21 días de iluminación (32); en plántulas de soya, los cloroplastos disminuyen su contenido de almidón y su número de tilacoides por grana con solo enfriar las plántulas a 10°C durante 24 h (17); y en el caso de *Elodea sp.* se han reportado cambios en la ultraestructura de los cloroplastos, relacionados con el número de tilacoides, que ocurren con solo alterar la cantidad y la calidad de la luz durante 6 h (21). Dada la versatilidad en la ultraestructura de los cloroplastos, no es sorprendente que *Egeria densa* los utilice para su reserva de almidón en el invierno, pero la presencia de cloroplastos ricos en almidón durante el verano y alrededor de la nervadura central debe analizarse más detenidamente. Al microscopio electrónico, estos cloroplastos de verano ricos en almidón demostraron presentar tilacoides, por lo que no son enteramente amiloplastos, y su distribución es muy similar a la que podría esperarse de una planta C-4. Los resultados de espectrometría de masas demostraron una mayor proporción de ^{13}C en verano que en invierno y, aunque los valores caen dentro del rango descrito para plantas C-3 (28), resulta válido proponer que hay una mayor participación de la PEPCase en la captación del carbono que se incorpora definitivamente a la planta durante el verano. Es muy común encontrar semejanzas entre las plantas acuáticas y las plantas C-4 terrestres; estas semejanzas se presentan aun en las algas unicelulares (25) y pueden ser un reflejo de la intensa presión selectiva que implica la captación del carbono en el medio acuático.

Para *Egeria densa*, J. A. Browse y colaboradores proponen que la captación del carbono por la PEPCase, aunque puede llegar a representar el 70% del total de carbono captado, no se debe a que la planta siga la vía C-4, sino que es sólo una respuesta a las bajas concentraciones de dióxido de carbono en el medio (5). Los autores que proponen esto no toman en cuenta la anatomía foliar, ni la $\delta^{13}\text{C}$, ni la aclimatación, por lo que cabría preguntar ¿Qué entienden por vía C-4? En su origen, la vía C-4 se definía como la incorporación del dióxido de carbono que daba compuestos de cuatro carbonos como productos

(3), pero J. A. Browse y colaboradores proponen que en *Egeria densa* la producción de malato a partir de bióxido de carbono y PEP no sirve para captar bióxido de carbono, sino para balancear los excesos de captación de cationes en presencia de luz, sin embargo, ¿Qué pasa después con el carbono captado por la PEPCase? Los resultados de espectrometría de masas del presente trabajo se obtuvieron de la combustión de la planta entera, de modo que las diferencias no se pueden explicar por una captación momentánea del bióxido de carbono para balancear un exceso de cationes, sino que implican la incorporación del bióxido de carbono en las moléculas que constituyen propiamente a la planta (particularmente celulosa).

Las definiciones modernas de la vía C-4 toman en cuenta varios factores además de la carboxilación del PEP, pero ante la fisiología de *Egeria densa*, cualquier definición de la vía C-4 es discutible, y resulta conveniente plantear conceptos más esenciales. El tipo de discusión que resulta en este caso es el mismo que se da entre los zoólogos y los botánicos cuando tratan de decidir si las euglenas son plantas o animales, o si los mixomicetos se parecen más a las amibas o a los hongos. La naturaleza es un continuo de formas y funciones, y los límites exactos y definidos sólo existen en la mente del hombre. *Egeria densa* presenta variaciones en su producción de malato (5), en su punto de compensación del bióxido de carbono (2), en su anatomía foliar, y en su $\delta^{13}\text{C}$, por lo que no es en realidad una planta C-3 ni una planta C-4; pertenece a la categoría intermedia propuesta por A. S. Holaday y G. Bowes (13) para las monocotiledoneas acuáticas que ajustan su estrategia de captación de carbono a las exigencias de un medio que cambia a lo largo del año y, para ello, disponen de todos los recursos que tienen a su alcance, entre los que se encuentra, de acuerdo con los resultados del presente trabajo, el mantenimiento de un equilibrio entre la disponibilidad de luz y la disponibilidad de bióxido de carbono mediante los movimientos fototácticos de los cloroplastos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ASCENCIO, J. y G. BOWES, 1983. Phosphoenolpiruvate carboxilase in *Hydrilla* plants with varying CO₂ compensation points. *Photosynth. Res.* 4: 151-169.
- 2.- BARKO, J.W. y P.M. SMART, 1981. Comparative influences of light and temperature on the growth and metabolism of selected submersed freshwater macrophytes. *Ecol. Monogr.* 51 (2): 219-235.
- 3.- BONNER, J. y J.E. VARNER, 1976. *Plant Biochemistry*. Academic Press. Londres: 115-839.
- 4.- BROWSE, J.A., F.I. DROMGOOLE y J.M.A. BROWN, 1977. Photosynthesis in the aquatic macrophyte *Egeria densa*. I. ¹⁴C₂ fixation at natural CO₂ concentrations. *Aust. J. Plant. Physiol.* 4 (2): 169-176.
- 5.- BROWSE, J.A., J.M.A. BROWN y F.I. DROMGOOLE, 1979. Photosynthesis in the aquatic macrophyte *Egeria densa*. II. Effect of inorganic carbon conditions on C fixation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 6 (1): 1-9.
- 6.- BROWSE, J.A., F.I. DROMGOOLE y J.M.A. BROWN, 1979. Photosynthesis in the aquatic macrophyte *Egeria densa*. III. Gas exchange studies. *Aust. J. Plant. Physiol.* 6 (4): 499-512.
- 7.- BROWSE, J.A., J.M.A. BROWN y F.I. DROMGOOLE, 1980. Malate synthesis and metabolism during photosynthesis in *Egeria densa* Planch. *Aquat. Bot.* 8 (4): 295-305.
- 8.- COOK, C.D.K., 1974. *Water plants of the world*. Dr. W. Junk. Inglaterra: 254-255.
- 9.- COOMBS, J. y D.O. HALL, 1981. *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon International. Nueva York: 58-65.
- 10.- CRONQUIST, A., 1968. The evolution and classification of flowering plants. Houghton Meflin. Boston: 315-319.
- 11.- ERWEE, M.G. y P.B. GOODWIN, 1983. Characterization of the *Egeria densa* leaf symplast: Inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group 2 ions. *Planta (Berl.)*. 158 (4): 320-328.

- 12.- HAUPT,W., 1982. Light-mediated movement of chloroplasts. Ann. Rev. Plant. Physiol. 33: 205-233.
- 13.- HOLADAY,A.S. y G.BOWES, 1980. C₄ acid metabolism and dark CO₂ fixation in a submersed aquatic macrophyte (*Hydrilla verticillata*). Plant. Physiol. 65 (2): 331-335.
- 14.- HOUGH,R.A., 1979. Photosynthesis, respiration and organic carbon release in *Elodea canadensis* Michx. Aquat. Bot. 7 (1): 1-11.
- 15.- JANAVER,G.A., 1981. *Elodea canadensis* and its dormant apices: an investigation of organic and mineral constituents. Aquat. Bot. 11 (3): 231-244.
- 16.- MABERLY,S.C., 1983. The interdependence of photon irradiance and free carbon dioxide or bicarbonate concentrations on the photosynthetic compensation points of fresh water plants. New Phytol. 93: 1-12.
- 17.- MUSSER,R.L., S.A.THOMAS, R.WISE, T.C.PEELER y A.W.NAYLOR. 1984. Chloroplast ultrastructure, chlorophyll fluorescence and pigment composition in chilling stressed soybeans. Plant. Physiol. 74 (4): 749-754.
- 18.- NULTSCH,W., y J.PFAU, 1979. Occurrence and biological role of light-induced chromatophore displacements in seaweeds Mar. Biol. 51: 77-82.
- 19.- NULTSCH,W., J.PFAU y U.RUFFER,1981. Do correlations exist between chromatophore arrangement and photosynthetic activity in seaweeds? Mar. Biol. 62: 111-117.
- 20.- OHSUKA,K. y A.INOUE, 1979. Identification of myosin in a flowering plant, *Egeria densa*. J. Biochem. (Tokyo). 85 (2):375-378.
- 21.- PUNNETT,T., S.R.HILFER y J.BROWN, 1981. Chloroplast thylakoids undergo rapid rearrangements in vivo. J. Cell. Biol. 91 (2): A287.
- 22.- ROSHCHINA,V.D., L.V.BOROVIKOVA, V.V.ROSHCHINA y E.G.SHERUDILO, 1981. Effect of natural growth regulators on chloroplast movement and photochemical reactions. Fiziol. Rast. (Mosc). 27 (6): 1267-1276.

- 23.- SALVUCCI, M.E. y G. BOWES, 1981. Induction of reduced photorespiratory activity in submersed macrophytes and amphibious aquatic macrophytes. *Plant Physiol.* 67 (2): 335-340.
- 24.- SAN PIETRO, A., 1971. *Methods in Enzymology*. Vol. XXIII Photosynthesis Parte A. Academic Press. Nueva York: 473-475.
- 25.- SEEMANN, J.R., M.R. BADGER y J.A. BERRY, 1984. Variations in the specific activity of Ribulose-1,5-biphosphate carboxilase between species utilizing differing photosynthetic pathways. *Plant Physiol.* 74 (4): 791-794.
- 26.- SEITZ, K., 1972. Primary processes controlling the light-induced movement of chloroplasts. *Acta Protozool.* 11 (26): 225-235.
- 27.- SICHER, R.C., 1984. Characteristics of light-dependent inorganic carbon uptake by isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 74 (4): 962-966.
- 28.- SMITH, B.N. y S. EPSTEIN, 1971. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiol.* 47 (2): 380-384.
- 29.- TAYLOR, S.E. y N. TERRY, 1984. Limiting factors in photosynthesis V. Photochemical energy supply colimits photosynthesis at low values of intercellular CO_2 concentration. *Plant Physiol.* 75 (1): 82-86.
- 30.- VIRGIN, H.I., 1954. Further studies of the action spectrum for light-induced changes in the protoplasmic viscosity of *Helodea Densa*. *Physiol. Plant.* 7: 343-353.
- 31.- WITZTUM, A. 1978. Transcellular chloroplast banding patterns in leaves of *Elodea densa* induced by light and DCMU. *Ann. Bot.* 42 (182): 1459-1462.
- 32.- ZHU, Y., D.L. MERKLE-LEHMAN y S.D. KUNG, 1984. Light induced transformation of amyloplasts into chloroplasts in potato tubers. *Plant Physiol.* 75 (1): 142-145.