



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"

**FOTOSINTESIS Y CONTENIDO DE IONES EN
CLOROPLASTOS DE SORGO CRECIDO A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl**

BO 347/86
E. 2

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

MARTIN PEDRO VARGAS SUAREZ

LOS REYES IZTACALA

1986

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres y hermanos
por el amor y cariño que
siempre les he tenido.

Especialmente a mi madre
por su enorme ayuda, com
prensión y esfuerzo a lo
largo de todos mis estu-
dios.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica - de la E.N.E.P. Iztacala, bajo la dirección del M. en C. Sergio González Moreno.

INDICE.

	Página
ABREVIATURAS	ii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	2
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	36
APENDICE	37
BIBLIOGRAFIA	38

ABREVIATURAS.

ATP	_____	Adeosín-5-trifosfato.
BSA	_____	Albúmina de suero de bovino.
C ₃	_____	Compuesto orgánico de 3 carbonos.
C ₄	_____	Compuesto orgánico de 4 carbonos.
DCMU	_____	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea.
DCPIP	_____	2,6-diclorofenolindofenol.
DPGA	_____	1,3-difosfoglicerato.
EDTA	_____	Etilendinitrotetracetato disódico.
G-3-P	_____	Gliceraldehído-3-fosfato.
HEPES	_____	Acido N-2-hidroxiethyl piperazina-N-2 etanosulfónico.
MV	_____	Metil viológeno.
NADP (H)	_____	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma reducida).
OAA	_____	Oxalacetato.
PEP	_____	Fosfoenolpiruvato.
PGA	_____	3-fosfoglicerato.
Pyr	_____	Piruvato.
PVP	_____	Polivinilpolipirrolidona.
RuBP	_____	Ribulosa-1,5-bifosfato.
RuBPC-asa	_____	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa.

INTRODUCCION.

A partir de los estudios de Brownell (12,13), se ha podido destacar que el requerimiento del sodio como un micronutriente, está confinado casi exclusivamente a especies capaces de llevar a cabo la fotosíntesis por la vía C-4. También se sabe que, dentro del grupo de las plantas C-4, varias están adaptadas a medios salinos o bien son de origen halófito y que, en cambio otras, no presentan tolerancia a altas salinidades (26,50). Sin embargo, las bases bioquímicas para el requerimiento del Na^+ en estas plantas no es claro hasta la fecha.

Por otro lado, cuando las plantas en general son sometidas a un stress salino, los iones captados por ellas pueden experimentar diferentes destinos dentro de su estructura (25,26) y - deben ser mantenidos en algún "sitio" dentro de sus células.

Una de las hipótesis que existen al respecto, postula como posible compartamentalizador a los cloroplastos, teniendo como base los resultados obtenidos en estudios realizados tanto con plantas halófitas como con glicófitas (7, 52,56); no obstante, el número de trabajos es escaso y las conclusiones incompletas, por lo que más estudios deben llevarse a cabo.

REVISION DE LITERATURA.

Fotosíntesis en plantas C-4.

Diferentes vías fotosintéticas. Hasta el año de 1966 se tenía el conocimiento de que la vía por la cual el dióxido de carbono es fijado e incorporado en azúcares, era la llamada "Ciclo de Calvin" o "Ciclo de Reducción del Carbono Fotosintético" (CRCF) y a las plantas que la poseían se les llamó plantas C-3. Sin embargo, poco después ciertos estudios resultaron en la formulación de una nueva vía de fijación, la vía C-4 (28,29) conociéndose con ello a las denominadas plantas C-4, en las cuales el CO₂ es primeramente incorporado en un ácido de cuatro carbonos y subsecuente^{mente} transferido al C₁ del 3-fosfoglicerato, como en la primera vía. La relación entre ambas vías fotosintéticas en este último tipo de plantas se muestra a continuación:

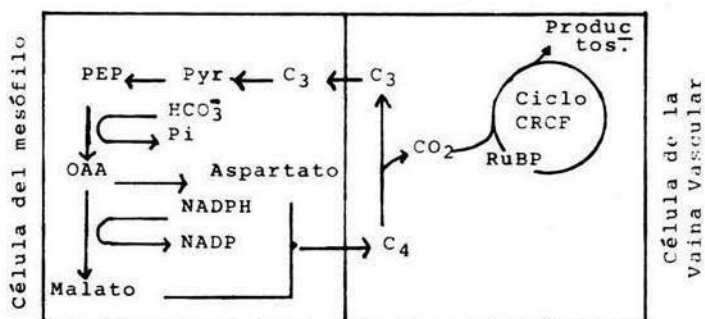


Figura 1. Relación entre el ciclo CRCF y el ciclo C-4 en plantas C-4.

Existe otro tipo de plantas, las cuales fijan el CO₂ de manera semejante a la vía C-4 durante la noche e incrementan altamente la cantidad de ácido málico, disminuyéndolo durante el día en donde prácticamente no hay obtención de CO₂ pero se sintetizan carbohidratos; a esta forma de fijación se le ha llamado "Metabolismo Acido Crasuláceo".

Fijación del CO₂. Dado que varias plantas de importancia agrícola pertenecen al grupo de las denominadas plantas C-4 (29), la vía de 4 carbonos ha adquirido un gran interés para la investigación en las diversas ramas del conocimiento.

La fotosíntesis C-4 consiste de tres pasos principales: a) carboxilación para dar ácidos de 4 carbonos en las células del mesófilo, b) descarboxilación del ácido de 4 carbonos en las células de la vaina vascular y donación de CO_2 y c) fijación a través del ciclo CRCP, existiendo diferencias en los patrones de descarboxilación en diferentes especies. En el ciclo CRCP la fase regenerativa y la fase de descarboxilación están localizadas en las células Kranz, mientras que la fase reductiva se encuentra en ambos tipos celulares (23).

Anatomía de la hoja. Las plantas C-4 presentan una anatomía llamada "Kranz", cuya característica distintiva es un arreglo radial del parénquima alrededor del haz vascular y cuyo tipo más común consiste de una capa de células rodeando al haz vascular (células de la vaina del haz vascular), las que a su vez se encuentran rodeadas por una sola capa de otro tipo de células, las del mesófilo. Las células de la vaina tienden a ser cilíndricas, grandes, de pared gruesa y a no presentar espacios intercelulares entre ellas, a diferencia de las del mesófilo que son células pequeñas y sí presentan dichos espacios. En general existe un menor número de células de la vaina que del mesófilo (38). La figura 2 muestra la anatomía Kranz.

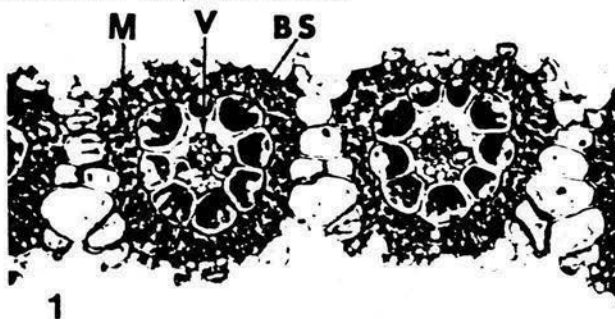


Figura 2. Anatomía de la hoja de plantas C-4. Mesófilo (M); Vaina vascular (BS); Tejido vascular (V).

Tipos de plantas C-4. Existen tres subgrupos basados en las diferencias de los mecanismos descarboxilantes que actúan sobre los ácidos de 4 carbonos, formados en las células del mesófilo (30).

Tipo Enzima Málica-NADP. En este subgrupo de especies C-4, el malato es formado en las células del mesófilo y transportado ha-

cia las células de la vaina vascular en cuyos cloroplastos es descarboxilado por una enzima málica dependiente de NADP (E.M.-NADP). En esta reacción se crea un poder reductor (NADPH); el CO_2 que también es formado, se utiliza en el CRCF en tanto que el piruvato regresa a las células del mesófilo para regenerar fosfoenolpiruvato. Lo anterior se ilustra en la siguiente figura.

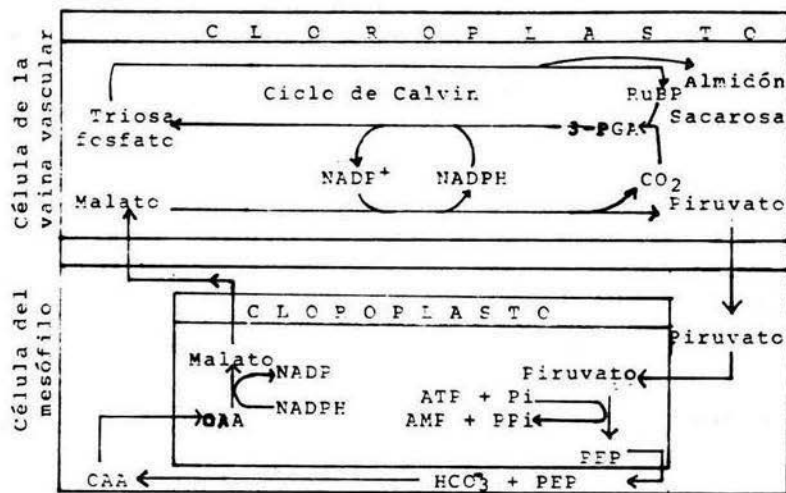


Figura 3. Reacciones de la fotosíntesis C-4 en las células de la vaina vascular y células del mesófilo en plantas del tipo E.M.-NADP.

A este tipo pertenecen entre otras, las siguientes especies, Zea mays, Sorghum bicolor, Saccharum officinarum y Digitaria sanguinalis.

Tipo Enzima Málica-NAD. Este sistema descarboxilante está caracterizado por el paso del aspartato de las células del mesófilo a las mitocondrias de las células de la vaina, en donde se convierte en oxalacetato, luego en malato y éste es descarboxilado por una enzima málica dependiente de NAD (E.M.-NAD). El CO_2 pasa de la mitocondria al cloroplasto y el piruvato sale de ella al citoplasma y regresa al mesófilo en forma de alamina. Esto se muestra en la figura 4.

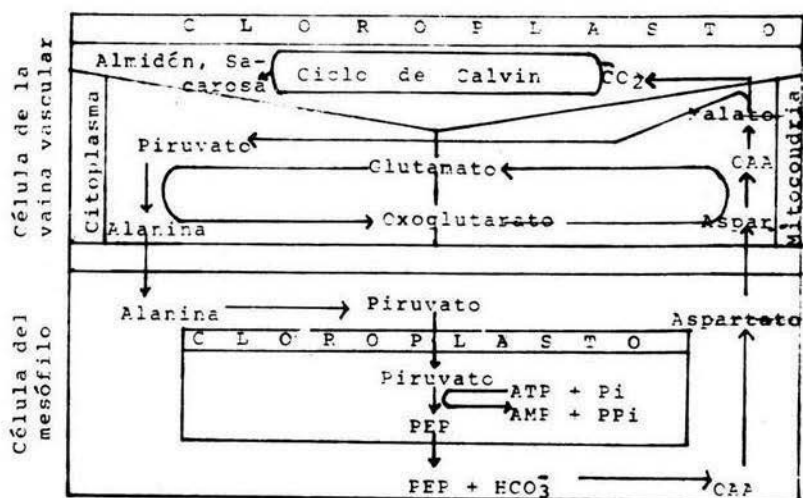


Figura 4. Reacciones de la fotosíntesis C-4 en las células de la vaina vascular y células del mesófilo en plantas del tipo E.M.-NAD.

Panicum miliaceum, Portulaca oleracea, Amaranthus retroflexus y Atriplex spongiosa son algunos de los representantes de este tipo de plantas C-4.

Tipo Fosfoenolpiruvatocarboxicinasa. Como las plantas del tipo anterior, éstas también poseen una aspartato aminotransferasa en las células de la vaina, aunque localizada en citoplasma y no en mitocondria. Además, el oxalacetato es directamente descarboxilado por la fosfoenolpiruvatocarboxicinasa (PEPCK) a expensas de ATP y el CO_2 difunde al cloroplasto. Aquí también es la alanina quien sale de las células para regenerar PEP en la vaina, como se aprecia en la figura 5.

Algunas de las especies de este tipo de plantas son: Panicum maximum, Chloris gayana y Sporobolus Fimbriatus.

Cloroplastos y clorofila en plantas C-4. Una de las características de las plantas C-4 es que presentan dimorfismo. Este puede estar referido al tamaño, siendo los de las células Kranz más grandes que los del mesófilo, o bien al desarrollo de sus grana -estructural- (cloroplastos granales y coroplastos agranales). Se ha encontrado que en los casos en que no existe un di-

morfismo de tamaño, existe un dimorfismo estructural muy pronunciado y viceversa. Como quiera que sea, típicamente los cloroplastos de las células de la vaina han sido considerados como el sitio primario de almacenamiento de almidón, aunque en algunos casos ambos tipos de cloroplastos lo almacenan (38).

Dada la composición de sus tilacoides así como de sus pigmentos asociados, las plantas del tipo E.M.-NADP han recibido especial atención dentro de las plantas C-4. Sus características principales son: una reducción en el grado de desarrollo de sus grana en los cloroplastos de las células de la vaina vascular; una alta proporción de clorofila a/clorofila b en las mismas, aproximadamente 6.0 (en las del mesófilo es cercana a 3.5) así como cantidades pequeñas del complejo IV, complejo relacionado con el centro de reacción del fotosistema II (8, 24, 31).

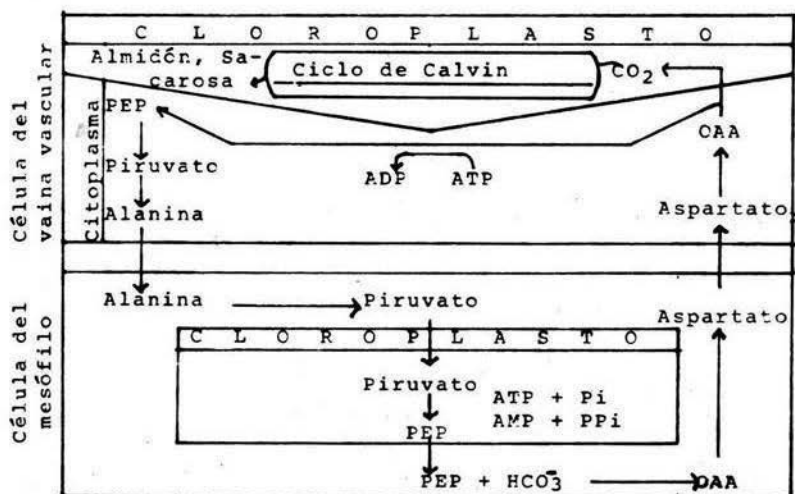


Figura 5. Reacciones de la fotosíntesis C-4 en las células de la vaina vascular y células del mesófilo en plantas del tipo PEPCK.

Modulación de la respuesta de fotosistema I y fotosistema II por iones y clorofila.

Es sabido que cuando las plantas son expuestas a la luz, un número de reacciones fotoquímicas ocurre dentro del cloro-

plasto. Los quanta de luz excitan a moléculas de clorofila las -
cuales transfieren la energía de dichos quanta hacia el centro -
de reacción del fotosistema I (FS I) llamado P700 y al centro
de reacción del fotosistema II (FS II), denominado P680. El P680
reduce a un aceptor primario de electrones, éste a un segundo y
así sucesivamente hasta llegar al P700, el cual también reduce a
otros aceptores (41).

Las moléculas que atrapan la luz y son excitadas, son molé-
culas de clorofila a y clorofila b, las cuales están asociadas
con proteínas, formando un complejo denominado: "complejo cloro-
fila-proteína atrapador de luz" (CPAL). Por otro lado, al menos
el centro de reacción I tiene clorofila a pero no clorofila b.
Ahora bien, los cloroplastos de la vaina vascular de las plantas
C-4 del tipo E.M.-NADP, presentan, además de las características
mencionadas anteriormente, una disminución en la cantidad de los
péptidos 23KD y 25 KD y por tanto de CPAL (para la formación de
CPAL se requieren tales péptidos así como clorofila b), con una
baja actividad de FS II. Se ha intentado correlacionar tales ca-
racterísticas con esta baja actividad fotosintética aunque se ha
señalado que organismos carentes de CPAL presentan actividades -
normales de FS I y FS II y que los casos en que existe actividad
disminuida de FS II es a causa de un decremento en la cantidad -
del complejo IV. No obstante, no se ha descartado enteramente la
posibilidad de modulación de dicho fotosistema por la clorofila
b debido a que, por un lado, no se tiene aún la certeza del tipo
de clorofilas involucradas en el centro de reacción II y a que ,
por otro lado, la cantidad de clorofila b y actividad de FS II -
en cloroplastos del mesófilo no son tan bajas como en los cloro-
plastos de la vaina (41).

El descubrimiento del efecto "acrecamiento-Emerson" (48),
(aceleración de la producción de O₂ por la iluminación complemen-
taria de luz de un fotosistema al otro) así como el estudio de la
producción de fluorescencia por la clorofila a después de ilumi-
nar muestras de cloroplastos o células completas (10,11,43), lle-
vó al establecimiento de lo que hoy se conoce como: "Estado 1-Es-
tado 2", en el cloroplasto. El estado 1 está caracterizado por una
eficiencia incrementada en el uso de luz de una longitud de onda
de 710 nm, la cual es preferencialmente absorbida por el FS I y -
una eficiencia decrementada en el uso de luz de una longitud de -

onda de 650 nm, la que es preferencialmente absorbida por el FS II (55). Sin embargo, en el estado 1 una mayor cantidad de excitación se encuentra disponible al sistema de pigmentos II y una menor al sistema de pigmentos I, en relación al estado 2 (46). Este hecho aunado a las observaciones de que existen cambios entre ambos estados (14), mediados por la transferencia de energía de excitación por las clorofilas antena (a_I y a_{II}) de un fotosistema a otro, han resultado en la postulación de un mecanismo de control de distribución de quanta a los dos fotosistemas y así optimizar la velocidad de flujo de electrones cuando exista un desbalance entre aquéllos.

El papel de los iones en la fotosíntesis puede relacionarse con las reacciones anteriores, pues se sabe que concentraciones relativamente bajas (del orden de 0.5 a 7.0 mM) de sales de cationes divalentes tales como el $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$ y $MnCl_2$ disminuyen la transferencia de energía de excitación de las clorofilas a_{II} a las a_I , aumentan la existente entre unidades de FS II y disminuyen la de las unidades de FS I con el consecuente incremento en la actividad del primero y decremento en la actividad del segundo; concentraciones también bajas (3 mM) de sales de cationes monovalentes ($NaCl$ y KCl), promueven dicha transferencia de energía de las clorofilas a_{II} a las a_I en tanto que a concentraciones de 100 mM con $LiCl$, $NaCl$, KCl , $RbCl$ y $CsCl$ se inhibe (11,44,45,47).

La regulación de la actividad de FS I y FS II por iones puede también estar dada a otro nivel. Durante el transporte de electrones en la membrana tilacoidal, existe un movimiento de protones del estroma hacia el espacio intratilacoidal, aumentando el pH del primero (32). El influjo de H^+ es acompañado por el influjo de iones Cl^- , aunque en una proporción de Cl^-/H^+ cercana a 2.0. El resto de movimientos iónicos para alcanzar la electroneutralidad puede estar dada por los iones K^+ , Ca^{++} o Mg^{++} . El Mg^{++} exhibe un flujo desde el interior hacia el exterior del tilacoide si se encuentra en la misma proporción que el K^+ , pero si ésta es menor, entonces el K^+ sale hacia el estroma. Asimismo, si los cloroplastos se encuentran en un medio con predominancia de Ca^{++} en vez de Mg^{++} , entonces la velocidad de eflujo del primero será mayor que la del se--

gundo. De lo anterior se desprende que las variaciones en las concentraciones de estos iones pueden alterar el paso de electrones en los fotosistemas (35). Finalmente, se sabe que tanto el Cl^- como el Mn^{++} incrementan la velocidad de fotooxidación del agua a concentraciones mayores de 5 mM (20).

Efectos de la salinidad sobre algunos aspectos de la fotosíntesis.

Contenido de clorofila y iones. Realmente es escasa la información disponible respecto al efecto que causa el stress salino en las plantas, sobre el contenido de clorofila y iones en cloroplastos. Existen reportes en los que se ha señalado: 1) un incremento en la proporción de clorofila a/clorofila b en Panicum antidotale (54), 2) una disminución en la cantidad de clorofila total/g. de tejido fresco en Parthenium hysterophorus cuando se creció a 350 mM NaCl (33) y ningún cambio en los mangles Avicenia germinans y A. marina (40). En Spinacea oleracea (51) no hay cambio en la proporción de clorofila a/clorofila b, pero sí una disminución en la cantidad de clorofila total/area foliar cuando el medio de crecimiento se llevó hasta una concentración de 500 y 200 mM NaCl, respectivamente. —

En cuanto al contenido de iones se encontró que una concentración de 200 mM NaCl en el medio de crecimiento, modificó los niveles de los siguientes iones en cloroplastos de espinaca: la concentración de K^+ disminuyó de 195 a 109 mM, mientras que la de Na^+ subió de 81 a 138 mM y la de Cl^- de 84 a 99 mM (52). Sin embargo, hubo un incremento de 8.3 a 308 mM y de 3 a 232 mM de los iones Na^+ y Cl^- , respectivamente, en toda la hoja. En el limón, en cambio, una concentración de 100 mM NaCl en el medio de incubación de segmentos de hoja, produjo una elevación de Na^+ de hasta 500 mM y de Cl^- de hasta 700 mM en sus cloroplastos (39). No obstante, cabe señalar que el limón tolera mayores concentraciones salinas que la espinaca.

Actividad de fotosistemas I y II. En base al postulado de que los cambios en los niveles catiónicos en los cloroplastos regulan la transición Estado 1-Estado 2, varios investigadores han enfocado sus estudios a los efectos observados, por cambios inducidos por cationes, en la eficiencia cuántica de las reaccio-

nes de transferencia de electrones mediadas por FS I y FS II.

El trabajo de Robinson et al (51), es el único reportado en el que se analizó tanto la actividad de fotosistemas como contenido iónico en cloroplastos, a partir de las mismas muestras de estos organelos. En este estudio ellos utilizaron espinacas crecidas en una solución nutritiva con y sin NaCl 200 mM. Encontraron que, en los dos casos, la actividad de FS I y FS II fue casi la misma y que las concentraciones de iones variaron de la manera anteriormente señalada (52); sin embargo, no pudieron relacionar ambos hallazgos. Baker (6), por su parte, también trabajó con cloroplastos de espinaca y estudió los efectos *in vitro* del NaCl, KCl y MgCl₂ sobre la actividad de FS II. Encontró que concentraciones de 50-400 mM NaCl estimularon el transporte de electrones y que concentraciones mayores inhibieron, obteniendo resultados similares con KCl. Utilizando el MgCl₂, un pequeño incremento en la velocidad de reducción del ferricianuro fue observado a concentraciones de 25 mM, mientras que a partir de 50 mM y hasta 200 mM, se obtuvo una inhibición.

Por otro lado, Marilyn et al (40) trabajaron con Cucurbita sativus (una planta sensible a la salinidad) y con A. germinans, A. marina y Beta vulgaris (plantas no sensibles) y reportaron una disminución de aproximadamente el 30% para FS I en relación al control, cuando la concentración de NaCl en el medio de crecimiento varió de 0-500 mM. En cambio, a estas mismas concentraciones, no hubo efectos sustanciales en el FS II. No existieron diferencias notables entre las plantas sensibles y las no sensibles. También, utilizando una planta tolerante a la salinidad (Aster tripolium), Wignarajah (56) encontró respuestas diferentes a las de Marilyn. La respuesta de FS I a diferentes concentraciones de sales *in vitro*, fue afectada por la salinidad del medio de crecimiento. Concentraciones de 50-700 mM NaCl y de 25-300 mM MgCl₂, produjeron una inhibición de 40% en FS I en plantas crecidas a 345 mM NaCl mientras que en aquellas que crecieron a 0, 86 y 172 mM se encontró una estimulación. Las respuestas mostradas para FS I a diferentes concentraciones de KCl fueron distintas a las de las otras sales. Concentraciones de 200-800 mM estimularon la actividad en grado similar y la respuesta fue estimulada en relación inversa a la concentración

del NaCl en el medio de crecimiento (120% de activación para 0 y 86 mM y 90% para 172 y 345 mM). En este mismo estudio se analizó la respuesta de cloroplastos a cambios salinos in vitro en Pisum sativum, una planta glicófito. El patrón de cambio en la actividad de FS I ante concentraciones salinas crecientes, fue similar para las tres sales, aunque el grado de efecto generado fue dependiente del catión presente en la sal: el NaCl estimuló desde 50 hasta 600 mM y el KCl y el MgCl₂ estimularon desde 50 mM e inhibieron a concentraciones de 400 y 100 mM, respectivamente.

En cuanto a la actividad de FS II, se encontraron resultados similares tanto para la halófito como para la glicófito. A concentraciones de 25-100 mM todas las sales provocaron la mayor estimulación, pero se requirieron de diferentes concentraciones de cada una de ellas para lograr la inhibición en ambos tipos de plantas. ^{Aquí continúa}

Finalmente, ^{Además} existe un reporte (18) que, tomando en cuenta el papel de los aniones en los procesos primarios de la fotosíntesis, evaluó la respuesta de FS I y FS II de cloroplastos de A. marina ante la adición in vitro de diferentes sales que le permitieron asegurar al Cl⁻ como el único anión modificador de dichas respuestas. En este estudio la cantidad de O₂ desprendida fue máxima a una concentración de 500 mM NaCl y tal desprendimiento fue prácticamente nulo cuando no se añadió NaCl, a menos que los cloroplastos hubiesen sido extraídos en presencia de 500 mM NaCl. Aun cuando la actividad de FS II también se incrementó con la adición de NaCl, el grado de aumento fue considerablemente menor que para el FS I.]

OBJETIVOS.

En vista de la falta de información y claridad en los patrones de respuesta del cloroplasto ante un stress salino, el presente trabajo tuvo como objetivo general el siguiente:

Determinar si durante el crecimiento del sorgo sometido a diferentes concentraciones de NaCl, existe modulación de la actividad fotosintética por clorofila a y clorofila b,

para lo cual los siguientes objetivos particulares debieron ser cubiertos:

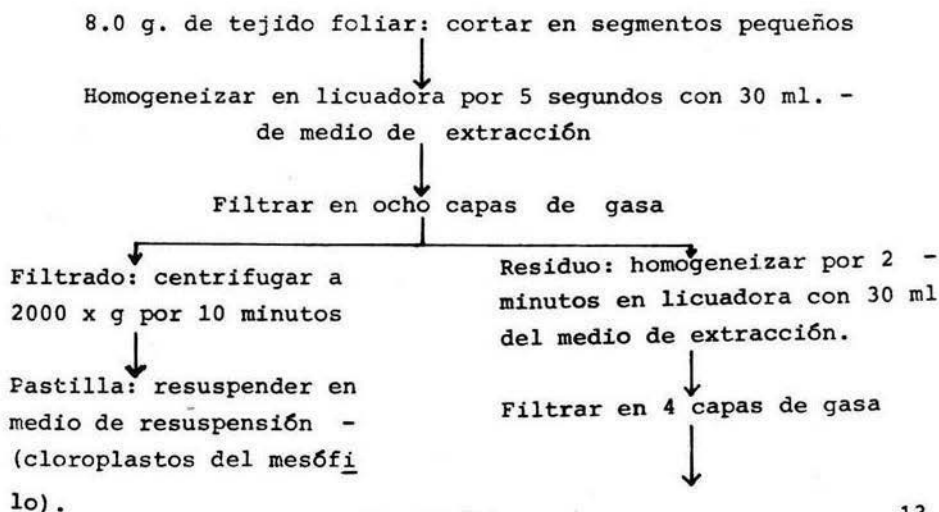
- a) Medición de las actividades de los fotosistemas - I y II.
- b) Cuantificación de clorofila a y clorofila b.
- c) Cuantificación de los siguientes iones en cloroplastos: Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y Cl^- .

Cada evaluación se realizó a diferentes tiempos de exposición a distintas concentraciones de NaCl.

MATERIAL Y METODOS.

Material vegetal. Se germinaron aproximadamente 2900 semillas - de sorgo (serie RB 3030) por cada uno de ocho soportes de 20 X 20 cm. de malla de nylon en una cámara con goteo continuo de agua. Se dejaron en la obscuridad durante dos días al cabo de - los cuales la radícula se introdujo por los poros de la malla , trasladándose después a charolas para formar cuatro grupos de - dos muestras cada uno. Todas las charolas contuvieron 2.5 lí---tros de solución Hoagland (22) y una de las siguientes concen---traciones de NaCl: 0, 50, 100 y 200 mM. Los cultivos se desarro---llaron bajo burbujeo continuo de las soluciones, cuyo volumen - final fue completado con agua destilada cada vez que fue necesá---rio. Se mantuvo un fotoperiodo de 12 X 12 horas con una tempera---tura durante el día de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y por la noche de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; la humedad relativa fue de 45% y la intensidad luminosa de 2400 lx. La toma de muestras de cada grupo para los diferentes ensayos - se hizo a los 4, 10 y 14 días de exposición al NaCl. Cabe señá---lar que el sorgo ha sido clasificado como una planta de toleran---cia media a la salinidad (53), pudiendo elevar por tanto sus ní---veles iónicos en cloroplasto.

Aislamiento de cloroplastos. Los cloroplastos fueron aislados - por el método de Osmond (49), pero con algunas modificaciones , como se muestra en la figura 6.



(continúa)

↓

Filtrado: centrifugar a -
20 000 x g por 10 minutos .

↓

Pastilla: resuspender en me-
dio de resuspensión (frag-
mentos de cloroplastos de -
la vaina vascular).

Figura 6. Procedimiento para aislar cloroplastos del mesófilo y cloroplastos de la vaina vascular.

Actividad de Fotosistemas. La actividad del FS II fue determinada en base a la reducción del diclorofenolindofenol (22) a - 592 nm. El medio de reacción consistió de: buffer KH_2PO_4 0.019 M pH 7.6, DCPIP 35.7 mM y NH_4Cl 5.0 mM, en un volumen final de 5.25 ml. Después de verificar que con sólo el medio de reac- ción no hubo cambios en los valores de absorbancia, se añadie- ron 15 μg de clorofila y hasta después de 30 segundos se ilu- minó la mezcla con una intensidad de 3500 lx. Las lecturas fue- ron tomadas cada 30 segundos durante 3 minutos. Las μmoles de DCPIP utilizadas fueron obtenidas por interpolación de los va- lores de absorbancia en una curva patrón de este mismo oxidan- te de Hill.

La actividad del FS I fue determinada en base al consumo de oxígeno por medio de un electrodo de Clark (17). Es impor- tante señalar que el consumo de oxígeno mide la actividad de - este fotosistema debido a que el metil viológeno reduce al oxí- geno y éste forma H_2O_2 , disminuyendo así la concentración de - oxígeno. Posterior a la adición del medio de reacción se aña- dieron los cloroplastos (15 μg de clorofila) y después de apro- ximadamente 1 minuto se iluminó la mezcla con una intensidad - de 3500 lx por una duración similar. Las μmoles de O_2 consumi- das por unidad de tiempo fueron calculadas en base a la pen- - diente del trazo registrado en el graficador del polarógrafo y considerando que en 1 ml. de agua a 30°C se disuelven 235 nm - de oxígeno (19). Las mezclas de los medios de reacción con - los cloroplastos, fueron protegidas de la luz antes de ser ilu- minadas. La actividad presentada en la obscuridad fue restada a la obtenida en presencia de luz blanca. La composición del -

medio de reacción del FS I es descrita en la sección de apéndice.

Cuantificación de clorofila. Se determinó por el método de Arnon (5) leyendo a 645 y 663 nm para conocer la cantidad de clorofila a y clorofila b.

Cuantificación de iones. Los iones Ca^{++} y Mg^{++} fueron cuantificados por absorción atómica mientras que el Na^+ y el K^+ por flourometría (42) y los iones Cl^- por la formación de cloruro de plata (37). Con el objeto de no considerar los iones que compusieron tanto el medio de extracción como el de resuspensión, se realizó una muestra blanco con cada uno de ellos.

Estadístico. El estadístico aplicado fue una ANDEVA para experimentos factoriales (21).

RESULTADOS.

Actividad de fotosistemas. El efecto del NaCl en el medio de crecimiento sobre la velocidad de reducción del DCPIP en cloroplastos aislados de la vaina vascular se muestra en la figura 7. Se observa un patrón de respuesta similar para cada uno de los grupos de plantas crecidas a diferentes concentraciones salinas, existiendo una disminución en la reducción del DCPIP a los 4, 10 y 14 días. Esta disminución es particularmente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y los grupos crecidos en 100 y 200 mM NaCl a los 4 y 10 días del desarrollo. El mayor efecto se encontró a los 4 días a 200 mM NaCl. La figura 8 muestra la velocidad de consumo de O_2 afectada por el NaCl, en fragmentos de cloroplastos aislados de la vaina vascular. La actividad de FS I, al igual que la del FS II, en este tipo de cloroplastos, es disminuida ante un stress salino, pero aquí se vió afectada a cualquier concentración y tiempo ($p < 0.05$) aunque también el mayor porcentaje de inhibición fue a 200 mM NaCl y a los 4 días de exposición a la sal. Sin embargo, la actividad de este fotosistema, a diferencia del anterior, siempre es mayor en las plantas más desarrolladas. Las figuras 9 y 10 representan, respectivamente, el efecto del NaCl sobre la velocidad de reducción del DCPIP y el consumo de O_2 en cloroplastos del mesófilo. Se encontró que en plantas crecidas durante 4, 10 y 14 días en un medio salino, el NaCl estimuló dichas actividades: 200 mM para el FS II y 50, 100 y 200 mM para el FS I ($p < 0.05$) y, por otro lado, que no alteró la relación "mayor actividad a mayor edad". Puede destacarse que mientras las actividades de ambos fotosistemas disminuyen con la salinidad en cloroplastos de la vaina, las actividades correspondientes en cloroplastos del mesófilo se incrementan también con la salinidad.

Cantidad de clorofilas. Con el objeto de encontrar una relación entre actividad de fotosistemas y cantidad de clorofila a y clorofila b, éstas fueron cuantificadas a partir de alícuotas tomadas de las muestras con que se midieron dichas actividades.

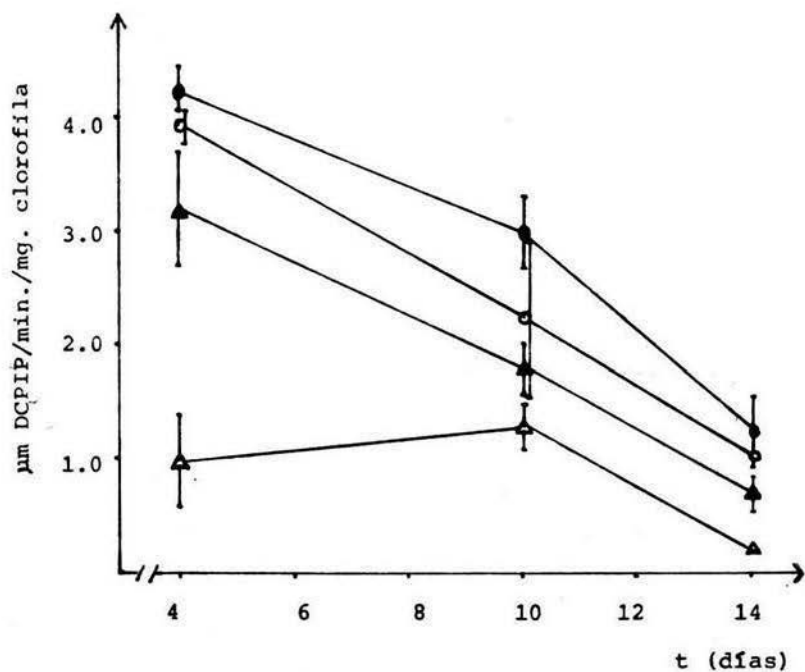


Figura 7. Efecto del NaCl durante el crecimiento del sorgo, sobre la velocidad de reducción del -DCPIP por cloroplastos aislados de la vaina vascular. ●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

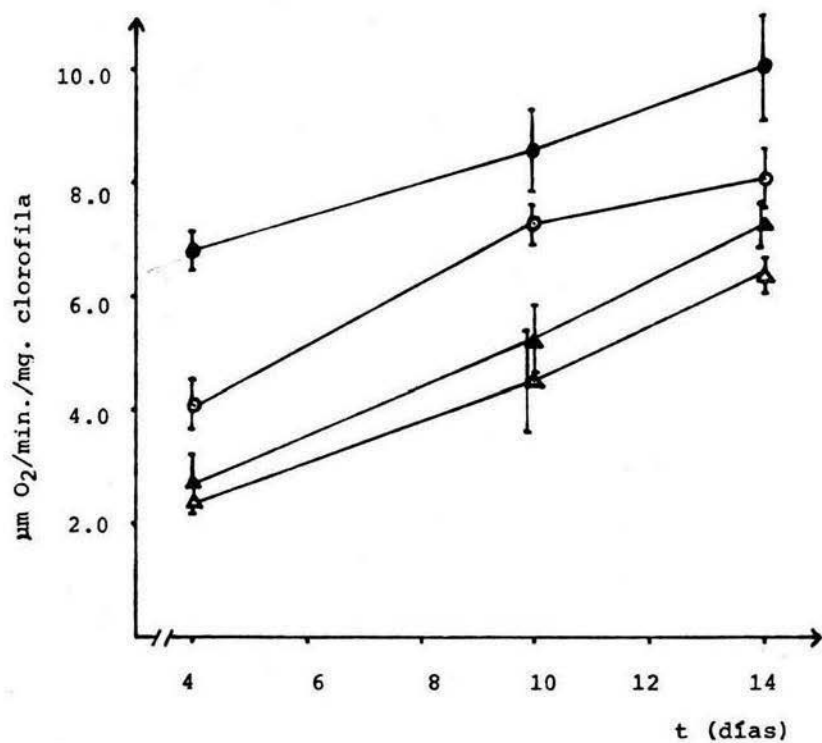


Figura 8. Efecto del NaCl durante el crecimiento del sorgo, sobre la velocidad de consumo de O_2 - por cloroplastos aislados de la vaina vascular.

●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

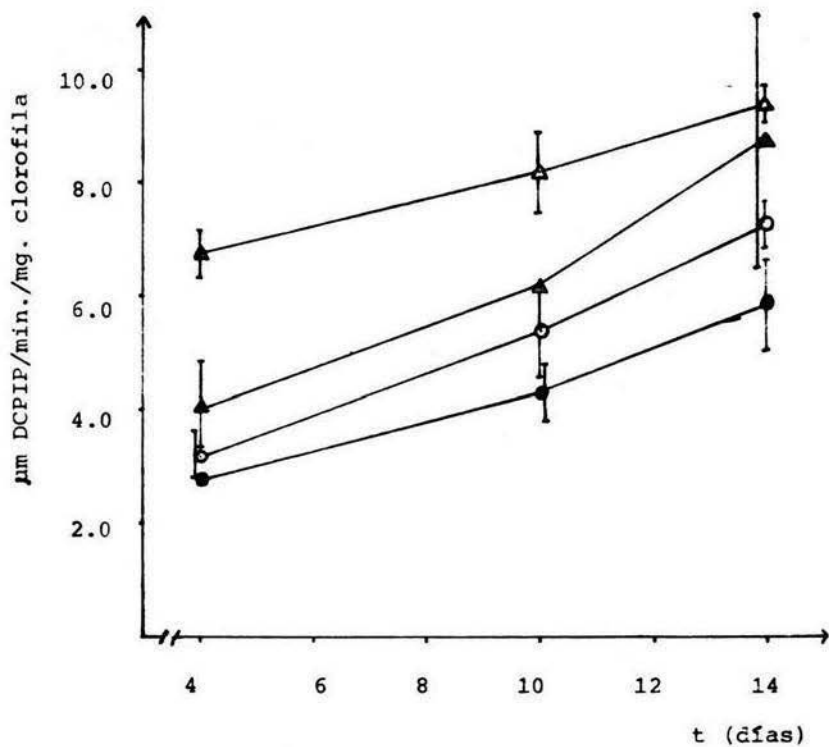


Figura 9. Efecto del NaCl durante el crecimiento del sorgo, sobre la velocidad de reducción del -DCPIP por cloroplastos aislados del mesófilo.

●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

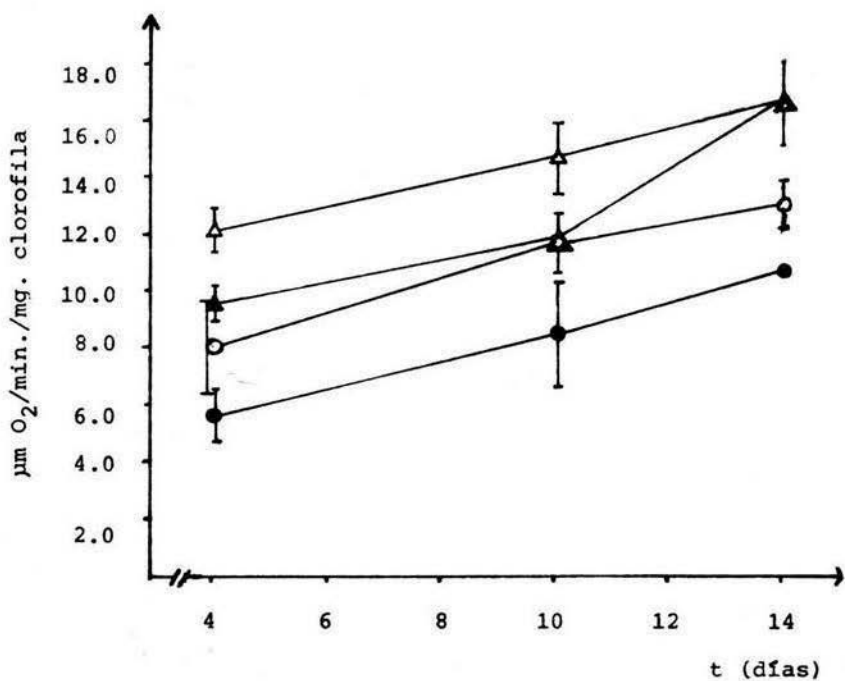


Figura 10. Efecto del NaCl durante el crecimiento del sorgo, sobre la velocidad de consumo de O_2 - por cloroplastos aislados del mesófilo.

●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

En las figuras 11 y 12 se puede observar que la cantidad de clorofila total en ambos tipos de cloroplastos aumentó por efecto del NaCl. En los cloroplastos de la vaina vascular las concentraciones de 50, 100 y 200 mM tuvieron efecto en el 4° día de crecimiento en tanto que únicamente 100 y 200 mM afectaron en el 14° día y 200 mM en el 10° ($p < 0.05$). En los cloroplastos del mesófilo a 50, 100 y 200 mM NaCl existen diferencias significativas en relación al control en el 4° día de crecimiento y a 50 y 100 mM en el 14° día ($p < 0.05$). Por otra parte, en este último tipo de cloroplastos, la cantidad de clorofila total aumentó en relación al tiempo, pero la proporción de clorofila a/clorofila b no fue alterada significativamente (tabla I), ocurriendo lo contrario en los cloroplastos de la vaina vascular (figura 13). Es de remarcarse que, en general, el NaCl a una concentración y un tiempo dado, incrementó más la cantidad de clorofila a que de clorofila b y que conforme la planta crece, los niveles de la primera aumentaron en tanto que los de la segunda más bien no variaron (figuras 14 y 15).

Niveles iónicos en cloroplastos. Las figuras 16 y 17 muestran los niveles de Na^+ , K^+ y Mg^{++} encontrados en los cloroplastos de la vaina vascular y del mesófilo, respectivamente.

En las plantas crecidas sólo en Hoagland se observó que: no se encontraron variaciones significativas para el Na^+ pero sí para el K^+ en los dos tipos de cloroplastos en relación al tiempo. El Mg^{++} tampoco presentó variaciones en los cloroplastos del mesófilo aunque sí en los de la vaina vascular.

Para las plantas crecidas en un medio salino se obtuvieron los siguientes resultados: el NaCl a concentraciones de 100 y 200 mM produjo un incremento significativo de iones Na^+ tanto en los cloroplastos del mesófilo como en los de la vaina vascular y a concentraciones de 50, 100 y 200 mM sólo en éstos últimos se elevaron los niveles de Mg^{++} . En cualquier caso, las cantidades del Ca^{++} variaron de manera estadísticamente no significativa, entre 0.09 y 0.19 $\mu\text{Eq}/\text{mg}$. clorofila. Los valores obtenidos para los niveles de Cl^- variaron de 153 a 833 mEq/mg . clorofila, los cuales son demasiado altos y

Falta página

N° 22

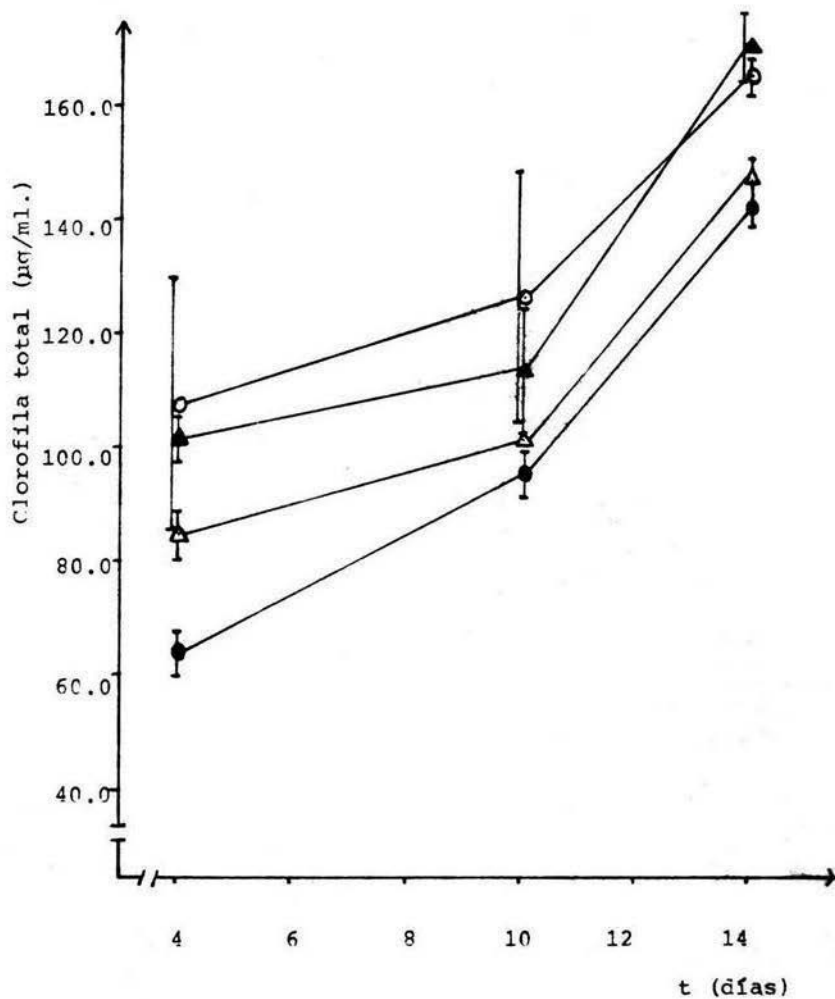


Figura 12. Contenido de clorofila total en clóro--
 vclastos del mesófilo de sorgo, crecido a diferen--
 tes concentraciones de NaCl. ●, ○, ▲, △, C, 50,100
 y 200 mM NaCl.

NaCl (mM)	Días de crecimiento		
	4	10	14
0	0.92 ± 0.02	0.92 ± 0.01	1.0 ± 0.01
50	0.90 ± 0.06	0.91 ± 0.06	0.96 ± 0.02
100	0.82 ± 0.17	0.94 ± 0.03	1.02 ± 0.17
200	0.80 ± 0.07	0.86 ± 0.03	1.21 ± 0.14

Tabla I. Proporción de clorofila a/clorofila b en clo-roplastos del mesófilo de sorgo, crecido a diferentes concentraciones de NaCl. Los valores están dados en µg clorofila /ml.

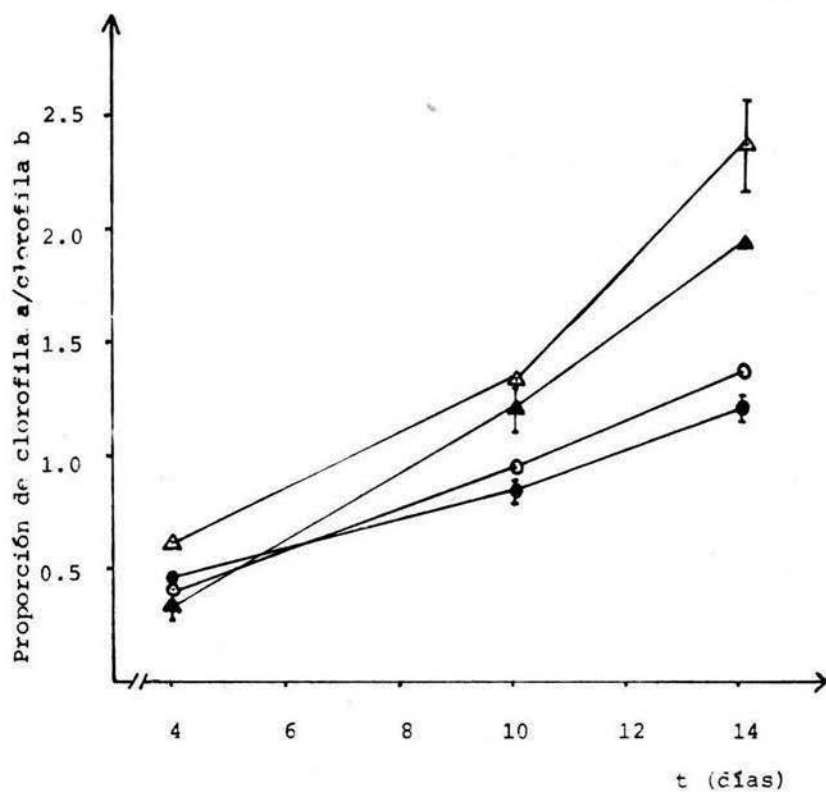


Figura 13. Relación de clorofila a-clorofila b en cloroplastos de la vaina vascular de sorgo, crecido a diferentes concentraciones de NaCl. ●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

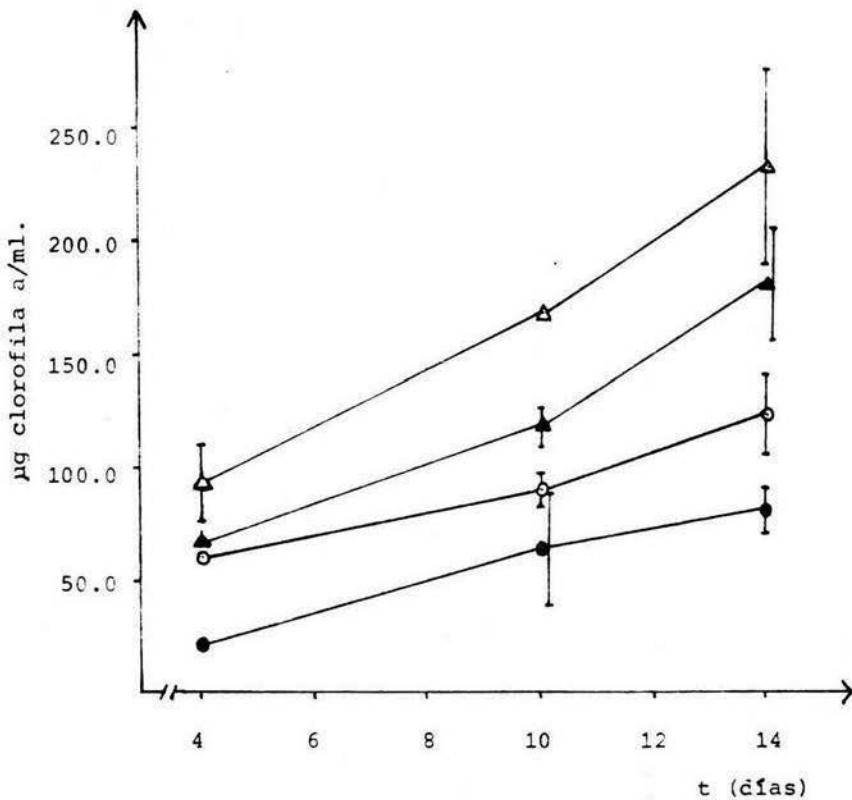


Figura 14. Niveles de clorofila a en cloroplastos de la vaina vascular de sorgo, crecido a diferentes concentraciones de NaCl. ●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

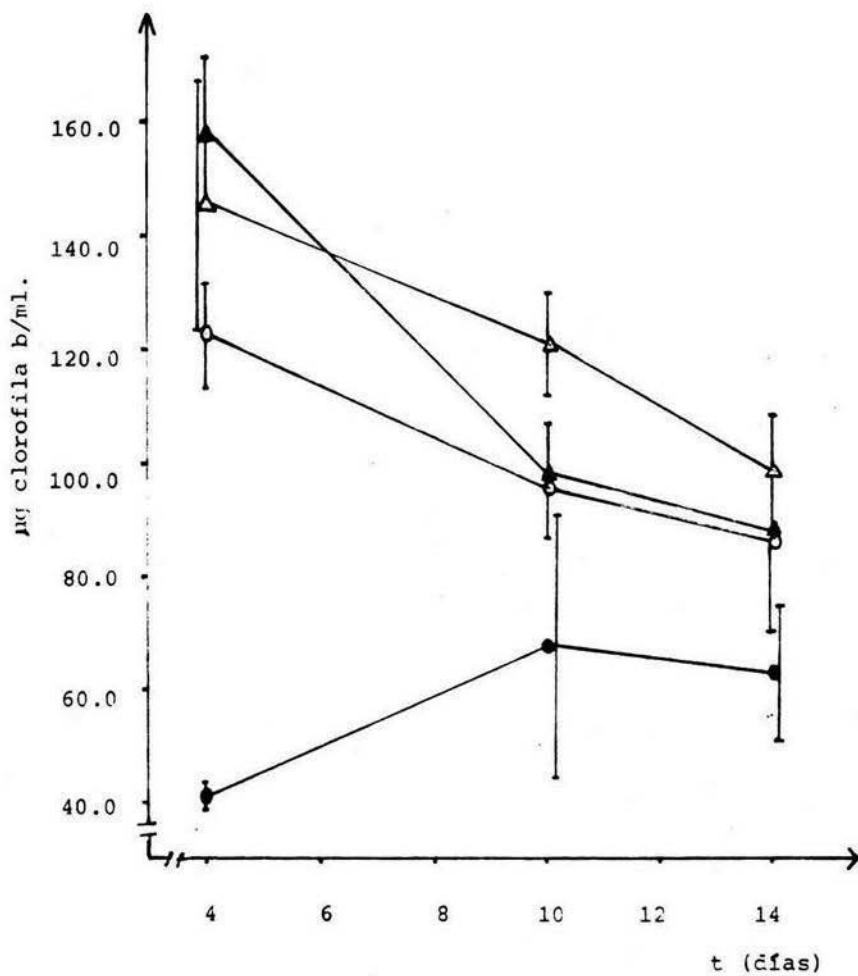


Figura 15. Niveles de clorofila b en cloroplastos de la vaina vascular de sorgo, crecido a diferentes concentraciones de NaCl. ●, ○, ▲, △, 0, 50, 100 y 200 mM NaCl.

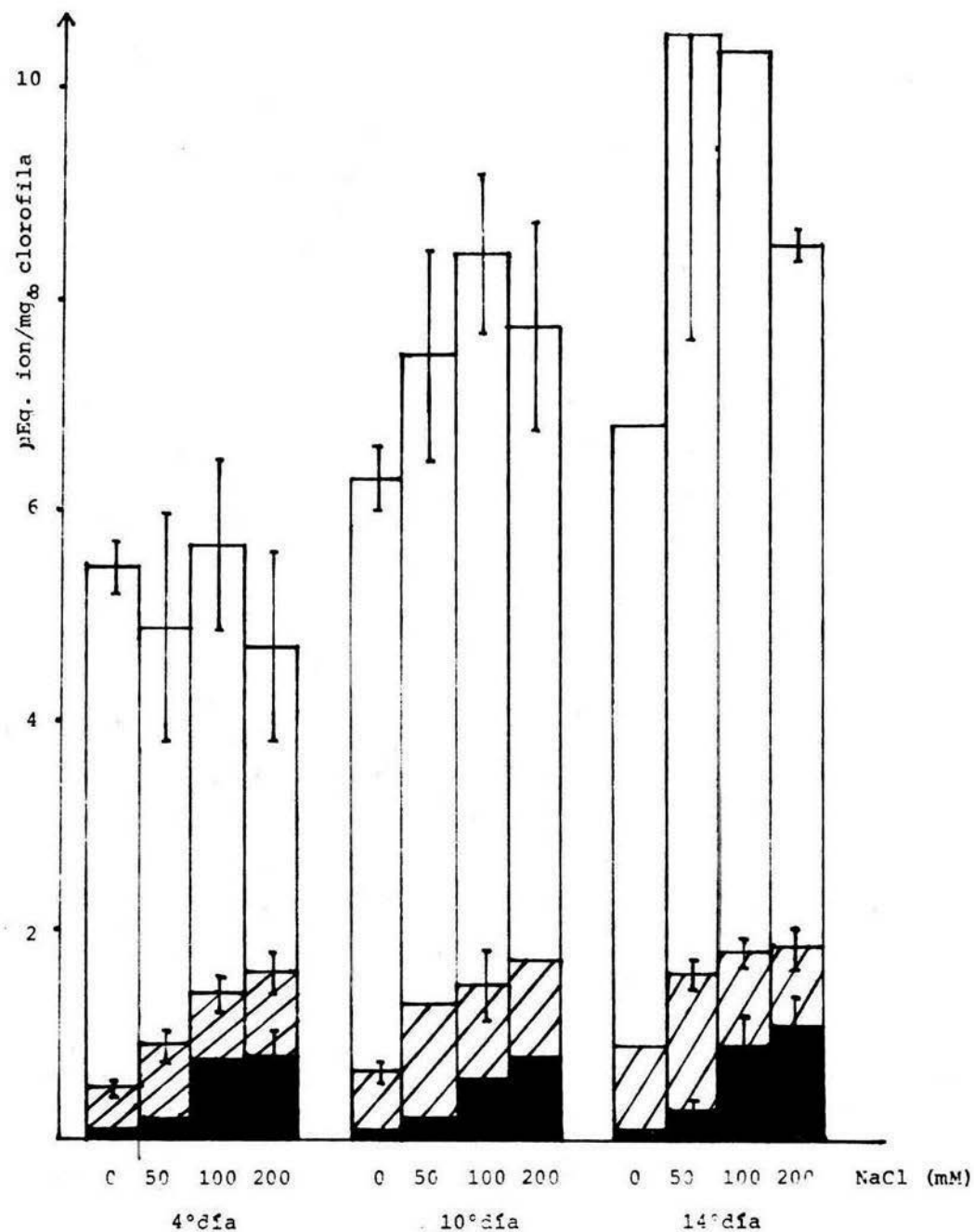


Figura 16. Niveles de K^+ , Mg^{2+} y Na^+ en cloroplastos de la vaina vascular de sorgo crecido en NaCl. □: K^+ ; ▨: Mg^{2+} ; ■: Na^+ .

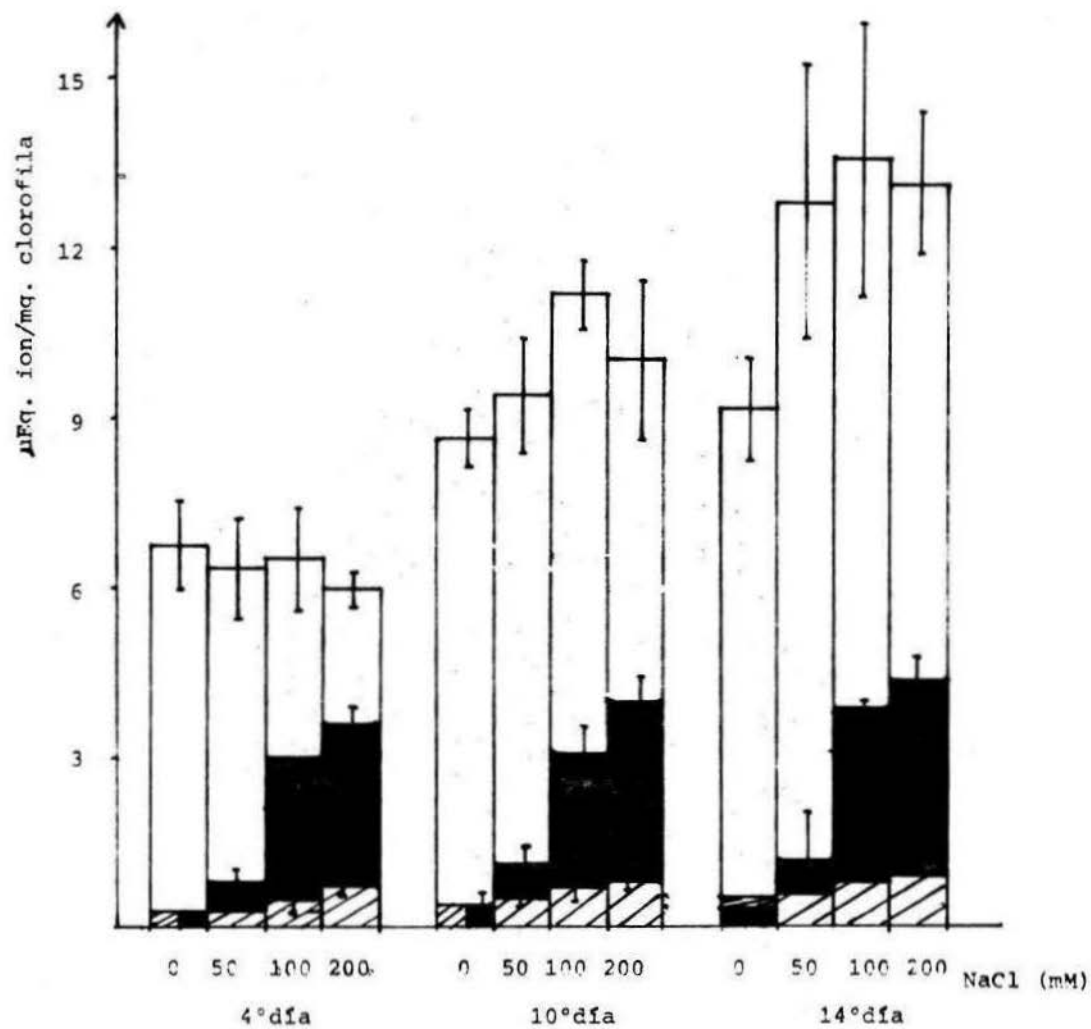


Figura 1-. Niveles de K⁺, Mg²⁺ y Na⁺ en cloroplastos de 1 mesó
 file de sorgo crecido en NaCl. □: K⁺; ▨: Mg²⁺; ■: Na⁺.

y se considera son inconsistentes con los reportados en la literatura, por lo cual no se presentan. La razón de esta discrepancia es explicada en la sección de discusión.

Es importante señalar que dado que no se determinó el volumen de los cloroplastos, no se conocieron las concentraciones a las cuales se encontraban cada uno de los iones.

DISCUSION.

Cambios asociados con el desarrollo de planta. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen cambios en las actividades de los fotosistemas y en las cantidades de clorofilas (figuras 7-15), no sólo dependientes de la concentración del NaCl, sino también del tiempo.

En los grupos control la actividad de FS II disminuyó con el desarrollo de la planta en los cloroplastos de la vaina vascular, pero en cambio aumentó la del FS I. En los cloroplastos del mesófilo ambas actividades aumentaron. Existe información escasa referida al análisis de estos eventos en relación al tiempo. Downton (1971), citado por Coombs (16) encontró que la deficiencia en actividad de FS II en varias plantas C-4, puede desarrollarse durante la ontogenia de los cloroplastos de la vaina; sin embargo, es probable que este hallazgo pueda explicar parcialmente la disminución aquí observada en los susodichos cloroplastos, puesto que el desarrollo total de los mismos parece completarse en el orden de hasta 2 días como máximo bajo una intensidad luminosa de 40,000-50,000 lx (1,33), pero el sorgo creció a tan sólo 2,400 lx. Otros investigadores han encontrado que (2,3,47) en plantas C-4 de 14 días de edad, la actividad de FS II en cloroplastos de la vaina vascular representa entre el 15 y el 47% de la actividad existente en cloroplastos del mesófilo, dependiendo de la especie y de las condiciones de ensayo. Aquí, la actividad en el primer tipo de cloroplastos fue cercana al 20% en relación al total hallado en el segundo tipo. Por otro lado, se ha reportado (2,47,55) actividad de FSI similar para ambos tipos de cloroplastos en plantas E.M.-NADP, lo cual apoya la semejanza en actividad obtenida para las plantas crecidas sin NaCl. El incremento en la cantidad de clorofila a y de K^+ , puede explicar el aumento en actividad de FS I en cloroplastos de la vaina vascular, mientras que la disminución de la actividad del FS II sería explicada por la disminución en la cantidad de clorofila b durante el desarrollo de las plantas. Se considera que la clorofila a casi no estaba disponible al FS II, ya que el aumento del Mg^{++} habría incrementado la actividad de dicho fotosistema, por inhibición de la transferencia de

energía de excitación de las clorofilas a_{II} a las a_I (42). Además Anderson et al (4) y Boardman(9), reportaron respectivamente, proporciones de clorofila a/clorofila b de 6.0 y 4.0 para FS I y de 1.7 y 2.0 para FS II. En los cloroplastos del mesófilo el aumento de clorofila total puede explicar el incremento observado para ambos fotosistemas. El aumento de K^+ probablemente también contribuyó en la actividad del FS I. El que el Na^+ y el Ca^{++} no se hayan modificado en relación al tiempo, no significa que no se requirió de ellos.

Cambios asociados con el medio salino de crecimiento. El NaCl no modificó los patrones de respuesta de actividad de fotosistemas así como tampoco de clorofilas, pero sí originó alteraciones a un tiempo dado, generalmente a concentraciones de 100 y 200 mM. Ya que se sabe que, por una parte, el único paso dentro de la vía biosintética de la clorofila que requiere iones es la conversión de protoporfirina IX monometil éster, participando únicamente el ión Mg^{++} y que, por otra parte, la regulación de la vía involucra otro tipo de factores diferentes a los iones (23) se piensa que probablemente el aumento del ión Mg^{++} en los cloroplastos de la vaina vascular de plantas crecidas en presencia de NaCl, justificaría el correspondiente aumento en la cantidad de clorofila total; sin embargo, parece que no sólo la variación en la cantidad de Mg^{++} indujo cambios en la cantidad de la misma, ya que en los cloroplastos del mesófilo ésta se incrementó pero no el Mg^{++} . Se encontró esto mismo durante el desarrollo de las plantas a cualquier concentración de NaCl, ya que el nivel de la clorofila total aumentó en cloroplastos del mesófilo (aunque sólo en el 4º día) y no en los de la vaina vascular y el valor del Mg^{++} se elevó en los segundos y no en los primeros. Es probable que este aumento del Mg^{++} estuvo en relación tanto con la actividad de la RuBPC-asa como con el aumento de clorofila debido a que, por un lado, se requieren concentraciones cercanas a 20 mM de Mg^{++} para activar esta enzima (36) y, por otro lado, se incrementó más la cantidad de clorofila total en cloroplastos de la vaina vascular que en los del mesófilo.

Los aumentos de clorofila contrastan con estudios previos

(33,40,51). En ellos la cantidad de clorofila es reportada en relación al peso fresco de la planta entera o de la hoja, el cual encontraron que aumentaba; no obstante, lo mejor sería conocer la cantidad de tal pigmento en relación a algún parámetro del cloroplasto mismo, ya que es en él donde se encuentra (p. ej. su contenido de agua). Gross y Phrasse (27) detectaron cambios en la estructura de los grana por efecto de iones pero ningún cambio en su volumen.

En relación al incremento en actividad de FS II en cloroplastos del mesófilo, es posible que se deba al aumento en cantidad de clorofila total encontrado en ellos, aunque también el Na^+ pudo haber contribuido a la respuesta incrementada de dicho fotosistema, ya que se ha propuesto (47) que bajo ciertas condiciones facilita la transferencia de energía de excitación de las clorofilas a_I a las a_{II} . Es difícil establecer con precisión la causa del aumento observado en la actividad de FS I en estos cloroplastos; aunque las variaciones del Na^+ hayan sido significativas, no se puede asegurar qué ión fue el responsable de tales respuestas, pues el K^+ pudo estar involucrado - aun sin variar sus concentraciones. Los aumentos en la cantidad de clorofila total también pudieron contribuir en la respuesta de este fotosistema. Aun cuando en el análisis de los grupos control se estableció que la actividad de FS II en cloroplastos de la vaina no aumentaba con el tiempo debido a una disminución en la cantidad de clorofila b y poca disponibilidad de clorofila a, era de esperarse que en los grupos experimentales sí aumentara ya que ambas clorofilas aumentaron sus niveles, lo que haría suponer que estuviera así más disponible la clorofila a; además los niveles de Mg^{++} también aumentaron. Sin embargo, ocurrió lo contrario por lo que se piensa que la baja actividad de FS II asociada a estos cloroplastos en plantas E.M.-NADP radica en otros componentes diferentes a las clorofilas a y b. No es claro porqué la actividad de FS I disminuyó en cloroplastos de la vaina vascular, no obstante el incremento en ambas clorofilas y ión Na^+ .

Es pertinente señalar que es difícil que las respuestas obtenidas de las actividades de los fotosistemas se hayan debido a un efecto osmótico. Wignarajah (56) encontró que tanto -

en A. tripolium como en P. sativum el manitol no inhibió la actividad de FS II aun a concentraciones de 800 mM. En cambio, a esta misma concentración, incrementó en un 50% la del FS I -- cuando se comparó con 0 mM. En el presente trabajo también se obtuvo un incremento similar en plantas de 14 días de crecidas en 200 mM NaCl; sin embargo, las actividades específicas fueron mucho mayores.

Aunque el nivel de Ca^{++} permaneció inalterado a cualquier concentración de NaCl, pudo estar involucrado con el movimiento de H^+ lo mismo que con la transferencia de energía de las clorofilas a_{II} a las a_I . Es muy sorprendente el hecho de que se hayan obtenido valores tan altos para los niveles de Cl^- (153 a - 188 mEq/mg. clorofila), sobre todo si se considera que en la planta tolerante Limonium vulgare, uno de los organismos que mayor cantidad de tal anión acumula en sus cloroplastos (39), se detectaron valores alrededor de 0.05 mEq/mg. clorofila y que la membrana de cloroplastos tiene una alta permeabilidad al Cl^- - (32). Tales resultados se explican en relación al procedimiento utilizado para la cuantificación de estos aniones: en muestras de grupos control y experimentales, el volumen del titulante - gastado fue del orden de ml. habiéndose calculado que sólo alícuotas del orden de μl o menos habrían sido suficientes para - obtener valores comparables a los previamente reportados, de - ahí que los valores hayan sido tan elevados y que se pueda decir menos de estos iones en relación a la actividad de fotosistemas. Es evidente que no se puede hacer un análisis respecto a si los iones cuantificados en este trabajo cumplen con mantener una diferencia de cargas mínima entre ambos lados de la membrana del tilacoide debido a que, por un lado, el contenido estromal y la membrana de los cloroplastos de la vaina vascular se - perdieron en el método de aislamiento y a que, por otro, cierta pérdida de iones de los cloroplastos puede ocurrir durante su - aislamiento, como ya se mencionó (51,52), de manera que no se puede conocer la cantidad total que se encontraba en cada tipo de cloroplasto así como tampoco su distribución entre estroma - y espacio intratilacoidal.

El conjunto de datos, en su totalidad, puede llevarnos a - establecer el siguiente cambio metabólico que ocurriría en plan

tas E.M.-NADP luego de ser sometidas a un stress salino.

Dado que hubo disminución de actividad de FS II y FS I en cloroplastos de la vaina vascular, prácticamente todo el PGA formado por carboxilación de la RuBP sería trasladado a los cloroplastos del mesófilo en donde los altos niveles tanto de ATP como de NADPH, formados por las actividades incrementadas de los fotosistemas, lo reducirían. Así, de estos cloroplastos las nuevas moléculas de G3P se transportarían a los cloroplastos de la vaina para sintetizar almidón. También podría ser que, parte del total de las moléculas de DPGA, regresaran a los cloroplastos ya que el NADPH lo proporcionaría la malato deshidrogenasa dependiente de NADP. La figura de abajo ilustra lo anterior.

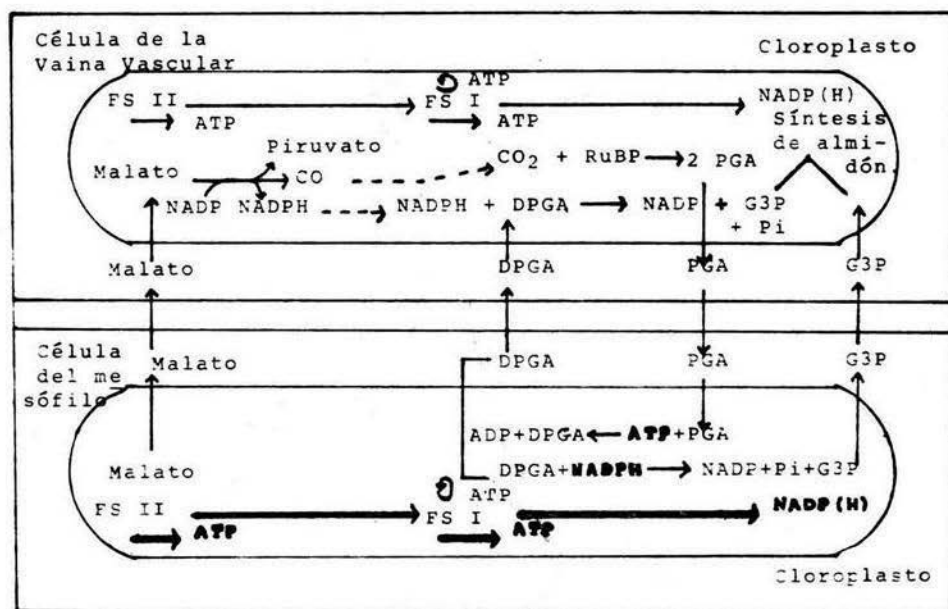


Figura 17. Reacciones parciales de la fotosíntesis C-4 en plantas E.M.-NADP crecidas en un medio salino. Las líneas y letras delgadas representan, respectivamente, actividades y cantidades bajas; las gruesas representan actividades y cantidades altas. Esto está referido únicamente a las actividades fotoquímicas y sus productos.

CONCLUSIONES.

1. El crecimiento del sorgo a intensidades luminosas tan bajas como 2400 lx, parece provocar un retraso en el tiempo requerido para la formación de las unidades fotosintéticas completas.
2. Durante esta fase de retraso se elevan las cantidades de clorofila a y clorofila b en cloroplastos del mesófilo, mientras que en los de la vaina vascular sólo suben las de la clorofila a y no se alteran las de la clorofila b, aunque la clorofila total se eleva. Asociados a estos cambios también ocurren otros que, en conjunto con los anteriores, están relacionados con el desarrollo de la planta. Estos cambios son: incrementos en actividad de FS I y fotosistema II en cloroplastos del mesófilo y aumento en FS I en cloroplastos de la vaina vascular pero disminución en FS II.
3. Ante un stress salino, se incrementan los niveles de Na^+ y Mg^{++} en los cloroplastos de la vaina vascular en los cuales la clorofila a aumenta sus niveles más que la clorofila b. En los cloroplastos del mesófilo, sólo se eleva el nivel de Na^+ y los niveles de ambas clorofilas se incrementan por igual. Es probable que, de los iones cuantificados, sólo el Mg^{++} origine el aumento de clorofilas.
4. La disminución en actividad de FS II en cloroplastos de la vaina vascular, parece no estar relacionada ni con la clorofila a ni con la clorofila b.
5. Es posible que ante condiciones de salinidad, los cloroplastos del mesófilo de una planta E.M.-NADP lleven a cabo la mayor parte de la fase reductiva de la fotosíntesis así como la fase generativa de los poderes reductores de la misma.

APENDICE.

Medio de extracción de cloroplastos.

Manitol	0.33 M		MnCl ₂	1.00 mM
HEPES-K ⁺	30.00 mM	pH 7.4	Mercaptoetanol	5.00 mM
EDTA	1.00 mM		BSA	0.50 %
MgCl ₂	1.00 mM		PVP insoluble	2.00 %

Medio de resuspensión de cloroplastos.

Manitol	0.33 M		
KH ₂ PO ₄	0.01 M	pH 7.0	
MgCl ₂	1.00 mM		
BSA	0.50 %		

Medio de reacción para FS I.

HEPES-K ⁺	50.00 mM	pH 7.6	Ascorbato	1.00 mM
Manitol	1.33 M		DCPIP	0.10 mM
MgCl ₂	1.00 mM		MV	0.20 mM
MnCl ₂	1.00 mM		DCMU	0.38 mM
EDTA	1.00 mM		NH ₄ Cl	5.00 mM
KH ₂ PO ₄	2.00 mM			

El volumen final utilizado de este medio para la medición de actividad de FS I fue 1.30 ml.

BIBLIOGRAFIA.

1. Anderson, J. y Boardman, N. (1964). Studies on the greening -- of dark-grown bean plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 17: 93-101.
2. Anderson, J. et al. (1971). Phosphorylation by intact bundle sheath chloroplasts from maize. *Biochem. Biophys. Acta.* 245 : 253-258.
3. Anderson, J. et al. (1971). Photochemical systems in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C-4 plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 245: 398-408.
4. Anderson, J. et al. (1973). Compositions of the photosystems - and chloroplasts structure in extreme shade plants. *Biochem. - Biophys. Acta.* 325: 573-585.
5. Arnon, D. (1949). Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Poly phenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
6. Baker, N. (1978). Effect of high cation concentration on photo system II activities. *Plant Physiol.* 62: 889-893.
7. Barber, J. (1976). Ionic regulation in intact chloroplasts and its effect on primary photosynthetic processes. En: "The Intact Chloroplast". (Barber, J. ed.). Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. pp. 89-134.
8. Black, C. y Mayne, B. (1970). P700 activity and chlorophyll - contents of plants with different photosynthetic carbon dioxide fixation cycles. *Plant Physiol.* 45: 738-741.
9. Boardman, N. (1970). Physical separation of the photosynthetic photochemical systems. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21: 115-140.
10. Bonaventura, C. y Myers, J. (1969). Fluorescence and oxygen - evolution from Chlorella pyrenoidosa. *Biochem. Biophys. Acta* . 189: 366-383.
11. Briantais, J. et al. (1973). Intersystems exciton transfer in isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 325: 530-538.
12. Brownell, P. (1965). Sodium as an essential micronutrient element for a higher plant (Atriplex vesicaria). *Plant Physiol.* 40: 460-468.
13. Brownell, P. y Crossland, C. (1972). The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C-4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 49: 794-797.
14. Butler, W. y Kitajima, M. (1975). Energy transfer between PSII and PSI in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 396: 72-85.

15. Calvin, M. y Bassham, J. (1962). The photosynthesis of carbon compounds. Benjamin, W.A., Inc. New York. pp. 8-11.
16. Coombs, J. (1976). Interactions between chloroplasts and cytoplasm in C4 plants. En: "The Intact Chloroplast". (Barber, J. ed.). Vol. 1. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp. 279-313.
17. Coombs, J. y Hall, D. (1982). Techniques in bioproductivity - and photosynthesis. Pergamon Press. London. pp. 94-111.
18. Critchley, C. (1982). Stimulation of photosynthesis electron - transport in a salt tolerant plant by high chloride concentrations. Nature. 298: 483-485.
19. Chance, B. y Williams, G. (1956). The respiratory chain and - oxidative phosphorylation. Adv. in Enzimology. 17: 65-134.
20. Cheniae, G. (1970). Photosystem II and C₂ evolution. Ann. Rev. Plant Physiol. 21: 467-498.
21. Daniel, W. (1983). Bioestadística. Limusa. México. pp. 222-233.
22. Dunn, A. y Arditti, J. (1968). Experimental Physiology. Experi-
ments in cellular, general and plant physiology. Holt, Rine-
hart and Winston, Inc. New York. pp. 43-45.
23. Edwards, G. y Huber, S. (1981). The C-4 Pathway. En: "The Bio-
chemistry of Plants. (Hatch, M. y Boardman, N. eds.). Vol. 8.
Academic Press, Inc. New York. pp. 237-281.
24. Edwards, G. y Walker, D. (1983). C₃, C₄: mechanisms, and cellu-
lar and environmental regulation of photosynthesis. University
of California Press. Great Britain. pp. 299-325.
25. Flowers, T. et al. (1977). The mechanisms of salt tolerance in
halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 89-121.
26. Greenway, H. y Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance
in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 149-190.
27. Gross, E. y Prasher, H. (1974). Correlation between monovalent
cation-induced decreases in chlorophyll a fluorescence and -
chloroplasts structural changes. Arch. Biochem. Biophys. 164 :
460-468.
28. Hatch, M. and Slack, C. (1966). Photosynthesis by sugar-cane -
leaves. Biochem. J. 101: 103-111.
29. Hatch, M. et al. (1967). Further studies on a new pathway of -
photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its -
occurrence in other plants species. Biochem. J. 102: 417-422.

30. Hatch, M. et al. (1970). Subdivision of C-4 pathway species - based on differing C4 acids decarboxilating systems and ultrastructural features. *Aust. J. Plant Physiol.* 2: 111-128.
31. Hatch, M. (1978). Regulation of enzymes in C4 photosynthesis. *Curr. Top. Cell. Reg.* 14: 1-27.
32. Heber, U. (1981). The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 139-168.
33. Hegde, B. (1982). Effect of salt stress on the structure and carbon flow mechanism in a noxious weed Parthenium hysterophorus L. 22: 51-56.
34. Henningsen, K. (1973). Development of photochemical activity and the appearance of the high potential form of cytochrome b-559 in greening barley seedlings. *Plant Physiol.* 51: 1117 - 1126.
35. Hind, G. et al. (1974). Light dependent redistributions of ions in suspensions of chloroplasts thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 1484-1488.
36. Jensen, R. (1977). Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 379-400.
37. Kenner, C. y Busch, K. (1979). Quantitative analysis. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. pp. 142-144.
38. Laetsch, W. (1974). The C4 syndrome: a structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 27-52.
39. Larkum, A. (1970). Ion and water transport in Limonium. V. The ionic status of chloroplasts in the leaf of Limonium vulgare in relation to the activity of the salt glands. *Biochem. Biophys. Acta.* 203: 133-138.
40. Marilyn, C. et al. (1984). Properties in thylakoid membranes of the mangroves, Avicennia germinans and Avicennia marina, - and the sugar beet, Beta vulgaris grown under different salinity conditions. *Plant Physiol.* 76: 531-535.
41. Mathis, P. y Paillotin, G. (1981). Primary processes of photosynthesis. En: "The Biochemistry of Plants". (Hatch, M. y Boardman, N. eds.). Vol. 8. Academic Press, Inc. New York. pp. 97-161.

42. Members of the Pye Unicam Application Laboratories. (1975). Atomic absorption spectrophotometry with the Pye Unicam SP 1900 and SP 90 series instruments. Pye U. Ltd. Yorks Street. England. s/pp.
43. Murata, N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light induced changes of chlorophyll a fluorescence in Porphyridium cruentum. 172: 242-251.
44. Murata, N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in chloroplasts - spinach. Biochem. Biophys. Acta. 189: 171-181.
45. Murata, N. et al. (1970). Effects of divalent metals ions on chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts spinach. Biochem. Biophys. Acta. 197: 250-256.
46. Murata, N. (1970). Control of excitation transfer in photosynthesis. IV. Kinetics on chlorophyll a fluorescence in Porphyra yezoensis. Biochem. Biophys. Acta. 205: 379-389.
47. Murata, N. (1970). Effects of monovalent cations on light - energy distribution between two pigment systems of photosynthesis in isolated chloroplasts spinach. Biochem. Biophys. - Acta. 226: 422-432.
48. Myers, J. (1971). Enhancement studies in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. 22: 289-312.
49. Osmond, C. (1974). Carbon reduction and photosystem II deficiency in leaves of C4 plants. Aust. J. Plant Physiol. 1: 41-50.
50. Reimold, R. y Queen, W. (1974). Ecology of halophytes. Academic Press, Inc. New York. pp. 355-378.
51. Robinson, S. et al. (1983). Photosynthesis and ion content - of leaves and isolated chloroplasts of salt stressed spinach 73: 238-242.
52. Robinson, S. y Downton, J. (1984). Potassium, sodium, and - chloride content of isolated intact chloroplasts in relation to ionic compartmentation in leaves. Arch. Biochem. Biophys. 228: 197-206.
53. Taylor, R. et al. (1975). Salt tolerance in cultivars of -- grain sorghum. Crop Science. 15: 734-735.

54. Varshney, K. (1977). Effect of salt stress on chlorophyll content of some grasses. Indian. J. Plant Physiol. 20: - 161-163.
55. Wang, R. y Myers, J (1974). On the state 1-state 2 phenomenon in photosynthesis. Biochem. Biophys. Acta. 347: 134 140.
56. Wignarajah, K. y Baker, N. (1981). Salt induced responses of chloroplasts activities in species of differing salt - tolerance. Photosynthetic electron transport in Aster tri-polium and Pisum sativum. Physiol. Plant. 51: 387-393.
57. Woo, K. et al. (1970). Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C4 plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67: 18-25.