



24
19

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

ENEP ZARAGOZA

ABSORCION Y MOVIMIENTO
DE LOS CLOROPLASTOS
EN LA MACROFITA ACUATICA

Egeria densa Planch

TESIS

Que para obtener el título de

BIOLOGA

PRESENTA

MA. CRISTINA SALCEDO LOAIZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



México, D. F.

1991



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.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Ubicación taxonómica	9
Metodología	
Colecta y tratamiento	10
Movimiento de los cloroplastos	10
Resultados	
Absorbancia y espectros de acción	14
Movimiento de los cloroplastos	15
Discusión	36
Conclusiones	43
Bibliografía	44

INDICE DE ESQUEMAS , TABLAS Y GRAFICAS .

Página

Esquema 1 . Colocación de la hoja dentro de la celda y del espectrofotómetro .	12
Esquema 2 . Orientación de los cloroplastos .	16
Tabla 1 . Intensidades máximas del espectrofotómetro utilizando una abertura de 4.0 nm para cada longitud de onda .	13
Gráfica 1. Espectro de absorción de una hoja viva de <u>Egeria densa</u> .	17
Gráfica 2 .Variaciones en la absorbancia a - 682 nm de una hoja viva de <u>E. densa</u> en función del tiempo de iluminación o de oscuridad.	18
Gráfica 3 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 760 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	19
Gráfica 4 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 730 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	20
Gráfica 5 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 700 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	21
Gráfica 6 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 680 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	22
Gráfica 7 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 660 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	23
Gráfica 8 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 650 nm a diferentes - concentraciones de CO ₂ .	24
Gráfica 9 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 600 nm a diferentes -	

concentraciones de CO_2 .	25
Gráfica 10 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 540 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	26
Gráfica 11 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 480 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	27
Gráfica 12 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 450 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	28
Gráfica 13 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 430 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	29
Gráfica 14 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 420 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	30
Gráfica 15 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 380 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	31
Gráfica 16 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 370 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	32
Gráfica 17 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 340 nm a diferentes <u>con</u> centraciones de CO_2 .	33
Gráfica 18 . Espectro de acción de <u>Egeria densa</u> a baja concentración de CO_2 (1.8 mM) .	34
Gráfica 19 . Espectro de acción de <u>Egeria densa</u> con alta concentración de CO_2 (17.4 mM) .	35
Gráfica 20 . Espectro de acción de la fotosíntesis, espectro de absorción de una hoja y pigmentos	41
Gráfica 21 . Espectro de acción del movimiento de los cloroplastos en <u>Vallisneria spiralis tortu</u> .	42

RESUMEN

Las plantas deben afrontar diversos obstáculos para la captación de carbono y estos están relacionados con el ambiente en el que éstas se desarrollan .

En las plantas acuáticas , los principales obstáculos para captar bióxido de carbono son la baja difusión del mismo en el agua y la variabilidad en la concentración de este compuesto de acuerdo con la temperatura , salinidad , altitud , por lo que las plantas acuáticas requieren de adaptaciones especiales o estrategias para afrontar la dificultad en la captación de carbono . Una de estas estrategias son los movimientos fototácticos de los cloroplastos al mantener un equilibrio entre la disponibilidad de luz y de CO_2 .

Los movimientos de los cloroplastos causan cambios en la capacidad de absorber la luz , pudiendo ser detectados espectrofotométricamente .

Para explicar estos movimientos , Seitz (1971) propuso un mecanismo que se basa en la formación de gradientes de ATP .

En Egeria densa se han observado tres tipos de orientación : la de oscuridad en la que los cloroplastos se encuentran dispersos aleatoriamente por toda la célula ; la temprana o de luz tenue en la que los cloroplastos se mueven en las paredes y la tardía , propia de iluminación intensa y prolongada , que se presenta como un agrupamiento de estos .

Se obtuvo un espectro de acción de E. densa con baja intensidad de luz ($5.55 \times 10^{-5} \mu\text{Einsteins cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) haciendo mediciones de la absorbancia a diferentes longitudes de onda comprendidas entre 760 y 340 nm colocando una hoja viva de la planta en APW después de 12 h de oscuridad y con dos concentraciones de CO_2 (1.8 mM y 17.4 mM) observándose valores mayores de absorbancia a mayor concentración de CO_2 . En ambos espectros de acción se observaron máximos a 370 , 480 , 660 y 680 nm , participando los pigmentos fotosintéticos , por lo que aún a muy baja intensidad de

luz se puede obtener un espectro de acción del movimiento de los cloroplastos y que es comparable con el obtenido por Seitz . A todas las longitudes de onda observadas se presentó movimiento de los cloroplastos alrededor de la célula pero muy lentamente y este desaparece conforme se aleja de la zona iluminada .

INTRODUCCION

La fotosíntesis es un proceso mediante el cual se sintetizan todos los compuestos orgánicos a partir de inorgánicos en presencia de luz solar (7) siendo de este modo la fuente de energía química de autótrofos y heterótrofos por la interacción de las cadenas tróficas de la biosfera (13) .

La captación de carbono (C) en las plantas depende de diversos factores internos y externos ; los primeros son la estructura y contenido de clorofila de la hoja y cloroplastos , la acumulación de los productos de la fotosíntesis dentro de estos , la influencia de enzimas y los segundos son la calidad y cantidad de la luz incidente sobre las hojas , la temperatura ambiente , la concentración de bióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) en la atmósfera que lo rodea y más generalmente la disponibilidad de agua y nutrientes (7) .

El movimiento de cloroplastos en las células , bajo la influencia de la luz , es un fenómeno muy difundido en los vegetales que se presenta de dos maneras , las cuales son fácilmente distinguibles entre sí , no obstante que algunas veces se traslapen o hasta estén interconectados : A) los cloroplastos frecuentemente participan en el flujo citoplasmático que denota un movimiento más o menos continuo de una parte pequeña o grande del citoplasma con sus organelos (Flujo rotacional , ciclósis) . La luz puede afectar la fracción del citoplasma y de sus organelos que muestran este movimiento , así como cambiar la velocidad del mismo . El estado uniforme de la distribución de los organelos , sin embargo , permanece incambiable y la respuesta es independiente de la dirección de la luz ; este efecto se llama fotodinésis y B) la fotoorientación , en la que los cloroplastos se reorientan en la célula de manera que la distribución resultante está relacionada con los patrones de absorción de la célula , que a su vez están determinados por la dirección de la luz (8 , 9) . Así mismo , la luz también ocasiona cambios en la centrifugabilidad de los cloroplastos debido a alteración en la viscosidad del citoplasma en funció

de la intensidad luminosa (19) .

En ciertas algas marinas de la zona intermareal , la luz de alta intensidad causa la orientación de los cromatóforos ; se ha demostrado que ésta no ocasiona cambios en el desprendimiento de O_2 ni en la actividad de los fotosistemas , por lo que su función posiblemente se restringe a la prevención de la fotooxidación de los pigmentos (15 , 16) .

En algunos casos , los cromatóforos de las algas se mueven de acuerdo con ciclos circadianos y no por cambios en la intensidad de la luz (15) , sin embargo , en algunas plantas vasculares de agua dulce y algas , el movimiento orientado de los cloroplastos tiende a una posición donde la irradiación es más favorable para la fotosíntesis (11) . Así mismo , en algunas especies de algas como Mougeotia sp. se ha observado aunado a la orientación de los cloroplastos un cambio en la forma y tamaño de estos en función de la luz (9 , 11) . Tanto en las algas , como en las plantas superiores , los movimientos de los cloroplastos y cromatóforos ocasionan cambios en la capacidad de absorción de luz (7 , 15) . En la oscuridad , los cloroplastos se encuentran dispersos en la célula (perístrofe) ; a baja o mediana intensidad de luz , se mueven en las paredes (11) , mientras que la orientación propia de iluminación intensa y prolongada se presenta como un agrupamiento de estos (orientación tardía) (2) pudiendo ser detectada espectrofotométricamente como un aumento en la transmitancia o disminución de la absorbancia del tejido en el rango de la luz visible (15) .

El espectro de acción de los movimientos de los cloroplastos de diversos vegetales presentan máximos a 370 y 450 nm que indican a la flavina como fotoreceptor ; picos menores a 550 nm debido al citocromo ; a 430 , 480 y 680 nm , donde la luz es absorbida por la clorofila (6 , 11 , 19) . También se observa un pequeño efecto debido a luz roja (650 nm) que es reversible con luz del rojo lejano (730 nm) fenómeno que es atribuido a la acción del fitocromo (9 , 11 , 21) .

Tanto los movimientos fototáticos de los cloroplastos como los-

cambios en la viscosidad del citoplasma son debidos al flujo citoplasmático , cuyo mecanismo se localiza en el límite entre el ectoplasma periférico estacionario y el endoplasma móvil que contiene los cloroplastos y que consta de filamentos proteínicos contractiles , los cuales generan un movimiento deslizante del endoplasma a lo largo del ectoplasma , probablemente de manera análoga a lo que sucede con la actina y miosina de las células musculares animales , que requieren energía química en forma de Adenín trifosfato (ATP) para la contracción (8 , 10 , 11) .

Seitz (1971) propuso un mecanismo para explicar el movimiento de los cloroplastos que se basa en la formación de gradientes de ATP .

Según ésta proposición , tanto la intensidad como 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 es el siguiente : cuando la intensidad luminosa es baja (ca. $0.1 \text{ erg cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$) , la luz ultravioleta y la azul estimulan la fosforilación oxidativa de las mitocondrias por medio de la excitación de las flavinas ; esto ocurre primero en la parte cercana a las paredes de la célula que reciben mayor cantidad de luz . A medida que la intensidad luminosa va aumentando (ca. $10 \text{ erg cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$) se llega a un máximo de saturación de la fosforilación oxidativa en toda la célula y los cloroplastos captan la luz para activar , en primer lugar , la fotofosforilación acíclica , ya que cuentan con suficiente fofato de nicotinamida adenín dinucleótido oxidado (NADP^+) que puede recibir electrones para pasar a su forma reducida (NADPH) . Durante la fijación inicial de CO_2 , se consume más ATP del que se sintetiza por medio de la fotofosforilación acíclica , por lo que los cloroplastos tienen que tomar ATP del citoplasma circundante , lo que ocasiona una disminución del movimiento del flujo citoplasmático y un incremento de la viscosidad . Con un aumento de la intensidad luminosa (ca. $1000 \text{ erg cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$) , se llega a un rango en el que se satura la reducción de NADP^+ y en estas

circunstancias , la luz puede ser usada plenamente para la fotosíntesis cíclica , produciéndose 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 (ca. 20 000 erg cm⁻² seg⁻¹) y el ATP se ha acumulado en el citoplasma , aumenta la fuerza cortante que dirige a éste y a los cloroplastos , en los que disminuye la sujeción que los mantiene unidos al citoplasma cortical (11 , 19) por lo que la orientación que los cloroplastos toman después de varios minutos de iluminación intensa -- (orientación tardía , de racimo , aunada a una disminución de la absorbancia) corresponde a condiciones en las que el ATP se encuentra en exceso (2 , 3) .

En el caso del flujo citoplasmático originado por la luz roja y que es reversible con luz del rojo lejano , Takagi s. (1985) llegó a la conclusión de que la luz roja induce el flujo citoplasmático rotacional en Vallisneria por un decremento de la concentración de calcio (Ca⁺²) en el citoplasma , y la luz del rojo lejano inhibe ese flujo por incremento de la concentración del mismo . La luz roja y del rojo lejano pueden facilitar el movimiento del Ca⁺² desde y hacia el citoplasma respectivamente y estos cambios de concentración son regulados por el fitocromo cuyos picos de absorción corresponden al de la luz roja (650 nm) y del rojo lejano (730 nm) (6 , 9 , 17 , 21) .

Participación del CO₂

En el mecanismo descrito que explica los movimientos de los cloroplastos se debe considerar que la disponibilidad de CO₂ puede ser un factor limitante del proceso . Cuando la concentración de CO₂ es muy baja , las plantas acuáticas requieren de una mayor intensidad luminosa para realizar el proceso fotosintético ; y cuando la cantidad de luz que reciben estas plantas es muy baja , incrementan su punto de compensación de CO₂ (14) .

Resulta claro que se requiere de un equilibrio entre la cantidad de luz que se capta y la de CO₂ que se fija para la producción

de azúcares (glucosa , almidón) (13 , 21) y cualquier proceso que tienda a mantener este equilibrio debe considerarse como un mecanismo de regulación de la fotosíntesis ; tal es el caso de los movimientos orientados de los cloroplastos , como lo muestra Benavides (1986) que al mantener un hoja viva de Egeria densa (Familia Hydrocharitaceae) en un medio con baja concentración de CO_2 , notó que se produce un decremento notable de la absorban - cia y se reduce la disponibilidad de luz para la fotosíntesis .

Cuando por el contrario , la disponibilidad de CO_2 es alta , casi no hay cambio en la absorbancia ante la iluminación ya que se evi - ta la formación de la orientación tardía , de racimo ; esto indu - ce a pensar que los movimientos de los cloroplastos forman parte de la regulación de la fotosíntesis en E. densa ; con ello se logra mantener un equilibrio entre la cantidad de luz y de CO_2 dis - ponibles (2) y al mismo tiempo se protege a los pigmentos de la fotooxidación cuando hay exceso de luz .

Relacionando esto con lo propuesto por Seitz , al aumentar el CO_2 en el medio , se dispondrá de $NADP^+$ en estado oxidado , capaz de seguir captando electrones procedentes de la fotofosforilación - acíclica ; en otras palabras , la energía luminosa captada por - los cloroplastos podrá utilizarse íntegramente para la producción de compuestos orgánicos , y por tanto no ocurrirá la acumulación - de un exceso de ATP en el citoplasma , los cloroplastos no se - agruparán y la absorbancia permanecerá alta (3) .

En las plantas acuáticas , uno de los principales obstáculos para la captación de CO_2 son la baja difusión del mismo en el agua y la variabilidad en la concentración de este compuesto de acuerdo con la temperatura , salinidad , altitud y la ecología general - de los organismos que ocupan un cuerpo de agua (2) por lo que las plantas acuáticas requieren de adaptaciones especiales para - afrontar la dificultad en la captación de C .

Una de estas adaptaciones consiste en la capacidad que tienen las plantas para usar al ión bicarbonato como fuente de C para la fo - tosíntesis (4) .

En algunas plantas acuáticas de la familia Hydrocharitaceae se ha

observado la producción de malato a partir de CO_2 y de Fosfoenolpiruvato (PEP) como en la vía C_4 , pero no sirve como vía principal para captar CO_2 , sino para balancear los excesos de captación de cationes en presencia de luz (5) . En realidad , -- Egeria densa presenta variaciones en su producción de malato , - en su punto de compensación de CO_2 , en su anatomía foliar y en su relación isotópica $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) (2) por lo que en realidad no es una planta C_3 (plantas que fijan el CO_2 sólo por la vía del ciclo de Calvin , donde el producto inicial de la fijación es un compuesto de tres carbonos , el ácido fosfoglicérico) ni C_4 (plantas que fijan el CO_2 por el ciclo de Calvin y por el camino donde se combinan el CO_2 con el PEP para producir los ácidos de cuatro carbonos , malato y oxaloacetato) (7) ; pertenece a la categoría intermedia propuesta por Haladay A. S. y Bowes G. (10) para las monocotiledóneas acuáticas que ajustan su estrategia de captación de C a las exigencias de un medio que cambia a lo largo del año .

Otra de las estrategias utilizadas pueden ser los movimientos fototácticos de los cloroplastos , que se ha propuesto (2 , 3 , - 11) que sirven para mantener el equilibrio entre la disponibilidad de luz y de CO_2 .

Benavides (2) obtuvo el espectro de absorción de E. densa (Gráfica 1) haciendo un barrido desde 400 nm hasta 800 nm y al repetir el barrido varias veces , se incrementan los datos de absorción en todas las longitudes de onda ; este efecto desaparece si la planta se calienta a 45°C o bien se irradia con rayos β de alta energía , es decir , este efectos sólo se presenta in vivo . En forma concomitante , dicho autor estudió el movimiento de los cloroplastos observando que estos ocasionan cambios en la absorción de los tejidos fotosintéticos (Gráfica 2) donde el máximo se alcanza después del primer minuto de iluminación intensa (50 W m^{-2}) descendiendo inmediatamente después bruscamente , - aunado esto a cambios en la orientación de los cloroplastos .

En nuestro caso se trató de trabajar en la parte inicial de la curva descrita por Benavides (2) (Gráfica 2) usando una baja

intensidad de luz (5.55×10^{-5} μ Einsteins $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) producida por el propio espectrofotómetro .

Se planteó como hipótesis inicial que la presencia de máximos de absorbancia en la macrofita acuática Egeria densa y por tanto - los movimientos orientados de los cloroplastos , están relacionados con la longitud de onda de la luz incidente .

Como consecuencia se propuso el siguiente objetivo : determinar - el efecto de la longitud de onda de la luz en el movimiento y - orientación de los cloroplastos en Egeria densa mediante la evaluación de la absorbancia (máximos de absorción) y los cambios en la misma a baja y alta concentración de CO_2 .

UBICACION TAXONOMICA (2)

División : Magnoliophyta .
Clase : Liliatae .
Orden : Hydrocaritales .
Familia : Hydrocaritaceae .
Género : Egeria .
Especie : Egeria densa Planch .

METODOLOGIA

Colecta y tratamiento

Los ejemplares de E. densa empleados en los experimentos fueron colectados en el Jardín Botánico del Instituto de Biología y cultivados en un recipiente rectangular de vidrio de 48.5 litros de capacidad que contenía 29 l de agua, mismo que fue sometido a un período de iluminación de 12 horas y 12 h de oscuridad y a temperatura ambiente entre 22 y 24°C (condiciones de verano).

Movimiento de los cloroplastos

Para evaluar los cambios en la orientación de los cloroplastos a diferentes longitudes de onda (760, 730, 700, 680, 660, 650, 600, 540, 480, 450, 430, 420, 380, 370 y 340 nm) se determinaron los cambios en la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Perkin - Elmer modelo 552 de doble haz. Para esto se utilizaron celdas desechables de polipropileno Kartell, en las que se colocó después del período de oscuridad una hoja de E. densa, ya que en la oscuridad los cloroplastos presentan una distribución al azar en el citoplasma y sin movimiento (2, 9). Esta hoja se adhería a una de las paredes de la celda con cinta adhesiva, de tal forma que su superficie quedara perpendicular al haz de luz del espectrofotómetro. Esto permitía que la hoja fuera atravesada por la luz, sin que incidiera sobre la nervadura central, como se ilustra en el Esquema 1.

La celda se llenó con una solución de Agua de estanque artificial (APW) ya que las células de las hojas preparadas en esta solución no presentan ningún signo de movimiento (21). La preparación de las celdas con las hojas se realizó en un cuarto oscuro iluminado ligeramente con luz roja y en el menor tiempo posible (aproximadamente 1 minuto), sin ocasionarse el movimiento de los cloroplastos, como se comprobó al hacer observaciones al microscopio.

Una vez que las hojas fueron colocadas en las celdas, se introdujeron en el espectrofotómetro antes descrito para obtener una zona

definida de longitud de onda , aunque como se utilizó la mayor --
abertura del aparato (4.0 nm) debido a que se requería la máxi
ma intensidad luminosa de la fuente (intensidad máxima total de
 $5.55 \times 10^{-5} \text{M Einstein cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) las mediciones corresponden a
un intervalo de longitud de onda de 4.0 nm en cada punto . La in-
tensidad máxima para cada longitud de onda se aprecia en la Ta -
bla 1 .

Se realizaron mediciones de absorbancia a las diferentes longitu-
des de onda mencionadas para cubrir los centros activos de la foto
síntesis y para obtener un espectro de acción , haciendo medicio -
nes cada 30 segundos durante un período de iluminación de 30 minu-
tos , ya que en observaciones previas se obtuvo que es el tiempo -
máximo más adecuado , ya que si se deja más tiempo , la absorban-
cia puede llegar a descender bruscamente debido a que la hoja deja
de ser funcional posiblemente por muerte .

Se obtuvieron 5 repeticiones por cada longitud de onda de incremen-
to de absorbancia (ΔA) contra tiempo de iluminación para hojas
con baja (1.8 mM) y alta (17.4 mM) concentración de CO_2 , sien-
do ésta última en la que hay una saturación efectiva para la fo-
tosíntesis (2) . Para mantener las concentraciones constantes ,
las celdas se sellaron con parafina y se determinaron éstas con hi-
dróxido de sodio (NaOH) 0.01 N .

Para relacionar los cambios de la absorbancia con las diferentes -
orientaciones de los cloroplastos , se utilizó un microscopio de -
polarización Meopta modelo 155732 , haciéndose observaciones al -
término del período de oscuridad , al alcanzar la absorbancia má-
xima y al término del período de iluminación con el espectrofotó -
metro .

En todos los experimentos se utilizaron hojas que estuvieran a una
distancia de 20 verticilos del punto de vegetación así como la zo-
na de la hoja del segundo cuarto partiendo de la base , ya que és-
ta es una zona muy sensible (18) .

Esquema 1. Colocación de la hoja dentro de A) la celda y B) del
espectrofotómetro .

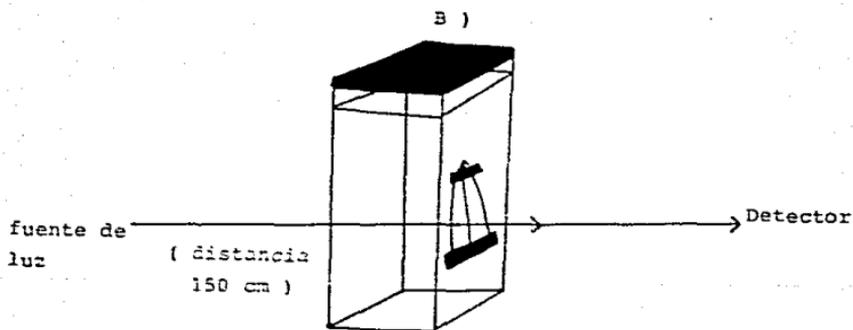
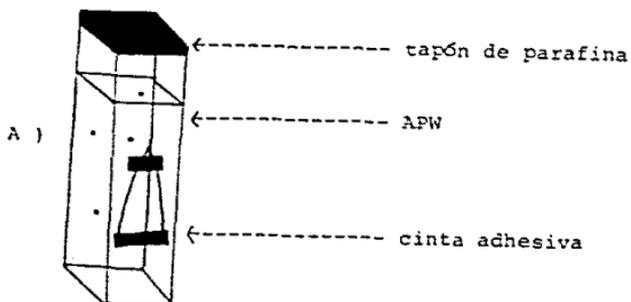


Tabla 1 .

Intensidades máximas del espectrofotómetro utilizando una abertura de 4.0 nm para cada longitud de onda .

Longitud de onda (nm) .	Intensidad $\times 10^{-5} \mu\text{Einsteins cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$
343	4.07
373	3.46
382	3.52
421	3.96
430	4.07
448	4.12
484	4.29
538	3.96
601	4.12
650	4.23
660	4.29
680	4.29
700	4.67
730	4.67
763	4.67

* Los cambios de energía se deben a la disminución de la emisión - a longitudes de onda corta que están compensados por una mayor energía según la ecuación de Plank $E = hv$ que daría intensidades mayores a bajas longitudes de onda y además afectada por la introducción de filtros .

RESULTADOS

Absorbancia y espectros de acción

En las gráficas 3 a 17 se observan los incrementos de absorbancia-promedio ($\Delta \bar{A}$) con respecto al tiempo para cada longitud de onda a baja y alta concentración de CO_2 y que presentan tendencias claras para cada longitud de onda, apreciándose valores mayores de incremento de absorbancia a concentración alta de CO_2 . Para la elaboración de éstas gráficas promedio se excluyeron las que tenían valores negativos, solo descensos, debido a que se consideró que esa hoja posiblemente ya estaba muerta o con los tejidos muy afectados.

A partir de las gráficas se obtuvieron los espectros de acción de Egeria densa para cada concentración (Gráficas 18 y 19) a diferentes rangos de tiempo, debido a la variación que hay a diferentes longitudes de onda para producir incrementos de absorción distintos.

A baja concentración de CO_2 se observaron máximos, de 0 a 10 minutos a 370, 480, 600 y 680 nm; de 11 a 20 min a 370, 480 y 660 nm y de 21 a 30 min a 370, 480 y 660 nm.

El espectro de acción a concentración alta presentó un comportamiento similar: de 0 a 10 min, máximos a 370 y 660 nm; de 11 a 20 min a 480 y 660 nm y de 21 a 30 min se aprecian los máximos de 370, 480 y 660 nm.

En ambos espectros se observó que los mayores incrementos de absorbancia promedio tienen lugar a tiempos largos, después de 11 minutos de iluminación y el máximo de mayor magnitud se presentó a los 370 nm después de los 20 min de iluminación.

En las gráficas promedio por longitud de onda a baja concentración de CO_2 donde se observa aumento de absorbancia sin llegar a un máximo (760, 700, 680, 660, 600, 480, 380, 370 nm) en el espectro de acción se presentan como máximos o con valores medios; las gráficas promedio donde se aprecian solo descensos (730 nm) o ligeros aumentos seguidos de descensos (650, 540, 430 nm) en

el espectro de acción se observan como mínimos o con valores de - absorbancia bajos . También se encuentran otras gráficas promedio que tienen un comportamiento oscilante (340 , 420 , 450 nm) , - que en el espectro de acción se presentan con valores relativamente bajos .

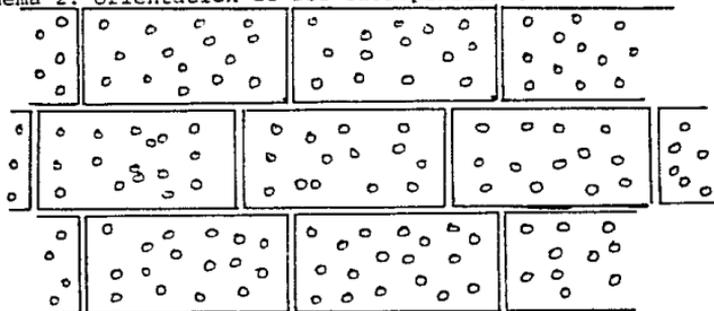
En cuanto a las gráficas promedio por longitud de onda con alta - concentración de CO_2 , se encuentran las que tienen varios máximos (760 , 700 , 680 , 600 , 430 y 370 nm) ; otras que presentan aumentos de absorbancia sin llegar a un máximo (650 y 480 nm) y - las últimas que muestran un comportamiento particular , con máximos claros pero con tendencia oscilante (660 , 540 y 380 nm) y - que en el espectro de acción presentan múltiples máximos de absorbancia .

Movimiento de los cloroplastos .

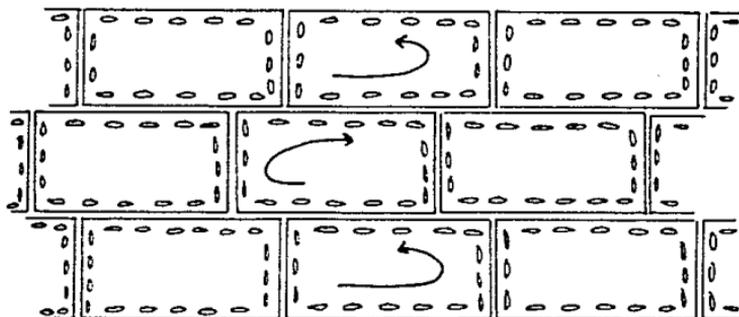
Se observaron dos tipos de orientación : la de oscuridad , en la - que los cloroplastos se encuentran dispersos aleatoriamente por toda la célula (perístrofe) , presentando los cloroplastos la forma casi circular , de cara ; y la orientación temprana , después - de la irradiación (Esquema 2) en la que los cloroplastos giran - alrededor del citoplasma cerca de las paredes y con una distribución perpendicular de estos con relación a la superficie de la hoja (2) , la cual se presentó a todas las longitudes de onda , - pero sólo en la capa adaxial de la hoja , ya que en las células - más internas se observaron los cloroplastos dispersos y de forma - circular , es decir , en una distribución similar a la inicial .

En cuanto a la forma de los cloroplastos , al hacer las observaciones a los 30 min de iluminación , esto es , al término de las mediciones de la absorbancia , los cloroplastos presentan la forma - alargada , de perfil , mientras que si se observa al alcanzar el - máximo de absorción , que no siempre aparece a los 30 min , se pueden encontrar de forma alargada , de perfil , o de forma casi circular , de cara . Además , el movimiento es muy lento y sólo se observó en la zona de la hoja que fue iluminada y se hace más lento hasta desaparecer conforme se aleja de ésta .

Esquema 2. Orientación de los cloroplastos .

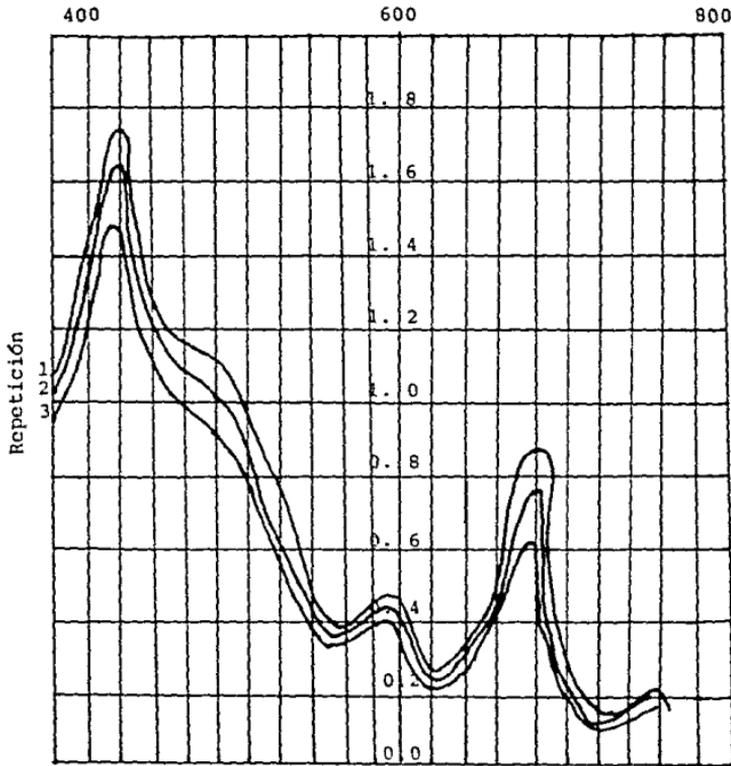


Orientación de los cloroplastos en la oscuridad (peristrophe) en Egeria densa .

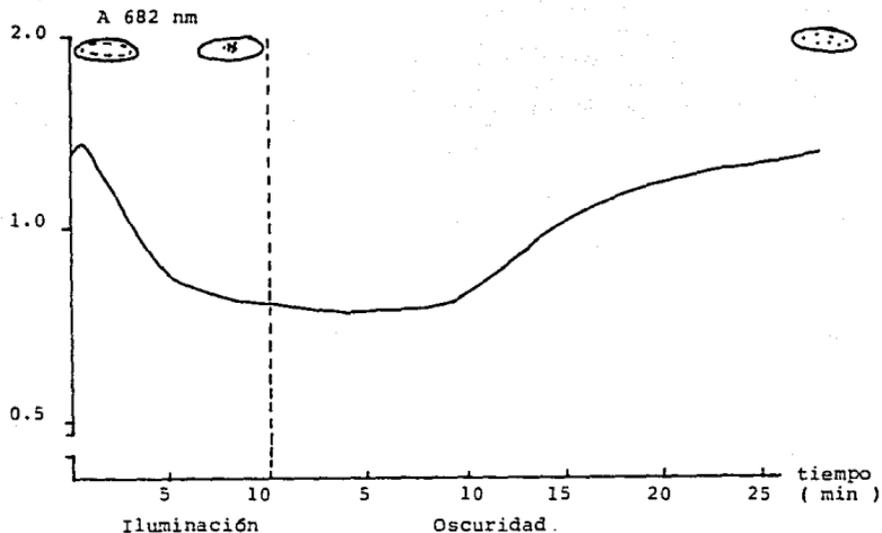


Orientación de los cloroplastos de E. densa después de la iluminación con el espectrofotómetro . Se observa un giro ordenado a lo largo de las paredes perpendiculares a la superficie de la hoja - (orientación temprana) .

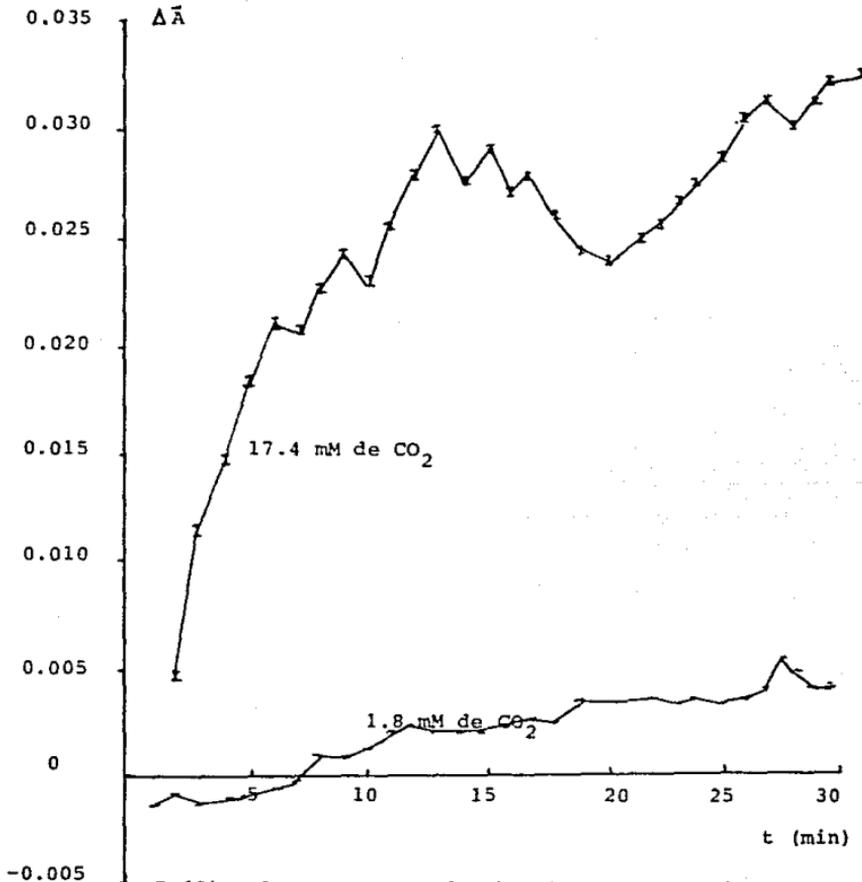
longitud
de onda
(nm) .



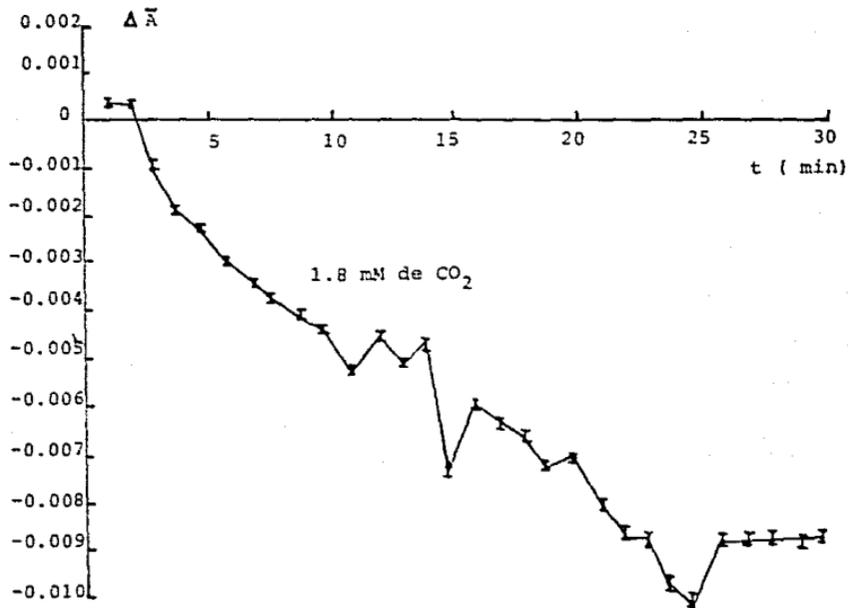
Gráfica 1. Espectro de absorción de una hoja viva de Egeria densa
(3) .



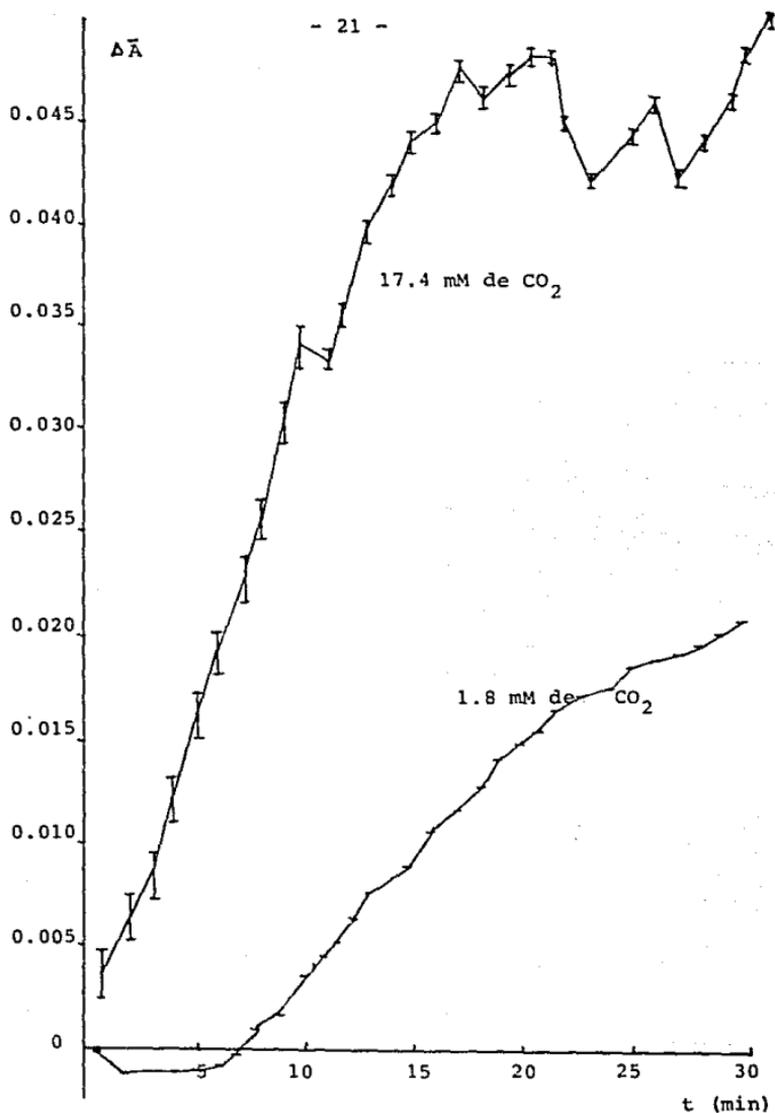
Gráfica 2. Variaciones en la absorbancia a 682 nm de una hoja viva de *Egeria densa*, en función del tiempo de iluminación o de oscuridad . En la parte superior se muestra , en forma esquemática , la distribución de los cloroplastos que corresponde a las condiciones indicadas en la abscisa (2) .



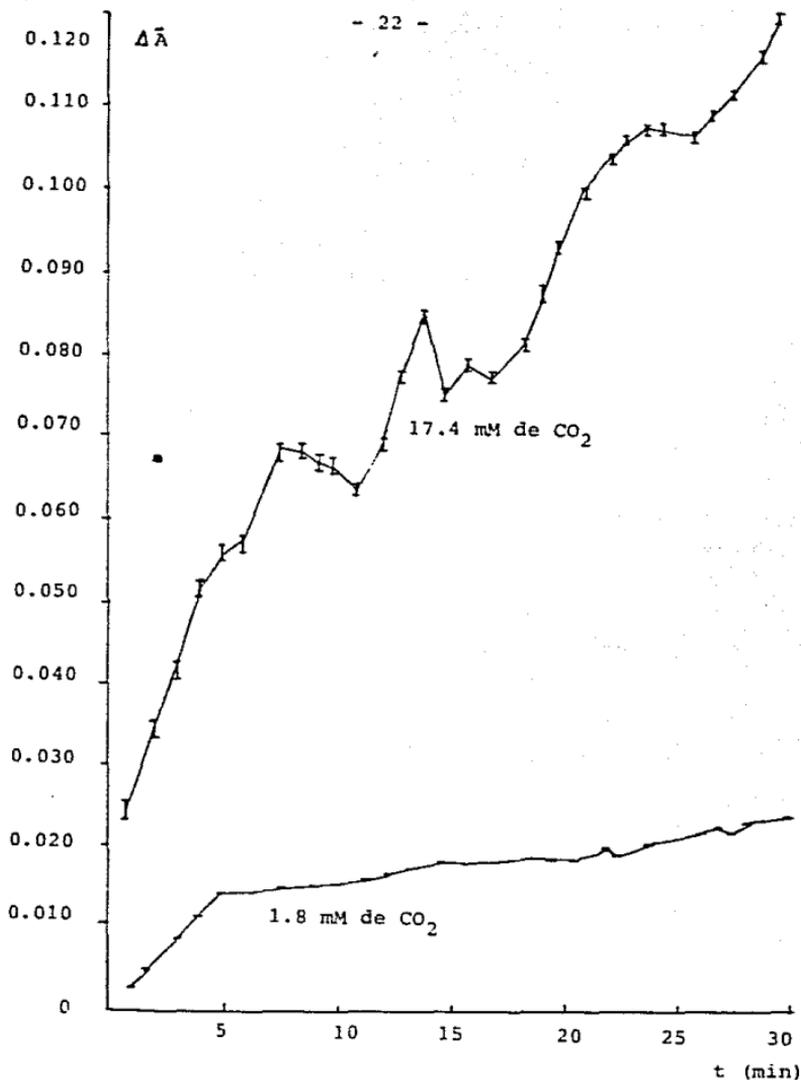
Gráfica 3. Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 760 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica.



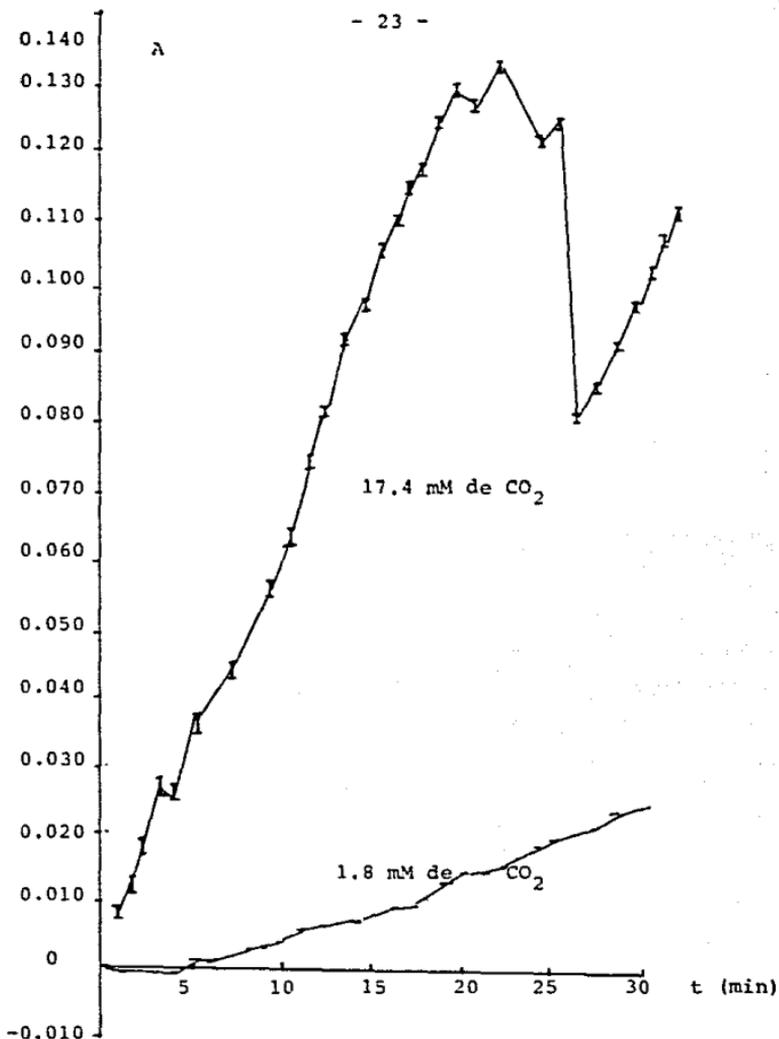
Gráfica 4 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 730 nm a diferentes concentraciones de CO₂ . Las barras verticales indican la desviación típica .



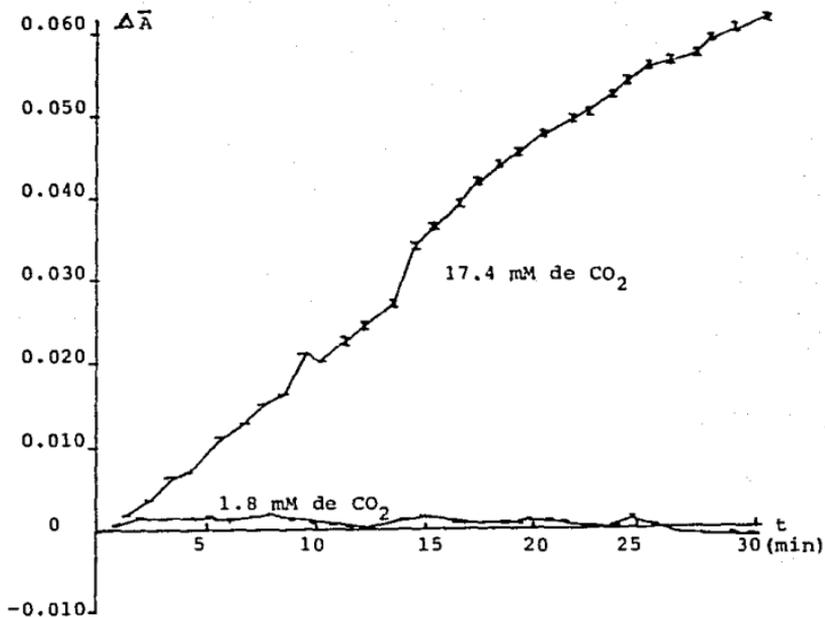
Gráfica 5 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 700 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



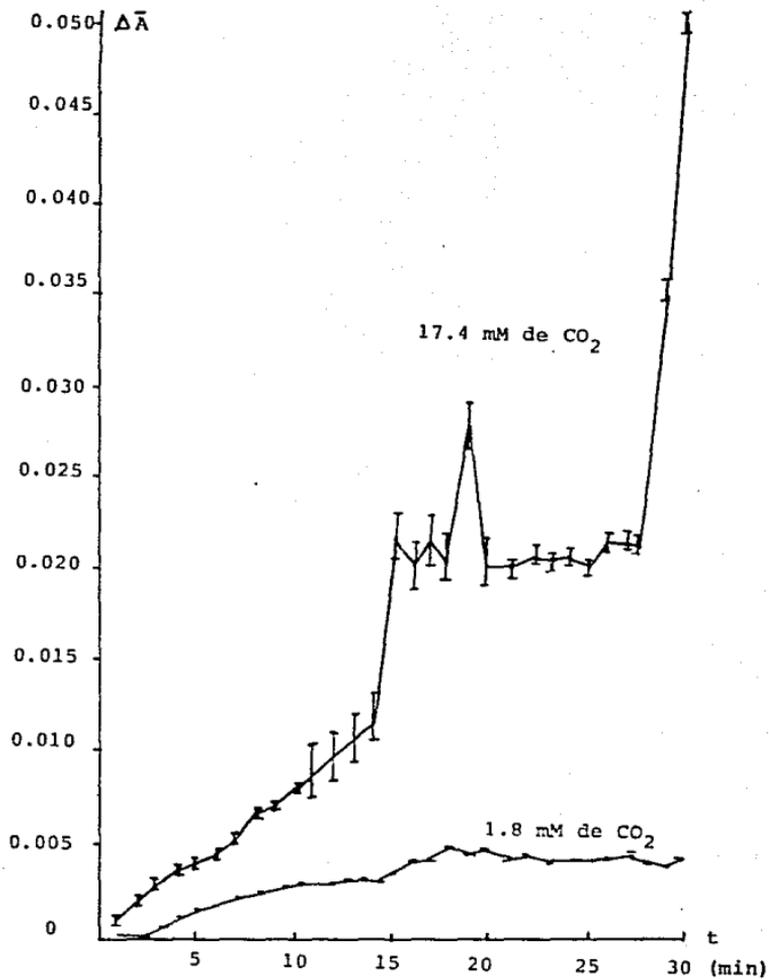
Gráfica 6. Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 680 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica.



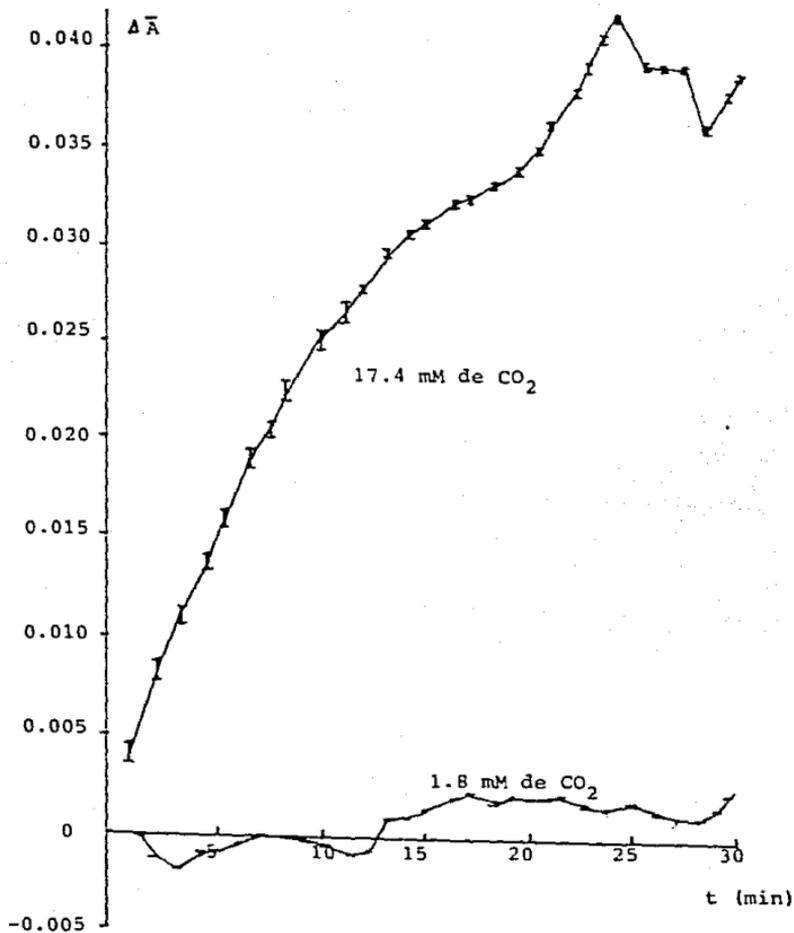
Gráfica 7 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 660 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



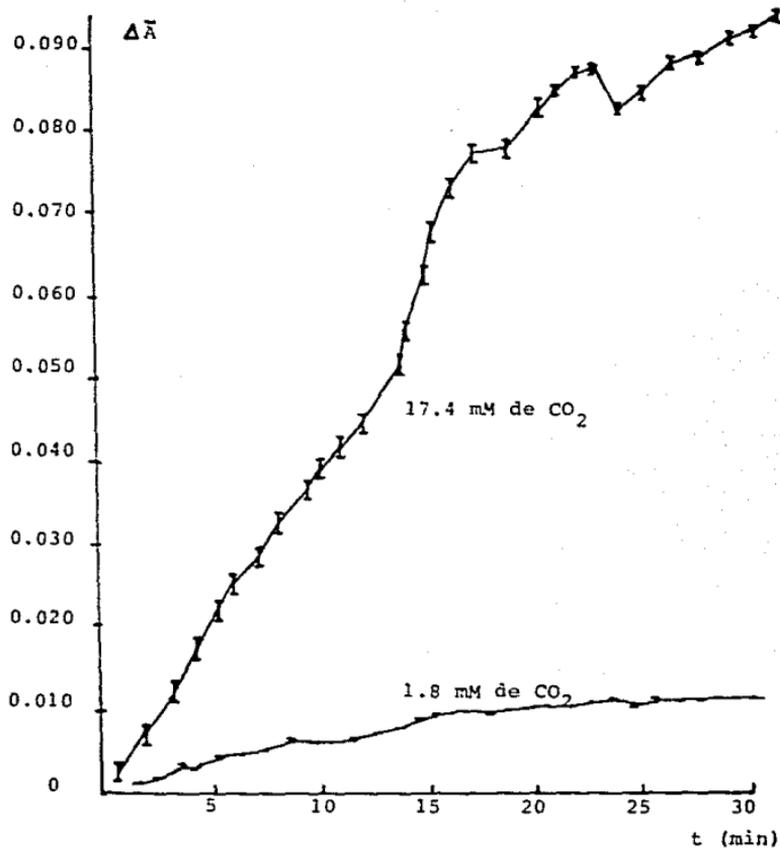
Gráfica 8 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 650 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



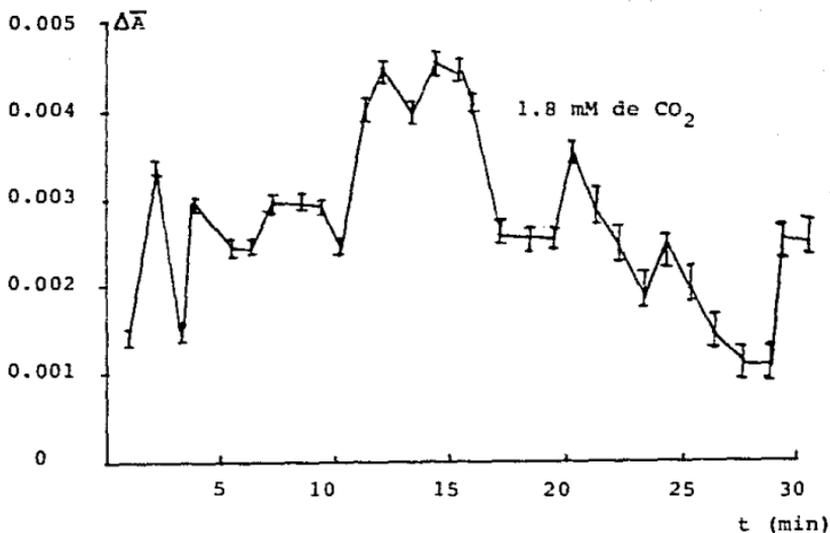
Gráfica 9 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 600 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



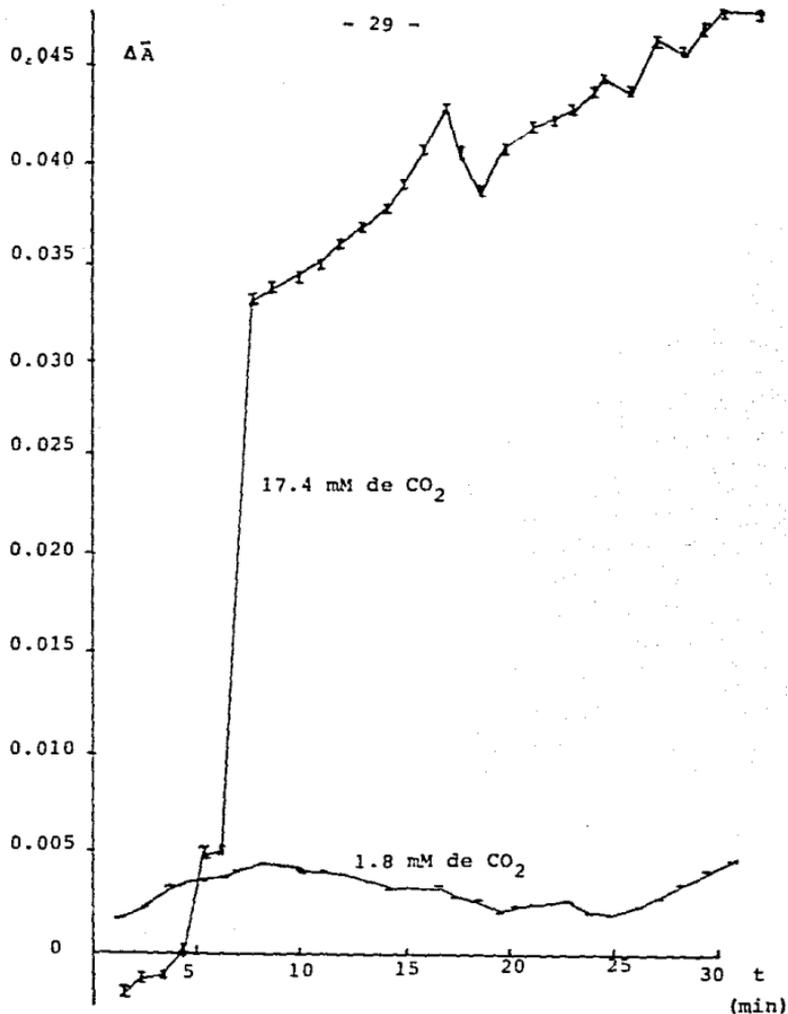
Gráfica 10 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 540 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



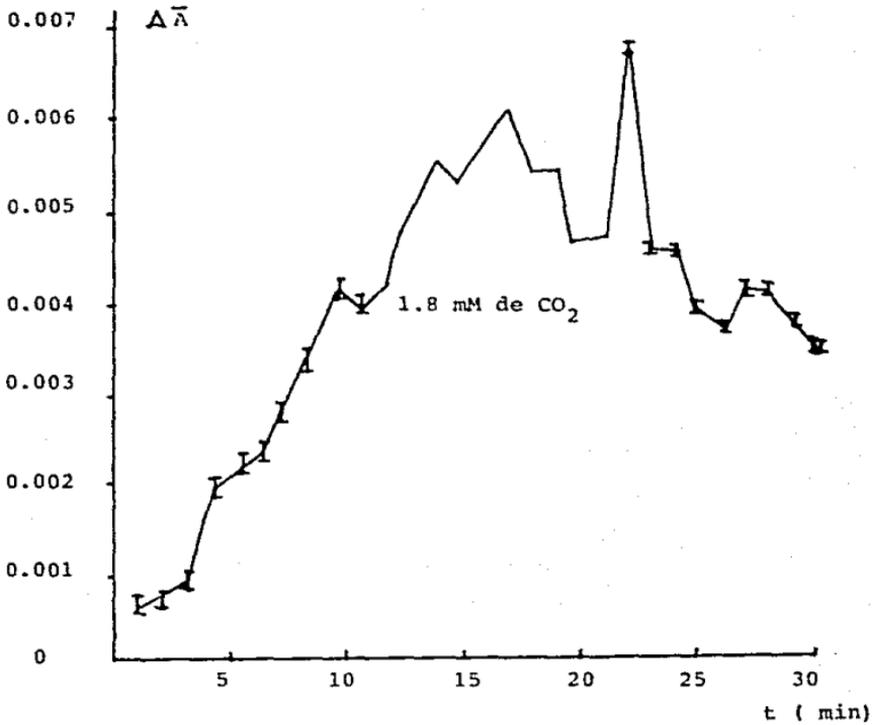
Gráfica 11 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 480 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



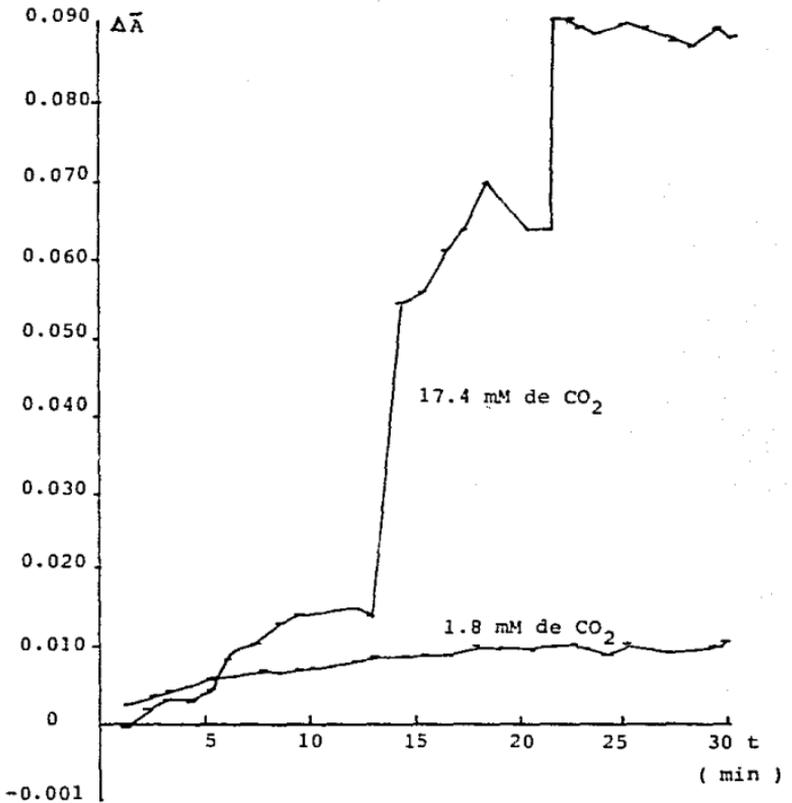
Gráfica 12 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 450 nm a diferentes concentraciones de CO₂ . Las barras verticales indican la desviación típica .



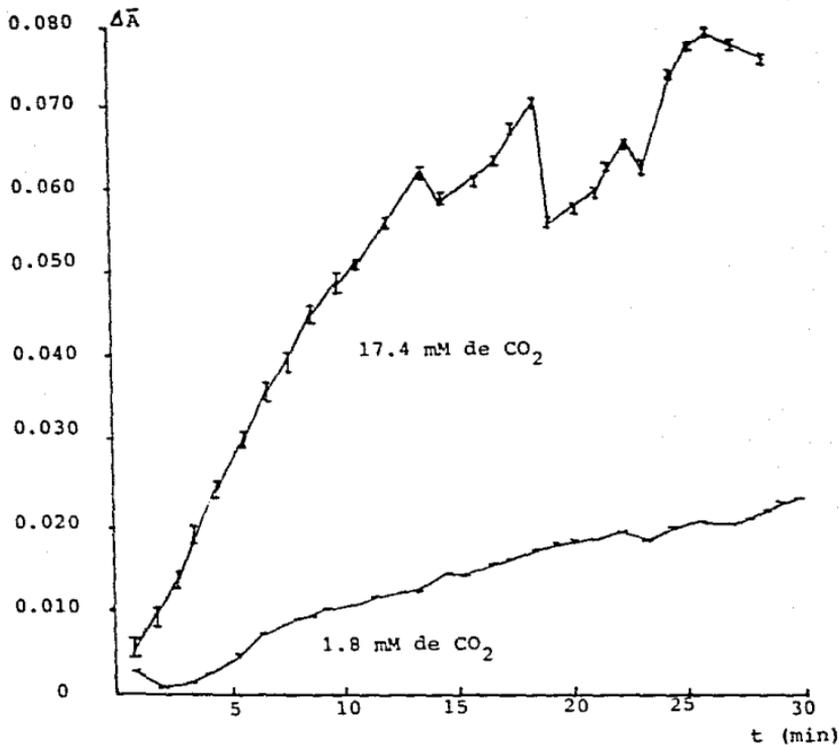
Gráfica 13 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 430 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



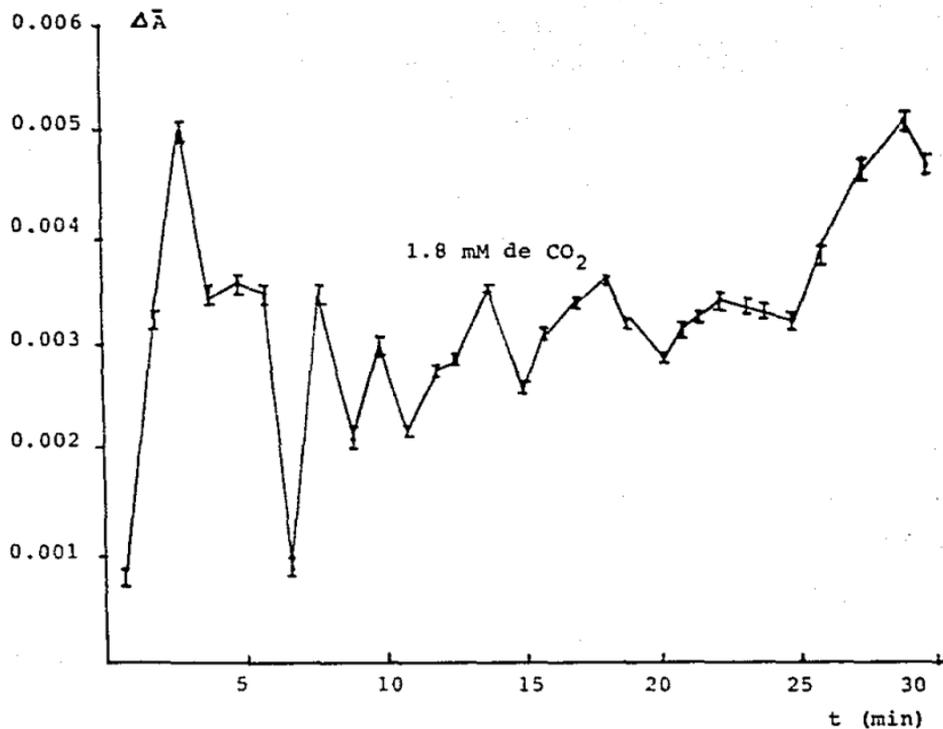
Gráfica 14 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 420 nm a diferentes concentraciones de CO₂ . Las barras verticales indican la desviación típica .



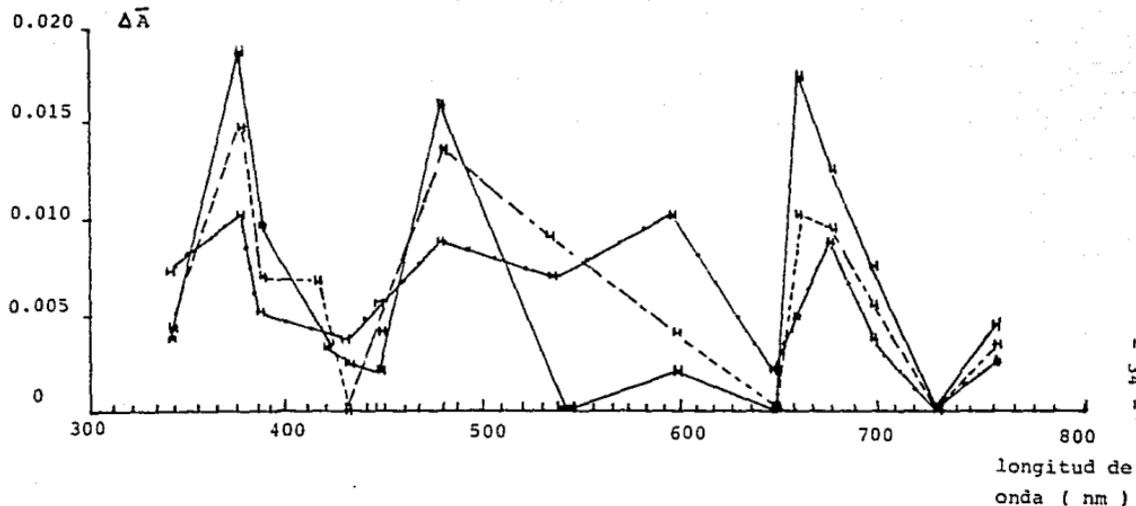
Gráfica 15 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 380 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



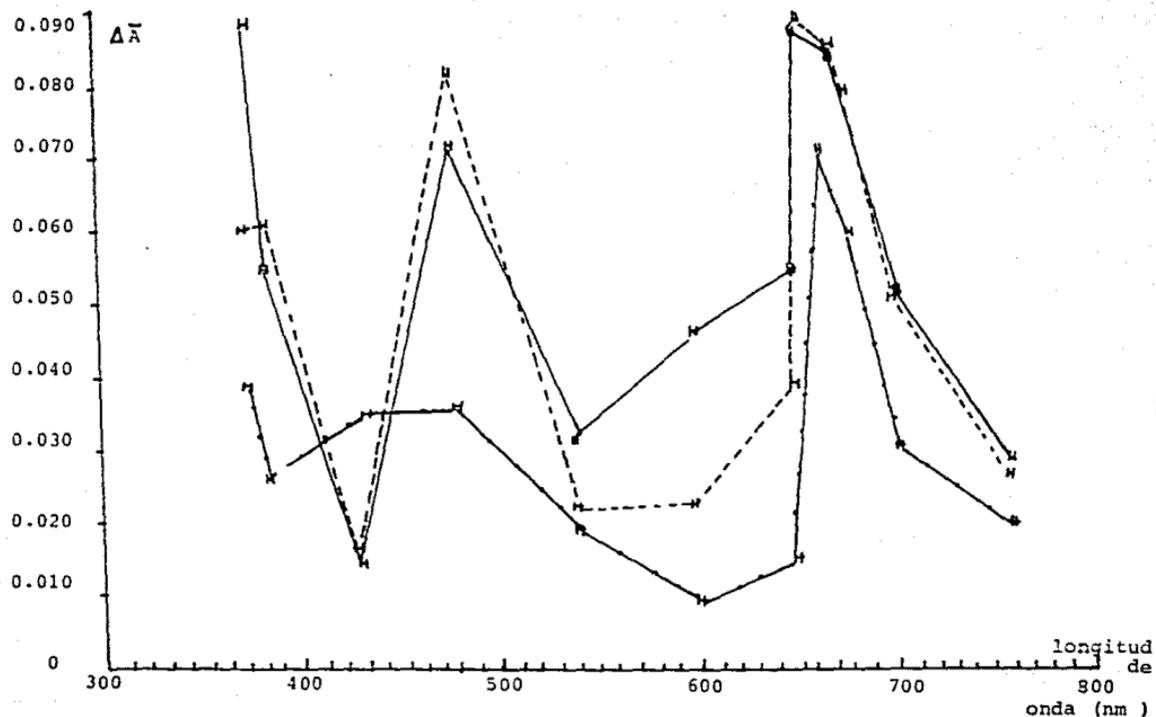
Gráfica 16 . Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 370 nm a diferentes concentraciones de CO_2 . Las barras verticales indican la desviación típica .



Gráfica 17. Incremento de absorbancia promedio con respecto al tiempo a 340 nm a diferentes concentraciones de CO₂ . Las barras verticales indican la desviación típica .



Gráfica 18. Espectro de acción de Egeria densa con baja concentración de CO_2 (1.8 mM).
 (—) 0 a 10 min ; (- -) 11 a 20 min ; (—) 21 a 30 min .



Gráfica 19 . Espectro de acción de *Egeria densa* con alta concentración de CO_2 (17.4 mM) .
 (\rightarrow) 0 a 10 min ; ($--$) 11 a 20 min ; ($-$) 21 a 30 min) .

DISCUSION

La técnica empleada para las mediciones de absorbancia fue efectiva , aunque se presentó un problema en el caso de alta concentración de CO_2 , ya que se formaron burbujas que en algunos casos ocasionaron el desprendimiento de la hoja , lo que condujo a lecturas incorrectas de la absorbancia , descartándose algunas observaciones , por lo que se repusieron hasta tener 5 de cada longitud de onda .

Aunque en todas las repeticiones se mantuvo el mismo tiempo de oscuridad , existieron variaciones en los incrementos de absorbancia y en algunos casos estos valores fueron negativos , lo que se puede atribuir a variaciones en las condiciones metabólicas de las muestras o bien a que el haz de luz del espectrofotómetro cubre zonas en las que no hay tejido fotosintético . Sin embargo , las tendencias de incrementos de absorbancia para cada longitud de onda muestra patrones claros y reproducibles .

El espectro de acción de E. densa (Gráfica 18) presentó máximos a 370 , 480 y 660 nm teniendo éstos incrementos de absorbancia promedio cercanos (0.0188 , 0.016 y 0.018 respectivamente) , un hombro y picos menores a 420 , 600 y 680 nm y que si se compara con el espectro de absorción de E. densa (Gráfica 1) y el de acción de la fotosíntesis (Gráfica 20) se observan los máximos de 420 , 600 y 680 nm , pero en nuestro caso la relación de intensidades es diferente , mientras que los de 370 , 480 y 660nm no se aprecian como tales en los espectros mencionados ; no obstante se puede deducir la participación de los pigmentos fotosintéticos . Como fotoreceptores a 370 nm se puede considerar a la flavina ; a 480 nm la clorofila b y el β -caroteno , así como a 420 , 660 y 680 nm la clorofila a (8 , 18) .

El pico a 660 nm también podría ser atribuido a la participación del fitocromo como sucede en Mougeotia (11) . El máximo a 600nm esta afectado por bandas de interferencia en el espectro provocado por la estructura de las paredes de celulosa de la hoja .

En el espectro de acción con alta concentración de CO_2 (Gráfica

19) se observan los mismos máximos a 370 , 480 y 660 nm , pero en este caso los incrementos de absorbancia son más grandes . Debido a que se requiere de un equilibrio entre la cantidad de luz que se capta y la cantidad de CO_2 que se fija para la producción de azúcares (2) con alta concentración de CO_2 la absorbancia fue elevada también e inclusive no disminuyó en algunos casos, ya que la alta concentración de CO_2 tiende a compensar la baja intensidad de luz .

Mientras la fotosíntesis se encuentra saturada de CO_2 , no disminuye la absorbancia (2) pero a baja concentración de CO_2 , ésta desciende después de un máximo al no haber suficiente CO_2 que compense la saturación de NADPH en estas condiciones de iluminación. Las gráficas promedio de incremento de absorbancia contra tiempo a baja concentración de CO_2 (1.8 mM) a diferentes longitudes de onda presentan variaciones cuyas tendencias permiten clasificarlas en varios grupos : en un primer grupo se pueden colocar aquellas que presentan una tendencia a producir uno o varios máximos como se observa a 450 , 420 y 340 nm ; un segundo grupo donde se incluyen las gráficas que presentan una tendencia al incremento de la absorbancia sin llegar a un máximo como tal ; en este grupo se pueden incluir las gráficas de 760 , 700 , 680 , 660 , 430 y 370 nm . En otro grupo se pueden incluir aquellas que presentan un incremento gradual de la absorbancia y luego se mantiene cierta constancia , como a 600 , 480 y 380 nm ; un cuarto grupo donde se encuentran aquellas observaciones en las cuales se aprecian tanto incrementos pequeños de absorbancia como decrementos ; en este grupo se encuentran las gráficas de 650 y 540 nm. Un último grupo , donde se incluyen las longitudes de onda en las cuales se presentan principalmente decrementos de la absorbancia ; es muy notable que en este grupo se encuentren solamente las observaciones a 730 nm y esto puede deberse a que a esta longitud de onda el flujo citoplasmático se inhibe marcadamente , debido a un incremento en la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma que es regulada por el fitocromo (21) .

En cuanto a las gráficas promedio por longitud de onda con alta -

concentración de CO_2 (17.4 mM) , también se pueden colocar en - varios grupos : el primero donde hay tendencia al aumento de la absorbancia produciéndose varios máximos , donde se incluyen las observaciones a 760 , 700 , 680 , 600 , 430 y 370 nm . Un segundo grupo , donde se aprecia una tendencia a un aumento constante de la absorbancia sin llegar a un máximo , donde se encuentran las - gráficas de 650 y 480 nm y un tercer grupo , donde se observa un gran aumento de la absorbancia , descenso y nuevo aumento más gra - dual que el primero , como son a 660 , 540 y 380 nm .

Si comparamos en forma global éstas gráficas promedio con las de baja concentración de CO_2 , se observa que éstas últimas present - tan incrementos de absorbancia menores ; en algunos casos se apre - cia la misma tendencia al ascenso , pero el comportamiento es dife - rente (760 , 700 , 680 , 660 , 430 y 370 nm) ; en otras, tan - to el comportamiento como la tendencia son diferentes (650 , 600 , 540 , 480 y 380 nm) .

No se realizaron mediciones de absorbancia a concentración alta - de CO_2 a 730 , 450 , 420 y 340 nm , ya que solo se tomaron aque - llas longitudes de onda que en el espectro de acción a baja con - centración de CO_2 se presentaron como máximos , así como algunos puntos intermedios , además de que a esas longitudes de onda men - cionadas la captación de luz es poco efectiva .

Se compararon los espectros de acción de E. densa (Gráfica 18) obtenido con luz de muy baja intensidad (total 5.55×10^{-5} μ Einsteins $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) con el espectro de acción de Seitz (Gráfica 21) obtenido con una intensidad considerablemente más alta --- (1×10^{-3} μ Einsteins $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) los cuales además se midie - ron utilizando parámetros diferentes , incremento de absorbancia - en nuestro caso , con base en las observaciones realizadas en el presente trabajo y por Benavides (2) , existe una correlación - entre el movimiento orientado de los cloroplastos y la absorban - cia , y en el caso de Seitz , utilizó la ciclósis , la centrifuga - bilidad y la distribución de los cloroplastos . En ambos espec - tros se observaron los máximos de 370 , 480 y 680 nm , actuando - tanto a alta como a baja intensidad de luz prácticamente el mismo

sistema de fotoreceptores . Posiblemente también sea válida en estas condiciones la hipótesis de Seitz en la que propone que el movimiento y orientación de los cloroplastos depende de la disponibilidad y gradientes de ATP intracelular (18) .

A baja intensidad lumínica , se incrementa el suplemento de ATP - por la fosforilación oxidativa y participación de las mitocondrias e incrementa la centrifugabilidad de los cloroplastos y por lo tanto su movimiento ; a mediana intensidad de luz , debido al proceso de reducción del NADP^+ y a la fijación fotosintética de CO_2 , se causa una escasez de ATP y un decremento en la centrifugabilidad de los cloroplastos y finalmente la luz de alta intensidad incrementa de nuevo la disponibilidad de ATP de la fosforilación oxidativa cíclica , causando un incremento en la centrifugabilidad de los cloroplastos (19) .

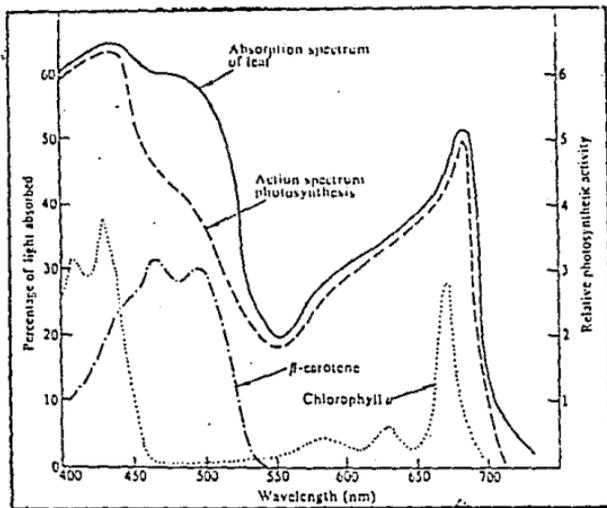
En cuanto al movimiento de los cloroplastos , en todas las longitudes de onda se observó movimiento de estos girando alrededor de la célula , muy lentamente , pero no se alcanzan a agrupar debido a que la intensidad de la luz es muy baja ; aunque se supone que se activa la fosforilación oxidativa , ésto sólo ocurre en la pared periclinal , donde se incrementa la disponibilidad de ATP , - provocando el flujo citoplasmático (19) . Este suplemento de ATP provoca un movimiento orientado de los cloroplastos , de una distribución aleatoria (perístrofe) en la célula , a una distribución alrededor de las paredes .

Benavides (2) observó que cuando la concentración de CO_2 es baja , hay un decremento notable de la absorbancia , mientras que altas concentraciones de CO_2 en el medio conducen al mantenimiento de una alta absorbancia , pero en nuestro caso la absorbancia disminuyó a baja concentración de CO_2 aunque los cloroplastos no hayan adoptado la orientación tardía y continúen en movimiento , ya que el CO_2 se ha agotado .

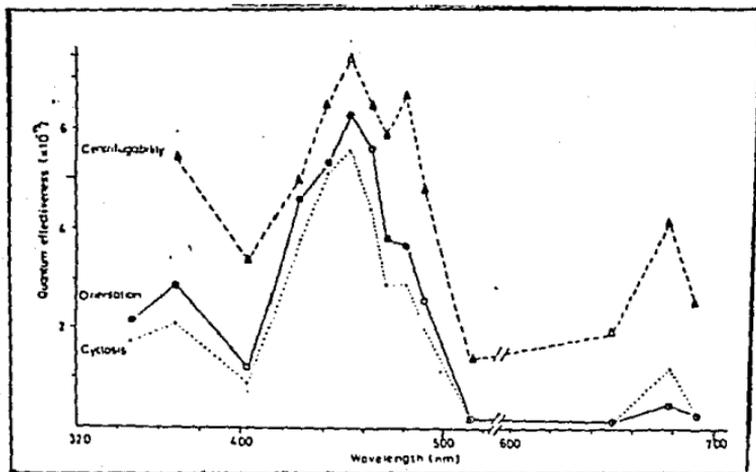
A pesar de que en nuestro caso se trabajó muy por debajo del punto de compensación de luz de E. densa ($9.4 \text{ Einsteins cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) (12) , se observaron cambios importantes en la absorbancia en el espectro de acción de E. densa relacionados con la concentra -

ción de CO_2 , por lo que se puede pensar en que se lleva a cabo la fotosíntesis aunque no en forma completa , ya que no hay liberación de O_2 .

Según Andreson (1) las plantas con poca luz tienen menos unidades del Fotosistema II , que es el encargado de su liberación (7) y este es otro factor que podría estar participando en el proceso .



Gráfica 20 . Espectro de acción de la fotosíntesis , espectro de - absorción de una hoja y pigmentos (20) .



Gráfica 21 . Espectro de acción del movimiento de los cloroplastos en Vallisneria spiralis torta (11) .

CONCLUSIONES

Se llegó a una hipótesis modificada , " la luz de distintas longitudes de onda ocasiona cambios en la absorbancia , observándose tendencias claras para cada longitud de onda , encontrándose los mayores incrementos de absorbancia a 370 , 480 y 660 nm , actuando como fotoreceptores los pigmentos fotosintéticos . Estos cambios van acompañados por el movimiento de los cloroplastos . La magnitud de los incrementos de absorbancia depende de la concentración de CO_2 en el medio , siendo mucho mayores cuando hay alta concentración de ésta sustancia . "

Se puede obtener un espectro de acción a muy bajas energías de irradiación . No obstante la medición de parámetros diferentes , existe cierta similitud entre el espectro de acción obtenido en nuestro caso y el obtenido por Seitz , así como diferencias de importancia entre ambos .

La luz de cualquier longitud de onda entre 340 y 760 nm ocasiona el movimiento de los cloroplastos ; debido a la baja intensidad luminosa utilizada en este trabajo , nunca se alcanza la distribución de racimo . En condiciones elevadas de CO_2 (17.4 mM) ni siquiera se obtiene un máximo de absorbancia definido , aún a tiempos de observación relativamente grandes (45 min) a diferencia de lo observado por Benavides .

Los cambios en la absorbancia a las diferentes longitudes de onda no necesariamente son debidos exclusivamente al movimiento de los cloroplastos , ya que la absorbancia puede depender del estado de asociación de los pigmentos de antena , pero sobre este punto en particular no se tiene ninguna información en ésta tesis . Sin embargo , si hay una correlación entre los movimientos de los cloroplastos , su distribución y la absorbancia (2) .

BIBLIOGRAFIA

- 1) Anderson J. M. , Andersson B. 1988 . The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion . TIBS 13 351 - 355 .
- 2) Benavides V. D. 1986 . Captación de carbono y movimientos orientados de los cloroplastos en Egeria densa Planch . Tesis profesional . Facultad de Ciencias . UNAM 32 p.
- 3) Benavides V. D. , García J. F. , Pérez A. M. C. 1987 . Movimientos de los cloroplastos en Egeria densa Planch . ØYTON 47(½): 95 - 101 .
- 4) Browse J. A. , Dromgoole F. I. , Brown J. M. A. 1979 . Photosynthesis in the aquatic macrophyte Egeria densa III . Gas exchange studies . Aust. J. Plant Physiol. 6 (4) : 499 - 512 .
- 5) Browse J. A. , Brown J. M. A. , Dromgoole F. I. 1980 . Malate synthesis and metabolism during the photosynthesis in Egeria densa Aquat. Bot. 8 (4) : 295 - 305 .
- 6) Dreyer E. M. and Weisenseel M. H. 1979 . Phytochrome mediated uptake of calcium in Mougeotia cells . Planta . 146 : 31 - 36 .
- 7) Hall D. O. and Rao K. K. 1987 . Photosynthesis . 4a. ed. Edward Arnold. Great Britain . 113 p .
- 8) Haupt W. 1982 . Light - mediated movement of chloroplasts. - Ann. Rev. Plant Physiol. 33 : 205 - 233 .
- 9) Haupt W. 1983 . Movement of chloroplasts under the control of light . Progress in Phycological Research . 2 : 228 - 281 .
- 10) Haladay A. S. , Bowes G. 1980 . C₄ acid metabolism and dark fixation in a submersed aquatic macrophyte Hydrilla verticillata Plant Physiol 65 (2) : 331 - 335 .
- 11) Kinne O. 1975 . Marine ecology . Vol.II . Physiological mechanism. Part 2 . John Wiley . Great Britain . 992 p.
- 12) Kirk J. T. 1983 . Light and photosynthesis in aquatic ecosystems . Cambridge Univ. Great Britain . 401 p.
- 13) Leninger A. 1975 . Biochemistry . 2a. ed. Worth. U.S.A. 883p
- 14) Maberly S. C. 1983 . The interdependence of photon irradiance and free carbonate dioxide or bicarbonate concentrations on the

- photosynthetic compensation point of fresh water plants . 93 :
1 - 12 .
- 15) Nultsch W. , Pfau J. 1979 . Occurrence and biological role of
light - induced chromatophore displacements in seaweeds . Mar . -
Biol. 51 : 77 - 82 .
- 16) Nultsch W. , Pfau J. , Ruffer V. 1981 . Do correlation exist
between chromatophore and photosynthetic activity in seaweeds . -
Mar. Biol. 62 : 111 - 117 .
- 17) Roux S. J. , McEntire K. 1981 . Phytochrome induces reversi-
ble calcium fluxes in a purified mitochondrial fraction from oats
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 283 - 287 .
- 18) Seitz K. 1967. Action spectra of phototactic movement of -
chloroplasts , of photodinesis and light dependent viscosity-chan-
ges in Vallisneria spiralis torta . Zpflanzphysiol. B. D. 56 ,
S. 246 - 261 .
- 19) Seitz K. 1971 . Primary process controlling the light - indu-
ced movement of chloroplasts . Acta . Protozool. 11 (26) : 225-
235 .
- 20) Smith H. 1975 . Phytochrome and photomorphogenesis . McGraw-
Hill . Great Britain . 335 p.
- 21) Takagi S. , Nagai R . 1985 . Light - controlled cytoplasmic -
streaming in Vallisneria mesophyll cells. Plant Cell. Physiol. -
26 (5) : 941 - 952 .
- 22) Taylor S. E. , Terry M. 1984 . Limiting factors in photosyn-
thesis . Photochemical supply colimits . Photosynthesis at low -
values of intercellular CO₂ concentration. Plant Physiol. 75 -
(1) : 82 - 86 .