



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BIOGENESIS DE CLOROPLASTOS EN CULTIVO
DE CELULAS DE MAIZ (Zea mays L. Var. VS-22)
EN ENVERDECIMIENTO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

Martin Pedro Vargas Suárez



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 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.

I.	Resumen.	1
II.	Introducción.	3
III.	Antecedentes.	8
	III.1. Vía C ₄ de fijación del carbono.	8
	III.2. Tipos de plantas C ₄ .	8
	III.3. Desarrollo de la anatomía Kranz.	13
	III.4. Biogénesis del cloroplasto.	17
	III.5. Fotosíntesis en Cultivo de Tejidos.	28
IV.	Diseño Experimental.	37
V.	Materiales y Métodos.	43
	V.1. Material Biológico.	43
	V.2. Inducción de callo.	43
	V.3. Resiembra de los callos.	44
	V.4. Sistema A: cultivos "en capa".	47
	V.5. Establecimiento de los cultivos en suspensión.	50
	V.6. Sistema B: cultivos "en placa".	54
	V.7. Cuantificación de clorofilas.	54
	V.8. Cuantificación de proteínas.	55
	V.9. Detección de la presencia de la proteína RUBISCO por dot-blot.	55
	V.10. Medición de la actividad enzimática de la RUBISCO.	57
	V.11. Técnicas histológicas.	58
	V.11.1. Microscopía Óptica.	59
	V.11.2. Microscopía Electrónica.	59

VI.	Resultados.	60
VI.1.	Inducción y mantenimiento del material biológico.	60
VI.2.	Enverdecimiento de los callos.	60
VI.2.1.	Efecto del genotipo en el enverdecimiento de los callos.	64
VI.2.2.	Efecto de la luz en el enverdecimiento de los callos.	64
VI.2.2.1.	Régimen de horas luz.	64
VI.2.2.2.	Intensidad luminosa.	64
VI.2.3.	Efecto de la composición hormonal en el enverdecimiento de callos con brotes y callos sin brotes (sistema A).	65
VI.2.4.	Efecto de la fuente de carbono en el enverdecimiento de callos sin brotes.	68
VI.3.	Cultivos en suspensión.	68
VI.4.	Enverdecimiento de los cultivos "en placa" (sistema B).	73
VI.5.	Medida de parámetros bioquímicos.	74
VI.5.1.	Determinación del contenido de clorofila.	75
VI.5.2.	Detección de la presencia de la proteína RUBISCO.	79
VI.5.3.	Actividad enzimática de la RUBISCO.	84

VI.6. Estudios histológicos de los cultivos enverdecidos.	89
VI.6.1. Callos con brotes.	89
VI.6.2. Callos "en capa" (sistema A).	92
VI.6.3. Cultivos "en placa" (sistema B).	97
VII. Discusión.	102
VIII. Conclusiones.	114
IX. Perspectivas.	115
X. Bibliografía.	117
XI. Apéndice.	129

ABREVIATURAS.

AIA	_____	ácido indolacético.
ANA	_____	ácido naftalenacético.
BAP	_____	bencilaminopurina.
BSA	_____	albúmina de suero de bovino.
C ₃	_____	vía de fijación del C fo- tosintético en el que el primer compuesto estable después de la fijación - del CO ₂ , es un compuesto de 3 carbonos.
C ₄	_____	vía de fijación del C fo- tosintético en el que el primer compuesto estable después de la fijación - del CO ₂ , es un compuesto de 4 carbonos.
CRCF	_____	ciclo de reducción del - carbono fotosintético.
DHAP	_____	dihidroxiacetona fosfato.
DTT	_____	ditiotreitól.
EDTA	_____	ácido etilendinitrilote- tetra acético.
E. M. -NAD	_____	enzima málica dependiente de NAD.
FS I	_____	fotosistema I.

FS II	_____	fotosistema II.
MCP	_____	ácido 2-(2-metil,4-cloro fenoxi)propiónico.
MDH-NADP	_____	malato deshidrogenasa de- pendiente de NADP.
OAA	_____	ácido oxalacético.
PEG	_____	polietilenglicol.
PEP	_____	ácido fosfoenolpirúvico.
PEPCasa	_____	fosfoenolpirúvico carboxilasa.
3-PGA	_____	ác. 3-fosfoglicérico.
PMSF	_____	fluoruro de fenil metil sulfonilo.
PPdk	_____	piruvato fosfato dicinasa.
RUBISCO	_____	ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa.
RuBP	_____	ribulosa-1,5-bifosfato.

I. RESUMEN.

El objetivo fundamental del presente trabajo consistió en inducir el enverdecimiento homogéneo y sincrónico así como el carácter fotomixotrófico en callos de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad VS-22, bajo diferentes condiciones hormonales y de fuente de carbono. Para ello se estableció un modelo consistente en una "capa delgada" de callo, sin la presencia de regiones organogénicas visibles (brotes), colocada sobre la superficie del medio y se evaluó el contenido de clorofilas totales, la proporción de clorofilas a/b, el desarrollo ultraestructural del cloroplasto, la presencia de la proteína RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa) y su actividad enzimática de carboxilación, a los 7 y 12 días de exposición a la luz.

Los resultados mostraron que el medio que contuvo cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm y sacarosa 2% condujo a un mejor desarrollo de la biogénesis del cloroplasto. Aparentemente, el tipo y la concentración del azúcar empleados juegan un papel importante junto con la composición hormonal en la formación de estos plastidios.

El sistema de callo "en capa", por enverdecer homogénea y sincrónicamente, constituyó un modelo útil para estudiar la biogénesis del cloroplasto; sin embargo, se logró un desarrollo que comprendió únicamente sus fases iniciales. De hecho, no se detectó la actividad enzimática esperada de la RUBISCO, sino solamente la presencia de la proteína correspondiente. Se discute la probable causa de esta falla.

De manera secundaria, se trató de establecer un cultivo "en

placa" que involucró la disociación de las células de los callos en un cultivo en suspensión y que posteriormente fueron reorganizadas en un medio sólido como "placa". Este modelo pareció ser útil para realizar estudios de biogénesis del cloroplasto, pero mostró deficiencias metabólicas originadas probablemente desde el establecimiento de los cultivos en suspensión.

II. INTRODUCCION.

Existen dos principales enfoques experimentales para estudiar la biogénesis del cloroplasto. El primero de ellos y el más frecuente consiste en permitir el desarrollo de plántulas en obscuridad completa por varios días sometiéndolas después a iluminación continua (Bradbeer, 1981). El proceso de enverdecimiento que se produce va en paralelo con la formación de los cloroplastos. Sin embargo, en este caso existe el inconveniente de que los cloroplastos surgen de organelos que ya presentan cierto grado de diferenciación: los etioplastos. En el segundo enfoque, las plantas en estudio crecen bajo un régimen determinado de horas luz-obscuridad considerando que aquéllas emergen del suelo bajo condiciones de variación diurna de luz (Leech *et al.*, 1973), por lo cual este constituye un sistema natural del desarrollo del cloroplasto en el que este organelo puede estudiarse desde la etapa de proplastidio aprovechando el gradiente en edad celular que presentan las hojas de plantas monocotiledóneas, de la base a la punta. A pesar de que la vasta información que se ha generado con ambos enfoques es muy interesante, difícilmente permite integrar un esquema completo del desarrollo de la maquinaria fotosintética del cloroplasto, debido a que los reportes existentes provienen de una variabilidad grande de modelos: hojas con caracteres metabólicos de tipo C₃ ó de C₄, diferentes segmentos de hojas (edad de las células) y diferentes condiciones ambientales (Crespo *et al.*, 1979; Robertson y Laetsch, 1974; Bradbeer, 1981).

El cultivo *in vitro* de células vegetales, ya sea en forma de

callo o como cultivo en suspensión, proporciona también otro sistema para el estudio de la biogénesis del cloroplasto, ya que al estar constituido por un conjunto de células desdiferenciadas, puede inducirse su diferenciación bioquímica a través de manipulaciones de factores químicos (hormonas, fuente de carbono) y físicos (luz, calor). Aquí el proceso ocurre a partir de proplastidios por lo cual en este sistema se puede analizar la biogénesis del cloroplasto desde su origen. Además, el modelo permite realizar manipulaciones genéticas en las células y en estos organelos e intentar regenerar plantas transformadas a través del proceso de organogénesis.

Las células de los cultivos fotomixotróficos poseen la capacidad de sintetizar clorofila, desarrollar cloroplastos, y asimilar CO₂, pero su crecimiento sostenido depende del suministro exógeno de azúcares como fuente de carbono (Nagai et al., 1989). Este estado metabólico permanente de los cloroplastos es por lo tanto comparable al de una hoja en desarrollo, hasta el momento en que ésta deja de importar productos fotosintéticos (Turgeon, 1989). En cambio, las células de los cultivos fotoautotróficos, por no requerir de un suministro de fuente de carbono adicional al CO₂ ambiental para poder crecer, mostrarían un estado metabólico semejante al de una hoja madura (Turgeon, 1989).

Es importante resaltar que la mayoría de los cultivos *in vitro* fotoautotróficos que se han estudiado derivan de plantas C₃ (Neumann y Bender, 1987). Probablemente el fracaso en el establecimiento de cultivos fotoautotróficos y el éxito parcial en el de los fotomixotróficos de plantas C₄, se debe en parte a

que el metabolismo del carbono en sus cloroplastos es bastante más complejo en relación al que presentan los cloroplastos de plantas C₃. Es importante considerar también que en los cultivos *in vitro* no existe la presencia de un órgano demandante al que se transloquen los fotosintatos formados, lo cual debe tenerse en cuenta en el equilibrio metabólico que se espera obtener al tratar de establecer cultivos de tipo fotomixotrófico y fotoautotrófico.

Por otra parte, las células que constituyen a los callos tienen la desventaja de recibir los nutrientes y hormonas en forma de gradiente, que se da en mayor concentración en la zona de contacto con el medio de cultivo y disminuye de ahí hacia la superficie del callo. Además, por ser los callos de estructuras irregulares, sus células no enverdecen de manera simultánea cuando son expuestos a la luz. Esto probablemente también se debe a que las células que los constituyen son metabólicamente heterogéneas por lo que su respuesta a inductores de la biogénesis de los cloroplastos no puede ser sincrónica y homogénea.

Dentro de este contexto y en base a la importancia de lograr un cultivo *in vitro* de maíz, planta de metabolismo tipo C₄, que permita el estudio de la diferenciación y desarrollo de cloroplastos desde su origen, en el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos generales:

1. Lograr la obtención de un cultivo *in vitro* homogéneo de células de maíz, de grosor y superficie uniformes, que enverdezca sincrónicamente y que adquiera el carácter fotomixotrófico.

2. Aportar conocimiento acerca de los eventos bioquímicos que ocurren durante el proceso de biogénesis del cloroplasto en este sistema.

Como objetivos particulares se establecieron los siguientes:

1. Establecer un modelo de cultivo *in vitro* de callos de maíz, en forma de una "capa delgada" uniforme, sobre la superficie del medio sólido (sistema A).

2. Determinar en los cultivos del sistema A, el efecto de los siguientes factores sobre el enverdecimiento sincrónico y el proceso de biogénesis del cloroplasto: tipo de hormonas, luz (intensidad luminosa) y fuente de carbono.

3. Estudiar los siguientes parámetros durante el proceso de diferenciación del cloroplasto, en el sistema A:

- a) el contenido de clorofilas totales.
- b) la relación cuantitativa de las clorofilas a/b.
- c) la presencia de la proteína RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa).
- d) la actividad de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa.
- e) la ultraestructura del cloroplasto en desarrollo.

4. Establecer un modelo de cultivo *in vitro* de células de maíz, más homogéneas en tamaño que el sistema A, proveniente

de células disociadas en cultivo en suspensión y colocadas en forma de "placa" sobre la superficie del medio sólido (sistema B), para su eventual utilización en estudios de enverdecimiento.

III. ANTECEDENTES.

III.1. Vía C₄ de fijación del carbono.

Hasta el año de 1966 se sabía que la vía por la cual el bióxido de carbono era fijado e incorporado en azúcares en todos los organismos fotosintéticos, era la vía del "Ciclo de Calvin" o "Ciclo de Reducción del Carbono Fotosintético" (C₃CRF) y a las plantas que en ellas ocurría se les llamó plantas C₃ (Robinson y Walker, 1981). Sin embargo, después de ciertos estudios se llegó a la formulación de una nueva vía de fijación, la vía C₄, en la cual el CO₂ queda primero incorporado en un ácido de cuatro carbonos y subsecuentemente en el C₃ del 3-fosfoglicerato, como sucede en el C₃CRF (Hatch *et al.*, 1967).

La vía C₄ de fijación del carbono consiste en tres pasos principales los cuales ocurren en dos tipos de células y en más de un compartimiento celular: 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 del haz vascular y donación del CO₂, con algunas diferencias en los patrones de descarboxilación según la especie y c) fijación a través del ciclo C₃CRF en el cloroplasto de las células del haz vascular (Edwards y Huber, 1981). La relación entre ambas vías de fijación en plantas C₄ se muestra en la figura 1.

III.2. Tipos de plantas C₄.

Existen tres grupos basados en los diferentes mecanismos de descarboxilación que actúan sobre los ácidos de 4 carbonos formados en las células del mesófilo (Hatch *et al.*, 1975).

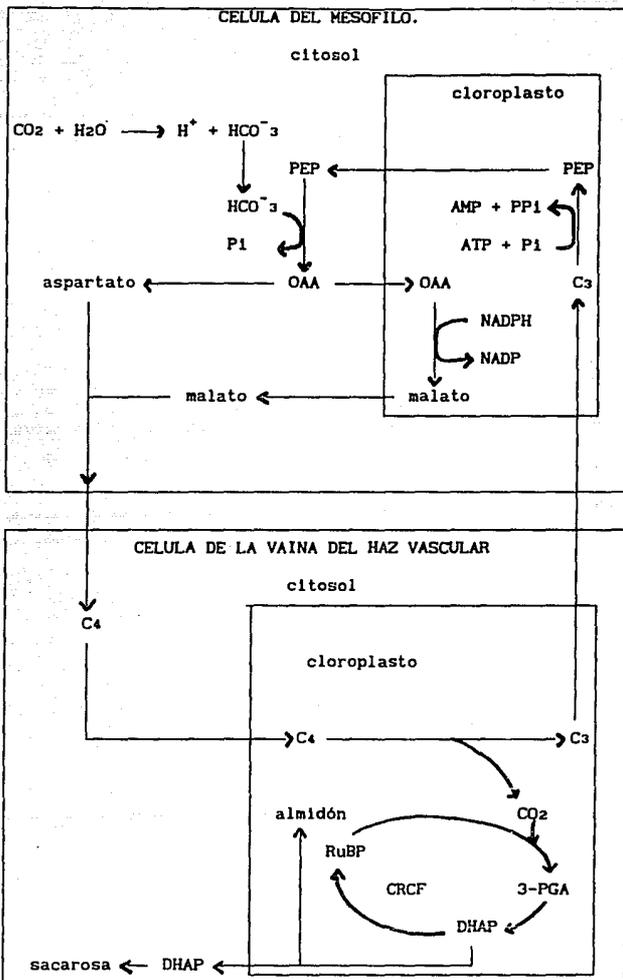


Figura 1. Esquema simplificado del flujo de carbono en el ciclo C_4 de fijación del CO_2 . (Modificado de Edwards y Huber, 1981).

a) Tipo enzima málica dependiente de NADP (E.M.-NADP). En este grupo de especies C₄, el malato se forma en las células del mesófilo y se transporta hacia las células de la vaina del haz vascular en cuyos cloroplastos se descarboxila por una enzima málica dependiente de NADP. En esta reacción se crea un poder reductor (NADPH) y el CO₂ que también se forma, 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 figura 2.

A este tipo pertenecen, entre otras, las siguientes especies: *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum* y *Digitaria sanguinalis*, algunas de las cuales han recibido particular atención por su importancia agrícola (Hatch et al., 1975).

b) Tipo enzima málica dependiente de NAD (E.M.-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 y este se descarboxila por una enzima málica dependiente de NAD. El CO₂ pasa de la mitocondria al cloroplasto y el piruvato sale de ella al citoplasma y regresa al mesófilo como alanina. Esto se muestra en la figura 3. *Panicum miliaceum*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus retroflexus* y *Atriplex spongiosa* son algunos de los representantes de este tipo de plantas C₄ (Hatch et al., 1975).

c) Tipo fosfoenolpiruvato-carboxicinas (PEP-CK). Como las

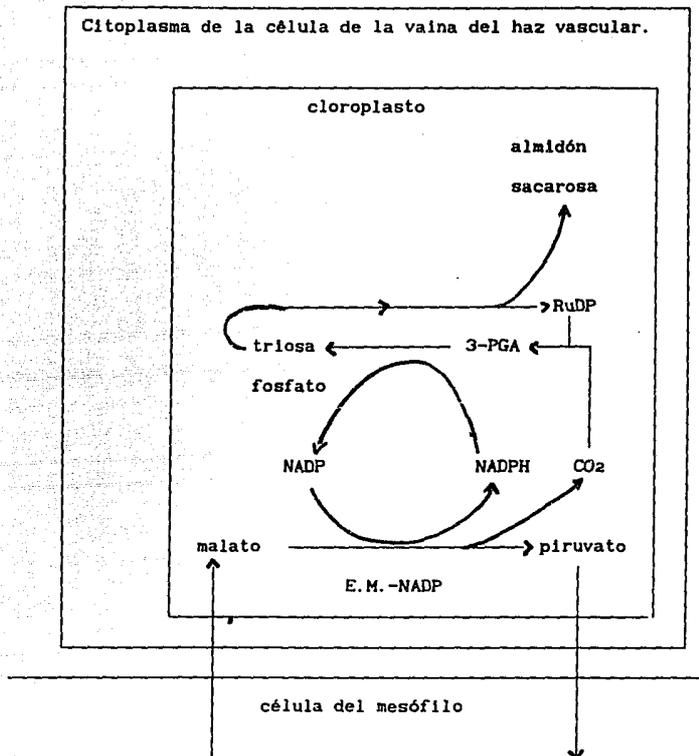


Figura 2. Reacciones de la vía C₄ de la fotosíntesis, en las células de la vaina del haz vascular en especies C₄ del subgrupo enzima málica dependiente de NADP ("tipo E.M.-NADP). Fuente: Hatch *et al.*, 1975.

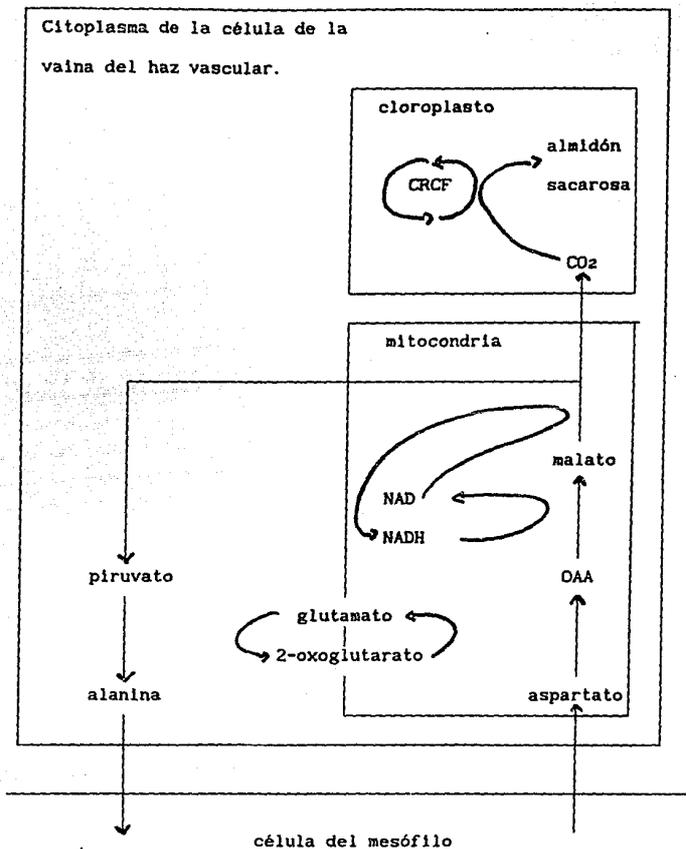


Figura 3. Reacciones de la vía C₄ de la fotosíntesis, de las células de la vaina del haz vascular en especies C₄ del subgrupo enzima málica dependiente de NAD ("tipo E.M.-NAD"). Fuente: Hatch et al., 1975).

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 fosfoenol piruvato-carboxicinas a expensas de ATP y el CO₂ difunde al cloroplasto. Aquí también es la alanina la que sale de las células para regenerar PEP en la vaina, como se aprecia en la figura 4. Algunas de las especies de este tipo de plantas son: *Panicum maximum*, *Chloris gayana* y *Sporobolus fimbriatus* (Hatch et al., 1975).

III.3. Desarrollo de la anatomía Kranz.

En plantas C₄ monocotiledóneas y dicotiledóneas, el sistema vascular es una red alrededor de la cual dos tipos de células fotosintéticas están arregladas en un patrón conocido como anatomía Kranz que consiste en una o dos capas de células que rodean al haz vascular (células de la vaina del haz vascular) las que a su vez están rodeadas por otra capa de células, las del mesófilo (Laetsch, 1974). Como las hojas de las plantas C₄ están muy vascularizadas, sus venas están frecuentemente separadas por tan sólo cuatro células fotosintéticas: contiguas a las venas, se encuentran las células de la vaina y, entre éstas, dos células del mesófilo. Además, pueden existir espacios intercelulares (Brown, 1975).

Las células de la vaina del haz vascular tienden a ser cilíndricas, grandes, de pared gruesa, acumulan almidón y tienen numerosos cloroplastos los cuales pueden presentar una distribución centrífuga, centrípeta o uniforme en el citoplasma en

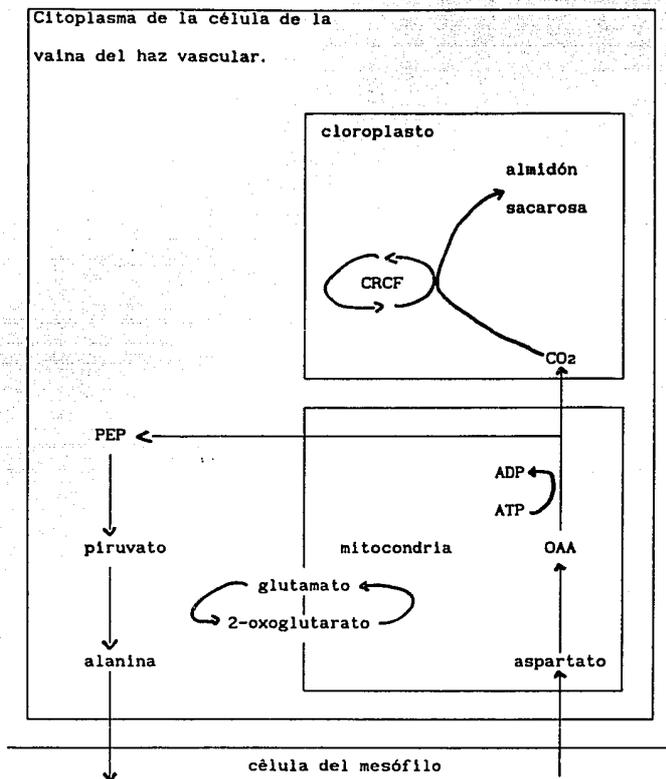


Figura 4. Reacciones de la vía C₄ de la fotosíntesis, en las células de la vaina del haz vascular en especies C₄ del subgrupo fosfoenol piruvato carboxicinasa ("tipo PEP-CK"). Fuente: Hatch et al., 1975.

relación a las venas contiguas de las células en que se encuentran. En las plantas del tipo E.M.-NADP se encuentran orientados centrifugamente y son agranales, en las del tipo E.M.-NAD, centripetamente y, en las del tipo PEP-CK, distribuidos por todo el citoplasma. Se desconoce la importancia de tales arreglos. Las células del mesófilo son similares en apariencia a las células del clorénquima de plantas C₃ con abundantes cloroplastos granales y generalmente sin almidón. En general, existe un menor número de células de la vaina que de células del mesófilo (Laetsch, 1974; Brown, 1975). La figura 5 muestra la anatomía Kranz.

Las hojas de las plantas C₄ son órganos que derivan de dos (monocotiledóneas) o tres capas (dicotiledóneas) más externas del meristemo apical del tallo. Las divisiones celulares en el primordio foliar son primariamente anticlinales, de manera que las células resultantes de la capa más externa (L1) del ápice, forman la epidermis de la hoja en tanto que las células resultantes de las capas subsuperficiales (L2 y L3) forman el mesófilo, a partir del cual surgen los meristemas del procámbium que originarán al sistema vascular (Nelson y Langdale, 1989). Existen datos que involucran a los reguladores del crecimiento, particularmente particularmente auxinas, en la diferenciación vascular pero se sabe muy poco acerca del inicio de las divisiones celulares localizadas que dan a las venas una posición discreta (Aloni, 1987). Las células derivadas de la capa L1 que forman la epidermis, generan "células acompañantes" fotosintéticas pero también pueden dividirse periclinalmente y generar células que se diferencien como células fotosintéticas del mesófilo

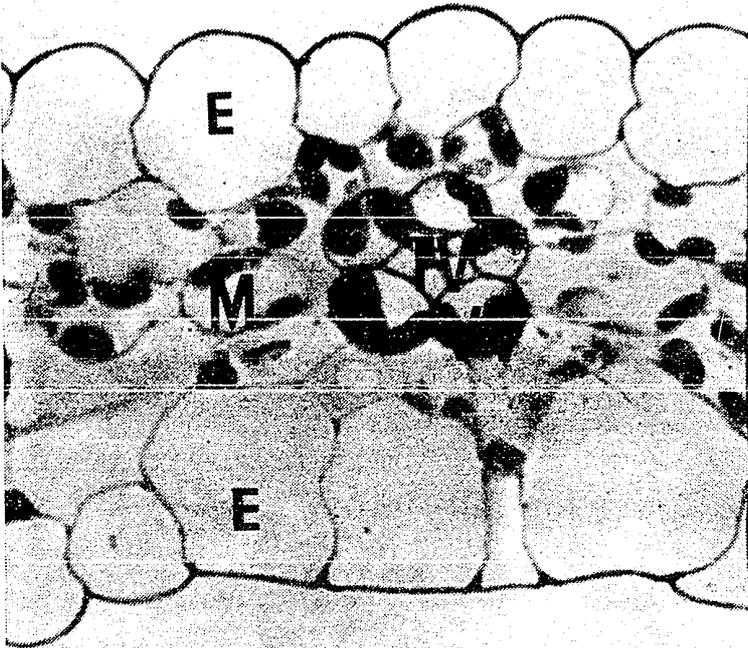


Figura 5. Fotomicrografía al microscopio de luz (1397 X) mostrando la anatomía Kranz de una hoja de *Pennisetum americanum*, planta C₄, en sección transversal. (E) epidermis, (TV) tejido vascular, (VV) células de la vaina del haz vascular, (M) células del mesófilo. Tomado de: Black *et al.*, 1987.

(Nelson y Langdale, 1989).

Las células de la vaina vascular pueden surgir de divisiones en el procámbium o de divisiones en el mesófilo. En el caso de las plantas del tipo E.M.-NADP, éstas tienen siempre una sola vaina rodeando al haz y parece que se derivan del procámbium, mientras que las plantas del tipo E.M.-NAD y PEP-CK exhiben una doble vaina. La vaina interna, la cual no es fotosintética, deriva del procámbium pero la externa que sí es fotosintética, deriva de las células del mesófilo (Nelson y Langdale, 1989).

III.4. Biogénesis del cloroplasto.

El conocimiento actual de la biogénesis del cloroplasto ha derivado de dos modelos experimentales. En el primero, las plántulas crecen en condiciones de obscuridad por varios días y después son irradiadas continuamente con lo cual se provoca su enverdecimiento y formación de cloroplastos. No obstante, cuando se aplica la luz el proceso parte de un organelo con cierto grado de diferenciación: el etioplasto (Bradbeer, 1981). En cambio, en el segundo modelo la biogénesis del cloroplasto se estudia a partir de organelos no diferenciados: los proplastidios, ya que en este caso las plantas se desarrollan en condiciones de variación luz/obscuridad y esto representa una situación que refleja con mayor fidelidad los procesos que ocurren de manera natural en la hoja (Leech *et al*, 1973).

En monocotiledóneas, el meristemo basal genera filas de células que permanecen alineadas de la base de la hoja a la punta. La diferenciación celular procede en una dirección basipétala. Las células localizadas hacia la punta son las más maduras y contienen

cloroplastos fotosintéticamente desarrollados por completo, mientras que las células localizadas hacia la región basal, presentan y cloroplastos en estadios tempranos del desarrollo (Miranda, 1981).

En las células de los meristemos foliares los plastidios existen en la forma de proplastidios que son organelos esféricos no diferenciados de 0.5-1.0 μm de diámetro y que normalmente tienen un origen materno durante la formación del cigoto. Prácticamente no tienen membranas internas aunque sí bajas cantidades de DNA, RNA, ribosomas y proteínas solubles (Mullet, 1988).

Utilizando la segunda hoja de plantas de maíz (Leech et al., 1973) se observó que entre los 0.4 cm a partir de la base, existen proplastidios con diferentes grados de complejidad. Justo en la base, sus perfiles son de 1.5 a 2.0 μm de largo y 0.5 a 1.2 μm de ancho. La mayoría tiene un pequeño cuerpo prolamelar y unos pocos grana con uno o dos compartimientos. Entre los 2 y 4 cm de la base de la hoja, los proplastidios miden aproximadamente el doble en longitud y ancho en relación a su conformación inicial. Aunque los cuerpos prolamelares siguen estando presentes, ahora son más pequeños y varios grana presentan de cuatro a seis compartimientos. Además, en esta región los plastidios se empiezan a dividir. En una zona distal (5-6 cm a partir de la base) la diferenciación en cloroplastos granales del mesófilo y agranales de la vaina del haz vascular, toma lugar. Ambos tipos de plastidios son similares en forma y tamaño con un ancho de alrededor de 2 μm y cerca de 4 μm de largo. Ya en la sección de la punta de la hoja, todos los cloroplastos están más grandes

que en la sección precedente. Los cloroplastos del mesófilo son más complejos en estructura y composición granal ocurriendo lo contrario en los de la vaina del haz, que ahora están muy elongados y con forma de cono en los extremos.

Durante el crecimiento de la hoja en la obscuridad (Bradbeer, 1981), los proplastidios se transforman en etioplastos, cuyos rasgos prominentes son los cuerpos prolamelares que consisten en una rejilla regular de túbulos; éstos contienen lípidos y proteínas que son reserva de materiales para la formación de los tilacoides. Los túbulos del cuerpo prolamelar están conectados a un número de protilacoides perforados. Los etioplastos de maíz son dimórficos (Ruffer-Turner *et al.*, 1984). Los del haz de la vaina contienen varios cuerpos prolamelares y los protilacoides están orientados como haces paralelos; en contraste, los de las células del mesófilo contienen cuerpos prolamelares grandes ubicados en el centro con los protilacoides orientados irregularmente.

Al transferir las plántulas crecidas en obscuridad a iluminación continua (Bradbeer, 1981), los cuerpos prolamelares pierden su apariencia regular cristalina y rápidamente pierden su volumen aumentando las membranas de los tilacoides. En los cloroplastos de la vaina del haz la formación *de novo* de tilacoides se completa entre las 12 y 24 horas después del comienzo de la iluminación, en tanto que para las del mesófilo hasta las 72 horas. Estas respuestas se han observado al crecer plántulas de maíz en la obscuridad por 14 días y luego iluminarlas con luz fluorescente ($63 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$). Bajo estas condiciones también se observa que los cloroplastos de la vaina del haz

vascular son casi completamente agranales en tanto que los del mesófilo son granales (Ruffer-Turner *et al.*, 1984).

En cebada (Robertson y Laetsch, 1974), durante la transición de etioplasto a cloroplasto, como en la transición de proplastidio a cloroplasto, también ocurre un aumento en el tamaño y número de plastidios, independientemente del grado de desarrollo del etioplasto. El aumento puede ir de 10 proplastidios en células meristemáticas a 65 cloroplastos en células maduras del mesófilo. Además, parece que el número de cloroplastos por célula aumenta proporcionalmente con incrementos en el tamaño de ésta, ocupando una proporción constante de la misma.

Se ha señalado que el incremento en volumen de los proplastidios puede ser de más de cien veces y en células maduras del mesófilo los cloroplastos pueden explicar un gran porcentaje del volumen citoplásmico. El aumento de volumen en los plastidios provendría de la acumulación de proteínas, lípidos y cofactores requeridos para la fotosíntesis y derivados de un número de vías biosintéticas activadas durante la biogénesis del cloroplasto. En monocotiledóneas, en general, el aumento del volumen de los cloroplastos sigue una cinética sigmoide que al final decae durante la senescencia de la hoja (Mullet, 1988).

Existe un gran número de macromoléculas que se sintetizan y acumulan durante la biogénesis del cloroplasto, las cuales intervienen en las reacciones oscuras o en las luminosas de la fotosíntesis. Mayfield y Taylor (1984) analizaron la aparición de proteínas relacionadas con los eventos fotoquímicos de la fotosíntesis en la tercera hoja en desarrollo de maíz crecido bajo fotoperiodo y encontraron que las proteínas del complejo

proteína-clorofila cosechador de luz del FS II, las proteínas del FS I que se unen a las clorofilas, la subunidad *alfa* del factor 1 de acoplamiento de la ATPasa, la plastocianina y la ferredoxina-NADP reductasa, están presentes en la base de la hoja, es decir en los proplastidios y se acumulan rápidamente en las células de las zonas media y distal de la hoja (cloroplastos en desarrollo). Ya que las clorofilas a y b también mostraron el patrón anterior de aparición a lo largo de la hoja, los autores sugirieron que ambos fotosistemas y fotofosforilación estarían activos desde la fase de proplastidio. De hecho se sabe (Downton y Pyliotis, 1971) que durante el desarrollo temprano de la hoja de maíz crecido en fotoperiodo, ambos tipos de cloroplastos presentan actividad de FS II y que aproximadamente a los cuatro días de edad, ésta desaparece concomitantemente con la pérdida de grana en los cloroplastos en la vaina del haz vascular. Mientras que los tilacoides de los cloroplastos de las células del mesófilo tienen todas las proteínas y pigmentos necesarios para el funcionamiento del transporte de electrones fotosintético y de la fotofosforilación, los tilacoides de los cloroplastos de la vaina del haz contienen el complemento total del FS I y citocromo f, pero son deficientes en FS II, el complejo asociado LHCP y el citocromo b₅₅₉ (Woo et al., 1970).

Konis et al (citado por Ruffer-Turner et al., 1984) describieron que en hojas de maíz en enverdecimiento, el desarrollo del FS I no está relacionado con la velocidad de síntesis de clorofila en tanto que el desarrollo del FS II se reduce cuando la síntesis de clorofila se inhibe. La proporción de actividades de FS I a FS II en cloroplastos de la vaina del haz

vascular fue de 95 y tan sólo de 6 en cloroplastos del mesófilo. Analizando la aparición de clorofilas también en maíz en enverdecimiento, Horváth et al (revisado en Ruffer-Turner et al., 1984) encontraron que la acumulación de clorofila total se detiene más pronto y a concentraciones más bajas en cloroplastos de la vaina que en cloroplastos del mesófilo; además, los primeros tienen una proporción de clorofila a/b mayor a 5 y los segundos una proporción cercana a 3.

Baker y Leech (1977) encontraron actividad de ambos fotosistemas en la sección basal de la primera hoja de maíz, en condiciones de fotoperíodo. Sus resultados indican que el aparato cosechador de luz se va haciendo más eficiente durante el desarrollo del plastidio debido a un incremento en el tamaño de las unidades fotosintéticas. También encontraron que el desarrollo del FS I se completa antes que el del FS II y que la capacidad de desprendimiento de O₂ durante la biogénesis del cloroplasto puede correlacionarse con una fusión incrementada de los tilacoides.

Experimentos en plantas etioladas corroboraron la última afirmación. Robertson y Laetsch (1974) determinaron que en hojas de cebada transferidas de la obscuridad a la luz, las regiones más jóvenes requieren periodos más largos de iluminación a fin de iniciar el desprendimiento de O₂ y que las regiones más maduras de la hoja, tienen una capacidad fotosintética mayor a cualquier tiempo de iluminación. Como en el trabajo anterior, se encontró que la oxidación del agua para producir O₂ se correlaciona con la cantidad de tilacoides empalmados.

Diferentes estudios a nivel molecular han originado conocimientos que permiten entender porqué determinadas actividades fotosintéticas surgen en tiempos definidos. Liveanu *et al* (1986) demostraron que los tres polipéptidos extrínsecos del FS II relacionados con el desprendimiento de O₂ están presentes en hojas etioladas de espinaca en cantidades relativamente altas, en tanto que otros tres polipéptidos (34,33 y 32 kDa) también relacionados con el FS II, están ausentes y que el tejido necesita más de seis horas de iluminación para que estas proteínas aparezcan. De manera interesante, se observó una correlación entre el inicio de la actividad de desprendimiento de O₂ y la acumulación dependiente de luz de los polipéptidos arriba mencionados (Liveanu *et al.*, 1986).

Se sabe (Henningsen y Boardman, 1973) que algunos componentes del sistema de transporte de electrones fotosintético tales como citocromo b₅₅₉_{LP}, citocromo b₆, citocromo f y plastocianina, están presentes en etioplastos y que su nivel aumenta con la luz, especialmente el de la plastocianina. Sin embargo, otros componentes como el complejo clorofila-proteína P700 y el citocromo b₅₅₉_{HP} se forman después de la iluminación. Los componentes inducidos por la luz se ensamblan junto con los que existen desde el periodo oscuro para formar el sistema de transporte de electrones completo, durante el enverdecimiento. En el caso de la cebada (Ohashi *et al.*, 1989) durante la transición etioplasto-cloroplasto, la actividad del FS I aparece primero que la del FS II y está asociada a la producción del complejo proteína-clorofila P700. A las dos horas de iniciada la iluminación, la ferredoxina se reduce por el FS I y sólo hasta las

cuatro horas el NADPH puede formarse. Este último proceso está relacionado con la aparición de una alta actividad de ferredoxina NADP reductasa y acumulación de las clorofilas a y b así como con una poza funcional de plastoquinona (considerada como la molécula que une la actividad de ambos fotosistemas).

Aunque Grebanier *et al* (1978) y Klein y Mullet (1986) no trataron de relacionar la presencia de ciertas proteínas con alguna función fotosintética, sus resultados son relevantes en el sentido de describir qué moléculas ya están sintetizadas en etioplastos y cuáles se sintetizan durante el enverdecimiento de la hoja. Analizando fracciones membranales, los primeros identificaron 25 bandas de polipéptidos provenientes de cuerpos prolamelares y protilacoides de etioplastos. Sin embargo, los tilacoides de los cloroplastos presentaron 23 de las 25 bandas anteriores más otras 6 bandas cuya síntesis es dependiente de luz. Entre éstas últimas hay 3 que corresponden al complejo LHCP. En realidad, sus respectivos RNAs están presentes en hojas etioladas aunque en bajas cantidades (Thompson *et al.*, 1983) siendo la luz lo que aumenta la actividad de su transcripción.

En etioplastos de cebada (Klein y Mullet, 1986) como en los de maíz (Rodermel y Bogorad, 1985) se han identificado bandas proteicas como las subunidades *alfa* y *beta* de la ATPasa de cloroplastos; sin embargo, están ausentes dos proteínas del FS II (47 y 43 kDa) y dos del FS I (68 y 65 kDa) así como otras proteínas de peso molecular de 32, 23 y 21 kDa. En los cloroplastos de maíz las proteínas que se unen a la clorofila del FS I se sintetizan como consecuencia de una transcripción estimulada por la luz, pero en cebada se sintetizan sin que ocurra un aumento

paralelo en los transcritos correspondientes, indicando una regulación postranscripcional. La formación de clorofila a partir de protoclorofilida, en cambio, sí aumenta paralelamente con los cambios en cantidad de dichas proteínas. Por lo tanto, parece que existe una síntesis concertada entre los componentes del complejo proteína-clorofila del FS I. Este modo de regulación es apoyado por los resultados de Martineau y Taylor (1985). Ellos analizaron la expresión de diferentes genes que codifican para proteínas relacionadas con la fotosíntesis. Encontraron que la acumulación de las proteínas del complejo LHCP no era paralela con la aparición de sus respectivos RNA_m. De hecho, en la base de la hoja de maíz, existen estos RNA_m asociados a polirribosomas y los polipéptidos no están presentes, indicando que hay una inhibición traduccional o un alto recambio de las proteínas.

En otro estudio con cebada (Krupinska y Apel, 1989) se encontró que la síntesis, dependiente de luz, de diferentes proteínas codificadas en el genoma de cloroplasto no ocurrió debido a un aumento en la transcripción de los genes que las codifican. Esto confirma diferentes modos de regulación de la expresión génica involucrados en el control dependiente de luz de la transformación etioplasto-cloroplasto.

Otro de los aspectos arduamente investigados durante la biogénesis del cloroplasto, ha sido la aparición de enzimas relacionadas con las vías C₃ y C₄ de fijación del carbono. Estudios con hojas completas (Crespo, et al, 1979) demostraron que la aparición de las enzimas de la vía C₄ varió en las hojas 1 a 5 de plántulas de maíz. La hoja 1 fue más C₃ mientras que la hoja 5 fue completamente C₄. Moore et al (1986)

mostraron que el uso de los esquemas C4 y C3 varió de hojas jóvenes a hojas maduras y a hojas senescentes de la misma planta. Miranda et al (1981) indicaron que la vía C4 aparece a un tiempo consistente con la madurez de la anatomía Kranz y sugirieron que el uso exclusivo de la vía C3 puede ocurrir previo a la diferenciación completa de dicha anatomía y de la vía C4.

Explotando el gradiente de edad que se da durante el desarrollo de hojas de plantas monocotiledóneas, Mayfield y Taylor (1984) establecieron que en el tejido basal de la tercera hoja de maíz no existe todavía la capacidad de fijar el CO₂ porque ni la PEPCasa ni la RuBPCasa están presentes, además de que no se detectaron estomas funcionales. Sin embargo estas dos enzimas, así como la piruvato dicinasa, fueron detectadas en una posición de la hoja donde la anatomía Kranz es evidente y los estomas funcionales. En contraposición, Dean y Leech (1982) y Viro y Kloppstech (1980) reportaron respectivamente que en trigo y cebada, plantas C3, la RuBPCasa está a niveles relativamente altos en la sección basal, pero Martineau y Taylor (1985) reportaron que los RNA_m de la PEPCasa y de ambas subunidades de las RuBPCasa están presentes desde la base de la hoja de maíz y que sólo el aumento de la PEPCasa es paralelo al aumento de su RNA_m respectivo. Cuando el nivel de las subunidades de la RuBPCasa es bajo, sus respectivos RNA_m ya son muy altos, lo que sugiere un control postranscripcional de éstos.

Otra observación interesante a partir de estudios *in situ* es que la expresión del sistema C4 se concentra cerca de las venas. Langdale et al (1988a) observaron que al utilizar una variedad de tipos de hojas de maíz con anatomía Kranz pero con diferentes

distancias que separaban sus venas, el desarrollo C₄ se dió en todas las hojas utilizadas, pero que más allá de un cierto radio de varias células, las células del mesófilo desarrollaron un esquema C₃. Las células del mesófilo más distantes expresan los genes de la RuBPCasa y el complejo LHCP, mientras que las células del mesófilo próximas a la vena expresan la PEPCasa, la piruvato dicinasa y la malato deshidrogenasa dependiente de NADP.

La expresión de la vía C₄ depende de la luz. En plantas de maíz crecidas en la obscuridad, se encuentran bajos niveles de RNA_m que codifican para proteínas fotosintéticas y cuyo nivel aumenta varias veces al ser iluminadas (Sheen y Bogorad, 1985). En el caso de la RuBPCasa, ésta se acumula en células de la vaina del haz y en células del mesófilo en condiciones de obscuridad, pero en condiciones de iluminación su acumulación está restringida a las primeras.

Utilizando las vainas que envuelven la mazorca del maíz (Langdale *et al.*, 1988b) las cuales presentan venas muy espaciadas se pudo concluir que la intensidad luminosa afecta la síntesis de proteínas fotosintéticas de acuerdo a la distancia que guardan las células en relación a las venas. En bajas intensidades luminosas, la RuBPCasa se acumula en las células del mesófilo y en las células de la vaina del haz vascular, mientras que las enzimas características de la vía C₄ están ausentes. En altas intensidades luminosas, la expresión de la RuBPCasa en las células del mesófilo se suprime en tanto que la PEPCasa, la malato deshidrogenasa dependiente de NADP, la piruvato dicinasa y la E.M.-NAD se expresan abundantemente. La PEPCasa y la malato deshidrogenasa se localizan

exclusivamente en las células del mesófilo. La piruvato dicinasa se encuentra predominantemente en las células del mesófilo y la E.M.-NAD, exclusivamente en las células de la vaina del haz vascular.

Un estudio reciente (Ngerpratsiri *et al*, 1989) mostró que un nuevo componente de un probable control de múltiples factores en la regulación diferencial de la expresión génica de la fotosíntesis C₄ en células de la vaina del haz y células del mesófilo, puede ser la metilación selectiva tanto del DNA nuclear como del de cloroplasto. Se destacó que existe una correlación inversa entre la abundancia relativa de los transcritos de genes específicos de la fotosíntesis C₄ en los dos tipos celulares durante el enverdecimiento de hojas de maíz y el estado de metilación correspondiente a las regiones del DNA nuclear y del de cloroplasto que contienen a estos genes específicos.

Al mismo tiempo que todas las enzimas anteriores van acumulándose, como sucede con los componentes de los tilacoides, la captación neta de CO₂ va aumentando a partir de las 12 horas de iluminación, en el caso de plántulas de maíz etioladas, hasta alcanzar un máximo a las 96 horas (Ruffer-Turner *et al*, 1984).

III.5. Fotosíntesis en Cultivo de Tejidos.

Los estudios realizados para analizar diferentes aspectos de la estructura y función de los cloroplastos han hecho uso de dos modelos experimentales: los cultivos fotomixotróficos y los fotoautotróficos. Los primeros se caracterizan por formar cloroplastos, sintetizar clorofila y fijar CO₂, pero su supervivencia depende de la adición de una fuente carbonada

(comúnmente sacarosa) al medio de cultivo. Los cultivos fotoautotróficos se diferencian de los fotomixotróficos en que pueden sobrevivir aun sin la adición de alguna fuente carbonada orgánica, aunque muchos requieren de una atmósfera enriquecida de CO₂ (aproximadamente 2 a 5%) (Nagai et al., 1989 y La Rosa et al., 1984).

La mayoría de las investigaciones se han trabajado con cultivos en suspensión de plantas C₃, habiéndose logrado establecer muy pocos cultivos fotoautotróficos. Generalmente los resultados están referidos a la actividad de fijación de ¹⁴CO₂, patrones de marcaje en productos de fijación por ¹⁴CO₂ y actividad de la PEPCasa y RUBISCO, mientras que muy pocos han considerado la estructura de los cloroplastos y/o la anatomía Kranz (Neumann y Bender, 1987).

Una característica general tanto de los cultivos fotomixotróficos como de los fotoautotróficos es que presentan una alta actividad de PEPCasa, particularmente durante la fase exponencial de la curva de crecimiento. Nato y Mathieu (1978) reportaron un aumento en la velocidad de asimilación de CO₂, de 200 a 800 $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ fijado} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso seco} \cdot \text{h}^{-1}$ y luego una caída a 200 μmoles , en cultivos en suspensión de células fotomixotróficas de *Nicotiana tabacum* lo cual fue la consecuencia de un aumento primero y una disminución después en la síntesis de la enzima. Sato et al (1980) encontraron que la actividad de PEPCasa en tabaco y *Cytisus scoparius* fue bastante cercana e idéntica, respectivamente, al comparar cultivos mixotróficos con cultivos autotróficos.

La actividad de la PEPCasa se ha podido evidenciar de manera indirecta también. En el trabajo anterior de Sato et al (1980) se indicó que del 100% del ^{14}C fijado en 10 minutos los cultivos fotoautotróficos incorporaron el 44% en compuestos ácidos de 4 carbonos, mientras que los fotomixotróficos el 41%, siendo ambos porcentajes mayores a los que se encuentran en plantas C_3 (Slack y Hatch, 1967). Sin embargo, Nishida et al (1980) encontraron una relación inversa: el porcentaje de ^{14}C en compuestos de 4 carbonos en la luz y por 5 minutos fue de 24% para células autotróficas y 40% para células heterotróficas, de la fijación total. El malato se marcó en un 29% de la fijación total en células mixotróficas y tan sólo en un 15% en cultivos autotróficos en condiciones de luz durante los 5 minutos de fijación de CO_2 . En este caso, también la incorporación de ^{14}C es alta en células en cultivo en relación a plantas intactas. En tabaco (Ongun y Stocking, 1965) el malato se marca en un 1.5% durante los primeros 10 minutos de fotosíntesis, en arroz (Nishida, 1962) en un 1.7% en los primeros 3 minutos y en *Chlorella* en 3.5% en los 2 primeros minutos (Holm-Hansen et al., 1959).

No obstante que la sorprendente actividad de PEPCasa en cultivo de células verdes podría sugerir un metabolismo C_4 , Yamada et al (1982) mostraron que estos productos de fijación por la PEPCasa no parecen ser usados como una fuente de carbono para el ciclo de Calvin; además, Sato et al (citado por Neumann y Bender, 1987) caracterizaron la PEPCasa presente en cultivos de tabaco, la cual resultó ser del tipo de las plantas C_3 con una K_m (PEP) de 60 μM comparada con 1000 μM para la PEPCasa de plantas C_4 . Neumann y Bender (1987) han concebido la carboxilación del PEP como una

reacción anaplerótica que proporciona esqueletos carbonados para una biosíntesis acelerada durante la división celular activa (fase exponencial). Resulta interesante saber que en las regiones meristemáticas de la base de las hojas en desarrollo de trigo y tabaco, la PEPCasa tiene una participación mayor que en las áreas maduras. Posiblemente una alta actividad de PEPCasa sea una característica general de células en división activa para satisfacer una alta demanda de la maquinaria biosintética. (Aoyagi y Bassham, 1986b).

Las células verdes de tabaco en cultivo también incorporan ^{14}C en compuestos de 3 carbonos por mediación de la actividad de la RUBISCO (Nishida *et al.*, 1980). El ciclo de Calvin operó tanto en células fotoautotróficas como fotomixotróficas. En ambos tipos de células el PGA y azúcares fosfatados se marcaron rápidamente seguidos por el marcaje del producto fotosintético final, la sacarosa. El glicolato y la serina/glicina también se marcaron, indicando actividad de RuBP-oxigenasa. No obstante, el porcentaje de marca para cada compuesto fue mucho menor que el obtenido con la planta intacta de tabaco, lo cual refleja una baja actividad de RUBISCO.

Los cambios detectados en células de cultivo para la RUBISCO han sido mucho menos pronunciados. Nato y Mathieu (1978) detectaron variaciones entre sólo 90 y 140 $\mu\text{moles CO}_2 \text{ fijado} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco $\cdot \text{h}^{-1}$ a lo largo del ciclo de crecimiento y un incremento en la síntesis de la enzima al término del mismo. Durante la fase exponencial la relación de actividades PEPCasa/RUBISCO reportada como $\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína soluble fue de 6.77 en tanto que en la fase estacionaria fue de 1.8

Aunque reportaron la actividad como $\mu\text{moles CO}_2.\text{mg}^{-1}$ clorofila⁻¹.h, Sato *et al* (1980) obtuvieron una mayor actividad de PEPCasa que de RUBISCO: 3.6 y 4.5 para cultivos fotomixotróficos y fotoautotróficos, respectivamente, de células de tabaco en fase estacionaria. Estas proporciones fueron resultado de una actividad muy alta de PEPCasa pero también de una actividad bajísima de RUBISCO (aproximadamente 1/10 de la actividad encontrada en extractos de hojas de plantas C₃). Sin embargo, Nato y Mathieu (1978) demostraron que en tabaco la actividad y también la concentración de RUBISCO disminuyen al mismo tiempo que la concentración y actividad de la PEPCasa aumentan durante el crecimiento exponencial pero que en la transición de esta fase a la estacionaria ocurre un aumento en la actividad de la enzima debido a su síntesis *de novo*, paralelo a la disminución en concentración y actividad de PEPCasa, aunque se desconocen los mecanismos regulatorios de esta relación inversa entre las dos enzimas descarboxilantes.

Los cultivos fotomixotróficos y los fotoautotróficos de tabaco fijan ¹⁴CO₂ en fase estacionaria a una velocidad constante durante los primeros 10 minutos; su velocidad de fijación total de ¹⁴CO₂ fue muy semejante: 7.3 y 6.4 $\mu\text{moles/g}^{-1}$ peso fresco.⁻¹.h, respectivamente. Sin embargo, en base al parámetro clorofila, los cultivos fotomixotróficos fijan el ¹⁴CO₂ a una velocidad de 94.5 $\mu\text{moles CO}_2.\text{mg}^{-1}$ clorofila.h⁻¹ en tanto que los fotoautotróficos lo hacen a una velocidad de 132 $\mu\text{moles CO}_2.\text{mg}^{-1}$ clorofila.h⁻¹, a pesar de haber sintetizado menor cantidad de clorofila.g⁻¹ peso fresco que los primeros (Nishida *et al.*,1980). Además, la

velocidad de fijación de CO₂ por las células fotoautotróficas fue similar a la de las células del mesófilo de hojas de *Papaver somniferum* (Paul y Bassham, 1977).

Sato et al (1980) indicaron que la velocidad de fijación de las células fotoautotróficas fue tan sólo de 64 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{clorofila} \cdot \text{h}^{-1}$ y de 62.3 la de las células fotomixotróficas. En un cultivo autotrófico de soya, establecido por Horn et al (1983) el valor máximo fue de 92 y se alcanzó al día 12 de crecimiento. No obstante, dado que hasta la fecha este cultivo parece ser el que más clorofila ha sintetizado (alrededor de 450 $\mu\text{g clorofila} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco) los $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ fijado} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso fresco} \cdot \text{h}^{-1}$ son tan altos como 400, lo que contrasta con los 6.4 fijados por células fotoautotróficas de tabaco.

Independientemente de qué metabolismo fotosintético esté ocurriendo en estos cultivos de plantas C₃, es importante resaltar que, como lo señalaron Brangeon y Nato (1981), las células en cultivo *in vitro* de plantas C₃ son capaces de expresar su potencial para la diferenciación.

Varias de las denominadas plantas C₄ tienen una gran importancia agronómica y, desafortunadamente, sólo un escaso número de investigadores ha analizado la biogénesis de estos cloroplastos en cultivo de callos en enverdecimiento, a pesar de que ello proporciona información valiosa y fundamental (Nelson y Langdale, 1989).

Los primeros estudios con callos de plantas C₄ postularon la existencia tanto de la vía C₃ como de la C₄, a juzgar por los

patrones de marcaje con ^{14}C de los primeros productos de fijación del CO_2 (Kennedy *et al.*, 1977; Usuda *et al.*, 1971). En ninguna de las especies se detectó la presencia de la anatomía Kranz ni de cloroplastos dimórficos, por lo que esta característica anatómica se consideró no indispensable para exhibir la vía C_4 . Los cloroplastos observados fueron semejantes a los de las células del mesófilo de las especies en cuestión. Sin embargo, recientemente Kumar *et al.* (1989) detectaron actividad de PEPCasa y de RUBISCO en callos de maíz originados del meristemo apical y señalaron que estas actividades fueron semejantes a las encontradas en las porciones basales de las hojas jóvenes de las mismas plantas, por lo cual es una evidencia de que al menos por lo que a la actividad de enzimas fijadoras de CO_2 se refiere, el callo no exhibiría claramente un metabolismo C_4 . Además, utilizando otra planta C_4 , Seení y Gnanam (1983) descubrieron que los principales productos primarios de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ fueron PGA y azúcares fosfatados y que los cloroplastos formados en este callo fueron del tipo mesófilo pero atípicos.

Se ha señalado (Edwards y Walker, 1983) que los criterios para establecer el funcionamiento completo de la fotosíntesis C_4 incluyen la formación del malato o aspartato como productos primarios de la fijación del CO_2 fotosintético, presencia de anatomía Kranz y presencia y actividad de enzimas específicas del metabolismo C_4 . Los trabajos arriba citados carecieron de este último criterio.

Aoyagi y Bassham (1986 a) analizaron cada uno de los parámetros anteriores en callo blanco, callo verde y brotes regenerados de callo embriogénico de maíz. Los callos blancos

acumularon PEPCasa y piruvato dicinasa pero no RUBISCO, por lo que los productos primarios de fijación de CO₂ fueron los esperados para un sistema activo de *B*-carboxilación. Los callos verdes acumularon PEPCasa, piruvato dicinasa y RUBISCO. En este caso se marcaron ácidos de 4 carbonos y también azúcares fosfatados y PGA. Sin embargo, no se detectó actividad de E.M.-NADP por lo que la conversión de ácidos de 4 carbonos a CO₂ y piruvato en estos cloroplastos fue improbable. Además, la piruvato dicinasa de callos blancos y verdes no pareció ser la forma activa de cloroplasto y ninguno desarrolló anatomía Kranz.

En los brotes más viejos, en comparación con los jóvenes, se detectó mayor actividad de PEPCasa pero ningún transporte intercelular C₄, lo cual sería el resultado de un desarrollo morfológico desordenado y lento hacia la anatomía Kranz y de una carencia del correcto arreglo de los cloroplastos en las células semejantes a las de la vaina del haz vascular. Debido a lo anterior y considerando que el origen de las células que conforman la vaina del haz vascular reside en el procámbium Nelson y Langdale, 1989), significa que para que en los callos pueda existir la anatomía Kranz y un dimorfismo estructural-funcional de cloroplastos, deberían existir meristemas provasculares los cuales se diferenciarían en células de la vaina del haz vascular y an tejido vascular. Por lo tanto, resultaría poco probable inducir la formación de la anatomía Kranz y de los dos tipos de cloroplastos característicos de las plantas C₄ en callos que no estén experimentando un proceso organogénico.

En contraste a lo esperado, Solís et al (1989), al estudiar la biogénesis del cloroplasto en callos de maíz, encontraron

que se formaron dos tipos de cloroplastos después de 10 días de iluminación continua: uno con abundantes grana y otro con muy pocos, similares a los cloroplastos de las células del haz vascular, sin que los callos hubieran desarrollado la anatomía Kranz. Sin embargo, se desconoce el metabolismo del carbonó fotosintético que estos cloroplastos llevan a cabo. Además, al cabo de dos semanas, sólo se encontraron cloroplastos del mesófilo, mismos que presentaron indicios de senescencia. Por otra parte, el contenido de clorofila total aumentó así como la relación de clorofilas a/b, alcanzando un valor máximo de alrededor de 3 en el día 15. La proporción reportada para estas clorofilas en hojas completas de plantas C₄ es cercana a 4 y de 3 para cloroplastos del mesófilo. Curiosamente, a partir del día 10 y hasta el 22, la actividad de transporte de electrones fue aumentando. Por consiguiente, no existió correlación alguna entre los eventos bioquímicos y los ultraestructurales ocurridos en aquellos cloroplastos. Roy y Kumar (1989) obtuvieron resultados similares en cuanto a la ultraestructura de los cloroplastos formados también en callos de maíz.

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.

A fin de poder conocer algunos cambios bioquímicos y ultraestructurales durante la biogénesis del cloroplasto en cultivo *in vitro*, se establecieron dos modelos experimentales: uno manipulando el callo como tal, adquiriendo una forma de "capa delgada" (sistema A) y otro en el que se formó una "placa" con las células de los cultivos en suspensión, derivados de la disgregación de los callos (sistema B). En ambos modelos el material biológico utilizado fue maíz (*Zea mays*, L.) de la variedad VS-22, que se adquirió de PRONASE (Productora Nacional de Semillas).

IV.1. Sistema A: callos "en capa".

Este modelo consistió en hacer, de un callo completo sin formaciones organogénicas, una "capa delgada" del mismo, sobre la superficie del medio sólido. El manipular el callo de esta manera tiene dos ventajas: permite disminuir el gradiente celular en cuanto a disponibilidad de nutrientes y hormonas, por un lado y, por otro, deja al callo constituido por células que tienen aparentemente una capacidad escasa, pero semejante, de generar cloroplastos. Esta afirmación se basa en lo reportado en la literatura, en cuanto a que sólo se formaron zonas verdes en regiones de los callos de maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1989) y de avena (Nabors *et al.*, 1982) que se encontraban en proceso de organogénesis.

La obtención de cultivos *in vitro* fotoautotróficos depende básicamente de los factores: tipo y relación de hormonas (Yamada

et al., 1978), fuente de carbono (La Rosa et al., 1984) y presencia o ausencia de luz (Gillot et al., 1991). Estudios con plántulas etioladas muestran que la luz puede tener dos efectos sobre el desarrollo del cloroplasto; a) presentar ciertas fases, dependiendo de si las plántulas son iluminadas de manera continua o de acuerdo a un fotoperiodo (Leech et al., 1973); b) variación estructural-funcional de acuerdo a la intensidad luminosa (Bradbeer, 1981).

Además, en los cultivos *in vitro* en general, se sabe que la respuesta de una especie a estímulos morfogénicos depende del genotipo (George y Sherrington, 1984). Esto es aún más notorio para el caso de maíz (Duncan et al., 1985).

Por ello, se juzgó conveniente en primer lugar, tratar de enverdecer callos de maíz de la variedad VS-22 que es una variedad propia de los Valles Altos de México y comparar su respuesta en relación a la biogénesis del cloroplasto, con la de callos de maíz de la variedad Tuxpeño, variedad propia del trópico húmedo, la cual ya ha sido descrita (Solís et al., 1989). Posteriormente se analizó la influencia de algunas combinaciones hormonales en los callos. Para este efecto se decidió usar AIA, cinetina y BAP que son fitorreguladores que inducen el enverdecimiento (Solís et al., 1989; Horn et al., 1983; Sánchez de Jiménez et al., 1989).

Por otra parte, se consideró de utilidad aplicar, sobre la superficie de los callos, una intensidad luminosa relativamente baja ($90 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$) y contrastar sus efectos con los de una intensidad ligeramente mayor ($150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$). Una intensidad luminosa semejante a esta última, ha

inducido el desarrollo de cloroplastos en cultivos de soya (Gillot et al.,1991). Asimismo, se resolvió examinar la importancia de la duración del periodo de horas luz, por lo cual en una serie de experimentos se aplicó luz continua, mientras que en otro se aplicó un régimen de 16 h. luz/8 h. oscuridad.

Para evaluar la influencia de la sacarosa, se diseñaron dos tipos de experimentos; uno en el que la concentración de la sacarosa se redujera y al mismo tiempo se compensara la fuente carbonada con un aumento equimolar de lactosa y ,otro, en el que simplemente se disminuyera la concentración de la sacarosa, sin añadir otro azúcar como compensador. Esto se fundamenta en el hecho de que sin acumulación de clorofilas los proplastidios no pueden diferenciarse en cloroplastos (Harpster y Apel,1985) y la síntesis de clorofila puede ser suprimida por la sacarosa (Pamplin y Chapman,1975). Además, en un estudio con protoplastos de maíz (Sheen,1990), se encontró que de una serie de metabolitos, la lactosa fue uno de los que menos inhibieron la transcripción de ciertos promotores de genes que codifican para proteínas fotosintéticas.

Los parámetros a medir serían: contenido de clorofila total, relación de clorofilas a/b, presencia de la proteína RUBISCO, actividad enzimática de esta proteína. Además se planeó visualizar en paralelo los efectos del enverdecimiento sobre la ultraestructura del cloroplasto en desarrollo. Las evaluaciones se realizarían a los 7 y 12 días de iluminación, ya que la biogénesis del cloroplasto en cultivos *in vitro*, toma aproximadamente dos semanas (Solís et al.,1989; Gillot et al.,1991). Por otra parte se consideró necesario examinar la presencia de

plastidios en general y de la proteína RUBISCO en un grupo de callos blancos, para precisar el estadio de diferenciación a partir del cual ocurriría la biogénesis del cloroplasto.

Los callos están constituidos por tipos heterogéneos de células: peridermis, cámbium vascular y nódulos meristemáticos; éstos últimos dan origen a células parenquimatosas y a zonas embriogénicas y organogénicas (Yeoman y Aitchison, 1973). El enverdecimiento preferencial de estas zonas es común cuando los callos se exponen a la luz (dos Santos *et al.*, 1980; Heyser y Nabors, 1982; Nabors *et al.*, 1982; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988).

Los callos inducidos a partir de embriones maduros de maíz de la variedad VS-22 presentan células de tipo meristemático, zonas organogénicas y zonas embriogénicas, dependiendo de los medios de resiembra utilizados; además, la consistencia de los callos es friable (García, 1991), característica que facilita la manipulación de los mismos.

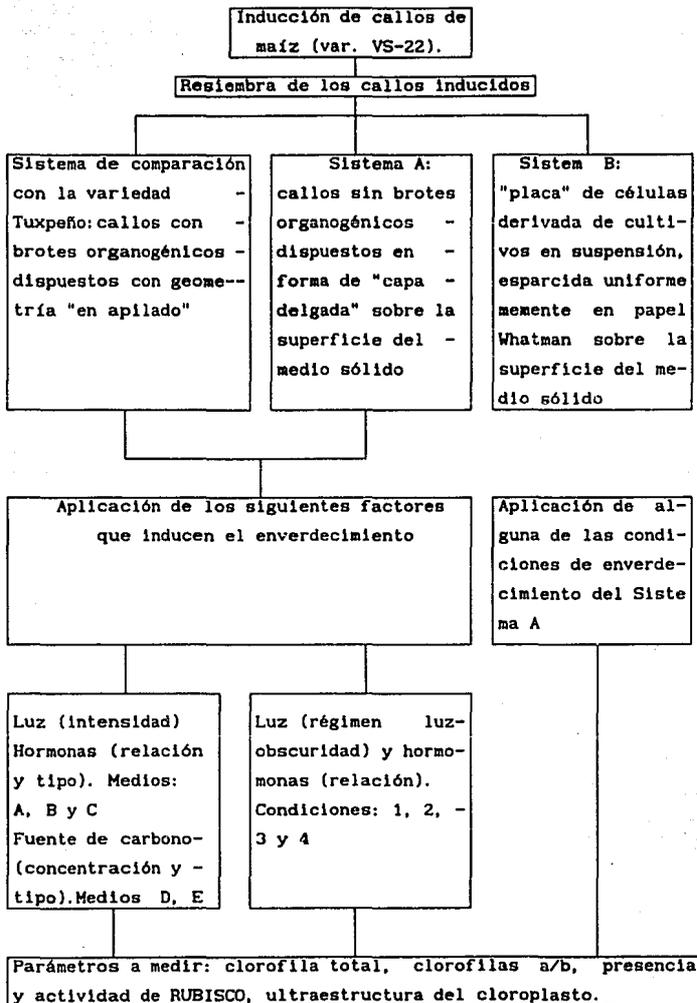
Con base a esta información, se esperaría que al trabajar con callos de maíz de la variedad VS-22, a los cuales se les hayan eliminado las zonas organogénicas y embriogénicas visibles, se pudiera lograr el establecimiento de un cultivo homogéneo tipo "capa delgada" uniforme, en el que las células constitutivas tendrían una capacidad escasa, pero semejante, de responder a los factores que inducen el enverdecimiento y estarían forzadas a responder sincrónicamente a los mismos, con lo cual se lograría su carácter fotomixotrófico, lo cual podría aportar conocimiento acerca de ciertos eventos que se dan durante la biogénesis del cloroplasto en este sistema.

IV.2. Sistema B: cultivos "en placa".

En caso de obtener resultados positivos en los callos del sistema A, se planearía realizar un experimento piloto en el cual se estudiaría la respuesta a inductores del enverdecimiento, en los cultivos "en placa" (Horsch *et al.*,1980), derivados de los cultivos en suspensión que se habrían establecido en base a la disociación de las células de los callos, en medio líquido con agitación.

Se considera que el establecimiento de un cultivo "en placa" es factible lograr por tres razones: a) se han podido establecer cultivos en suspensión de células de maíz a partir de los callos respectivos de diferentes variedades (Prioli y Sondhal,1989; Shillito *et al.*,1989; Gordon-Kamm *et al.*,1990); b) la presencia de conglomerados grandes de células puede ser eliminada a través del uso de mallas de abertura definida (Prioli y Sondhal,1989); c) se han colocado células de *Datura innoxia* provenientes de cultivos en suspensión, como "capa fina", sobre un disco de papel filtro, sin que su crecimiento se vea afectado (Horsch *et al.*,1980).

DIAGRAMA DE FLUJO.



V. MATERIALES Y METODOS.

V.1. Material Biológico.

Se trabajó con semillas de maíz, *Zea mays*, L. variedad VS-22, obtenidas de Productora Nacional de Semillas (PRONASE). Las semillas se almacenaron en bolsas de manta con Ca (Cl)₂ como deshidratante, en la obscuridad a 15°C.

Preparación de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones stock basadas en el medio de Murashige-Skoog (1962) con las modificaciones indicadas en el Apéndice. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 con KOH 0.5 N o con HCl 0.5 N y posteriormente se aforaron al volumen deseado. La solución stock de AIA y BAP se prepararon cada vez que se utilizaron. Después de aforados, a los medios que fueron sólidos se les añadió agar y se calentó hasta disolverlo completamente. Una vez vaciados los medios a frascos o a matraces, se esterilizaron en una autoclave a 1.6 Kg.cm⁻² durante 15 minutos.

V.2. Inducción de callo.

Los embriones de las semillas maduras de maíz se disectaron manualmente de uno a tres días antes de su siembra, manteniéndolos a 15°C hasta su uso. Antes de sembrar los embriones, éstos se esterilizaron con 50 ml de una solución de hipoclorito de sodio que contuvo una concentración final de 0.66% de cloro activo, durante 11 minutos, en matraces Erlen-Meyer estériles de 250 ml, conteniendo dos gotas de Tween 20, con 100 embriones por matraz. Después se enjuagaron cuatro veces con agua estéril y

posteriormente se sembraron en frascos Gerber a razón de 4 embriones por frasco, conteniendo cada uno 20 ml de medio sólido de inducción. Se probaron diferentes medios de inducción con el objeto de generar una gran cantidad de callo desde el inicio (ver Apéndice). Tanto el medio N₆ (Chu *et al.*, 1975) como el R₄ (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1989) se han utilizado para inducir callo en maíz. Los embriones sembrados se incubaron durante tres semanas en la oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

V.3. Resiembra de los callos.

Los callos inducidos durante el lapso de las 3 semanas en los diferentes medios de inducción, se resembraron cada 14 días en diferentes medios sólidos (ver apéndice) y se incubaron en la oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Dichos medios tuvieron una composición idéntica en sales, vitaminas y complejos orgánicos que los medios de inducción respectivos, pero diferente en contenido de hormonas.

Con el objeto de definir el protocolo de resiembra de los callos que serían enverdecidos, se realizó una prueba piloto consistente en inducir el callo de maíz en medio R₄, resembrarlo en medio R (MCPP 1 ppm, con y sin prolina 9 mM) y transferirlo a una serie de medios de enverdecimiento utilizando las hormonas ANA y BAP. Los resultados negativos de esta prueba nos orientaron a adoptar posteriormente el siguiente protocolo(A): inducción de callo en medio R con MCPP 2 ppm evitando así una concentración relativamente alta de esta auxina en el sistema desde el inicio, el cual por tratarse de un compuesto análogo al 2,4-D (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981), hormona que inhibe el enverdecimiento (Nagai *et al.*, 1989), podría tener efectos semejantes a ésta;

primera resiembra en medio R con MCPP 1 ppm, AIA 1 ppm y cinetina 0.01 ppm y segunda resiembra en medio R con MCPP 0.5 ppm, AIA 10 ppm y cinetina 0.01 ppm. Lo anterior derivó de considerar que la transferencia de los callos a los medios de enverdecimiento debería ser gradual por lo que a composición hormonal se refería, mismos que contuvieron AIA 10 ppm y cinetina 0.1 ppm o AIA 10 ppm y BAP 0.3 ppm., ya que dentro de las citocininas, además del BAP, la cinetina (Brangeon y Nato, 1981) también se ha utilizado aunque menos frecuentemente en medios de enverdecimiento. Además, ésta última combinación de hormonas tuvo éxito en el enverdecimiento de callos de la variedad Tuxpeño de maíz (Solís *et al.*, 1989).

Las variedades Tuxpeño y VS-22 de maíz son originarias de un hábitat diferente. Se ha apreciado que el genotipo de los materiales biológicos influye sobre la respuesta de morfogénesis *in vitro* (George y Sherrington, 1984; Duncan *et al.*, 1985); por esto, aunque los callos de la variedad Tuxpeño enverdecen cuando son iluminados (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988), ello no garantiza la misma respuesta para los callos de la variedad VS-22. Para estudiar la dependencia de la respuesta de enverdecimiento con respecto al genotipo, se comparó la respuesta que tuvieron los callos de la variedad Tuxpeño (Solís *et al.*, 1989) con la de un grupo de callos de la variedad VS-22, que se incubó bajo iluminación continua, en el medio utilizado para enverdecer los callos de la variedad Tuxpeño: AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, sacarosa 2% y manitol 1%, éste para igualar la presión osmótica que se origina en los medios de cultivo cuando contienen sacarosa 3%

(condición 1).

En la mayoría de los estudios relativos a la biogénesis del cloroplasto, tanto en plántulas etioladas como en cultivos *in vitro*, el material biológico se irradia continuamente (Krupinska y Apel, 1989; Gillot *et al.*, 1991); sin embargo, el modelo que se acercaría más a las condiciones naturales, debería considerar el ciclo diurno de luz. Por esto, otro grupo de callos de la variedad VS-22 del mismo lote que el anterior, se incubó en un medio de igual composición, excepto que se manejó un ciclo de 16 h luz/8 h obscuridad (condición 2).

Simultáneamente a la realización de los experimentos relativos al efecto del genotipo, se investigó en otro grupo de callos de ese mismo lote, cuál sería la respuesta de enverdecimiento cuando se incubaran en un medio con una relación de auxina/citocinina tres veces mayor que la utilizada en aquéllos, esto es: AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm, bajo iluminación continua (condición 3) y fotoperiodo (condición 4). Esta nueva relación de hormonas también fue probada en el trabajo de Solís *et al.* (1989), aunque con menor éxito que la primera.

Por otra parte, se aplicó un segundo protocolo (B) a callos de la variedad VS-22 más simple que el protocolo (A) en el que los callos se indujeron en medio R con MCPP 2 ppm y luego se transfirieron directamente al medio de enverdecimiento R con MCPP 0.25 ppm, similarmente a lo reportado (de Fossard, 1976). En los protocolos A y B descritos, los callos al ser incubados en la luz, siempre tuvieron una disposición geométrica "en apilado" la cual debió propiciar diferencias en relación a la disponibilidad de nutrientes y hormonas en

distintas zonas del callo. Por esta razón se repitió el protocolo A con la diferencia de que en este caso el callo permaneció con una disposición geométrica "en capa".

En todos los casos anteriores, los callos transferidos en la última resiembra, fueron callos que presentaron zonas organogénicas sobre su superficie, condición bajo la cual el enverdecimiento ocurre principal pero asincrónicamente en los brotes, provocando una situación de coexistencia de zonas diferenciadas con callos blancos y zonas intermedias en proceso de diferenciación. Esto dificulta grandemente la realización de estudios metabólicos en esos materiales y exige la conveniencia de desarrollar otro sistema. Sin embargo, se consideró conveniente realizar los experimentos señalados con anterioridad ya que permitirían definir los medios de resiembra para intentar lograr con mayor probabilidad de éxito el enverdecimiento homogéneo en los cultivos de maíz desprovistos de zonas organogénicas.

V.4. Sistema A: cultivos "en capa".

El establecimiento del sistema A se logró de la siguiente manera: en el primer subcultivo, cada callo fue transferido junto con su escutelo como una sola "unidad" a fin de asegurar el crecimiento de aquél. En este primer subcultivo se inocularon entre 4 y 6 "unidades" dependiendo de su tamaño por cada tubo de vidrio (15 cm X 2.3 cm), conteniendo 8 ml de medio sólido. En el segundo subcultivo se eliminó el escutelo al igual que aquellas regiones no sanas del callo y las organogénicas. Cuando fue necesario, en la tercera resiembra se descartaron nuevamente las secciones no sanas o vascularizadas de los callos.

La resiembra de los callos así manipulados para adoptar una disposición geométrica "en capa" durante el periodo de exposición a la luz, se hizo en cajas Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 50 ml de alguno de los medios de enverdecimiento ensayados (ver más adelante) sobre los cuales se colocaron una malla de nylon primero y un papel Whatman No.2 después, ambos de 4.8 cm de diámetro. Antes de esterilizarse, los dos soportes se lavaron con agua desionizada y con los medios líquidos respectivos durante 30 minutos. El inóculo se presionó ligeramente contra el medio y se extendió cuidadosamente tratando de hacer una capa compacta, uniforme en altura que ocupara el máximo de superficie sobre el papel. Finalmente se añadió 1 ml de medio de enverdecimiento estéril a cada caja para conservar un microambiente húmedo y lograr un contacto continuo del medio con el papel soporte del callo.

Los cultivos se incubaron durante 7 y 12 días con un fotoperiodo de 16 h luz bajo una intensidad luminosa de $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y $27 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura o de $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y $27 \pm 1^\circ\text{C}$, según el experimento realizado.

En los cultivos del sistema A se manipularon tres factores de los cuales depende la respuesta de enverdecimiento: composición hormonal (Yamada et al., 1978), luz (Gillot et al., 1991) y fuente de carbono (La Rosa et al., 1984). Primeramente se decidió analizar la importancia de la composición hormonal del medio de enverdecimiento, sobre el desarrollo uniforme de tono verdoso, en los cultivos "en capa" expuestos a un fotoperiodo de 16 h luz e intensidad luminosa de $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$, para lo cual se procedió como se indica en el esquema 1. Los medio de

ESQUEMA 1. PROTOCOLO DE INDUCCION Y RESIEMBRA DE CALLOS
DE MAIZ (var. VS-22) EN MEDIOS CON DIFERENTE COMPOSICION DE
HORMONAS (SISTEMA A).

Medio de Inducción.			
R2: MCPP 2 ppm, sacarosa 3%			
Medios de Resiembra.			
1 ^a			
MCPP (ppm)	1	1	1
AIA (ppm)	1	-	-
Cinetina (ppm)	0.01	0.01	0.01
Sacarosa (%)	3	3	3
2 ^a			
MCPP (ppm)	0.50	0.50	0.50
AIA (ppm)	10.00	10.00	10.00
Cinetina (ppm)	0.01	0.01	0.01
Sacarosa (%)	3	3	3
Medios de Enverdecimiento.			
3 ^a			
	(A)	(B)	(C)
AIA (ppm)	10.00	-	-
Cinetina (ppm)	0.10	0.10	0.10
BAP (ppm)	-	-	0.10
Sacarosa (%)	3	3	3

Los callos fueron mantenidos en la obscuridad durante la inducción y las dos primeras resiembras; en la tercera resiembra los callos se expusieron a un régimen de fotoperiodo de 16 h luz., por 7 y 12 días.

enverdecimiento contuvieron sacarosa 3% y las siguientes combinaciones de hormonas: AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm (medio A); cinetina 0.1 ppm (medio B); cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm (medio C).

En segundo lugar se investigó la influencia de dos intensidades luminosas incidentes en los callos incubados en el medio de enverdecimiento cuya composición hormonal fue AIA 10 ppm y cinetina 0.1 ppm con sacarosa 3% como fuente de carbono. Las intensidades luminosas fueron 90 y 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y se midieron utilizando un "Quantum" LI-185B (LI-COR, inc.).

Finalmente se estudió el efecto de la fuente carbonada sobre el desarrollo de color verde en callos resembrados en los medios que contuvieron: sacarosa 1%, lactosa 2%, AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm (medio D); sacarosa 2%, cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm (medio E) (ver esquema 2). En realidad los grupos control de estos callos incubados en los medios D y E fueron, respectivamente, los callos incubados en los medios A y C los cuales contuvieron sacarosa 3%.

V.5. Establecimiento de los cultivos en suspensión.

Para saber si se podría establecer un modelo de estudio tipo "placa" que proviniera de células en cultivo en suspensión (sistema B) para su eventual utilización en el estudio de la inducción del enverdecimiento y de la biogénesis del cloroplasto, fue necesario establecer primeramente un cultivo en suspensión de células de maíz, derivado de los callos ya establecidos.

Para lograr el establecimiento de ese cultivo, el callo inducido en medio R₂ se resembró de manera similar al protocolo A

ESQUEMA 2. PROTOCOLO DE INDUCCION Y RESEMBRA DE CALLOS DE MAIZ (var VS-22) EN MEDIOS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO (SISTEMA A).

Medio de Inducción.		
R2: MCPP 2 ppm, sacarosa 3%		
Medios de Resiembra.		
1 ^a		
MCPP (ppm)	1	1
AIA (ppm)	1	-
Cinetina (ppm)	0.01	0.01
Sacarosa (%)	2	3
Lactosa (%)	1	-
2 ^a		
MCPP (ppm)	0.50	0.50
AIA (ppm)	10.00	-
Cinetina (ppm)	0.01	0.01
Sacarosa (%)	1.5	2
Lactosa (%)	1.5	-
Medios de enverdecimiento.		
3 ^a		
	(D)	(E)
AIA (ppm)	10.00	-
Cinetina (ppm)	0.10	0.10
BAP (ppm)	-	0.10
Sacarosa (%)	1	2
Lactosa (%)	2	-

Los callos se expusieron a un régimen de fotoperiodo de 16 h luz durante 7 y 12 días en la tercera resiembra.

(ver esquema 3). La razón de no haber disminuído el MCPP de igual manera en este protocolo que en el protocolo A, estribó en que ello redundaría en un mayor crecimiento del callo del cual se requiere una gran cantidad para obtener los cultivos en suspensión.

La disgregación de los callos se llevó a cabo en matraces Erlen-Meyer de 500 ml con 100 ml de medio líquido Ro.5 (MCP 0.5 ppm, AIA 10 ppm, cinetina 0.01 ppm) y 19 g de callo. Los cultivos se incubaron en la obscuridad a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con agitación rotatoria de 110 rpm durante una semana. Al cabo de este tiempo los cultivos se filtraron por separado a través de una malla de acero inoxidable de 380 μm de apertura de malla y se dejó que cada uno de ellos se sedimentara, después de lo cual los sobrenadantes se decantaron dejando sólo una película muy delgada de medio para no eliminar las células; éstas se resuspendieron en medio líquido fresco Ro.5 utilizando 20 ml por cada dos paquetes de sedimento. Los cultivos en suspensión así establecidos se desarrollaron en matraces Erlen-Meyer de 125 ml con un volumen final aproximado de 25 ml cada uno y se incubaron en la obscuridad a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con agitación rotatoria de 110 rpm durante una semana.

Los cultivos anteriores se resembraron una única ocasión procediendo de la manera siguiente: el contenido total de cada matraz se vertió en uno solo de 500 ml, se dejó sedimentar y el sobrenadante se decantó dejando únicamente 50 ml de medio; luego se agitaron suavemente los cultivos para obtener una suspensión homogénea a partir de la cual se tomaron alícuotas de 10 ml y se inocularon en matraces Erlen-Meyer de 125 ml conteniendo 20 ml

ESQUEMA 3. PROTOCOLO DE INDUCCION Y RESEMBRA DE CALLOS DE MAIZ (var. VS-2) PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS "EN PLACA".

Medio de Inducción.

R: MCPP 2 ppm, sacarosa 3%

Medios de resiembra.

1^a

MCPP (ppm) 2

AIA (ppm) 1

Cinetina (ppm) 0.01

Sacarosa (%) 3

2^a

Como en la 1^a pero con MCPP 1 ppm

3^a

MCPP (ppm) 0.50

AIA (ppm) 10.00

Cinetina (ppm) 0.01

Sacarosa (%) 3

4^a

Establecimiento del cultivo en suspensión (como en 3^a resiembra)

5^a

Resiembra del cultivo en suspensión (como en la 3^a resiembra)

Medio de Enverdecimiento.

AIA (ppm) 10.00

Cinetina (ppm) 0.10

Sacarosa (%) 3

Los callos se disgregaron en la tercera resiembra en medio líquido. Los cultivos "en placa" se iluminaron durante 7 y 12 días.

de medio líquido fresco Ro.5 cada uno. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para el cultivo anterior. De estos nuevos cultivos se tomaron pequeñas muestras al inicio y a los 7 días de la incubación para determinar la velocidad de crecimiento así como el patrón de frecuencia de agregados celulares de composición variable en número. Lo anterior se obtuvo contando en un hemocitómetro el número de células totales y el número de agregados con 1 a 5 células, 6 a 10 células y 11 ó más células.

V.6. Sistema B: cultivos "en placa".

Para establecer este sistema, al término de la resiembra de los cultivos en suspensión, éstos se filtraron con vacío a través de un embudo Buchner (4.7 cm. de diámetro interno) el cual contuvo una malla de nylon y, encima, un papel Whatman No. 2 (Horsch et al., 1980). Tanto la malla como el papel se lavaron con agua desionizada y medio líquido de enverdecimiento por 30 minutos antes de ser esterilizados. Se utilizó el contenido de dos matraces para la obtención de cada una de las "placas". Estas se transfirieron cuidadosamente a las cajas Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 50 ml de medio R sólido de enverdecimiento (AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3%) y 1 ml del mismo medio pero líquido. Los cultivos se incubaron a $150 \mu\text{E.m}^{-2}\text{seg.}^{-1}$ a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 y 12 días.

V.7. Cuantificación de clorofilas.

Para este objeto, primero se liofilizó el callo y en seguida el liofilizado se homogeneizó en acetona fría 80% con un pistilo y

mortero fríos, en la oscuridad. El homogenado se centrifugó durante 15 minutos en una microfuga, a 10,500 rpm. Se utilizó el sobrenadante para cuantificar las clorofilas a y b por el método de Bruinsma (1963).

V.8. Cuantificación de proteínas.

Esta se realizó siguiendo la técnica descrita por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína estándar.

V.9. Detección de la presencia de la proteína RUBISCO por dot-blot.

Dada la intensidad del tono verdoso que desarrollaron los callos "en capa" del sistema A, se consideró conveniente concentrar la proteína RUBISCO para tener una mayor probabilidad de detectar su presencia y actividad enzimática. Por ello, se buscó una concentración adecuada de PEG (Ingham, 1984) que permitiera precipitar la mayor cantidad posible de la proteína RUBISCO de los extractos crudos de hojas de maíz, sin que se perdiera su actividad enzimática.

Los callos y las hojas se maceraron con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino y después se homogeneizaron con el siguiente buffer de extracción: (1:1; peso:vol.) tricina 0.1 M pH 8.1, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, DTT 10 mM, PMSF 0.5 mM.

Los extractos se centrifugaron en una microfuga a 10,500 rpm durante 15 minutos y a los sobrenadantes resultantes se les añadió PEG 50% frío, llevándolos a un porcentaje final de 17%, 21% y 35%. Las mezclas se agitaron por un minuto en vortex y se mantuvieron en reposo por 30 minutos a 4⁰C; luego se microfugaron nuevamente

por 10 minutos. Los precipitados se resuspendieron en 300 μ l de buffer de extracción.

La fuente de proteínas para detectar la presencia de RUBISCO en los cultivos celulares de maíz, incubados en los medios A a E y condiciones 1 a 4 y en los extractos de hoja, fue la misma que aquella para medir su actividad.

Con el objeto de delimitar la concentración mínima de clorofila que debería tener un extracto verde para poder visualizar la RUBISCO en un dot-blot y para tener una idea del nivel relativo de esta enzima probablemente existente en los cultivos en envordecimiento, se realizó dicho ensayo inmunológico con un extracto de hojas de maíz precipitado con PEG a una concentración final de 17%, a diferentes diluciones que comprendieron un intervalo de 2.648 μ g a 0.013 μ g de clorofila total (15 a 0.078 μ g de proteína).

Las muestras se colocaron en alícuotas de 2 μ l en membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m (Schleicher and Schuell, NC). Se utilizaron anticuerpos de conejo contra RUBISCO de espinaca a una dilución de 1:500 El título de estos anticuerpos fue de 1:16 000 y fueron preparados y donados gentilmente por Barajas (1990). Como segundo anticuerpo se utilizó anti-Ig G de conejo acoplado a peroxidasa, a una dilución de 1:1500 Como sustrato para revelar se utilizó 4-cloro-naftol y H₂O₂. El método se desarrolló según Torrent (1991).

De los extractos semipurificados con PEG de estos cultivos, se colocaron alícuotas de 2 μ l que contuvieron 0.0275 μ g de clorofila con cuya cantidad la RUBISCO resultó dar una reacción positiva aún visible en el extracto de

hoja; además, también se puso una muestra con $0.0275 \mu\text{g}$ de clorofila. $2 \mu\text{l}^{-1}$ (Hd) y una con $8.33 \mu\text{g}$ de clorofila. $2 \mu\text{l}^{-1}$ (Hc), ambas de un extracto de hoja de maíz como control positivo de la técnica y un extracto de callo verde (CV) de la variedad VS-22, como un control positivo de los callos. Este callo que presentó brotes en su superficie alcanzó una concentración de clorofila de $7.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco (el máximo enverdecimiento logrado en este trabajo) al ser enverdecido en medio R con MCPP 2 ppm, cinetina 0.01 ppm y sacarosa 3%, en luz continua de $90 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, después de 40 días de ser irradiado. Asimismo, se aplicó una muestra de BSA que contuvo $15 \mu\text{g}$ de proteína, como control negativo de la técnica y una muestra de callo blanco (CB) como control negativo de los mismos, con $0.15625 \mu\text{g}$ proteína, cantidad equivalente a $0.0275 \mu\text{g}$ de clorofila en el extracto de hoja utilizado.

V.10. Medición de la actividad enzimática de la RUBISCO.

El primer paso para determinar la actividad enzimática de la RUBISCO en los cultivos celulares de maíz, consistió en un ensayo control, aplicando el método a un extracto semipurificado con PEG de hojas de maíz.

La fuente de enzima para realizar el ensayo enzimático (Pike, 1987), se activó al combinar 9 volúmenes de la misma con 1 volumen de solución de activación (MgCl_2 100 mM, NaHCO_3 10 mM) y dejarlas reposar a 4°C durante 3 minutos. De esta mezcla activada se tomaron $30 \mu\text{l}$ (extractos de callos) ó $15 \mu\text{l}$ (extracto de hoja) y se añadieron a $30 \mu\text{l}$ (extractos de callos) o a 45

μl (extracto de hoja) de medio de reacción colocados en viales de cristal para centelleo, con lo cual dió inicio la reacción.

El medio de reacción enzimática consistió en los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas: buffer de ensayo pH 8.1 (tricina 0.1 M, MgCl_2 20 mM, DTT 5 mM), RuBP 3 mM y $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 10 mM (con actividad específica de $1.25 \mu\text{Ci} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ para las muestras de callo y de $0.25 \mu\text{Ci} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ para las muestras de hoja). La reacción se llevó a cabo a 28°C y se paró añadiendo 200 μl de HCl 3 N en metanol a los 0, 20, 40 y 60 segundos (para los extractos de callo) o a los 0, 15, 30, 45 y 60 segundos (para el extracto de hoja), posteriores al inicio. Después de esto se evaporaron las muestras en baño María para eliminar el CO_2 radioactivo que no se incorporó durante la reacción y el residuo se resuspendió en 50 μl de agua desionizada y se le añadieron 5 ml de líquido de Bray (Bray, 1960). La radioactividad incorporada en las muestras se detectó utilizando un contador de centelleo Minaxi B Tri-Carb, 4000 Series.

V.11 Técnicas Histológicas.

De los callos con brotes que se expusieron a la luz, las porciones que se tomaron para realizar los análisis histológicos fueron las zonas enverdecidas localizadas en los brotes.

En el caso de los callos "en capa" y cultivos "en placa", las muestras que fueron fijadas se tomaron indistintamente de cualquier punto de la superficie de los cultivos.

V.11.1 Microscopía óptica.

De los diferentes medios y condiciones que se manejaron para inducir el enverdecimiento de los cultivos celulares de maíz, se tomaron muestras de los siguientes casos: callos blancos, callos iluminados por 12 días en los medios A y D y callos iluminados por 7 días en los medios 1 y 2.

La técnica histológica que se desarrolló fue la reportada por García (1991). El grosor de los cortes fue de 6 μm , para lo cual se utilizó un microtomo Reichter-Jung. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Leitz-Dialux 20.

V.11.2 Microscopía electrónica.

En este caso, las muestras fijadas correspondieron a las muestras iluminadas por 7 y 12 días que se incubaron en los siguientes medios y condiciones: medio A, medio D, condición 1, condición 2, cultivos "en placa". Asimismo, se fijaron, en condiciones de obscuridad, callos incubados en el medio A y cultivos "en placa" antes de exponerse a la luz.

El material biológico se fijó por dos horas en glutaraldehído 2% (v/v) en buffer de fosfatos 0.15 M, pH 7.2 a 4°C y se postfijó en tetraóxido de osmio 2%, también por dos horas a 4°C. Luego se deshidrató en etanol y se embebió en Epon. Se utilizó un ultramicrotomo OmU3 Reichter y se realizaron cortes de entre 350 y 400 Å . Las muestras se contrastaron utilizando nitrato de uranilo y citrato de plomo (Sánchez de Jiménez et al., 1988). Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico JEOL 100B.

VI. RESULTADOS.

VI. 1. Inducción y mantenimiento del material biológico.

La primera meta consistió en inducir callo de embriones de semillas maduras de maíz y mantener un cultivo *in vitro* de estos callos en forma sistemática. Se probaron diferentes medios de cultivo, los cuales se señalan en la tabla I así como su resultado en cuanto a la producción de callo en base al peso fresco. Se puede notar que los medios con mayor rendimiento de callo fueron el 6 y el 8 ya que el resto de los medios generó una cantidad de callo semejante, a excepción de los 4, 5 y 11. Después de obtener los callos, éstos se resembraron en diferentes medios (tabla II) y se incubaron en la obscuridad por dos semanas. Los medios en que crecieron mejor los callos en los subcultivos, fueron N6 con prolina 9 mM (2') y 20 mM (1') y R2 con cinetina 0.01 ppm (9'). En términos generales, se puede concluir que el medio N6 con Pro 9 mM fue ligeramente mejor que el R2.

VI.2. Enverdecimiento de los callos.

Dado que la medición de los diferentes parámetros indicativos de la biogénesis del cloroplasto se hizo hasta después de haber realizado todos los experimentos, fue necesario tener una referencia que permitiera seleccionar las mejores condiciones experimentales, sobre la marcha de los mismos. Para este fin a los cultivos celulares se les asignó arbitrariamente un número de acuerdo a la intensidad del tono verdoso logrado (ver gama de tonalidades). El número 1 se refiere al color de los callos no expuestos a la luz y los números sucesivos indican una mayor

TABLA I. PRODUCCION DE CALLOS DE MAIZ (var. VS-22)
EN DIFERENTES MEDIOS DE INDUCCION.

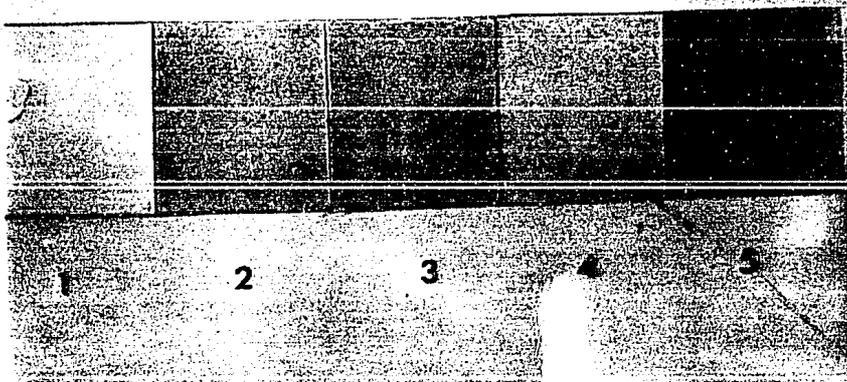
Medio de Inducción.	P. fresco (g)/100 embriones
(1) N64	8.10
(2) N62	8.90
(3) N62c	9.40
(4) N64*	7.50
(5) N6cc	5.60
(6) R4	11.20
(7) R6	8.40
(8) R8	10.70
(9) R4	8.95
(10) R2	9.54
(11) [®] R2	4.88

La inducción de los callos se llevó a cabo en la obscuridad durante 3 semanas. [®]: Los callos inducidos en este medio se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz. [®]: con hidrolizado de caseína (200 mg.L⁻¹); a partir del medio (6) todos lo llevan. La composición hormonal de los medios de inducción se describe en el Apéndice.

TABLA II. PRODUCCION DE CALLO DE MAIZ (var. VS-22)
EN DIFERENTES MEDIOS DE RESIEMBRA

M. de inducción	M. de resiembra	Peso inicial (%)	Peso final (%)
1	(1') N6 prolina 20 mM	100	145.6
2	(2') N6 prolina 9 mM	100	152.8
3	(3') N6 Asn 250 mg/L	100	126.0
4	(4') N6 adenina 10 mg/L	100	122.5
5	(5') N6ck	100	77.1
6	(6') R2	100	130.0
7	(7') R2	100	117.0
8	(8') R2	100	121.5
9	(9') R2	100	146.0

Los callos inducidos se transfirieron a diferentes medios de resiembra y, después de 14 días de incubación en la obscuridad, se pesaron nuevamente. El peso inicial se consideró como un 100% La composición hormonal de los medios de resiembra se describe en el Apéndice.



Gama de tonalidades de color verde exhibida por los callos con brotes y los callos "en capa" (sistema A). La tonalidad mostrada en el número 1 corresponde a los callos resebrados en la obscuridad; los números sucesivos indican una mayor intensidad del tono verdoso.

intensidad de tono verdoso.

VI.2.1. Efecto del genotipo en el enverdecimiento de los callos.

En el presente trabajo se encontró que los callos de la variedad VS-22 sólo desarrollaron entre 3 y 4 puntos y/o manchas de color verde, de aproximadamente 3 mm de extensión/callos, después de 12 días de iluminación ; de hecho, estas zonas enverdecidas fueron visibles desde los 7 días. En contraste, después del mismo periodo de estudio, los callos de la variedad Tuxpeño desarrollaron un color verde en una gran parte de su superficie (Solís *et al.*, 1989). Esto indica que el genotipo de las células en cuestión, origina respuestas diferentes en la biogénesis del cloroplasto.

VI.2.2. Efecto de la luz en el enverdecimiento de callos.

VI.2.2.1. Régimen de horas luz.

La respuesta de los callos con brotes expuestos a un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, fue similar a la obtenida con los callos expuestos continuamente a la luz.

A las regiones enverdecidas de los callos que se sembraron en el medio R cuya composición hormonal fue AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, ya fuera en luz continua (condición 1) o en fotoperiodo (condición 2), se les asignó el número 5 de la gama de tonalidades verdes.

VI.2.2.2. Intensidad luminosa.

Fueron dos las intensidades luminosas a las cuales se expusieron callos de maíz desprovistos de brotes y colocados en forma de capa, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz): 90 y 150 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$. En ambos casos la temperatura se mantuvo entre

27 ± 1° C. Ninguno de los callos incubados en estas condiciones desarrolló zonas verdes, sin embargo el tono verdoso de todos ellos fue muy débil pero de la misma intensidad (#3 de la gama de tonalidades); por lo que aparentemente en el rango probado, la mayor intensidad luminosa no generó un aumento importante en la síntesis de clorofilas. No obstante, se decidió continuar los experimentos a 150 $\mu\text{E.m}^{-2}\text{.seg}^{-1}$ considerando que podrían existir diferencias cuantitativas reales en el contenido de clorofilas, no perceptibles a simple vista.

VI.2.3. Efecto de la composición hormonal en el enverdecimiento de callos con brotes y callos sin brotes (sistema A).

La respuesta de los callos con brotes incubados en un medio con una relación de auxina/citocinina 3 veces más alta que la utilizada en los experimentos relativos al efecto del genotipo, fue la misma en ambas condiciones de luminosidad a los 7 y 12 días de cultivo: 3 a 4 zonas verdes de aproximadamente 3 mm de extensión/callos, con igual intensidad de color (# 5 de la gama de tonalidades).

Los resultados que se refieren al enverdecimiento de callos con brotes en medios con diferente composición hormonal, muestran que el porcentaje de callos "en apilado" con zonas verdes fue ligeramente mayor con la combinación hormonal AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm (75%) que con la combinación AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm (71%). El medio con MCPP 0.25 sólo permitió un 58% (tabla III). Es importante destacar que la mayoría de las zonas verdes (máximo 6/callos) se presentaron en la parte

**TABLA III. EFECTO DE LA RELACION Y TIPO DE HORMONAS Y DE LA
 GEOMETRIA DEL CALLO SOBRE EL PORCENTAJE DE CALLOS DE MAIZ
 (var. VS-22) CON ZONAS VERDES.**

Geometría del callo	Composición hormonal del medio de enverdecimiento (ppm)		
	AIA 10 cinetina 0.1	AIA 10 BAP 0.3	MCPD 0.25
callo "apilado"	75%	71%	58%
callo "en capa"	75%	64%	Nd

Las condiciones de incubación fueron: fotoperiodo 16 h luz; 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$; 27 \pm 1°C, excepto para el que involucró la adición de MCPD 0.25 ppm, aplicándose luz continua. Todos los callos contuvieron zonas organogénicas y se incubaron durante 3 semanas en los medios de enverdecimiento. Nd: no determinado. n= 12

basal de los brotes que comúnmente desarrollan estos callos cuando son resebrados en la obscuridad. De hecho, estas zonas verdes localizadas explican aproximadamente el 80% del color verde en los callos analizados.

Con base en los resultados anteriores y con la idea de lograr un cultivo que enverdeciera de manera homogénea, se investigó si este tipo de callos con brotes, colocados en forma de "capa delgada" más o menos uniforme en altura, también desarrollaría color verde al ser expuesto a la luz, en los medios que anteriormente propiciaron la síntesis de clorofilas. Esta variación en la manipulación de los callos se basó en la diferentes disponibilidad que tienen sus distintas regiones, con respecto a nutrientes, hormonas y luz, originada por la forma irregular de los mismos.

El medio con AIA y cinetina resultó mejor que el medio con AIA y BAP ya que en el primero, el 75% de los callos presentó puntos verdes y, en el segundo, sólo el 64% (tabla III). Sin embargo, en ambos medios, nuevamente la mayoría de los puntos y zonas verdes se presentaron en los brotes de los callos. Por consiguiente, se desarrolló un sistema en el cual al inicio de la tercera resiembra (incubación en la luz), se eliminaron los brotes de los callos y estos callos sin elementos organogénicos fueron acomodados como "capas delgadas" sobre la superficie de los medios de enverdecimiento. Este constituyó el sistema A y en él se analizó la influencia de otras relaciones hormonales y de la fuente de carbono, sobre el enverdecimiento uniforme de los cultivos.

Quando se incubaron en la luz una serie de callos

desprovistos de brotes, se observó que prácticamente ninguno formó puntos ni zonas verdes como los que anteriormente se habían formado, sino que el color del callo se hizo más uniforme, con distintos grados de tono verdoso, de acuerdo a la composición hormonal presente en el medio de enverdecimiento, (tabla IV). Aparentemente la transferencia de callos a un medio que contenga AIA 10 ppm y cinetina 0.1 ppm (medio A), favorece un mejor desarrollo de dicho tono (#3 en la gama) que la cinetina sola a una concentración de 0.1 ppm (medio B) o combinada con BAP, ambas a una concentración de 0.1 ppm (medio C) (#2 en la gama de tonalidades).

VI.2.4. Efecto de la fuente de carbono en el enverdecimiento de callos sin brotes.

La tabla V muestra que, en apariencia, la incorporación de lactosa al medio no tuvo influencia sobre la intensidad del tono verdoso ya que la apreciación visual fue la misma para el problema que para su control (#3 en la gama de tonalidades). También se aprecia que la sola disminución en la concentración de la sacarosa, tampoco produjo resultados benéficos.

VI.3. Cultivos en suspensión.

Al inicio, los callos se transfirieron a dos medios líquidos: R2 y N6, ambos con MCPP 2 ppm y cinetina 0.01 ppm. Los dos cultivos siempre desarrollaron un color amarillo-café desde los primeros días de su establecimiento. Por ello se analizó el efecto de la transferencia de regiones vascularizadas del callo, del medio sólido al líquido, ya que

TABLA IV. EFECTO DE LAS HORMONAS AIA, BAP Y CINETINA SOBRE
EL ENVERDECIMIENTO DE CALLOS DE MAIZ (var. VS-22) SIN
BROTOS ORGANOGÉNICOS.

Composición de hormonas en el medio de enverdecimiento (ppm)	Intensidad en el desarrollo del tono verdoso.
AIA 10, cinetina 0.1	# 3 (100%) ^a
cinetina 0.1	# 2 (100%)
cinetina 0.1, BAP 0.1	# 2 (100%)

Los callos se incubaron durante 12 días en los medios de enverdecimiento con una disposición geométrica "en placa" (sistema A). Fotoperiodo: 16 h luz ; $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$; $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.^a; el número entre paréntesis indica el por ciento de callos que tuvieron esa respuesta. n=8.

TABLA V. EFECTO DE LA CONCENTRACION Y FUENTES DE CARBONO,
SACAROSA Y LACTOSA, SOBRE EL ENVERDECIMIENTO DE CALLOS
DE MAIZ (var. VS-22) SIN BROTES ORGANOGENICOS.

Composición de hormonas en el medio de enverde- cimiento (ppm)	Fuente de carbono en el medio de - enverdecimiento.	Intensidad del tono verdoso
AIA 10, cinetina 0.1	Sacarosa 3% ^c	# 3 (100%) [*]
	Sacarosa 1% ^o	# 3 (100%)
	Lactosa 2%	
cinetina 0.1, BAP 0.1	Sacarosa 3% ^c	# 2 (100%)
	Sacarosa 2% ^o	# 2 (100%)

Los callos se incubaron durante 12 días en los medios de enverdecimiento, con una disposición geométrica "en placa" (sistema A). Fotoperiodo: 16 h luz; $150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$; $27 \pm 1^\circ\text{C}$. El número entre paréntesis indica el por ciento de callos que tuvieron esa respuesta. ^c: grupo control. ^o: grupo experimental. n= 8.

probablemente bajo condiciones de agitación (cultivos en suspensión) las células que constituían a estas regiones se murieran y excretaran sustancias tóxicas al medio. Se encontró que dichas zonas vascularizadas no tuvieron influencia alguna sobre la coloración del medio, aunque esta característica fue más evidente en el medio N₆.

Como la presencia de color café en los cultivos en suspensión podría ser reflejo de oxidaciones, se añadieron diferentes cantidades de ácido ascórbico al medio de cultivo R₂: 2, 10 y 20 mg.l⁻¹ Aparentemente no se encontraron cambios al emplear este antioxidante.

Finalmente se manipuló otro lote de callos el cual se resembró sucesivamente en medios con menor y mayor concentración de MCPP y AIA, respectivamente (medio R modificado). En este caso, la composición final del medio fue: medio R con AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3% Aparentemente hubo una ligera mejoría en cuanto al color que mostraron los cultivos utilizando este medio.

Los resultados relativos al crecimiento de los cultivos en suspensión incubados en un medio R, permiten afirmar que no hubo un cambio en el número de la población de células totales ni en el patrón de frecuencia de los agregados celulares analizados, después de una semana de incubación a 110 rpm en agitación rotatoria. Aproximadamente el 81% de la población celular consistió de entidades separadas en tanto que el 19% comprendió agregados en su mayoría con números de 1 a 5 células. Los agregados que contuvieron entre 6 y 10 células fueron más frecuentes que aquellos con 11 o más células (ver tabla VI).

TABLA VI. CONTENIDO DEL NUMERO DE CELULAS TOTALES Y DEL NUMERO DE AGREGADOS CELULARES EN CULTIVO EN SUSPENSION DE MAIZ (var. VS-22), DESPUES DE UNA SEMANA DE INCUBACION

Número de células totales ($\times 10^5$ /ml)	Número de agregados celulares/ml		
	1 a 5 céls.	6 a 10 céls.	11 ó más céls
Día 0 2.28 ± 0.33	0.40 ± 0.09	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.04
Día 7 1.94 ± 0.57	0.34 ± 0.13	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02

Los cultivos en suspensión se mantuvieron en la obscuridad a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, con agitación rotatoria de 110 rpm. n=6.

Los pasos realizados para la consecución de este cultivo tipo "placa" fueron satisfactorios ya que permitieron uniformizar parcialmente el tamaño de las células, después de filtrar los cultivos en suspensión a través de una malla de 380 μm de apertura y, además, las "placas" se distribuyeron homogéneamente en el papel sobre el cual se aplicaron, mostrando una superficie uniforme.

VI.4. Enverdecimiento de los cultivos "en placa" (sistema B).

Aun cuando no se planteó enverdecer este tipo de cultivos, se decidió averiguar, sólo como una aproximación, cuál sería la respuesta de estas células disociadas al ser expuestas a la luz.

En el primer intento para enverdecer una serie de cultivos tipo "monocapa", se utilizó un lote de cultivos en suspensión incubado en medio R2 (MCPD 2 ppm, cinetina 0.01 ppm, sacarosa 3%); este medio se utilizó para resembrar los callos establecidos de donde se originaron aquellos cultivos. Bajo estas condiciones, los cultivos en suspensión no exhibieron un color amarillo-café y las "placas" resultantes se incubaron por 21 días a 27°C, con fotoperiodo de 16 h luz e intensidad luminosa de 90 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, en un medio R con sacarosa 2%, manitol 1% y ya fuera con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm o bien BAP 0.3 ppm, cinetina 0.1 ppm. La primera combinación de hormonas se basó en lo reportado para el enverdecimiento de callos de la variedad Tuxpeño de maíz (Solís et al., 1989). Los resultados mostraron que con las dos combinaciones hormonales, la intensidad del tono verdoso desarrollado fue bastante homogéneo en las "placas" de ambos lotes (#4 en la gama).

Con la intención de lograr intensificar la tonalidad verde en

estos cultivos y considerando que en el caso de los callos del sistema A la mejor combinación hormonal fue AIA 10 ppm y cinetina 0.1 ppm, en base a la apreciación visual, ésta se aplicó a otro lote más de cultivos tipo "placa", a $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, el cual provino de los cultivos en suspensión resembrados en el medio R modificado. Sin embargo, en este caso el resultado fue negativo.

Puesto que una diferencia importante entre el sistema A y el B fue que los cultivos en suspensión se aplicaron sobre un disco de papel Whatman No.2 y una malla de nylon, lo cual no ocurrió con los callos "en capa", ésta podría ser una causa de la carencia de enverdecimiento en los cultivos tipo B. Para descartar esta posibilidad, se realizó un experimento que permitiera descartar la influencia de estos soportes sobre el enverdecimiento de callos "en capa" con brotes. Cuando este tipo de callos se incubó en un medio con y sin malla de nylon y papel Whatman, en ambos casos con AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm y sacarosa 3%, bajo fotoperiodo de 16 h luz y $90 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, después de tres semanas de iluminación, el 75% de los callos de cada lote desarrolló puntos y manchas verdes sobre los brotes; por lo anterior, se consideró que los cultivos del sistema B no tuvieron una limitante física en dichos soportes para tomar sus nutrientes. En consecuencia, el sistema celular de tipo B obtenido después de haber pasado el callo por medio líquido y haberlo organizado posteriormente en medio sólido, pareció tener diferencias originadas en la manipulación del callo de donde se derivó.

VI.5. Medida de parámetros bioquímicos.

Para conocer algunos de los cambios bioquímicos que se

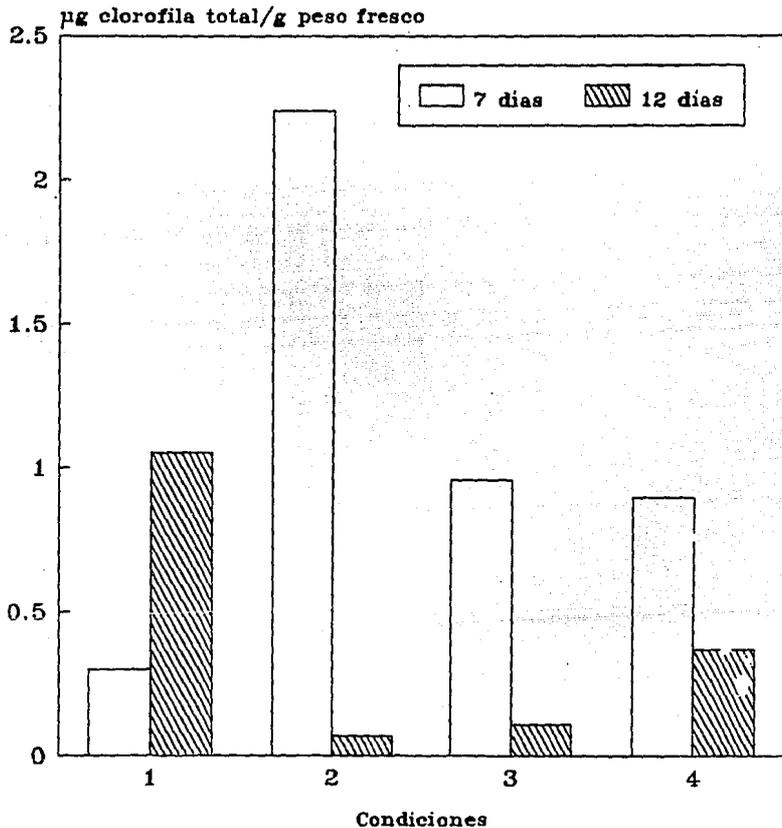
presentan durante la biogénesis del cloroplasto en el cultivo *in vitro* de células, se decidió cuantificar el nivel de clorofilas totales ya que la biogénesis de este organelo va acompañada de una síntesis importante de este pigmento. A partir de estas cuantificaciones se pudo calcular la relación de clorofilas a/b, la cual es un parámetro indicativo del tipo de cloroplastos presentes. Asimismo, se investigó si la proteína RUBISCO estaba presente, utilizando anticuerpos contra la holoenzima y si esta proteína mostraba actividad enzimática, para saber si se daba un ensamblaje adecuado de las subunidades que la constituyen y formar la holoenzima activa. Finalmente, también se realizaron estudios histológicos con el fin de correlacionar los aspectos ultraestructurales del proplastidio con algunos eventos bioquímicos.

VI.5.1. Determinación del contenido de clorofila.

El nivel de clorofila total en los callos con brotes fue de 0.30 μg clorofila. g^{-1} peso fresco a los 7 días y de 1.05 μg clorofila. g^{-1} .peso fresco a los 12 días de iluminación.

En los callos con brotes a los cuales se les aplicó un fotoperiodo de 16 h luz, el contenido de clorofila a los 7 y 12 días de iluminación fue respectivamente: 2.24 y 0.07 μg clorofila. g^{-1} peso fresco (figura 6). Esto nos muestra que la duración de las horas luz origina un patrón diferente de síntesis de clorofila en los callos incubados en un medio con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm. En cambio, en los callos incubados en un medio con AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm, el tiempo de exposición a la luz no produjo respuestas muy diferentes

Fig.6. Efecto de las hormonas AIA y BAP y de las horas luz sobre la síntesis de clorofilas totales en callos de maíz.



1 y 2 con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm
3 y 4 con AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm
1 y 3 luz continua; 2 y 4 fotoperiodo.

(figura 6, condiciones 3 y 4).

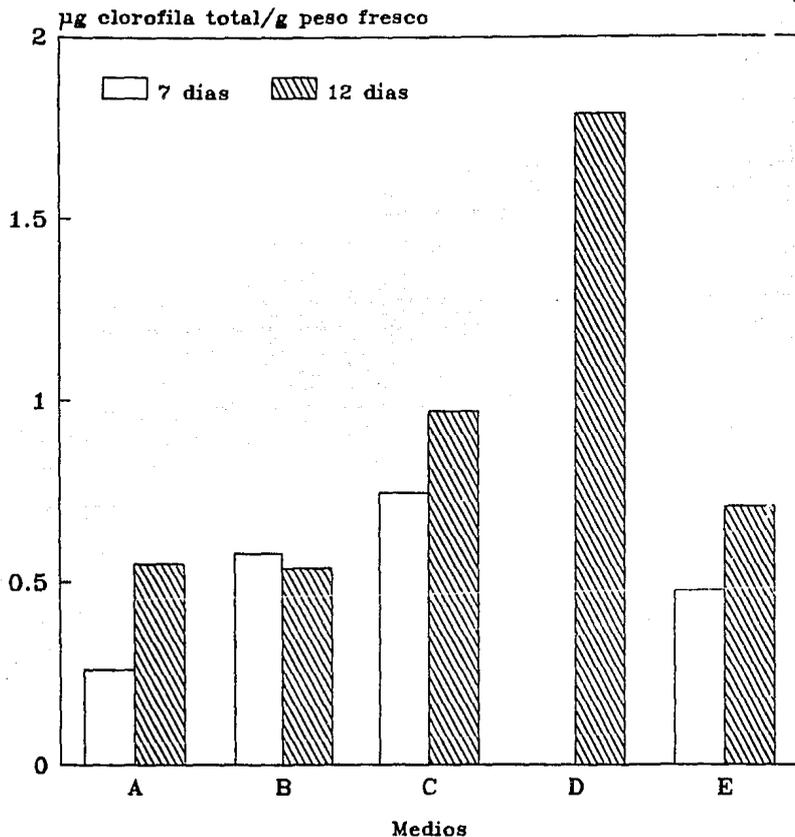
Al comparar el efecto de estas dos combinaciones hormonales entre sí, se aprecia que la consistente en AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm fue la que mayor cantidad produjo de este pigmento, en callos sometidos a fotoperiodo (condición 2). Es probable, entonces, que se requieran de altas concentraciones de esta citocinina para aumentar la síntesis de clorofila total. Las diferencias encontradas en el desarrollo de manchas verdes entre callos de la variedad Tuxpeño y VS-22 (sección VI.2.1.) después de 12 días de iluminación continua, se reflejó por lo tanto en los μg de clorofila. g^{-1} peso fresco alcanzados, ya que para Tuxpeño se obtuvieron 8.0 μg clorofila. g^{-1} peso fresco (Solís et al., 1989) y para VS-22 1.05 μg clorofila. g^{-1} peso fresco.

Independientemente de la composición hormonal de los medios A, B y C, la tendencia general de los cultivos "en capa" (sistema A) fue aumentar su nivel de clorofila de los 7 a los 12 días de iluminación, aunque el mayor nivel de ésta se alcanzó con cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm (figura 7, medio C).

Por lo tanto la apreciación visual no reflejó las diferencias cuantitativas reales en el contenido de clorofilas (ver tabla IV).

Respecto a los callos también del sistema A, que se utilizaron para estudiar la importancia de la fuente de carbono en el enverdecimiento, el contenido de clorofilas fue mayor en los cultivos resebrados en el medio con sacarosa/lactosa (medio D) que en los resebrados en los medios control, el cual contuvo sacarosa 3% (medio A); en tanto que los cultivos resebrados en el

Fig.7 Efecto de AIA, BAP, cinetina, sacarosa y lactosa sobre la síntesis de clorofilas totales en callos de maíz



Las letras representan los medios de enverdecimiento. Su composición se detalla en "Materiales y Métodos".

medio con sacarosa 2% (medio E), tuvieron un menor contenido de clorofilas que los callos resebrados en su medio control (medio C) (figura 7). En este caso como aquél en que se evaluó la influencia de las hormonas, no existió una concordancia entre la apreciación visual del tono de los callos y la cantidad de clorofila determinada (ver tabla V).

Aparte de haber cuantificado el nivel de clorofilas totales en los callos con brotes y callos sin brotes, después de 7 y 12 días de iluminación, también se cuantificó el nivel de la clorofila a y el de la clorofila b, con lo cual se pudo calcular su proporción. Los valores de estas relaciones aparecen en la tabla VII. Como se observa, en ningún caso el cociente es cercano a 3.0, ó mayor, excepto en los callos con brotes incubados en la caondición 4, lo cual sugiere que al menos todavía no existe una población homogénea de cloroplastos maduros del tipo C₃ y menos aún del tipo C₄.

VI.5.2 Detección de la presencia de la proteína RUBISCO.

Las alícuotas de las diferentes diluciones del extracto semipurificado con PEG, de hojas de maíz, dieron una reacción positiva para la RUBISCO en la que la dilución más concentrada produjo la tonalidad más intensa. La dilución más alta que produjo un color aún visible, fue la que contuvo 0.0275 μg clorofila.2 μl^{-1} de muestra (Hd). De hecho, una muestra que contuvo 8.33 μg clorofila.2 μl^{-1} muestra (Hc), originó una señal mucho mayor, misma que fue comparable a la obtenida con el callo verde control (CV). La muestra de callo blanco (CB), contrario a lo esperado, mostró una señal aunque ésta fue

TABLA VII. RELACION DE CLOROFILAS a/b EN CALLOS DE MAIZ
(var. VS-22) CON Y SIN BROTES ORGANOGÉNICOS.

Callos con brotes organogénicos.					
	C 1	C 2	C 3	C 4	
7 días	1.12 ± 0.13	1.11 ± 0.02	0.51 ± 0.03	0.52 ± 0.10	
12 días	1.15 ± 0.06	0.78 ± 0.34	0.78 ± 0.33	2.22 ± 0.53	
Callos sin brotes organogénicos (sistema A).					
	A	B	C	D	E
7 d.	1.32 ± 0.21	0.55 ± 0.08	1.0 ± 0.16	Nd	0.88 ± 0.02
12 d.	0.59 ± 0.00	0.64 ± 0.09	1.2 ± 0.06	1.78	0.30 ± 0.03

La descripción de las condiciones 1 a 4 (C 1 a C 4) y de los medios A a E, se localiza en los pies de las figuras 6 y 7, respectivamente. Nd: no determinado.

débil. Una alícuota de BSA, correspondiente al control negativo, con 15 μg de proteína. 2 ul^{-1} muestra, no dió reacción positiva, lo que significó que el anticuerpo utilizado fue específico contra la RUBISCO (figura 8).

Con respecto a los callos que se resembraron en los medios de enverdecimiento con AIA 10 ppm y BAP 0.3 ppm (condición 1: luz continua; condición 2: fotoperiodo) y AIA 10 ppm y BAP 0.1 ppm (condición 3: luz continua; condición 4: fotoperiodo), todas las muestras correspondientes a los 7 días de iluminación presentaron una respuesta positiva a la proteína RUBISCO, en intensidad similar entre sí (evaluación visual), a una misma concentración de clorofila (figura 9) y mucho mayor que la del callo blanco (figura 8). Debe notarse que los callos incubados en la condición 3 (figura 9) son los que dieron una respuesta más intensa.

Después de 12 días de iluminación, en la mayoría de las condiciones empleadas para inducir el enverdecimiento la intensidad de la señal disminuyó (figura 9), indicando una disminución en la síntesis de la RUBISCO y/o una degradación de la misma, lo que finalmente se traduce en una inestabilidad de esta proteína. La inestabilidad sería, de mayor a menor, en los callos crecidos en la condición 1, luego en los callos de las condiciones 4, 3 y, finalmente, en los de la condición 2 en cuyo caso de hecho la señal para la RUBISCO se incrementó, denotando mayor estabilidad.

El conjunto de estos resultados indica que en este tipo de callos con brotes, el régimen de horas luz y la relación auxina/citocinina probablemente originan una síntesis diferente de

PRESENCIA DE RUBISCO EN
MUESTRAS CONTROL

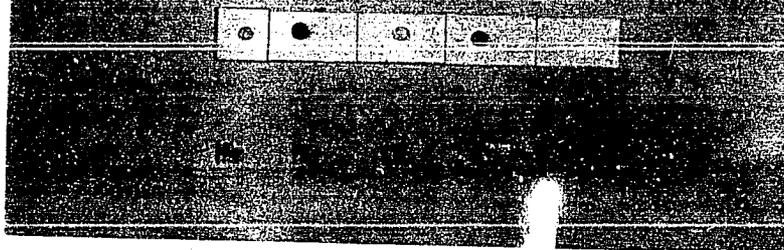


Figura 8. Hd: extracto diluido de hoja ($0.0274 \mu\text{g}$ clorofila. $2 \mu\text{l}^{-1}$); Hc: extracto concentrado de hoja ($8.33 \mu\text{g}$ clorofila. $2 \mu\text{l}^{-1}$); CB: extracto de callo blanco ($0.1562 \mu\text{g}$ proteína. $2 \mu\text{l}^{-1}$); CV: extracto de callo organogénico verde ($0.0275 \mu\text{g}$ clorofila. $2 \mu\text{l}^{-1}$); BSA: albúmina de suero de bovino ($15 \mu\text{g}$ proteína. $2 \mu\text{l}^{-1}$).



Figura 9. Los callos de maíz (var. VS-22) fueron iluminados durante 7 y 12 días, bajo las siguientes condiciones: 1, medio R con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, luz continua; 2, medio R con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, fotoperiodo; 3, medio R con AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm, luz continua; 4, medio R con AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm, fotoperiodo. El número 5 corresponde a la muestra control negativo, BSA.

la proteína RUBISCO.

La intensidad de la coloración contra la proteína RUBISCO en los cultivos del sistema A al día 7 de iluminación (figura 10) fue la siguiente (evaluación visual): los callos incubados en el medio B mostraron la mayor intensidad y, en orden decreciente, los incubados en los medios A, D, C y E. Es de hacerse notar que el nivel en los callos de los medios ,D, C y E es menor que el nivel en el callo blanco y en los extractos de hoja, pero superior al del control negativo hecho con BSA (figura 8).

De los 7 a los 12 días de iluminación, la intensidad de la marca para la RUBISCO aumentó en todos los cultivos (excepto en los del medio D) y de manera muy especial en los que se sembraron en el medio E (figura 10).

Como una prueba exploratoria inicial, se buscó la presencia de la RUBISCO en cultivos "en placa" (sistema B) expuestos durante 7 y 12 días a un fotoperiodo de 16 h luz (figura 10). Los resultados dieron una reacción positiva para ambos tiempos, intensificándose la señal en los 12 días.

VI.5.3. Actividad enzimática de la RUBISCO.

Respecto a las diferentes concentraciones finales de PEG que se utilizaron para precipitar la RUBISCO (17%, 21% y 35%), se encontró que las dos primeras concentraciones precipitaron casi totalmente la RUBISCO, ya que en ambos casos la distribución de la actividad de la enzima fue de un 97.5% en el precipitado y de un 2.5% en el sobrenadante. Además, utilizando PEG 17%, el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática en el precipitado, en relación a la actividad presente en el

PRESENCIA DE RUBISCO EN CALLOS "EN CAPA" (SISTEMA A)
Y EN CELULAS "EN PLACA" (SISTEMA B)



Figura 10. Las letras A, B, C, D y E indican los diferentes medios de enverdecimiento y corresponden a los callos "en capa". El medio basal fue el R. A: AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3%; B: cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3%; C: cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm, sacarosa 3%; D: AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 1%, lactosa 2%; E: cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm, sacarosa 2% La letra P se refiere a los cultivos "en placa" incubados en un medio con AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm y sacarosa 3%.

sobrenadante original (100%), fue mayor (69%) que utilizando PEG 21% ó 35% (tabla VIII).

Una unidad de enzima se consideró como la cantidad de enzima que catalizó la fijación de 1 μmol $^{14}\text{CO}_2$ por minuto, a 28°C , pH 8.1 La actividad específica se reporta como "Unidades. mg^{-1} proteína total. Como se aprecia en la figura 11, la reacción fue lineal al menos por los primeros 60 segundos.

Al aplicar los pasos de semipurificación con PEG a los callos verdes control (CV) de maíz, que tenían brotes en su superficie, se pudo detectar actividad de la enzima RUBISCO en estos callos verdes con brotes, aunque su valor fue muy bajo: 0.00346 U. mg^{-1} proteína total. En cambio, en ninguno de los callos "en capa" del sistema A ni de los cultivos "en placa" del sistema B, iluminados durante 7 y 12 días, se detectó actividad enzimática de RUBISCO.

De acuerdo al experimento realizado con los callos verdes que tuvieron 7.03 μg clorofila. g^{-1} peso fresco, esto significa que el método utilizado en la medición de la actividad enzimática de RUBISCO, puede proporcionar resultados positivos en muestras de callo sólo si en la mezcla de reacción se aplica una alícuota que contenga alrededor de 0.6021 μg clorofila.

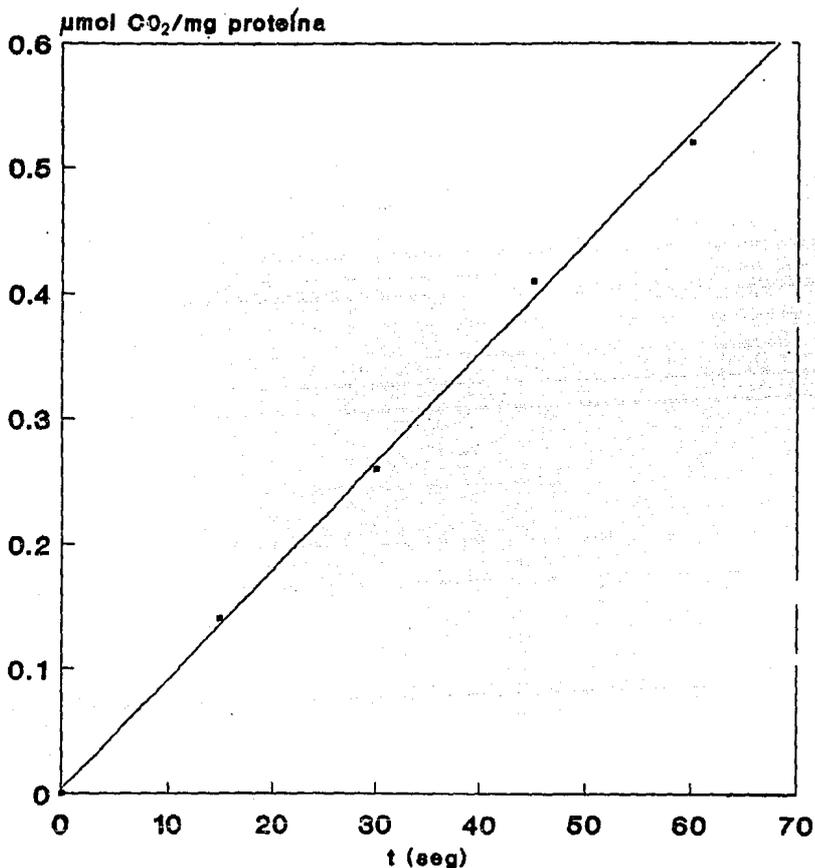
El nivel de clorofila en los callos en que no se detectó actividad de RUBISCO, comprendió un intervalo de 0.08 a 2.24 μg clorofila. g^{-1} peso fresco, por lo que en el ensayo enzimático el nivel de clorofila contenido en las alícuotas añadidas a los medios de reacción varió de 0.0068 a 0.1918 μg clorofila.

Los resultados relativos a la cantidad de clorofila sintetizada y a la presencia de la RUBISCO y su actividad enzimática en callos de maíz, muestran por lo tanto que la

TABLA VIII. EFECTO DEL PEG EN LA SEMIPURIFICACION DE LA RUBISCO EN EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS DE MAIZ (var. VS-22)

Concentración final de PEG en %	Velocidad de fijación (U.mg ⁻¹ proteína total)		% recuperación (U.ml ⁻¹)
	Fracc. precip.	Fracc. sobrenadante	Fracción precipitada
17	0.515	0.013	69
21	0.452	0.010	58
35	0.349	0.085	28
Sobrenadante del extracto crudo		0.183	100

Fig. 11. Actividad enzimática de RUBISCO
en hojas de maíz.



La fuente de la enzima fue el extracto de hoja semipurificado con PEG. Se realizaron 2 mediciones para cada tiempo.

acumulación de esta proteína y la de la clorofila no están correlacionadas y que la RUBISCO aunque está presente, es inactiva.

VI.6. Estudios histológicos de los cultivos enverdecidos.

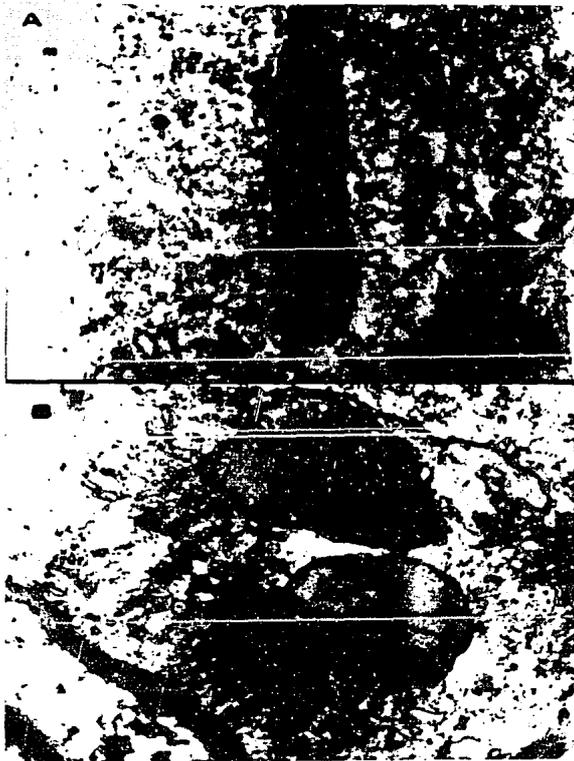
VI.6.1. Callos con brotes.

En los callos que se expusieron a un régimen de luz continua y que se incubaron en un medio que contuvo AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, a los 7 días de iluminación las células presentaron vacuolas de diferente tamaño, dictiosomas, ribosomas, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, amiloplastos, proplastidios y cloroplastos en diferenciación, pero con un desarrollo aún pobre de tilacoides (fotomicrografía 1). A los 12 días, se volvieron a observar dictiosomas, ribosomas, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias, pero no amiloplastos aunque sí pequeños cuerpos probablemente de reserva así como proplastidios y cloroplastos en diferenciación con un sistema de membranas internas más desarrollado que a los 7 días (fotomicrografía 2).

En los callos expuestos a un régimen de fotoperiodo de 16 h. luz/8 h. oscuridad y que también se incubaron en un medio con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm, las células presentaron abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, dictiosomas y, a diferencia de los callos iluminados continuamente, organelos cuya disposición de membranas internas fue semejante a la de los cuerpos prolamelares, así como cloroplastos maduros del tipo mesófilo con grana bien desarrollados, tilacoides intergranales y plastoglóbulos. También se detectaron lo que probablemente sea gránulos de reserva en el citoplasma y vacuola. Algunos



Fotomicrografía 1. Proplastidios (A 12,200 X) y cloroplastos en desarrollo (B 46,400 X) en células de callos de maíz (var. VS-22) con brotes en enverdecimiento, incubados en la condición 1 (iluminación continua) durante 7 días. Las letras representan: (a) almidón, (am) amiloplastos, (cd) coroplasto en desarrollo, (m) mitocondria, (n) núcleo, (p) proplastidio, (pc) pared celular, (r) ribosomas, (t) tilacoides, (v) vacuola.



Fotomicrografía 2. Cloroplastos en desarrollo (A 14,800 X; B 22,200 X) en células de callos de maíz (var. VS-22) con brotes, incubados en la condición 1 (iluminación continua) durante 12 días. Las letras representan: (cd) cloroplasto en desarrollo, (cr) cuerpos de reserva, (d) dictiosomas, (m) mitocondria, (n) núcleo, (p) proplastidio, (pc) pared celular, (r) ribosomas, (rer) retículo endoplásmico rugoso, (t) tilacoides.

cloroplastos contuvieron gránulos de almidón (fotomicrografía 3). No obstante, a los 12 días de exposición a la luz, las células de estos callos tuvieron pocas mitocondrias, ribosomas y retículo, endoplásmico rugoso, pero más cuerpos de reserva, vacuolas y una cantidad relativamente alta de amiloplastos. También contuvieron ciertos organelos, probablemente cloroplastos, que se distinguieron por la desorganización de sus membranas internas. Los cortes histológicos destinados a observarse por microscopía óptica, no mostraron la presencia de arreglos celulares específicos de la anatomía Kranz ni en los callos expuestos a luz continua ni en los expuestos a fotoperiodo.

VI.6.2. Callos "en capa" (sistema A).

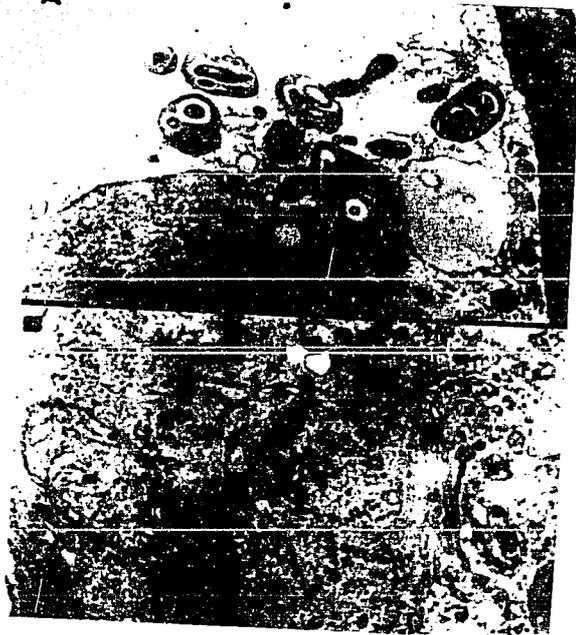
Antes de que los callos destinados a resemejarse en el medio A fueran iluminados, sus células mostraron un citoplasma denso, en el que destacaron mitocondrias, pequeñas vacuolas, una vacuola central, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, probables gránulos de reserva, dictiosomas, amiloplastos y proplastidios (fotomicrografía 4).

En las células de los callos incubados en el medio A que se iluminaron por 7 y por 12 días, se observaron ribosomas, mitocondrias, amiloplastos y proplastidios aparentemente con tilacoides empalmados, pero no intratilacoidales, que habrían empezado a formar grana. El grado de desarrollo de estos supuestos tilacoides fue ligeramente menor a los 7 (fotomicrografía 5) que a los 12 días de incubación.

En las células de los callos incubados en el medio D por 7 días (fotomicrografía 6), se detectó la presencia de mitocondrias,



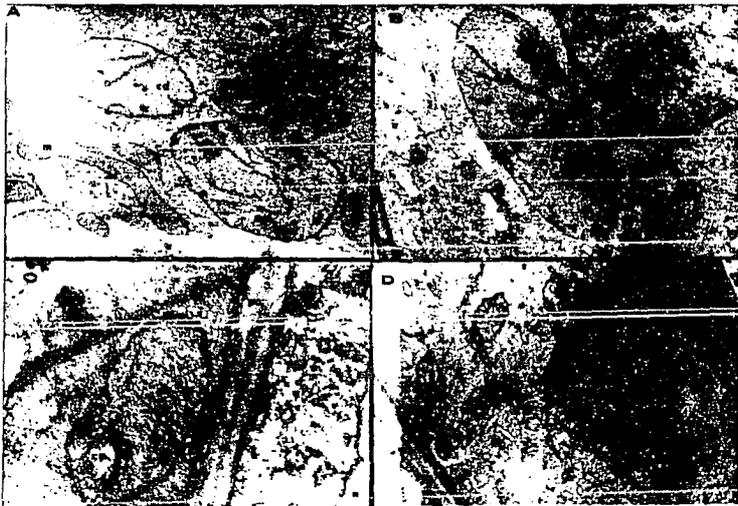
Fotomicrografía 3. Organelo semejante a un etioplasto (A 15,200 X) y cloroplastos maduros del tipo mesófilo, sin (B 7,600 X; C 30,400 X) y con (D 22,800 X) almidón, en callos de maíz (var. VS-22) con brotes, incubados en la condición 2 (fotoperíodo 16 h luz). Las letras representan: (a) almidón, (cm) cloroplasto maduro, (cp) cuerpo prolamelar, (cr) cuerpo de reserva, (d) dictiosoma, (g) grana, (m) mitocondria, (n) núcleo, (pc) pared celular, (r) ribosomas, (rer) retículo endoplásmico rugoso, (t) tilacoides, (tg) tilacoides intergranales.



Fotomicrografía. 4. Amiloplastos, proplastidios (A 6,960 X), mitocondrias y dictiosomas (B 46,400 X) en células de callos de maíz (var. VS-22) "en capa", sistema A, incubados en medio A (AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3%), antes de ser iluminados. Las letras representan: (a) almidón, (am) amiloplastos, (d) dictiosomas, (m) mitocondria, (n) núcleo, (p) proplastidio, (pc) pared celular.



Fotomicrografía 5. Cloroplastos en desarrollo y amiloplastos en células de callos "en capa", sistema A, incubados en medio A (AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3%), a los 7 (A 63,600 X; B 46,800) días de iluminación. Las letras representan: (a) almidón, (am) amiloplastos, (cd) cloroplasto en desarrollo, (n) núcleo, (pc) pared celular, (t) tilacoides.



Fotomicrografía 6. Cloroplastos en desarrollo, mitocondrias y proplastidios en células de callos de maíz (var. VS-22) "en capa", sistema A, expuestos a la luz en medio D (AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 1%, lactosa 2%), durante 7 (A, 4,000 X) y 12 días (B, 15,200 X; C, 25,300 X; D 15,200 X). Las letras representan: (cd) cloroplasto en desarrollo, (cp) cuerpo prolamelar, (m) mitocondria, (n) núcleo, (p) proplastidio, (pc) pared celular, (r) ribosomas, (rel) retículo endoplásmico liso, (rer) retículo endoplásmico rugoso, (t) tilacoides.

retículo endoplásmico liso y rugoso, probables cuerpos de reserva, proplastidios y cloroplastos con tilacoides que empezaron a empalmarse. A los 12 días de iluminación (fotomicrografía 6) las células de otros callos del mismo lote mostraron ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, vacuolas, mitocondrias, proplastidios y cloroplastos en diferenciación semejantes a los desarrollados a los 7 días de iluminación. Probablemente la inclusión de lactosa a los medios de resiembra y de enverdecimiento permite solamente la diferenciación de los proplastidios en cloroplastos y no en amiloplastos.

VI.6.3. Cultivos "en placa" (sistema B).

Como quedó señalado anteriormente, los cultivos en suspensión se distribuyeron homogéneamente en el papel sobre el cual se aplicaron, mostrando una superficie uniforme y los cultivos "en placa" dieron una respuesta positiva para la RUBISCO; sin embargo, éstos no desarrollaron el tono verdoso exhibido por los callos "en capa". Debido a esto se decidió examinar la ultraestructura de las células de los cultivos "en placa".

Se encontró que a los 7 días de ser irradiados, las células de estos cultivos no presentaron organelos ni estructuras reconocibles y a los 12 días fue evidente que ya muchas células se encontraban muertas, ya que prácticamente sólo se encontraron restos de membranas y vacuolas (fotomicrografía 7). De hecho, posteriormente se detectó que antes de que estos cultivos fueran sometidos a la luz, sus células revelaron la existencia de desajustes metabólicos ya que se observó que el citoplasma contenía un número pequeño de organelos de entre los que se



Fotomicrografía 7. Vista general de una célula de los cultivos de maíz (var. VS-22) "en placa", sistema B, incubados en un medio con AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3% a los 7 (A 17,500 X) y 12 (B 46,000 X) días de iluminación. Las letras representan: (m) mitocondria, (pc) pared celular, (v) vacuola.

distinguieron mitocondrias y proplastidios (fotomicrografía 8).
También se observó retículo endoplásmico rugoso.

En la tabla IX se resumen los resultados obtenidos con los callos "en capa" de maíz (var. VS-22).



Fotomicrografía 8. Vista general de una célula (60,000 X) de los cultivos "en placa", sistema B incubados en un medio con AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm, sacarosa 3% antes de ser iluminados. Las letras representan: (m) mitocondria, (p) proplastidio, (pc) pared celular, (rer) retículo endoplásmico rugoso.

Tabla IX. Niveles arbitrarios de diferentes marcadores de la biogénesis del cloroplasto, en callos "en capa" de maíz (var. VS-22) en enverdecimiento a los 7 y 12 días de iluminación.

	Contenido de clorofila		Presencia de RUBISCO [*]		Actividad enzimática de RUBISCO		Desarrollo del cloroplasto	
	7	12	7	12	7	12	7	12
A	+	+++	+++	++++	-	-	+	++
B	+++	+++	++++	++++	-	-	Nd	Nd
C	++++	++++	+	++	-	-	Nd	Nd
D	Nd	++++ ++++	+	+	-	-	++	++
E	++	+++	+	++++	-	-	Nd	Nd

A, B, C, D y E indican los medios en que se incubaron los callos. Un mayor número de "+" indica más cantidad de clorofila sintetizada, de RUBISCO presente y de grado en el desarrollo del cloroplasto. Nd: no determinado. * : en este parámetro "+ y ++" representan un nivel igual al obtenido en callos blancos. -: no detectable.

VII. DISCUSION.

En la primera serie de experimentos se enverdecieron callos con brotes de maíz de la variedad VS-22 y la respuesta de éstos se comparó con la de los callos con brotes de maíz de la variedad Tuxpeño, ya investigada (Solís *et al.*, 1989). habiendo sido iguales las condiciones hormonales y de fuente de carbono, en ambos casos. A los 12 días de iluminación continua, los callos de la variedad Tuxpeño enverdecieron en una gran parte de su superficie y desarrollaron cloroplastos del tipo mesófilo y cloroplastos semejantes al tipo de la vaina vascular; sin embargo, en la variedad VS-22 sólo se presentaron pocas zonas verdes y cloroplastos en formación con algunos tilacoides (fotomicrografía 2). Esta diferencia podría atribuirse al genotipo el cual es uno de los factores que más afecta sobre las respuestas de embriogénesis y organogénesis, en cultivo *in vitro*, particularmente en el caso de maíz (Duncan *et al.*, 1985).

Se podría objetar que el genotipo constituya la razón de la diferencia de respuestas encontradas entre las variedades VS-22 y Tuxpeño, argumentando que para el enverdecimiento de la primera se utilizó una intensidad luminosa de $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y para el de la segunda una de $600 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$. Sin embargo, utilizando intensidades luminosas de 80, 150, 205, y $250 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ para callos de *Portulaca oleracea* (Kennedy *et al.*, 1977), cultivos en suspensión de *Glycine max* (Gillot *et al.*, 1991), plántulas de maíz (Ruffer-Turner *et al.*, 1984) y callos de maíz (Aoyagi y Bassham, 1986), respectivamente, se obtuvieron cloroplastos maduros con grana bien definidos, lo que parecería indicar que la

intensidad de la luz no sería el factor limitante para el desarrollo de los cloroplastos. Sin embargo, sería necesario probar el rango de luminosidad de 150 a 600 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, sobre la superficie de los callos, para saber si existe un umbral o intensidad óptima para este desarrollo.

Se sabe que la viabilidad de las semillas disminuye en función del tiempo de almacenaje (Roberts, 1983), por lo que sería posible que la respuesta de enverdecimiento diferencial entre las variedades VS-22 y Tuxpsño se debiera a la duración distinta en el tiempo de almacenaje de las semillas de donde se obtuvieron los embriones maduros que originaron los callos respectivos.

En un mismo sistema, no se tienen antecedentes de comparación entre condiciones de iluminación con fotoperiodo e iluminación continua, para la biogénesis del cloroplasto. En este trabajo esto se llevó a cabo en callos con brotes incubados en las condiciones 1 y 2 (luz continua y fotoperiodo, respectivamente, ambos con AIA 10 ppm, BAP 0.3 ppm) y, después de 7 días de iluminación, el desarrollo de algunos plastidios hasta la madurez y la síntesis de una cantidad relativamente alta de clorofila sólo se detectó bajo la segunda condición (fotoperiodo) (ver fotomicrografías 1 y 3 y figura 6), aunque la intensidad de la señal para RUBISCO (figura 9) fue bastante semejante en ambos casos.

En contraste, en los callos incubados en las condiciones 3 y 4 (AIA 10 ppm, BAP 0.1 ppm) que también representaron condiciones de luz continua y fotoperiodo, respectivamente, los niveles de clorofila total alcanzados fueron los mismos a los 7 días, pero

la señal de presencia de RUBISCO fue un poco mayor bajo luz continua. Lo anterior muestra que la respuesta de enverdecimiento además de responder al fotoperiodo puede variar en función de la composición hormonal del medio. Un enverdecimiento diferencial en intensidad, dependiente de la relación auxina/citocinina se encontró en los trabajos de Sánchez de Jiménez et al (1988) y de Solís et al (1989).

El hecho de que la formación de los grana esté limitada por la acumulación de clorofila a (Mohr, 1977) puede explicar las diferencias encontradas en el desarrollo estructural del cloroplasto que arriba se señaló para los callos incubados en las condiciones 1 y 2, ya que los callos sometidos a fotoperiodo tuvieron $1.1 \mu\text{g}$ clorofila a g^{-1} peso fresco en tanto que los sometidos a iluminación continua tuvieron solamente $0.14 \mu\text{g}$ clorofila a/g peso fresco. Esta misma razón se aplica al desarrollo alcanzado en los cloroplastos de los callos incubados en la condición 1, iluminados continuamente, puesto que de los 7 a los 12 días de exposición a la luz, se formaron más tilacoides (ver fotomicrografías 2 y 1) y mayor cantidad de clorofila a.

Por consiguiente, parecería que la aplicación de un régimen luz-obscuridad, en comparación a uno de luz continua, desencadena más rápidamente tanto la conversión de la protoclorofila a clorofila a y, consecuentemente, un mayor desarrollo de grana en los callos de maíz cuando estos se incubaron en un medio conteniendo AIA 10 ppm y BAP 0.3 ppm.

En cuanto a la detección de la RUBISCO, se observó que a excepción de los callos resembrados en la condición 2, la

tendencia de los callos resebrados en las condiciones 1, 3 y 4, fue una disminución en la intensidad de la señal para esta proteína de los 7 a los 12 días de iluminación (figura 9), indicando una disminución en su síntesis y/o un aumento en su degradación, alterando finalmente la velocidad de recambio. La RUBISCO parecería tener una mayor estabilidad en los callos incubados en la condición 2 y progresivamente una menor en los callos incubados en las condiciones 3, 4 y 1.

La degradación de la RUBISCO en hojas parece ocurrir por dos medios distintos, de acuerdo a las hipótesis planteadas con respecto a la explicación de la senescencia de las mismas. Uno de ellos sería su destrucción por proteinasas en el interior del cloroplasto en las fases iniciales de la senescencia, sin que el número de éstos se alterara hasta esos momentos (Miller y Huffaker, 1985). La otra posibilidad sería que la RUBISCO fuera degradada desde el inicio de la senescencia por proteinasas localizadas en la vacuola, después de que el cloroplasto fuera incorporado y desintegrado por ésta, con lo cual el número de cloroplastos disminuiría también (Wittenbach et al., 1982). Los resultados de la presente investigación no permiten afirmar por cuál de estos medios la RUBISCO pudo ser degradada.

Es importante aclarar que la intensidad tan fuerte para la RUBISCO que exhibieron los callos con brotes a los 7 días de iluminación (figura 9) y la exhibida por el callo verde control (figura 8, CV), no pueden representar la misma cantidad de RUBISCO que el extracto concentrado de hoja (figura 8, Hc) aunque éstos hayan emitido una señal semejante a los otros, ya que en este caso en relación a los dos primeros, se aplicó un exceso de 300 veces

de contenido de clorofila lo cual debió generar una señal mucho más intensa si hubiera existido un exceso de anticuerpos en el sistema de dot-blot.

Los callos "en capa" sin brotes (sistema A) tuvieron la capacidad de diferenciarse puesto que en ellos se pudo apreciar la formación de cloroplastos en desarrollo (fotomicrografías 5 y 6) la presencia de la proteína RUBISCO (figura 10), y la acumulación de clorofila (figura 7).

Los resultados aquí descritos en relación a la presencia de RUBISCO en callos, indican que, a los 7 días de iluminación, en los callos incubados en los medios C, D y E (figura 10) y, a los 14 días de iluminación, en los incubados en los medios C y D (figura 10), existe un nivel igual o aun menor de RUBISCO que en los callos blancos (figura 8).

Freyssinet y colaboradores (1984) encontraron que en *Euglena gracilis* la RUBISCO se encuentra presente bajo condiciones de obscuridad aunque en niveles muy bajos. Sin embargo, su presencia no ha sido reportada en plantas etioladas. Inamine y colaboradores (1985) sugirieron que en plántulas etioladas de chícharo podría existir la subunidad grande de esta enzima y Nato y colaboradores (1981) detectaron en cultivos en suspensión de tabaco, que antes de enverdecerlos la subunidad pequeña ya está presente. Sin embargo, Aoyagi y Bassham (1986) no detectaron la presencia de ninguna de las subunidades en callos blancos de maíz. Por lo tanto, como se utilizaron anticuerpos contra la holoenzima, en los extractos de callo blanco y en los que mostraron una intensidad de la señal para la RUBISCO igual o menor a ellos, pudo existir cualquiera de las dos subunidades de

dicha enzima.

Dado que en los callos incubados en los medios A y B también se detectó un incremento en la intensidad de la respuesta para la RUBISCO de los 7 a los 12 días de iluminación y de acuerdo a lo anterior, probablemente sólo en los callos de los medios A, B y E debió existir la holoenzima completa. Debe tenerse presente, sin embargo, que estos resultados son semicuantitativos y las interpretaciones podrían tener otras opciones. Por ello sería importante que en experimentos futuros se realizara una evaluación cuantitativa de la RUBISCO, utilizando por ejemplo el método de ELISA.

La inducción del carácter fotomixotrófico en la variedad VS-22 de maíz fue parte de un objetivo que no pudo lograrse. Este fracaso radicó en la falta de actividad enzimática de RUBISCO en los callos "en capa". Considerando los valores tan pequeños de actividad enzimática de RUBISCO obtenidos en el grupo control realizado con un callo verde de 7.03 μg clorofila. g^{-1} peso fresco y que dió una señal intensa para la RUBISCO, no fue sorprendente la ausencia de actividad enzimática en los callos "en capa" del sistema A ni en los callos con brotes, dado que el contenido de clorofila en todos ellos fue menor, aunque en algunos la señal para la RUBISCO fue tan intensa como en los callos control.

Se sabe actualmente que la integración de las subunidades de la RUBISCO en forma de holoenzima activa requiere la presencia en el cloroplasto de unas proteínas llamadas chaperoninas (Ellis y van der Vies, 1991), de peso molecular aproximado de 60 kD que se unen a la subunidad grande de esta

enzima para mantenerla soluble y que ayudan a su ensamblaje correcto con la subunidad pequeña, produciendo la enzima RUBISCO activa. Asimismo, se ha demostrado (Salvucci et al., 1985) que una enzima específica del cloroplasto, la RUBISCO activasa, cataliza la activación de la RUBISCO *in vivo*. Esto querría decir, probablemente, que para que hubiera actividad enzimática de RUBISCO en los callos de maíz, se requeriría la presencia de estas proteínas cuya aparición debería ser paralela al proceso de diferenciación y de cuya función dependería el ensamblaje de las subunidades de la RUBISCO y la activación de la holoenzima. En estudios posteriores sería conveniente determinar los niveles de estas proteínas a lo largo del proceso de enverdecimiento de los callos.

A pesar de que el valor máximo de clorofila en los callos "en capa" fue aproximadamente 10 veces menor que inclusive el de los cultivos de callos con brotes que menos clorofila han sintetizado (Sánchez de Jiménez et al., 1988; Solís et al., 1989), la distribución del tono verdoso exhibida por estos callos fue homogénea y su aparición sincrónica, lo cual constituyó la parte complementaria del objetivo arriba señalado.

En relación a las hormonas, el hecho de que durante los 12 días de exposición de los callos a la luz, sólo los del medio A aumentaron su contenido de clorofila y su señal para la RUBISCO (mayor a la de callo blanco), además de haber presentado un desarrollo en los tilacoides de los proplastidios en diferenciación, muestra que el uso de una combinación hormonal consistente en la auxina AIA y la citocinina cinetina, es mejor

que el uso de la cinetina sola o que el de dos citocininas juntas, cinetina y BAP; ésto independientemente de la fuente de carbohidratos ya que en ambos casos se empleó sacarosa 3%, para inducir la biogénesis del cloroplasto y de sus componentes internos. Esto sugiere que la auxina puede jugar un papel fundamental en la respuesta de enverdecimiento, además de la importancia ya reconocida por la mayoría de las investigaciones realizadas hasta ahora, en las que las citocininas son el tipo de hormonas frecuentemente aplicadas para inducir el enverdecimiento de manera exitosa.

Respecto a la fuente de carbono, la inclusión de lactosa en el medio de enverdecimiento (medio D), a pesar de haber propiciado la mayor síntesis de clorofila en los callos "en capa", pareció impedir la acumulación de la holoenzima RUBISCO. Se ha reportado (Sheen, 1990) que la lactosa prácticamente no inhibe la expresión de ciertos promotores de genes de proteínas fotosintéticas, por lo cual esto significaría que dependiendo de la proteína fotosintética en cuestión, este disacárido originaría una inhibición diferencial sobre la expresión de los promotores respectivos.

Por otra parte, la disminución de sacarosa al 2% (medio E) resultó mejor que su uso al 3% por permitir la acumulación de clorofila y favorecer una señal muy intensa para la RUBISCO. Lo anterior sería explicable por lo reportado en la literatura (Sheen, 1990), en cuanto a que la sacarosa inhibe la expresión de ciertos promotores de genes de proteínas fotosintéticas.

La respuesta de los callos incubados en el medio E (cinetina 0.1 ppm, BAP 0.1 ppm y sacarosa 3%) fue mejor que la de los

incubados en el medio A (AIA 10 ppm, cinetina 0.1 ppm y sacarosa 3%), al menos por lo que a clorofila y especialmente a la presencia de RUBISCO se refiere. Atendiendo a este último criterio, aunque en los primeros no se estudió la diferenciación del proplastidio, es difícil pensar que los cloroplastos en formación presentes en ellos hubieran exhibido un desarrollo menor al de los cloroplastos de los callos del medio A, los cuales se encontraron en una etapa inicial de su formación.

Como la biogénesis del cloroplasto fue más completa en los callos del medio A que en los del medio C (grupo control de los del E) y más completa en los del medio E que en los del medio A, es aceptable entonces afirmar que la concentración y tipo de fuente de carbono, más que la composición y relación hormonal, sea el factor limitante de la acumulación de clorofila y, sobre todo, de la aparición de la RUBISCO.

La inducción del enverdecimiento de células en cultivo *in vitro* de plantas C₄ ha involucrado el manejo de callos bajo la forma irregular con que estos crecen, con la presencia en su superficie de zonas organogénicas. De acuerdo a la literatura consultada (Heyser y Nabors, 1982; Nabors *et al.*, 1982; Aoyagi y Bassham, 1986a; Neumann y Bender, 1987; Nelson y Langdale, 1989; Solís *et al.*, 1989) para el planteamiento del presente trabajo, éste sería el primero en hacer uso de un sistema de callo "en capa" sin brotes, para inducir su enverdecimiento.

Los resultados aquí obtenidos revelan la utilidad de este sistema: se propició un enverdecimiento uniforme en intensidad (débil) y sincrónico, con lo que se evitó la coexistencia de zonas no diferenciadas, zonas enverdecidas y zonas en proceso de

diferenciación, así como la de regiones de tono verdoso con diferente intensidad. Además, la biogénesis del cloroplasto ocurrió lentamente, lo que facilita el estudio de los cambios que lo acompañan desde las etapas iniciales de su formación; más aún, muestra el potencial de desarrollarse progresivamente con lo cual se podrían investigar las posteriores etapas hasta la madurez.

La ausencia de un mayor desarrollo estructural y bioquímico en los callos del sistema A pudo deberse a que las relaciones de hormonas utilizadas no fueron las más adecuadas, y no tanto al tipo de hormonas, ya que las aplicadas fueron las que tradicionalmente han resultado benéficas para prácticamente todos los cultivos (Yamada *et al.*, 1978; Horn *et al.*, 1983; Solís *et al.*, 1989). Otra causa pudo ser el empleo de una concentración de sacarosa relativamente alta en el medio de cultivo, aunado a la baja concentración de CO₂ en el aire y, probablemente también, debido a que la intensidad luminosa aplicada fue baja.

Dada la carencia de un sistema vascular en el sistema "en capa" que permitiría la translocación de fotosintatos de los cloroplastos desarrollados en las regiones enverdecidas a las posibles zonas no enverdecidas, (las cuales estarían funcionando como "centros demandantes"), entonces la producción de fotosintatos excedería constantemente la capacidad de utilización de los mismos, lo cual originaría primero la acumulación de almidón en esos cloroplastos y más tarde la degeneración y escasa presencia de los mismos. Es interesante señalar al respecto que la remoción de órganos demandantes causa un incremento sustancial en la concentración de sacarosa de las hojas y una inhibición severa de la fotosíntesis (Foyer, 1988).

La ultraestructura de las células de los cultivos "en placa" (sistema B) reveló un estado metabólico alterado en las mismas desde el momento en que estos cultivos fueron establecidos (fotomicrografía 7). Esto sugiere que desde el establecimiento de los cultivos en suspensión las células probablemente no se encontraban en condiciones adecuadas para sobrevivir. En la tabla VI se aprecia, por cierto, que no hubo cambio en el número total de células después de una semana de cultivo. A pesar de lo anterior, se logró observar la presencia de proplastidios y se detectó una reacción positiva para la RUBISCO, de intensidad similar a la emitida por las muestras de callos blancos. Por consiguiente, el cultivo en suspensión tendría que ser mejorado y los cultivos "en placa" quizá deberían primero ser adaptados al medio líquido y propiciar su crecimiento o cuando menos asegurarse de mantener su viabilidad, antes de utilizar el sistema B como un modelo de estudio de la biogénesis del cloroplasto.

El empleo del sistema B presenta ventajas para este tipo de investigación ya que está formado de una población celular más uniforme que la del sistema A. Además sería interesante porque plantearía un modelo para conocer la influencia de las uniones celulares en el proceso de diferenciación del cloroplasto.

En los cultivos en suspensión existen agregados celulares de diferente tamaño, pero también existen muchas células libres. Se desconoce si estas células libres, una vez reorganizadas como una "placa" en medio sólido, son capaces de reestablecer contactos citoplásmicos (plasmodesmos) entre ellas. A este respecto cabe señalar que actualmente se ha enfatizado la importancia que puede

tener la comunicación entre células en procesos de diferenciación y morfogénesis (Knox, 1992; Poethig, 1989; Robards y Lucas, 1990; Becraft y Freeling, 1991) pero no se sabe su efecto o requerimiento para la biogénesis del cloroplasto.

VIII. CONCLUSIONES.

1. En callos con brotes, el régimen de horas luz-obscuridad causa una respuesta diferencial en la biogénesis del cloroplasto, dependiendo de la relación auxina/citocinina. En un medio conteniendo AIA 10 ppm y BAP 0.3 ppm, un fotoperiodo de 16 h luz/8 h obscuridad es mucho más eficiente que la iluminación continua, a $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, en promover el desarrollo del cloroplasto hasta la madurez.
2. La RUBISCO acumulada en callos con brotes está presente en niveles suficientes para mostrar actividad enzimática pero parece requerir de su ensamblaje y/o activación adecuados.
3. En un medio de cultivo que contenga sacarosa 3%, es necesaria la presencia de una auxina (AIA) y una citocinina (cinetina) para permitir en mayor grado la biogénesis del cloroplasto, en callos "en capa".
4. Una concentración de sacarosa relativamente baja (2%), en la ausencia de otra fuente de carbono, es un factor importante involucrado en la síntesis (señal positiva) de la RUBISCO, en callos en proceso de enverdecimiento.
5. Las mejores condiciones que condujeron a la biogénesis del cloroplasto fueron: incubación de los callos en medio R con cinetina 0.1 ppm y BAP 0.1 ppm como hormonas y sacarosa 2% como fuente de carbono y exposición a la luz por 12 días a una intensidad luminosa de $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$.
6. El uso de callos "en capa" es un sistema que permite el enverdecimiento homogéneo y sincrónico de las células, lo cual lo hace propio para estudiar la biogénesis del cloroplasto.

IX. PERSPECTIVAS.

Con el objeto de propiciar un mayor desarrollo en la biogénesis del cloroplasto en los callos "en capa" de maíz (var. VS-22) y decidir qué condiciones son las que lo permiten, los futuros experimentos deberían comprender las siguientes modificaciones: un intervalo mayor de concentración de las hormonas manejadas paralelo a la aplicación de una baja concentración de sacarosa y una atmósfera enriquecida con CO₂. Es importante señalar a este respecto que debería ponerse especial atención en lograr un equilibrio entre el metabolismo del cloroplasto funcionalmente maduro y el requerimiento de energía para el resto de la célula, con la idea de no generar una mayor cantidad de fotosintatos que los que se puedan consumir y así poder obtener un cultivo fotomixotrófico estable. Como lo anterior involucraría la utilización constante de los productos fotosintéticos, una alternativa para lograr esto sería la inducción de la división activa de las células enverdecidas.

Igualmente deberían ensayarse intensidades luminosas de 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ hasta 600 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$. Es posible que también convenga permitir la exposición de los cultivos a la luz por periodos mayores a los 12 días, ya que en este trabajo la biogénesis del cloroplasto y la síntesis de sus componentes internos mostraron una tendencia a proseguir de los 7 a los 12 días de iluminación, en cuanto a la formación de tilacoides, clorofila total y RUBISCO.

Asimismo, en todos los casos debería analizarse el estado de diferenciación ultraestructural del cloroplasto. Además, si de

diferentes tratamientos se desea elegir el mejor y sobre éste hacer modificaciones adicionales, el criterio de elección debería ser el contenido de clorofila total en lugar de la apreciación visual. De igual forma, la técnica histológica para microscopía óptica tendrá que ser modificada para conservar íntegramente los arreglos celulares en el callo y evitar la lisis de las células.

X. BIBLIOGRAFIA.

- Aloni, R. 1987. Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 179-204.
- Aoyagi, K. y Bassham, J. 1986a. Appearance and accumulation of C₄ carbon pathway enzymes in developing maize leaves and differentiating maize A188 callus. *Plant Physiol.* 80: 322-333.
- Aoyagi, K. y Bassham, J. 1986b. Appearance and accumulation of C₄ carbon pathway enzymes in developing wheat leaves. *Plant Physiol.* 80: 334-340.
- Baker, N. y Lecch, R. 1977. Development of photosystem I and photosystem II activities in leaves of light grown maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 60: 640-644.
- Barajas, M. 1990. Análisis de la regulación de la actividad de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa en maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México. pp: 115.
- Becraft, P. y Freeling, M. 1991. Sectors of *liguleless-1* tissue interrupt an inductive signal during maize leaf development. *The Plant Cell.* 3: 801-807.
- Black, C.; Vines, H. y Jernstedt, J. 1987. Integration of biochemistry with leaf anatomy during C₄ plant photosynthesis. En: *Models in Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. I. (Newman, D. y Wilson, K. eds.). USA. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-4342-9 (set). pp: 37-44.
- Bradbeer, J. 1981. Development of photosynthetic function during chloroplast biogenesis. En: *The Biochemistry of Plants*. (Hatch, M. y Boardman, N. eds.). Vol. 8. Academic Press, Inc. Nueva York. ISBN 0-12-675408-X. pp: 423-472.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brangeon, J. y Nato, A. 1981. Heterotrophic tobacco cell cultures during greening. I. Chloroplast and cell development. *Physiol. Plant.* 53: 327-334.
- Bray, C. 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1: 229-235.
- Brown, W. 1975. Variations in anatomy, associations and origins of Kranz tissue. *Am. J. Bot.* 62: 395-402.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Phytochem. Photobiol.* 2: 241-249.
- Crespo, H.; Frean, M.; Creswell, C. y Tew, J. 1979. The occurrence of both C₃ and C₄ photosynthetic characteristics in a single *Zea mays* plant. *Planta.* 147: 257-263.
- Chu, C.; Wang, C.; Sun, C.; Hsu, C.; Yin, K.; Chu, C. y Bi, F. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659-668.
- de Fossard, R. 1976. Tissue culture for plant propagators. The University of New England Printery. Australia. ISBN 0 85834 118 2 pp: 317-319.
- Dean, C. y Leech, R. 1982. Genome expression during normal leaf development. *Plant Physiol.* 69: 904-910.
- dos Santos, A.; Outka, D.; Cocking, E. y Davey, M. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*.

- Z. Pflanzenphysiol. 99: 261-270.
- Downton, W. y Pyliotis, N. 1971. Loss of PS II during ontogeny of sorghum bundle sheath chloroplasts. Can. J. Bot. 49: 179-180.
- Duncan, R.; Williams, M.; Zehr, B. y Widholm, J. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. Planta. 165: 322-331.
- Edwards, G. y Huber, S. 1981. The C₄ pathway. En: The Biochemistry of Plants. (Hatch, M. y Boardman, N. eds.). Vol.8. Academic Press, Inc. Nueva York. ISBN 0-12-675408-X. pp:237-281.
- Edwards, G. y Walker, D. 1983. C₃, C₄: mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications. Oxford. ISBN 0-632-00757-5. pp: 275-298.
- Ellis, R. y van der Vies, S. 1991. Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 60: 321-347.
- Foyer, C. 1988. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. Plant Physiol. Biochem. 26: 483-492.
- Freyssinet, G.; Eichholz, R. y Buetow, D. 1984. Kinetics of accumulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase during greening in *Euglena gracilis*: photoregulation. Plant Physiol. 75: 850-857.
- García, F. 1991. Inducción y mantenimiento de cultivos embriogénicos *in vitro* de diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp:157.
- George, E. y Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue

- culture. Vol. I. Exegetics Limited. USA. pp: 125-129.
- Gillot, M.; Erdos, G. y Buetow, D. 1991. Light-induced chloroplast differentiation in soybean cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 96: 962-970.
- Gordon-Kamm, W.; Spencer, T.; Mangano, M.; Adams, T.; Daines, R.; Start, W.; O'Brien, I.; Chambers, S.; Adams, W.; Willets, N.; Rice, T.; Mackey, C.; Krueger, R.; Kausch, A. y Lemoux, P. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell.* 2: 603-618.
- Grebanier, A.; Coen, D.; Rich, A. y Bogorad, L. 1978. Membrane proteins synthesized but not processed by isolated maize chloroplasts. *J. Cell Biol.* 78: 734-746.
- Harpster, M. y Apel, K. 1985. The light-dependent regulation of gene expression during plastid development in higher plants. *Physiol. Plant.* 64: 147-152.
- Hatch, M.; Slack, C. y Johnson, H. 1967. Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurrence in other plant species. *Biochem. J.* 102: 417-422.
- Hatch, M.; Kagawa, T. y Craig, S. 1975. Subdivisions of C₄-pathway species based on differing C₄ acid decarboxilating systems and ultrastructural features. *Aust. J. Plant Physiol.* 2: 111-128.
- Henningsen, K. y Boardman, N. 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.
- Heyser, J. y Nabors, M. 1982. Long term plant regeneration, somatic

- embryogenesis and green spot formation in secondary Oat (*Avena sativa*) callus. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 107.S.: 153-160.
- Holm-Hansen, C.; Nishida, K.; Moses, V. y Calvin, M. 1959. Effect of mineral salts on short-term incorporation of carbon dioxide in *Chlorella*. J. Exp. Bot. 10: 109-124.
- Horn, M.; Sherrard, J. y Widholm, J. 1983. Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. I. Establishment of photoautotrophic cultures. Plant Physiol. 72: 426-429.
- Horsch, R.; King, J. y Jones, G. 1980. Measurement of cultured plant cell growth on filter paper discs. Can. J. Bot. 58: 2402-2406.
- Inamine, G.; Nash, B.; Weisbach, H. y Brot, N. 1985. Light regulation of the synthesis of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in peas: Evidence for translational control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5690-5694.
- Ingham, K. 1984. Protein precipitation with polyethylene glycol. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. Nueva York. ISBN 0-12-182004-1. 104: 351-356.
- Kennedy, R.; Barnes, J. y Laetsch, W. 1977. Photosynthesis in Ca plant tissue cultures. Plant Physiol. 59: 600-603.
- Klein, R. y Mullet, E. 1986. Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. J. Biol. Chem. 26: 11138-11145.
- Knox, J. 1992. Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. The Plant Journal. 2: 137-141.
- Krupinska, K. y Apel, K. 1989. Light-induced transformation of

- etioplasts to chloroplasts of barley without transcriptional control of plastid gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 219: 467-473.
- Kumar, A.; Roy, S. y Neumann-K. 1989. Activities of carbon dioxide fixing enzymes in maize tissue cultures in comparison to young seedlings. *Physiol. Plant.* 76: A-42.. Abstract 0185.
- Laetsch, W. 1974. The C₄ syndrome: a structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 27-42.
- Langdale, J.; Rothermel, B. y Nelson, T. 1998a. Cellular pattern of photosynthetic gene expression in developing maize leaves. *Gen. Dev.* 2: 106-115.
- Langdale, J.; Zelitch, I.; Miller, E. y Nelson, T. 1988b. Cell position and light influence C₄ versus C₃ patterns of photosynthetic gene expression in maize. *EMBO J.* 7: 3643-3651.
- La Rosa, P.; Hasegawa, P. y Bressan, R. 1984. Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol. Plant.* 61: 279-286.
- Leech, R.; Rumsby, M. y Thomson, W. 1973. Plastid differentiation, acyl lipid, and fatty acid changes in developing green maize leaves. *Plant Physiol.* 52: 240-245.
- Liveanu, V.; Yocum, F. y Nelson, N. 1986. Polypeptides of the oxygen-evolving photosystem II complex. *J. Biol. Chem.* 261: 5296-5300.
- Martineau, B. y Taylor, W. 1985. Photosynthetic gene expression and cellular differentiation in developing maize leaves. *Plant Physiol.* 78: 399-404.
- Mayfield, G. y Taylor, W. 1984. The appearance of photosynthetic

- proteins in developing maize leaves. *Planta*. 161: 481-486.
- Miller, B. y Huffaker, R. 1985. Differential induction of endoproteinasas during senescence of attached and detached barley leaves. *Plant Physiol.* 78: 442-446.
- Miranda, V.; Baker, N. y Long, S. 1981. Anatomical variation along the length of the *Zea mays* leaf in relation to photosynthesis. *New Phytol.* 88: 595-605.
- Mohr, H. 1977. Phytochrome and chloroplast development. *Endeavour*. 1:107-114.
- Moore, B.; Cheng, S.-H. y Edwards, G. 1986. The influence of leaf development on the expression of C₄ metabolism in *Flaveria trinervia*, a C₄ dicot. *Plant Cell Physiol.* 27: 1159-1167.
- Mullet, J. 1988. Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 475-502.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Nabors, M.; Kroskey, C. y Mc Hugh, D. 1982. Green spots are predictors of high callus growth rates and shoot formation in normal and in salt stressed tissue culture of Oat (*Avena sativa*) L.). *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105. S.: 341-349.
- Nagai, T.; Nakamura, Ch.; Nagayoshi, T. y Ono, H. 1989. 2,4-D sustained photomixotrophic growth of a chlorophyllous cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* 30: 17-23.
- Nato, A. y Mathieu, Y. 1978. Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose biphosphate carboxylase activities during the photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum*

- (*Cv. xanthi*) cell suspensions. *Plant Sci. Lett.* 13: 49-56.
- Nato, A.; Mathieu, Y. y Brangeon, J. 1981. Heterotrophic tobacco cell cultures durin greening. *Physiol. Plant.* 53: 335-341.
- Nelson, T. y Langdale, J. 1989. Patterns of leaf development in C₄ plants. *The Plant Cell.* 1: 3-13.
- Neumann, K-H. y Bender, L. 1987. Photosynthesis in cell and tissue culture systems. En: *Plant tissue and cell culture.* (Green, L.; Somers, D.; Hackett, W. y Biesbuer, D. eds.). *Proc. 6th Int. Congr. Plant tissue and cell culture.* Alan, R. Liss, Inc. USA. pp: 151-165.
- Ngernprasirtsiri, J.; Chollet, R.; Kobayashi, H.; Sugiyama, T. y Akazawa, T. 1989. DNA methylation and the differential expression of C₄ photosynthesis genes in mesophyll bundle sheath cells of greening maize leaves. *J. Biol. Chem.* 264: 8241-8248.
- Nishida, K. 1962. Effects of internal and external factors on photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation in general and on formation of ¹⁴C-maltose in *Acer* leaf in particular. *Physiol. Plant.* 15: 47-58.
- Nishida, K.; Sato, F. y Yamada, Y. 1980. Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 21: 47-55.
- Ohashi, K.; Tanaka, A. y Tsuji, H. 1989. Formation of the photosynthetic electron transport system during the early phase of greening in barley leaves. *Plant Physiol.* 91: 409-414.
- Ongun, A. y Stocking, C. 1965. Effect of light and dark on the intracellular fate of photosynthetic products. *Plant Physiol.*

40: 825-831.

- Pamplin, J. y Chapman, J. 1975. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue culture: changes in the activity of the enzymes of the chlorophyll biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 26: 212-220.
- Pike, C. 1987. Ribulose Bisphosphate Carboxylase assay. Información presentada en el Congreso Internacional de "Plant Physiology".
- Paul, J. y Bassham, J. 1977. Maintenance of high photosynthetic rates in mesophyll cells isolated from *Papaver somniferum*. *Plant Physiol.* 60: 775-778.
- Poethig, S. 1989. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends in Genetics.* 5: 273-277.
- Prioli, L. y Sondahl, M. 1989. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). *Bio/Technology.* 7: 589-594.
- Robards, A. y Lucas, W. 1990. Plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 369-419.
- Roberts, E. 1983. Loss of seed viability during storage. *Adv. Res. Technol. Seed.* 8: 9-34.
- Robertson, D. y Laetsch, W. 1974. Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiol.* 54: 148-159.
- Robinson, S. y Walker, D. 1981. Photosynthetic carbon reduction cycle. En: *The Biochemistry of Plants.* (Hatch, M. y Boardman, N. eds.). Vol. 8. Academic Press, Inc. Nueva York. ISBN 0-12-675408-X. pp: 193-236.
- Rodermel, S. y Bogorad, L. 1985. Maize plastids photogenes: mapping and photoregulation of transcript levels during

- light-induced development. *J. Cell Biol.* 100: 463-476.
- Roy, S. y Kumar, A. 1989. Development of photosynthetic apparatus in callus culture derived from a C₄ plant (*Zea mays*). *Physiol. Plant.* 76: A-139. Abstract 0768.
- Ruffer-Turner, M.; Bradbeer, J.; Stocking, C.; Montes, G. y Wara-Aswapati, O. 1984. Chloroplast development in *Zea mays*. *Israel J. Bot.* 33: 133-147.
- Salvucci, M.; Portis, A. y Ogren, W. 1985. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*. *Photosyn. Res.* 7: 193-201.
- Sánchez de Jiménez, E.; Albores, M. y Loyola-Vargas, V. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98: 347-353.
- Sánchez de Jiménez, E.; Vargas, M.; Aguilar, R. y Jiménez, E. 1988. Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 723-732.
- Sato, F.; Nishida, K. y Yamada, Y. 1980. Activities of carboxylation enzymes and products of ¹⁴CO₂ fixation in photoautotrophically cultured cells. *Plant Sci. Lett.* 20: 91-97.
- Seeni, S. y Gnanam, A. 1983. Photosynthesis in cell suspension culture of a C₄ plant, *Gisekia pharnaceoides* L. *Plant Cell Physiol.* 24: 1033-1041.
- Sheen, J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell.* 2: 1027-1038.
- Sheen, J. y Bogorad, L. 1985. Differential expression of the ribulose bisphosphate carboxylase large subunit gene in

- bundle sheath and mesophyll cells of developing maize leaves is influenced by light. *Plant Physiol.* 79: 1072-1076.
- Shillito, R.; Carswell, G.; Johnson, C.; DiMaio, J. y Harmas, C. 1989. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Bio/Technology.* 7: 581-587.
- Slack, C. y Hatch, M. 1967. Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. *Biochem. J.* 103: 660-665.
- Solís, C.; Sánchez de Jiménez, E.; Loyola-Vargas, V.; Cárabez, A. y Lotina-Hennson, B. 1989. The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C₃ and a C₄ plant. *Plant Cell Physiol.* 30: 609-616.
- Thompson, W.; Everett, M.; Polans, N.; Jorgensen, R. y Palmer, J. 1983. Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung bean leaves. *Planta.* 158: 487-500.
- Torrent, M. 1991. Manual del curso: "Mecanismos de acción de fitorreguladores en el desarrollo y germinación de semillas". Facultad de Química. UNAM. pp: 1-3.
- Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119-138.
- Usuda, H.; Kanai, R. y Takenchi, M. 1971. Comparison of carbon dioxide fixation and the fine structure in various assimilatory tissues of *Amaranthus retroflexus* L. *Plant Cell Physiol.* 12: 917-930.
- Viro, M. y Klopstech, K. 1980. Differential expression of the genes for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and light harvesting chlorophyll a/b protein in the developing barley

- leaf. *Planta*. 150: 41-45.
- Wittenbach, V.; Lin, W. y Herbert, R. 1982. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* 69: 98-102.
- Woo, K.; Anderson, J.; Boardman, N.; Downton, W.; Osmond, C. y Thorne, S. 1970. Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C₄ plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67: 18-25.
- Yamada, Y.; Sato, F. y Hagimori, M. 1978. Photoautotrophism in green cultured cells. En: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. (Thorpe, T. ed.). Univ. Calgary. Canada. pp: 453-462.
- Yamada, Y.; Sato, F. y Watanabe, K. 1982. Photosynthetic carbon metabolism in cultured photoautotrophic cells. *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*. Tokyo. pp: 249-250.
- Yeoman, M. y Aitchison, P. 1973. Growth patterns in tissue (callus) culture. En: *Plant Tissue and Cell Culture*. (Street, H. ed.). Botanical Monographs. Vol. 11. Blackwell Scientific Publications. Oxford. ISBN. 0 632 090103. pp: 240-269.

XI. APENDICE.

Soluciones stock del medio Murashige-Skoog (1962).

Solución	Composición	g.L ⁻¹	Conc. final en medio R (mg.L ⁻¹)
A	CaCl ₂ .2H ₂ O	44.0	440
B	NH ₄ NO ₃	16.5	825
	KNO ₃	19.0	950
C	KI	0.083	0.83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	0.025
D	KH ₂ PO ₄	17.0	170
	H ₃ BO ₃	0.62	6.2
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	0.25
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	18.5	185
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.9457	9.457
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0012	0.012
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.43	4.3
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	27.8
	EDTA. Na. 2H ₂ O	3.726	37.2
G	Inositol	10.0	100
H	Ac. nicotínico	0.1	0.5
I	Tiamina	0.2	1.0
J	Piridoxina	0.1	0.5
K	Glicina	1.0	2.0

Preparación del medio R.

Solución stock	ml. L ⁻¹ medio
A	10
B	50
C	10
D	10
E	10
F	10
G	10
H	5
I	5
J	5
K	2
Hidrolizado de caseína	200 mg
Sacarosa	30 g
MCPP	4 mg (R ₁)
	2 mg (R ₂)
Cinetina	0.01 mg (R ₂)
Agar	7.5 g

Soluciones stock del medio N6 (Chu et al., 1975).

Solución	Composición	g. L ⁻¹	Conc. final en N6 (mg. L ⁻¹)
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	16.60	166
2	KNO ₃	28.30	2830
3	KI	0.08	0.8
	KH ₂ PO ₄	40.00	400
	H ₃ BO ₃	0.16	1.6
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	18.50	185
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.33	3.3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.15	1.5
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78	27.84
	EDTA.Na ₂ .H ₂ O	3.72	37.26
H	Ac. nicotínico	0.10	0.5
I	Tiamina	0.02	0.1
J	Piridoxina	0.10	0.5
K	Glicina	1.00	2.0

Soluciones stock adicionales al medio N6cc (cocteles)

Solución	Composición	mg.100 ml ⁻¹
1	Glicina	10
2	Tiamina	10
3	Glicina	20
	Inositol	1000
	Ac. nicotínico	5
	Piridoxina	5
	Tiamina	10
4	Glicina	200
	Asparagina	100
	Ac. aspártico	75
	Arginina	600
	Urea	450
	Tiamina	10
	Ac. nicotínico	10
	Piridoxina	10
	Ac. fólico	10
	Biotina	10
	Riboflavina	1.0
	Ac. glutámico	75
	Inositol	450
5	Adenina	100
	H ₂ SO ₄ c	5 gotas

Preparación del medio N6.

Solución stock	ml.L ⁻¹ medio
1	10
2	100
3	10
4	10
F	10
II	5
I	5
J	5
K	2
Sacarosa	30 g
Agar	7.5 g

Para el medio N6cc, además de lo anterior, se añadió:

soluciones cc	ml.L ⁻¹ medio
1	10
2	9
3	10
4	10
5	10
asparagina	150 mg

Concentración de hormonas en los medios de inducción
y de resiembra indicados en las tablas I y II.

Medio de inducción	hormonas (mg.L ⁻¹)	medio de resiembra	hormonas (mg.L ⁻¹)
1 (N6)	MCPP 4	1' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
2 (N6)	MCPP 2	2' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
3 (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01	3' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
4 (N6)	MCPP 4	4' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
5 (N6) _{cc}	MCPP 4	5' (N6) _{cc}	MCPP 2 cinetina 0.01
6 (R)	MCPP 4 cinetina 0.001	6' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
7 (R)	MCPP 6 cinetina 0.001	7' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
8 (R)	MCPP 8 cinetina 0.001	8' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
9 (R)	MCPP 4	9' (R)	MCPP 2 cinetina 0.01
10 (R)	MCPP 2	-----	-----
11 (R)	MCPP 2 (fotop. 16 h luz).	-----	-----

Concentración de hormonas en los medios de inducción
y de resiembra indicados en las tablas I y II.

Medio de inducción	hormonas (mg.L ⁻¹)	medio de resiembra	hormonas (mg.L ⁻¹)
1 (N6)	MCPP 4	1' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
2 (N6)	MCPP 2	2' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
3 (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01	3' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
4 (N6)	MCPP 4	4' (N6)	MCPP 2 cinetina 0.01
5 (N6) _{cc}	MCPP 4	5' (N6) _{cc}	MCPP 2 cinetina 0.01
6 (R)	MCPP 4 cinetina 0.001	6' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
7 (R)	MCPP 6 cinetina 0.001	7' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
8 (R)	MCPP 8 cinetina 0.001	8' (R)	MCPP 2 cinetina 0.1
9 (R)	MCPP 4	9' (R)	MCPP 2 cinetina 0.01
10 (R)	MCPP 2	-----	-----
11 (R)	MCPP 2 (fotop. 16 h luz).	-----	-----