

152
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO
FOTOMIXOTROFICO *IN VITRO*: EFECTO
DE LA FUENTE DE CARBONO ORGANICO
Y SUMINISTRO DE CO₂ EN EL ENVERDE-
CIMIENTO DE CELULAS DE MAIZ
(*Zea mays L.* var. VS-22).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA ALMA RINCON GUZMAN



México, D. F.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

H. EN C. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México
P r e s e n t e

Per medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó 6 la pasante RINCON GUZMAN MARIA ALMA, con el título: ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO FOTOMIXOTROFICO "IN VITRO": EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO ORGANICO Y SUMINISTRO DE CO₂ EN EL ENVERDECIMIENTO DE CELULAS DE MAIZ (Zea mays L. var. VS-22).

Consideramos que reúne los méritos necesarios para obtener el título de BIOLOGA.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A t e n t a m e n t e
México, D. F., a 7 de Diciembre de 1993.

- | | | | | |
|-----|----------|----------------|---------------------|------------|
| 1.- | DRA. | ESTELA | SANCHEZ | QUINTANAR |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos | |
| 2.- | DRA. | ROCIO | SALCEDA | SACANELLES |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos | |
| 3.- | H. en C. | LAILA | GUTIERREZ | KOBEB |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos | |
| 4.- | Sup. | DRA. PATRICIA | GUEVARA | FEFER |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos | |
| 5.- | Sup. | BIOL. JOSEFINA | HERRERA | SANTOYO |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos | |

NOTA: El interesado deberá ponerse de acuerdo con el jurado para fijar fecha (día y hora) del examen, para evitar problemas de asistencia. ES MUY IMPORTANTE LA PUNTUALIDAD.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica Vegetal, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M. , bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Se agradece la valiosa cooperación recibida por parte de las siguientes Instituciones :

CONACYT.

Proyecto : " Biogénesis de cloroplastos en cultivo de células vegetales ".

Clave : D112-903884

y al **SNI.**

De quien se recibió beca durante la realización de esté trabajo.

Se agradece la amable colaboración y ayuda recibida del Técnico Académico **M. en C. Martín Vargas Suárez**, responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química U.N.A.M.

Se agradece también la atenta colaboración del Técnico Académico **Rodolfo Paredes Díaz**, de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. , quién realizó la parte histológica del presente trabajo.

Así mismo también se agradece al **M. en C. Guillermo González Vargas** responsable del Laboratorio de Computo de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química U.N.A.M. la ayuda recibida en el manejo de los programas utilizados en el presente estudio.

Agradecimientos.

Director de tesis:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química. U.N.A.M.

Jurado:

Dra. Rocío Salceda Sacanelles. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. U.N.A.M.

M. en C. Lalia Gutiérrez Kobeh. Departamento de Microbiología Instituto de Fisiología Celular. U.N.A.M.

Dra. Patricia Guevara Fefer. Departamento de Biología Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Biól. Josefina Herrera Santoyo. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Se agradece de forma especial a la **Dr. Eida Beltrán Peña** y a la **Dr. Ma. Elena Mellado Rojas** de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M., la ayuda recibida durante el desarrollo de este trabajo.

A mi Familia con amor.

A mis queridas hermanas:
Vianny, Olivia, Sara
y muy especialmente a
Miriam con quien
comparto este trabajo.

A mis amigos:
Solene Mancuela y
Rosario Sánchez por los
gratos momentos
compartidos.

*"Procuro recordar", " que lo
que en verdad cuenta no es ni
el dinero, ni los títulos, ni las
posiciones, sino la forma en que
amamos a los demás."*

R. D. A.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- BAP** ___ Bencilamino purina.
- BSA** ___ Albúmina de suero de bovino.
- C3** ___ Vía de fijación del C fotosintético, donde el primer producto
___ formado después de la fijación de CO₂, es un compuesto de 3
___ carbonos.
- C4** ___ Vía de fijación del C fotosintético, donde el primer compuesto
___ formado después de la fijación del CO₂, es un compuesto de 4
___ carbonos.
- CF1-CFo** ___ Factores de acoplamiento.
- DTT** ___ Ditiotreitól
- 2, 4-D** ___ Acido 2,4-diclorofenoxiacético.
- ETDA** ___ Acido tetra acético ethylenitrilo
- EM - NAD** _ Enzima málica dependiente de NAD.
- EM - NADP** Enzima málica dependiente de NADP.
- FI** ___ Fotosistema I
- FII** ___ Fotosistema II
- J** ___ Julios.
- LHCP** ___ Complejo proteína clorofila a / b.

MCPP ____ Acido 2- (2-metil, 4 - cloro fenoxi) propiónico.

MDH-NADP Malato deshidrogenasa dependiente de NADP.

MS ____ Medio de Murashige y Skoog.

NADPH ____ Nicotinamida adenindinucleótido fosfato.

PEG ____ Polietilenglicol.

OAA ____ Acido oxalacético

PEP ____ Acido fosfoenolpirúvico.

PEP-CK ____ Fosfoenolpiruvato-carboxicinasa.

PEPcase ____ Acido fosfoenolpirúvico carboxilasa.

PI ____ Ortofosfato inorgánico.

3 - PGA ____ Acido 3- fosfoglicérico.

PMSF ____ Fluoruro de fenil metil sulfonilo.

ppm ____ Partes por millón

rpm ____ Revoluciones por minuto.

RUBISCO _ Ribulosa bifosfato carboxilasa - oxigenasa.

RuBP ____ Ribulosa - 1,5 - bifosfato.

SDS ____ Dodecil sulfato de sodio.

INDICE

A. Resumen.	1
B. Antecedentes.	3
B.1. Importancia y función de la fotosíntesis.	3
B.1.1. Fases del proceso fotosintético.	5
B.2. Aparato fotosintético.	6
B.2.1. Estructura del cloroplasto.	7
B.2.2. Estructura de la clorofila.	11
B.2.2.1. Pigmentos fotosintéticos: fotosistemas.	13
B.2.2.2. Cadena transportadora de electrones.	15
B.2.3. Estructura de RUBISCO.	16
B.3. Fijación de CO ₂ vía C ₃ .	18
B.4. Fijación de CO ₂ vía C ₄ .	19
B.5. Tipos de plantas con fotosíntesis C ₄ .	19
B.6. Anatomía Kranz.	24
B.7. Biogénesis del Cloroplasto.	27
B.8. Fotosíntesis en cultivo de tejidos vegetales.	29
B.8.1. Cultivos Fotoautotróficos y Fotomixotróficos.	29
C. Introducción.	39
C.1. Hipótesis y objetivos.	41
C.2. Diseño experimental.	43
D. Materiales y métodos.	45
D.1. Material biológico.	45

D.2. Preparación de medios de cultivo.	45
D.3. Inducción de callo.	46
D.4. Resiembra del callo inducido.	46
D.5. Establecimiento de cultivos en "capa" con CO ₂ .	47
D.6. Establecimiento de cultivos en "capa" sin CO ₂ .	48
D.7. Cuantificación de clorofila.	48
D.8. Cuantificación de proteína.	49
D.9. Detección de Rubisco por Dot-Blot.	49
D.10. Detección de Rubisco por Western-Blot.	50
D.11. Cuantificación de la actividad enzimática de Rubisco.	51
D.12. Técnicas Histológicas.	52
D.12.1. Microscopía electrónica.	52
E.Resultados.	53
E.1. Inducción y crecimiento de callos de maíz.	53
E.2. Enverdecimiento de callos.	53
E.2.1. Medición cualitativa del enverdecimiento de callos.	53
E.2.2. Influencia del genotipo en el enverdecimiento del callo.	55
E.2.3. Efecto de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento de cultivos maíz.	55
E.2.4. Efecto del CO ₂ sobre el enverdecimiento de cultivos maíz.	57
E.3. Efecto de la fuente de carbono y CO ₂ en la síntesis de clorofila.	57
E.4. Efecto de la fuente de carbono y CO ₂ en la acumulación de proteína.	65

E.5. Presencia de Rubisco en cultivos de maíz.	67
E.5.1.Dot- Blot.	67
E.5.2.Western- Blot.	70
E.6. Presencia de actividad enzimática de Rubisco.	71
E.7. Análisis histológico de los cultivos de callos de maíz.	76
F. Discusión.	87
G. Conclusiones.	99
H. Bibliografía.	101
I. Apéndice.	110

A. RESUMEN.

El objetivo principal de este trabajo consistió en establecer un cultivo de callos de maíz (*Zea mays* L .) de las variedades **VS-22** y **Tuxpeño** que enverdeciera homogéneamente (entendiéndose por enverdecimiento, la síntesis de clorofila; proceso que ocurre dentro del cloroplasto) y adquiriera carácter fotomixotrófico. Investigaciones realizadas han demostrado que el tipo y concentración de azúcares juega un papel importante en la formación del cloroplasto, contenido de clorofila y en general del proceso fotosintético. Por estas razones en este trabajo se usaron distintas fuentes de carbono a diferentes porcentajes, pero a iguales concentraciones equimolares (igual molaridad, aunque sus porcentajes sean diferentes) y con un suministro adicional de una atmósfera rica en CO₂ al 3%. El modelo que se siguió fue el de " **capa delgada** " sistema que consistió en una distribución de tejido calloso geoméricamente homogéneo sobre la superficie del medio de cultivo .

El análisis bioquímico y de microscopía electrónica que se realizó consistió en la evaluación del contenido de clorofilas totales, proporción entre las clorofilas **a / b**, desarrollo ultraestructural del cloroplasto durante el proceso de enverdecimiento, presencia y actividad enzimática de la proteína Rubisco (Ribulosa bifosfato carboxilasa-oxígenoasa), a los 14 días de fotoperíodo 18 horas luz / 6 horas oscuridad.

Los resultados mostraron que la fuente de carbono que mejor contribuyó más significativamente al enverdecimiento celular de los cultivos fue el almidón, logrando un mejor desarrollo del proceso de la biogénesis del cloroplasto. Siendo

la composición final del medio BAP 0.1ppm, cinetina 0.1ppm y almidón 1%, además del suministro de CO₂ al 3%.

El sistema de cultivo " en capa ", constituyó un modelo adecuado para promover el enverdecimiento homogéneo y estudiar la biogénesis de cloroplastos en callos de maíz; con dicho modelo se logró un buen desarrollo de cloroplastos desde sus fases iniciales hasta su estado maduro. Así mismo, se detectó la presencia y actividad enzimática de Rubisco aunque ésta última fue muy baja. Se analizaron las posibles causas de este fenómeno.

B. ANTECEDENTES.

B.1. Importancia y función de la fotosíntesis .

La fotosíntesis es el proceso por el cual la biósfera capta la energía radiante necesaria para la vida. La energía solar que recibe la tierra es del orden de 3×10^{24} Julios (J) por año. La biósfera capta, mediante la fotosíntesis, sólo la milésima parte de esa energía o sea unos 3×10^{21} J por año. La fotosíntesis permite a los organismos fotosintéticos captar la energía solar y transformarla en energía química la cual es utilizada para fijar dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera para sintetizar sustancias hidrocarbonadas, particularmente azúcares (Hatch et al . , 1981).

Este proceso está acompañado por la producción de oxígeno. Priestley descubrió hace más de 200 años (1772) la propiedad de la fotosíntesis de generar oxígeno al observar que las plantas verdes eran capaces de restaurar el aire " consumido " por una vela ardiendo. Sus experimentos llamaron la atención del holandés Jan Ingenhousz quien, años más tarde, realizó experimentos que lo llevaron a descubrir la función indispensable que la luz desempeña en la fotosíntesis. Poco después otro investigador, Jean Senebier, descubrió en Ginebra que el CO_2 generado por los animales estimula la generación de oxígeno por las plantas y la luz. Nicolás de Saussure determinó en 1804 que las plantas iluminadas ganaban peso al absorber agua durante el intercambio de CO_2 por oxígeno (Stumpf et al . , 1980).

Finalmente, otro producto de las reacciones fotosintéticas fue revelado por Julius Sachs en 1864, cuando observó la formación de granos de almidón en cloroplastos iluminados, así se pudo postular que los cloroplastos eran responsables de la fotosíntesis. Esta función de los cloroplastos fue elegantemente demostrada por Engelmann en 1894, al observar en su microscopio la atracción de bacterias móviles hacia los cloroplastos de un alga *Spirogyra* por el oxígeno que generaban con la iluminación (Barber, 1976).

En 1930 Robert Hill observó la fotólisis del agua por cloroplastos en ausencia de CO₂. La aplicación de los radioisótopos en la década del los 40 y, en especial, la disponibilidad de ¹⁴C permitió seguir la ruta del CO₂ en la fotosíntesis desde su fijación hasta la biosíntesis de carbohidratos, resumida por Melvin Calvin y otros investigadores que han estudiado la fotosíntesis (Gibbs et al . , 1979). Los logros en fotosíntesis han aumentado en grado tal que es imposible mencionar todos ellos.

Los organismos no fotosintéticos dependen para subsistir de los fotosintéticos, que mediante sustancias orgánicas les sirven de alimento y, por lo tanto, de fuente de energía. Las células obtienen la energía necesaria para sus procesos vitales al oxidar esas sustancias orgánicas durante la respiración celular. Este proceso es inverso de la fotosíntesis (Hatch et al . , 1981). La energía libre de la respiración celular es utilizada en la síntesis de adenosina-trifosfato (ATP). El CO₂ puede volver a ser fijado por la fotosíntesis, estimándose que el total fijado anualmente es de 200.000 millones de toneladas de carbono. Solamente la décima parte es fijada por las plantas terrestres; el resto lo fijan las algas y otros microorganismos fotosintéticos (Hatch et al . , 1981).

En el contexto alimenticio la fotosíntesis juega un papel importante ya que este proceso incide directamente en la productividad de las plantas. La relación de energía solar con respecto al rendimiento medio de la fotosíntesis en biomasa es aproximadamente de 1%, esto varía dependiendo del tipo de planta (Kirk et al . , 1978). La eficiencia de una planta medida en términos de la fotosíntesis total, es la producción de biomasa, menos cualquier tipo de respiración que haya tenido lugar durante el crecimiento. Se sabe que entre el 90 y 95 por ciento de la materia obtenida de un cultivo deriva del CO₂ atmosférico, asimilado durante la fotosíntesis, y solo entre 5 y 10 por ciento corresponde a minerales tomados del suelo y al nitrógeno captado por microorganismos capaces de sintetizarlo y proveérselo a la planta (Kirk et al . , 1978).

El hombre depende de la fotosíntesis no sólo para obtener su alimento, sino que un porcentaje considerable de la energía que utiliza está constituido por combustibles fósiles como: gas, petróleo y carbón, cuyo origen ha sido fotosintético (Kirk et al . , 1978). Por lo anterior se comprende la importancia de la fotosíntesis, como un mecanismo que influye directamente en el proceso de la vida.

B.1.1. Fases del proceso fotosintético.

El proceso fotosintético está dividido en dos grandes etapas o fases conocidas como **reacciones luminosas** (fotoquímicas) y **reacciones oscuras** (químicas) de la fotosíntesis. En las reacciones dependientes de la luz, que definen a la fase luminosa, la energía electromagnética es capturada por un sistema especializado de pigmentos y utilizada para sintetizar ATP y NADPH (Rao et al . , 1981).

En las reacciones de la fase oscura el ATP y el NADPH formados en la fase luminosa se utilizaron como fuente química de energía y poder reductor respectivamente para convertir el CO₂ en carbohidratos. Estas reacciones comienzan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citoplasma de la célula, denominándose reacciones oscuras porque, si bien utilizan los productos de la fase luminosa, no requieren directamente luz (Trebs, et al . , 1977).

B.2. Aparato fotosintético.

La capacidad de las plantas de utilizar energía solar para efectuar su metabolismo es posible gracias a la existencia del aparato fotosintético, el cual está unido a la membrana tilacoidal y consta de un sistema complejo: proteína - clorofila a / b, captador de luz (LHCP) y un sistema transductor de energía formado por la cadena transportadora de electrones acoplado al complejo H⁺ATPasa sintetasa (CF1-CFo). La transferencia de energía química, se realiza por medio de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO), enzima capaz de acoplar el sistema energético a la fijación neta del CO₂ atmosférico y transformarlo en componentes orgánicos vitales para la planta (Passingham,1980). El aparato fotosintético contiene pues, los componentes que absorben la luz y que catalizan la energía de las moléculas de los pigmentos excitados a una serie de reacciones químicas y enzimáticas (Passingham,1980). Engleman demostró que las clorofilas son los pigmentos responsables de la absorción lumínica en la fotosíntesis, dentro de los cloroplastos (Rao et al . , 1981).

B.2.1. Estructura del cloroplasto.

En las células eucariontes el proceso fotosintético se encuentra localizado en un orgánulo subcelular membranoso que es característico de las células vegetales: los cloroplastos (figura 1). Tanto la forma que adopta este orgánulo, como el tamaño y el número de ellos por célula, varía de una especie vegetal a otra (Rao et al . , 1981).

Los cloroplastos están separados del citoplasma por una envoltura continua constituida por una doble membrana: la membrana externa, que es muy permeable, y la membrana interna, cuya permeabilidad es selectiva y dentro de la cual se encuentran ciertas proteínas transportadoras. Entre los transportadores el más importante es el translocador de fosfato, que constituye casi un 20% de las proteínas de la membrana interna y que participa en el transporte activo de las triosas fosfato. Se han descrito asimismo sistemas para el transporte activo de glucosa, piruvato, aminoácidos dicarboxílicos y un intercambio de ADP-ATP. Esta membrana participa, además, en el proceso de importación de proteínas cloroplásticas codificadas por el ácido desoxirribonucleico (DNA nuclear) y posee una ATPasa dependiente de Mg^{2+} cuya función fisiológica no se conoce aún (Miyahi et al . , 1977).

La membrana interna rodea a un gran espacio central llamado estroma que contiene numerosos sistemas enzimáticos, donde tiene lugar la fijación de dióxido de carbono (CO_2). En dicho espacio funciona un sistema genético completo diferente del nuclear que se encarga de la síntesis de unos cien polipéptidos cloroplásticos (Miyahi et al . , 1977).

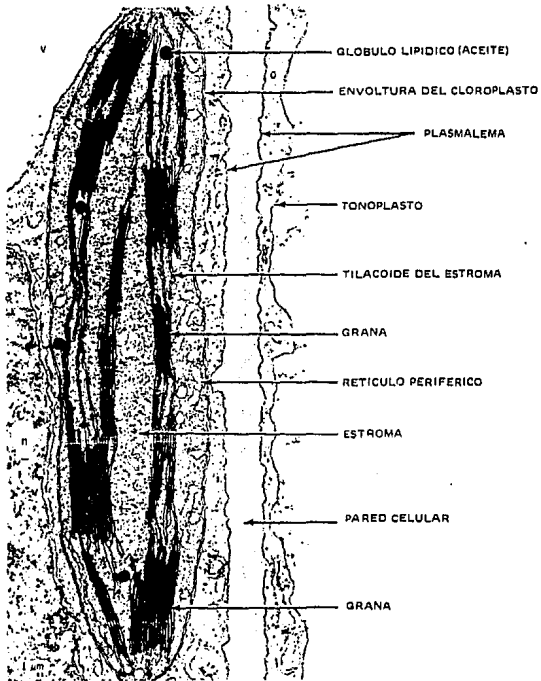


Figura 1. Micrografía electrónica de un cloroplasto con grana de una hoja de *Nicotiana tabacum* (tabaco). Tomado de Esaú, 1965.

En el interior de los cloroplastos se observa un tercer tipo de estructuras membranosas dispuestas en forma de sacos aplanados o discos llamados tilacoides. Los tilacoides se aplanan y constituyen estructuras mayores denominadas grana. El espacio interior o lumen de cada tilacoide se conecta a veces con el lumen de otros tilacoides, formándose de este modo un tercer compartimiento interno o espacio intratilacoidal, que está separado del estroma por la llamada membrana tilacoidal.

En los tilacoides tienen lugar las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis (Hatch et al . , 1981). En estas membranas la relación proteína-lípido es elevada; abundan los lípidos neutros, en especial galactolípidos y se encuentran los pigmentos que captan la energía solar, así como los complejos proteicos asociados a la clorofila en los centros de reacción, los componentes de la cadena transportadora de electrones que participan en la obtención de NADPH y los del complejo ATPasa capaz de catalizar la formación de ATP a partir de ADP (adenosina - difosfato) y P_i (Artzent et al . , 1975).

Las plantas C4 muestran un claro dimorfismo entre los cloroplastos de la vaina vascular y los del mesófilo (figura 2). Por lo general los cloroplastos del mesófilo no contienen gránulos de almidón sino grana bien desarrollada y presentan una característica estructura vesiculosa por debajo de la membrana exterior, que se denomina retículo periférico. Los cloroplastos de la vaina vascular se hallan típicamente repletos de almidón y pueden presentar un desarrollo de grana variable (Laetsch, 1971). Se ha encontrado que los cloroplastos carentes de grana se originan por degeneración de los grana en el curso del desarrollo del cloroplasto, como ocurre en la caña de azúcar (Laetsch y Price, 1969).



Figura 2. Micrografía electrónica de cloroplastos de la hoja del maíz (*Zea mays*) que muestra porciones de una célula del mesófilo (izquierda) y una célula de la vaina del haz vascular (derecha). El cloroplasto del mesófilo posee muchos grana mientras que los cloroplastos de la vaina carecen de ellos. Tomada de Hall, 1982.

B.2.2. Estructura de la clorofila

En el proceso fotosintético participan tres tipos de pigmentos distintos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas. La función de estos pigmentos consiste en proporcionar a los organismos fotosintéticos un sistema eficiente para la absorción de energía electromagnética. En las plantas superiores la clorofila es de dos tipos: **clorofila a** y **clorofila b** (figura 3). La clorofila es un complejo magnesio-porfirínico compuesto por un anillo ciclo pentanona (V) (Barber, 1976). Los cuatro átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos están coordinados con un átomo de magnesio formando un complejo planar constituido por el alcohol fitol, que se encuentra esterificado a un residuo de propionato, sustituyente de uno de los anillos pirrólicos (IV). Este alcohol de cadena larga, compuesto de cuatro unidades de isopreno, confiere a la molécula de clorofila la característica de ser altamente hidrofóbica. La clorofila b difiere de la clorofila a (figura 3) en que contiene como sustituyente un grupo formilo (-CHO) en vez de metilo (-CH₃) en el anillo pirrólico II (Barber, 1976).

La gran eficiencia de las clorofilas como receptores de luz se correlaciona con la presencia alternante de enlaces simples y dobles en su estructura. Las clorofilas presentan máximos de absorción en la región visible del espectro, pero difieren en sus espectros de absorción. Por ejemplo, la luz de 460nm no es apreciablemente absorbida por la clorofila a mientras que sí puede ser captada por la clorofila b, completándose de este modo la absorción de la luz incidente. En la región del espectro comprendida entre 500 y 600nm la absorción de luz por las clorofilas es muy débil (Barber, 1976).

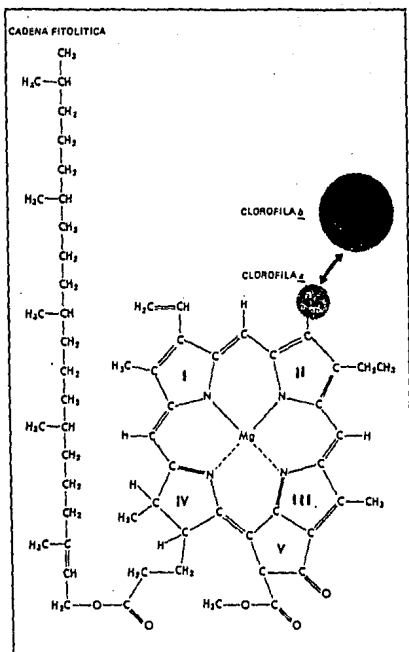


Figura 3. Estructura de las clorofilas a y b. La agrupación de los grupos $-C=O$ unidos al anillo de porfirina dejan esa región hidrofílica; la cadena de fitol es fuertemente hidrofóbica. Nótese el sistema de enlaces sencillos y dobles alternados que rodean al anillo de porfirina. Los electrones extras implicados en los enlaces no están restringidos a las posiciones en que se muestran, sino que se encuentran migrando alrededor del sistema. Esta propiedad es la que hace que el compuesto absorba muy eficientemente la energía luminosa. Tomada de Barber, 1976.

La clorofila a purificada disuelta en acetona presenta un máximo de absorción a 663 nm; sin embargo, en células enteras, exhibe diferentes máximos de absorción (660, 670, 680, 685, 690, y 700-720 nm). Estos máximos no indican la existencia de distintas moléculas de clorofila a, sino reflejan diferentes estados de agregación de las moléculas de clorofila a o la unión de esta molécula a proteínas específicas (Trebs et al . , 1977). A pesar de que las clorofilas son cuantitativamente las moléculas fotorreceptoras que predominan en las plantas, existen también pigmentos accesorios que presentan máximos de absorción a longitud de onda distintas de las clorofilas y que actúan como moléculas receptoras de luz suplementarias en regiones del espectro en que las clorofilas no tiene absorción, aumentando así la eficiencia con que las células fotosintéticas captan la luz (Trebs et al . , 1977).

B.2.2.1. Pigmentos fotosintéticos: fotosistemas.

A los pigmentos fotosintéticos les corresponde la función de captar la energía electromagnética y transferirla eficientemente hacia el centro o los centros donde ocurre la reacción fotoquímica primaria. Para cumplir esta función las moléculas fotorreceptoras forman agregados multimoleculares compuestos por cientos de moléculas que se mantienen firmemente asociados a la membrana tilacoidal por la acción de ciertas proteínas especiales (Stumpf et al . , 1980). En estos agregados multimoleculares o unidades fotosintéticas denominados fotosistemas las proteínas especiales alteran a las moléculas fotorreceptoras de forma tal que la energía luminosa puede ser captada con igual eficiencia por cualquiera de ellas, para ser luego conducida hacia una molécula especial de clorofila llamada "clorofila centro de reacción". Cada fotosistema actúa, pues, como un

embudo que recoge la energía luminosa y la conduce hacia un centro de reacción (Stumpf et al . , 1980).

En las plantas superiores se distinguen dos tipos de fotosistemas: el FI y el FII. El primero está compuesto por unas 250 a 300 moléculas de clorofila a , una reducida proporción de clorofila b y carotenoides. Asociados al FI se encuentra una molécula de un pigmento fotooxidable especializado, denominado P_{700} , que constituye el centro de reacción de este fotosistema (Rao et al . , 1981). El FII contiene clorofila a, una proporción relativamente elevada de clorofila b y xantofilas. El centro de reacción de este fotosistema es un pigmento fotooxidable llamado P_{680} . La energía lumínica que puede ser absorbida por una molécula aislada de clorofila en disolución se libera rápidamente como luz (fluorescencia) y calor al retornar la molécula a su nivel energético inicial (Trebs et al . , 1977).

En cambio, en un fotosistema la molécula de clorofila centro de reacción se asocia en alto grado a un dador y a un aceptor de electrones, el electrón excitado en el centro de reacción es transferido al aceptor de electrones dejando un hueco cargado positivamente con alta afinidad por los electrones. Este hueco es rápidamente ocupado por un electrón proveniente del dador de electrones (Rao et al . , 1981). De este modo, la organización en fotosistemas permite que la luz haga posible la transferencia neta de un electrón a partir de un donador débil de electrones hacia una molécula que se convierte, como resultado de esa transferencia, en un donador fuerte de electrones. Es decir, la energía de excitación que se liberaría rápidamente como fluorescencia y calor en una molécula aislada de clorofila es utilizada por los fotosistemas para elevar la energía de un electrón y formar un donador fuerte de electrones (Trebs et al . , 1977).

La función del FII, presente en algas y plantas verdes, es la de generar poder oxidante como prerrequisito para producir oxígeno a partir de agua. Las bacterias fotosintéticas, no emplean el agua como reductor y en las cuales no se produce oxígeno como consecuencia del proceso fotosintético carecen del FII y contienen exclusivamente el FI (Trebs et al . , 1977).

B.2.2.2. Cadena transportadora de electrones.

El transporte fotosintético de electrones en organismos cuyo proceso fotosintético involucra el desprendimiento de oxígeno, es aquel que incluye dos reacciones fotoquímicas que actúan cooperativamente en serie. El FII genera en la luz un reductor débil y un oxidante fuerte capaz de reaccionar con agua para generar oxígeno. Simultáneamente, el FI produce en la luz un oxidante débil y un reductor fuerte que puede reducir al NADP^+ . Los electrones tomados del agua por el FII son conducidos hacia el FI mediante reacciones de oxidorreducción que tienen lugar entre los dadores y aceptadores de electrones localizados asimétricamente en la membrana tilacoidal que constituye la cadena fotosintética de transporte de electrones (Trebs et al . , 1977).

El transporte de electrones entre el reductor débil generado por el FII y el oxidante débil producido por el FI es un proceso independiente de la luz. El transporte de electrones desde el agua, que hace las veces de reductor, hasta el NADP^+ , que actúa como oxidante, es unidireccional, por lo que se le denomina transporte de electrones " lineal " (Trebs et al . , 1977). El flujo de electrones se inicia con la absorción de un cuanto de luz, por uno de los fotosistemas. De este modo, la absorción de un cuanto por el FII resulta en la eliminación de un electrón del agua y en la reducción del aceptador primario X_{320} . Los electrones del compuesto X_{320} reducido son transportados, entonces, mediante una serie de

reacciones de oxidorreducción al pigmento P_{700} . La absorción de un segundo cuanto de luz por el FI resulta en la oxidación del P_{700} y en la reducción del P_{430} , denominado aceptor primario de electrones del FI. finalmente, el P_{430} reducido reduce al $NADP^+$ (Trebs et al . , 1977). La energía liberada a lo largo de la cadena transportadora de electrones es utilizada para bombear protones hacia el interior de los tilacoides, creando un gradiente electroquímico que, luego, impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP(adenosin difosfato) y fosfato por la acción enzimática de un complejo ATPásico (Trebs et al . , 1977).

B.2.3. Estructura de RUBISCO.

La ribulosa bifosfato carboxilasa - oxigenasa (**RUBISCO**) comprende más del 50 % de la proteína del estroma de los cloroplastos, es una proteína de elevado peso molecular (560.000 Daltons) que adopta la forma de un agregado molecular de dos tipos distintos de subunidades: grandes (51. 000 a 58.000) y pequeñas (12.000 a 18.000). Las subunidades grandes son catalíticas y las pequeñas posiblemente son reguladoras (Ellis, 1979).

Las primeras son codificadas por DNA de los cloroplastos y su composición y secuencia de aminoácidos son muy similares en algunas subunidades aisladas de enzimas provenientes de diversas especies; en cambio, las segundas son codificadas por el **DNA nuclear** y difieren en alto grado en su composición de aminoácidos con subunidades provenientes de enzimas de distintos orígenes (Ellis, 1979). La enzima de plantas superiores está formada por 16 subunidades : ocho grandes y ocho pequeñas. La molécula está estructurada en dos capas (Figura 4), cada una de las cuales contiene cuatro subunidades grandes y cuatro pequeñas (Ellis, 1979).

La ribulosa bifosfato carboxilasa es una enzima sometida a efectos regulatorios de naturaleza alostérica, siendo activada, en diferentes condiciones experimentales por los siguientes efectores: NADPH, 6-fosfogluconato, fructosa-1,6-difosfato, $MgCl_2$ y CO_2 . En general la actividad requiere preincubación de la enzima con los efectores (Ellis, 1979).

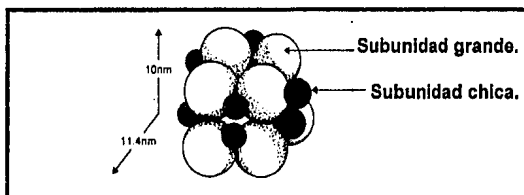


Figura 4. Estructura de la Rubisco. Tomada de Lawlor,1990.

La cinética de la activación de la enzima por CO_2 y Mg^{2+} depende del tiempo y del orden de adición de estos compuestos; esto se debe no solo a los efectos activadores del CO_2 y de Mg^{2+} sino también al efecto inactivador que ejerce la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), además de su función como sustrato (Kumar et al . , 1988). Análisis cinéticos indican que la enzima es activada por la unión del CO_2 en un proceso lento y reversible, seguido de una rápida reacción con Mg^{2+} . El grado de activación es función tanto de la concentración del CO_2 como del Mg^{2+} y el grado máximo de activación a concentraciones fijas de CO_2 y Mg^{2+} influye en gran medida el pH. Cuando la enzima se incuba primero con ribulosa-1,5-bifosfato y luego la reacción se inicia con la adición de Mg^{2+} y CO_2 , se observa una apreciable demora en la formación del producto (Kumar et al . , 1988).

B.3. Fijación del CO₂ vía C3.

La única ruta metabólica que poseen las plantas C3 para la fijación de CO₂ que conduce a la incorporación del carbono en hexosas, es el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, así denominado porque durante el proceso, el CO₂ se reduce hasta el nivel de carbohidratos y porque varios de los intermediarios que en él participan son pentosas fosforiladas. Esta secuencia cíclica de las reacciones se denomina también " **Ciclo de Calvin y Benson** " (Edwards y Walker, 1983).

Este ciclo comprende muchas etapas similares a reacciones de la vía glucolítica y del ciclo oxidativo de las pentosas y al estudiarlo puede considerarse que está compuesto por tres fases: carboxilación, reducción y regeneración. En la primera se incorpora CO₂ a un aceptor preexistente y se forma un ácido carboxílico que, luego, se reduce en la segunda fase; finalmente, parte del producto recién formado se utiliza inmediatamente para regenerar el aceptor del CO₂. Todo esto exige inevitablemente una complicada secuencia de reacciones, sobre todo si se considera que hay 12 reacciones en el ciclo y que deben ocurrir seis veces para que se sintetice una molécula de hexosa (Edwards y Walker, 1983).

El primer producto que resulta de la asimilación del CO₂ en este ciclo es el fosfoglicerato, compuesto constituido por tres átomos de carbono. Muchas especies vegetales, principalmente las que crecen en climas templados como: trigo, tomate, espinaca, etc; dependen únicamente del ciclo de Calvin y por ello se denominan plantas C3 (Edwards y Walker, 1983).

B.4. Fijación del CO₂ vía C₄.

Todas las plantas poseen el ciclo de **Calvin y Benson** como vía metabólica para la asimilar el CO₂. Otras plantas de zonas tropicales y semitropicales como el maíz, y la caña de azúcar (entre otras) poseen una ruta auxiliar para asimilar el CO₂, conocida como **Hatch y Slack (vía C₄)**, en el que el producto primario de la carboxilación es un compuesto de cuatro carbonos, estas plantas son conocidas como C₄ (Edwards y Walker, 1983).

En las plantas C₄ el CO₂ se fija (Figura 5) en tres pasos principales los cuales ocurren en dos tipos de células, y en más de un compartimiento celular. El CO₂ se fija primero en el citoplasma del mesófilo mediante la acción de la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, que cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato (OAA). Luego, este compuesto de cuatro carbonos es transformado y transportado a las células de la vaina vascular; una vez allí, y debido a la acción enzimática de una de las tres especies C₄ (figura 6) se descarboxila. Posteriormente, el malato o aspartato formado es fijado por el ciclo de Calvin en el cloroplasto de las células de la vaina vascular (Edwards y Huber, 1981).

B.5. Tipos de plantas con fotosíntesis C₄

En diversas especies de plantas con fotosíntesis C₄ se han observado diferentes enzimas que catalizan la degradación del malato o aspartato provenientes de las células mesofílicas. Por este motivo, existen tres grupos basados en los distintos mecanismos de descarboxilación (Figura 6) que actúan sobre los ácidos de 4 carbonos (Hatch, et al ., 1977).

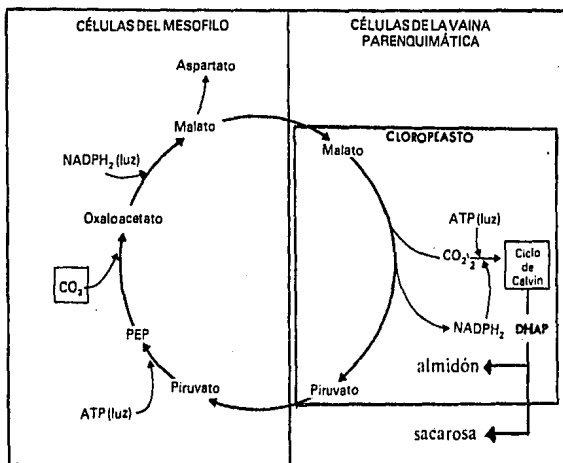


Figura 5. Esquema de la fijación de CO₂ en las plantas C₄. El CO₂ que difunde por las hojas a través de los estomas entra al citoplasma de las células del mesófilo y allí reacciona con el fosfoenolpiruvato (PEP) y forma oxaloacetato en presencia del enzima PEPcarboxilasa. El oxaloacetato es reducido posteriormente por el NADPH₂, que se ha formado por las reacciones luminosas normales, a malato. El malato es transportado luego a las células de la vaina parenquimática, donde es descarboxilado a piruvato y CO₂; el CO₂ liberado de este modo se usa en la producción de azúcar y almidón a través del ciclo C₃ de Calvin. El malato puede actuar también como un constituyente del ciclo de Krebs o puede ser aminado a aspartato. (Edwards y Huber, 1981).

a) Enzima málica NADP⁺ dependiente (tipo ME-NADP⁺):

En los cloroplastos de las células de la vaina vascular de las plantas C₄ del tipo ME-NADP⁺ el malato se descarboxila a piruvato. El CO₂ ingresa en el ciclo de Calvin y Benson , que también utiliza el NADP y el piruvato retorna a las células mesofílicas (figura 6). Dentro de este tipo de plantas se encuentran, entre otras especies: *Zea mays* (maíz), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Saccharum officinarum* (arce) y *Digitaria sanguinalis* (pasto), las cuales destacan por su importancia agrícola (Hatch, et al ., 1977).

b) Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (tipo PEP-CK):

En las plantas C₄ tipo PEP-CK, el aspartato proveniente de las células mesofílicas, es primero convertido en oxaloacetato en el citoplasma de las células de la vaina vascular y luego descarboxilado en los cloroplastos de estas células por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa. El CO₂ se fija en el ciclo de Calvin, mientras que el PEP se convierte primero en piruvato y luego en alanina que retorna a las células mesofílicas (Hatch, et al ., 1977).

c) Enzima málica NAD⁺ dependiente. (tipo ME-NAD⁺):

En las plantas C₄ tipo ME-NAD⁺ el aspartato proveniente de las células mesofílicas experimenta una transaminación a oxalacetato en las mitocondrias de las células de la vaina vascular y el oxalacetato se reduce a malato que, a su vez, se descarboxila por la enzima málica NAD⁺.

En las tres variantes de la fotosíntesis C₄ aumenta la concentración de CO₂ en las células de la vaina del haz vascular. En las plantas con fotosíntesis C₄ sus enzimas fotosintéticas presentan una neta compartimentalización espacial

(Figura 6). Por ejemplo, las células mesofilicas contiene toda la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la malato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente y la piruvato fosfato diquinasa, mientras que las células de la vaina vascular poseen prácticamente la totalidad de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa y las enzimas málica dependiente de NAD⁺ y NADP⁺ (Hatch et al . , 1977).

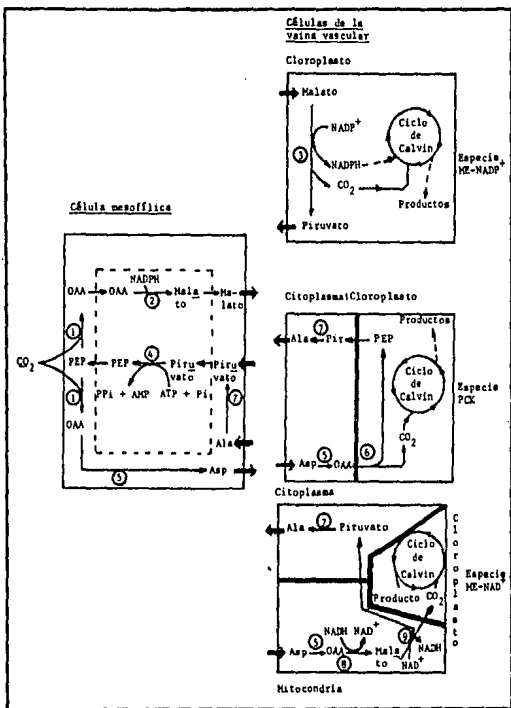


Figura 6. Reacciones fotosintéticas de fijación de CO₂ en plantas C₄, en las que colaboran células mesofíticas y de la vaina vascular. Los diagramas de la derecha indican las diferentes descarboxilaciones que experimenta un ácido de cuatro carbonos en las especies ME-NAD⁺, PCK y ME-NAD⁺. Intervienen las siguientes enzimas: 1, PEP carboxilasa; 2, malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺; 3, enzima málica dependiente de NADP⁺; 4, piruvato fosfato diquinasa; 5, aspartato amino transferasa; 6, PEP carboxiquinasa; 7, alanina amino transferasa; 8, malato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y 9, enzima málica dependiente de NAD⁺. Tomado de Hall, 1982.

B.6. Anatomía Kranz.

Una planta C4 se caracteriza por poseer una anatomía tipo Kranz (figura 7). La expresión tipo Kranz se emplea para describir la anatomía de las hojas cuyos vasos están rodeados por dos capas concéntricas de tejidos fotosintéticos diferentes. La capa interna que los rodea se llama vaina vascular y la capa externa, mesófilo. Las plantas C3 no poseen anatomía Kranz, en ellas no existe la capa de la vaina vascular y el mesófilo se distribuye uniformemente por toda la hoja (Nelson y Langdale, 1989).

El mesófilo de la hoja por lo general consta principalmente de clorénquima (parénquima que lleva clorofila). Típicamente está diferenciado con claridad en una capa superior, el parénquima en empalizada, y una capa inferior, el parénquima esponjoso, además, de estar atravesado por el sistema vascular (Laetsch, 1974). El parénquima en empalizada consta de una o dos filas de células alargadas más o menos cilíndricas o prismáticas, justamente por debajo de la epidermis superior y perpendicularmente a ella; el parénquima esponjoso, según se ha observado, consta de dos células típicamente irregulares con una alta proporción de espacios que generalmente contienen menos cloroplastos en proporción a su tamaño que las de la capa en empalizada (Brown, 1975).

Las células de la vaina del haz son grandes y alargadas de paredes gruesas (colenquimatosas y esclerenquimatosas). En algunas planta (especialmente en la especie *Zea mays*) los cloroplastos de la vaina fascicular muestran un desarrollo pobre y carente de grana con acumulación de granúlos de almidón como se muestra en la figura 2.



Figura 7. Micrografía al microscopio electrónico de barrido del tejido fotosintético de una hoja de C4 (coquillos, *Cyperus rotundus* x600). Nótese las conspicuas células de la vaina del haz, los pequeños espacios aéreos y la organización general que caracteriza a la anatomía tipo Kranz en las hojas C4. Tomada de Bidwell,1982.

Los tilacoides con grana parecen requerirse para la operación eficaz de los dos fotosistemas y los cloroplastos sin grana son a menudo deficientes en los FII. Esto significa que en los cloroplastos carentes de grana la formación de energía de producción de oxígeno es muy reducida, la producción de ATP mediante fosforilación por lo regular no se afecta (Aoyagi y Bassam, 1986).

La presencia de cloroplastos sin grana en la vaina fascicular se correlaciona con la presencia de un tipo de enzima NADP-málica del ciclo C4, en la cual la descarboxilación del malato conduce a la formación NADPH por cada CO₂. Por lo tanto se necesitan; cloroplastos de la vaina fascicular para producir sólo la mitad de la cantidad de energía de reducción que normalmente se necesita, la otra mitad es suministrada por el ciclo de Calvin (Aoyagi y Bassham, 1986).

Las células de la vaina vascular pueden surgir de divisiones en el mesófilo. En el caso de las plantas tipo ME-NADP, éstas tienen una sola vaina rodeando al haz y se cree que derivan del procámbium, en tanto que las plantas tipo EM-NAD y PEP- CK presentan doble vaina, siendo la vaina interna no fotosintética y la externa fotosintética, la primera derivada del procámbium (Nelson y Langdale, 1989). El tipo de enzima NADP málica del ciclo C4 en combinación con el dimorfismo cloroplásmico y la anatomía tipo Kranz, representan el nivel más alto de desarrollo evolutivo en la fotosíntesis (Aoyagi y Bassham, 1986).

B.7. Biogénesis del cloroplasto.

El desarrollo del cloroplasto ha sido estudiado desde hace muchos años lográndose ciertos progresos al respecto. La mayoría de los datos publicados sobre aspectos del desarrollo de cloroplastos en plantas han sido descriptivos y se han logrado siguiendo cambios bioquímicos y estructurales durante el desarrollo de cloroplastos proveniente del enverdecimiento de hojas etioladas (Mullet, 1988).

Los cloroplastos son derivados de protoplastidios pequeños e indiferenciados , los cuales en la mayoría de los casos son heredados del cigoto materno de la planta (Kirk et al . , 1978). El desarrollo subsecuente de los cloroplastos está acoplado a la formación de meristemos foliares y a la producción de células del mesófilo. Durante el desarrollo el volumen de plastidios por célula se incrementa dramáticamente y la composición del plastidio cambia paralelamente con la adquisición de requerimientos fotosintéticos (Mullet, 1988).

La composición de los plastidios también varía en respuesta a condiciones ambientales o por necesidades especiales de la planta. Estos cambios han sugerido numerosas preguntas acerca de mecanismos moleculares que activan y coordinan la expresión de genes durante la biogénesis del cloroplasto (Mullet, 1988). Los progenitores de los cloroplastos son organelos pequeños de 0.5 a 1.0 μ m de diámetro, generalmente esféricos y llamados protoplastidios (Thomson et al. ,1980). Estos son mantenidos en estado indiferenciado en las células meristemáticas durante el desarrollo de la planta (Kirk et al . ,1978).

Aparte de su origen materno durante la formación del cigoto los protoplastidios pueden también formarse en el período de latencia (Gaff, 1976) o en la maduración de estructuras especializadas (Whatley, 1979). Carecen de membrana y tienen poca cantidad de **DNA**, **RNA**, ribosomas y proteínas solubles (Mullet, 1988).

Los plastidios pueden ser divididos en dos grupos: los plastidios no fotosintéticos que incluyen protoplastidios como los etioplastos que son precursores de cloroplastos cuando las plantas crecidas en la obscuridad son iluminadas; y los plastidios especializados en la síntesis o acumulación de carotenos (cromoplastos), almidón (amiloplastos), terpenoides y lípidos (Thomson et al., 1980).

Los plastidios fotosintéticos también exhiben variación en composición y función, por ejemplo; los cloroplastos de las células del mesófilo de plantas C4 son deficientes en proteínas involucradas en la fijación de CO₂, mientras que en los cloroplastos de las células de la vaina son deficientes en proteínas del FII (Bassi et al . , 1985). El desarrollo de células del mesófilo está acompañado por un incremento en el número de plastidios por célula. En líneas hexaploides de trigo, las células maduras del mesófilo contienen hasta 150 plastidios (Robertson y Leech, 1974 y Pike et al . , 1987). Estudios de protoplastidios en esta misma especie han llevado a la conclusión que el número de cloroplastos por célula se incrementa proporcionalmente con el tamaño de la célula, es decir, los cloroplastos se dividen y se expanden ocupando una proporción constante de la superficie de las células del mesófilo (Robertson y Laetsch, 1974).

La composición y tamaño de los plastidios cambia durante el desarrollo de cloroplastos. El incremento en volumen de plastidios se debe en parte a la acumulación de proteínas, lípidos y cofactores requeridos para la fotosíntesis. Estos componentes derivan de varias vías biosintéticas durante la biogénesis del cloroplasto (Mullet, 1988).

B.8. Fotosíntesis en cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos ha provisto de sistemas que pueden ser fácilmente manipulados para realizar estudios citológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos. Con el establecimiento de modelos experimentales de cultivos fotomixotróficos y fotoautotróficos se han podido analizar diferentes eventos relacionados con el proceso fotosintético (Wildholm, 1992). La mayoría de los trabajos de investigación se han hecho sobre el establecimiento de cultivos en suspensión en plantas C3 y muy pocas en plantas C4, enfocándose en la actividad de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ y el marcaje de los productos de esta fijación y en la actividad de las enzimas PEPcase y Rubisco. Otros estudios, han sido sobre aspectos de biogénesis del cloroplasto, su estructura y función (Neumann y Bender, 1987).

B.8.1. Cultivos fotomixotróficos y fotoautotróficos.

Los cultivos fotomixotróficos dependen para su crecimiento y supervivencia del suministro externo de azúcares como fuente de carbono, poseen la capacidad de sintetizar clorofila, desarrollar cloroplastos y fijar CO_2 (Nagai et al . , 1989). Los cultivos fotoautotróficos a diferencia de los primeros, pueden sobrevivir sin

el suministro de algún azúcar, aunque requieren generalmente de una atmósfera rica en CO₂ (Nagai et al . , 1989 y La Rosa et al . , 1984).

En cultivos fotomixotróficos y fotoautotróficos se ha reportado una alta actividad de fosfoenol piruvato carboxilasa (**PEPcasa**), durante la fase exponencial de la curva de crecimiento, y un aumento en la velocidad de asimilación de CO₂, de 200 a 800 μmoles de CO₂ fijado g⁻¹ peso seco h⁻¹ y una baja a 200 μmoles, en cultivos fotomixotróficos en suspensión de *Nicotiana tabacum* debido al aumento en la síntesis de la PEPcasa y posterior disminución de ésta, después de su síntesis (Nato y Mathieu, 1978).

Nishida et al . , (1980) encontraron que en cultivos fotoautotróficos y fotomixotróficos de callos de *N. tabacum* que contenían 48 μg de clorofila.g⁻¹ peso fresco se fijó CO₂ en la luz y en la obscuridad en una proporción de 132 y 4.7 μmol / mg de clorofila. h⁻¹, respectivamente. El análisis del producto de la fijación en cultivos fotoautotróficos mostró que el 3% eran compuestos de cuatro carbonos, y 43% en el caso de cultivos fotomixotróficos.

Cuando los niveles de fijación de CO₂ de las enzimas fueron medidos en estos cultivos, la actividad de RuBPCasa fué de 39 μmol de CO₂ por miligramo de clorofila.h⁻¹ y de PEPcasa fué de 177 μmol de CO₂ mg/clorofila. h⁻¹ en cultivos fotoautotróficos. Los cultivos fotomixotróficos mostraron niveles similares de actividad de 38 y 130 μmol de CO₂ por miligramo de clorofila. h⁻¹ (Sato et al . , 1981). El malato se marca en un 1.5% en los primeros 10 minutos (Ongun y Stocking, 1965).

En el caso de cultivos de callos fotomixotróficos y fotoautotróficos de *Cytisus scoparius* la proporción de fijación del $^{14}\text{CO}_2$ fué cercana a $63\mu\text{mol} / \text{mg}$ de clorofila. $\cdot\text{h}^{-1}$ en la luz y de 2.6-7.0 en la obscuridad (Sato et al. ,1980). La fijación de CO_2 en compuestos de cuatro carbonos como el malato fué de 41-44% del total después de 5 minutos en la luz y cercana al 100% en la obscuridad. La actividad de la RuBPcase fué $37\mu\text{mol}$ de CO_2 / mg de clorofila h^{-1} (Sato et al. ,1980).

Nishida y colaboradores (1980), reportaron para la misma especie una relación inversa; el porcentaje de $^{14}\text{CO}_2$ en compuestos de 4 carbonos fué de 24% en la luz por 5 minutos para cultivos fotoautotróficos y 40% para cultivos fotomixotróficos de la fijación total. El malato se marcó en un 29% de la fijación total en las células de cultivos fotomixotróficos y 15% para las células de los cultivos fotoautotróficos en luz durante 5 minutos de fijación de CO_2 .

Muchos cultivos fotoautotróficos y algunos fotomixotróficos tienen altos niveles de PEPcase en relación con la RuBPcase, y muestran características de respiración y bajo contenido de clorofila durante la fase de crecimiento, en tanto que en la fase estacionaria ocurre un proceso inverso de estas tendencias, incrementando la RuBPcase así como la clorofila (Hüsemann, 1981 ; Hüsemann et al. , 1984; Rogers et al. , 1987; Chagvardieff et al. , 1990). La alta actividad de PEPcase es característica de la vía de fijación C4, donde los compuestos de cuatro carbonos son formados en las células del mesófilo y son rápidamente transportados a las células de la vaina, donde el CO_2 es liberado para ser fijado por RuBPcase.

El metabolismo de los compuestos C4 formados por fijación de la PEPcase en células de cultivos fotoautotróficos es lento (Nishida et al . , 1980 ; Hüsemann et al . , 1984, 1990 ; Roeske et al . , 1989) , se cree que los compuestos de cuatro carbonos entran al ciclo del ácido tricarbóxico. Otros estudios con ^{14}C malato dieron evidencias adicionales de la utilización de esta ruta C4 en dichos cultivos (Hüsemann et al . , 1990).

Nato y Mathieu, (1978) demostraron también que en tabaco la concentración y actividad de Rubisco disminuyen cuando la concentración y actividad de PEPcase aumentan, ocurriendo tal evento durante el crecimiento o fase exponencial, mientras que en la fase estacionaria ocurre el proceso inverso aumentando la actividad de Rubisco por síntesis de novo al mismo tiempo que disminuye tanto la actividad como la concentración de PEPcase.

Algo parecido ocurre en cultivos de quelite (Hüsemann et al . , 1977), espinaca (Blair et al . , 1988) y soya (Rogers et al . , 1987), donde se ha observado que cuando se incrementa la actividad de RuBPcase la PEPcase decrece. Estos cambios se adecuan con el concepto anaplerótico de fijación de CO_2 por PEPcase durante el rápido crecimiento para incorporar el carbono a las vías biosintéticas. Comparando estos sucesos con lo que ocurre en plantas C3 se ha observado que durante el desarrollo de las hojas, estas muestran cambios graduales de baja actividad de RuBPcase y alta de PEPcase durante el proceso de crecimiento, mientras que cuando las hojas han alcanzado la madurez se incrementa la RuBPcase y disminuye la PEPcase, con iguales cambios en los productos de fijación de CO_2 (Kisaki et al . , 1973).

Por otra parte Yamada y colaboradores . . (1982) mostraron que en cultivos de células verdes donde la actividad de PEPcase sugiere un metabolismo C₄, los productos de la fijación de esta enzima no parecen ser usados como fuente de carbono para el ciclo de Calvin, la caracterización de la PEPcase de cultivos de tabaco, es del tipo de plantas C₃ y no del tipo C₄.

Neumann y Bender, (1987) suponen que la carboxilación de la PEP es una reacción anaplerótica que proporciona esqueletos carbonados para la biosíntesis rápida de carbohidratos. En la activación del proceso de división celular (fase exponencial). Las células verdes de los cultivos de tabaco también incorporan ¹⁴C en compuestos de 3 carbonos. (Nishida et al ., 1980).

El ciclo de Calvin se llevó a cabo tanto en células de cultivos fotomixotróficos como en células de cultivos fotoautotróficos. Las variaciones detectadas por Nato y Mathieu (1978) para Rubisco oscilaron entre 90 y 140 $\mu\text{moles CO}_2$ fijado.g⁻¹ peso seco.h.⁻¹ durante la fase de crecimiento, con un aumento en la síntesis de la enzima al finalizar dicha fase. En la fase exponencial la relación de la enzimas PEPcase y Rubisco fué de 6.77 $\mu\text{moles CO}_2$.mg⁻¹ proteína soluble, mientras que en la fase estacionaria fué de 1.8 reportándose en $\mu\text{moles CO}_2$.mg⁻¹ clorofila h.⁻¹, en tanto que Sato et al (1980) reportaron menor actividad de Rubisco que de PEPcase, siendo de 3.6 $\mu\text{moles CO}_2$.mg⁻¹clorofila h.⁻¹ para cultivos fotomixotróficos y 4.5 $\mu\text{moles CO}_2$.mg⁻¹ clorofila h.⁻¹ para cultivos fotoautotróficos, en cultivos de tabaco durante la fase estacionaria.

Por otra parte la fuente de carbono y la cantidad de esta son factores que afectan los niveles de clorofila, numerosos estudios han descrito el efecto supresor de altas concentraciones de azúcar sobre la síntesis de clorofila en cultivos celulares, aunque el mecanismo de este efecto no está bien dilucidado (Dalton y Street,1977). Estudios realizados con cultivos fotoautotróficos y fotomixotróficos han mostrado que la fotosíntesis es inhibida rápidamente por altas concentraciones de sacarosa observándose una disminución en la concentración de clorofila como un efecto secundario (Widholm, 1992).

Edelman y Hanson (1971) mostraron que el uso de sacarosa al 3% inhibía la acumulación de clorofila en cultivos de zanahoria. Newman y Raafat (1973) también observaron el mismo efecto de la sacarosa en esta misma especie de cultivos. La Rosa et al (1984) trabajando con diferentes concentraciones de sacarosa en el intervalo de 0.75-2.5 % en cultivos fotomixotróficos de papa encontraron que la clorofila disminuyó, así como también la fijación de CO₂ la cual bajó de 35% a 0.25% en tan solo 1 hora.

Rebelle (1988) indicó que la fotosíntesis era alta durante la fase de crecimiento cuando los niveles de sacarosa y fructosa eran bajos en cultivos de clavel, mientras que cuando al medio de cultivo se le adicionó 20mM de sacarosa la fotosíntesis declinó un 75% en 24 horas. El mismo efecto de disminución en la fotosíntesis se observó cuando se añadió glucosa al cultivo fotomixotrófico de clavel crecido en una atmósfera de CO₂, observándose además un incremento en la respiración. (Avelange et al . , 1990). Resultados similares obtuvieron Newman et al . , (1989) con cultivos de cacahuete.

En estudios hechos por Dalton y Street (1977) con cultivos fotomixotróficos de espinaca, ellos encontraron que al usar diferentes fuentes de carbono como: sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa a diferentes porcentajes, se inhibía la acumulación de clorofila en los cultivos, mientras que con bajos niveles de rafinosa e inulina, se apreció un crecimiento lento, pero se estimuló la síntesis de clorofila .

Estos estudios llevaron al uso de otra fuente de carbono como el almidón, aparentemente éste era asimilado por los cultivos lentamente, limitando el crecimiento pero permitiendo la acumulación de clorofila (Blair et al . , 1988; Xu et al . , 1988).

Ranch y Giles (1980) lograron la formación de callos verdes de *Dacura innoxia* cultivados en medio MS basal adicionado con 3% de almidón soluble de papa, $0.5\mu\text{M}$ de la auxina sintética picloram, y $7.0\mu\text{M}$ de citocinina (cinetina). Los callos obtenidos con este tratamiento fueron empleados por Xu y colaboradores (1988) para el establecimiento de un cultivo fotomixotrófico en suspensión con el mismo medio sin agar pero ahora con almidón 1%.

Por otra parte, existen pocos trabajos acerca de la biogénesis del cloroplasto en cultivos de callos verdes en plantas C3 y aún menos en plantas C4. No hay reportes de cultivos fotoautotróficos de cereales, esto tal vez, debido en parte a la falta de uniformidad en el enverdecimiento en las células de estos cultivos. Se ha observado enverdecimiento en cultivos de *Zea mays* pero solo en ciertas regiones de callos ó en zonas con formaciones organogénicas (Widholm, 1992).

Los primeros trabajos con cultivos de callos de plantas C4 indicaron la presencia de las dos vías metabólicas (C3 y C4) según lo observado en los patrones de marcaje con ^{14}C , durante la fijación del CO_2 . Sin embargo en ninguna de las especies de los cultivos se observó la existencia de anatomía Kranz ni cloroplastos dimórficos por lo que esta característica anatómica se consideró no indispensable para exhibir la vía C4 (Usada et al . , 1971).

Kumar et al (1989) detectaron actividad de PEPcase y Rubisco en callos de maíz originados del meristemo apical y señalaron que estas actividades fueron semejantes a las encontradas en regiones basales de 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 metabolismo C4.

Aoyagi y Bassham (1986), reportaron en cultivos de callos verdes de maíz la presencia PEPcase, piruvato dicinasa, y Rubisco, marcándose durante la fijación de CO_2 , ácidos de cuatro carbonos, azúcares fosfatados y también ácido 3-fosfoglicérico (PEG), no detectándose actividad de enzima málica dependiente de NADP (E.M-NADP), debido a esto los autores sugieren que la conversión de estos compuestos de cuatro carbonos a CO_2 y piruvato en los cloroplastos de estos cultivos es poco probable, por otro lado tampoco se detectó la presencia de anatomía Kranz.

Nelson y Langdale (1989) han señalado que el origen de las células que conforman la vaina del haz vascular reside en el procámbium, lo que lleva a suponer que para que pueda originarse la anatomía Kranz y el dimorfismo entre los cloroplastos se necesitaría la existencia de meristemos provasculares los cuales se diferenciarían en células de la vaina del haz vascular y tejido vascular.

Los resultados obtenidos por Solis et al (1989) sobre la biogénesis del cloroplasto en cultivos de callos de maíz mostraron el desarrollo de los dos tipos de cloroplastos unos con grana bien definida probablemente del tipo mesófilo y otros sin grana, parecidos a los de la vaina del haz vascular, aunque según reportaron no se observó la presencia de anatomía Kranz. En cuanto a la relación de clorofila a / b fué de 3.2 a los 15 días de iluminación, rango que es muy semejante al que muestran las hojas de plantas C4 en las células del mesófilo, para cloroplastos de la vaina la relación a / b es de 4 a 5.

Lavergne et al (1992) lograron establecer un cultivo fotomixotrófico de callos de maíz, los cloroplastos observados en estos cultivos fueron del tipo mesófilo los cuales se caracterizan por presentar abundante grana, con y sin gránulos de almidón. Las actividades reportadas para Rubisco y PEPcasea fueron semejantes a las encontradas en hojas etioladas, los porcentajes de clorofila en los callos enverdecidos fueron también semejante a los encontrados en hojas verdes. En tanto que la actividad de NAD-malato deshidrogenasa fué 2 y 3 veces más alta que la observada en hojas etioladas y hojas verdes respectivamente. Una de las objeciones a este tipo de cultivos es que la obtención de los callos es a partir de nódulos, porciones que se encuentran entre el mesocótilo y el epicótilo del tallo de la planta, lo que sugiere un cierto grado de diferenciación de los tejidos

utilizados, tal modelo se asemeja a los realizados con hojas etioladas, las cuales al iluminarse reanudan su metabolismo normal con el desarrollo de todo su aparato fotosintético.

B. INTRODUCCION.

El proceso de enverdecimiento celular está directamente relacionado con la formación de cloroplastos y síntesis de clorofila. La mayoría de los datos obtenidos sobre aspectos de desarrollo de cloroplastos en plantas, se han logrado siguiendo los cambios bioquímicos y estructurales de estos organelos durante el enverdecimiento de hojas etioladas (Mullet, 1988).

Sin embargo, éste modelo no ha sido lo bastante adecuado para estudiar la biogénesis del cloroplasto, ya que se parte de organelos que presentan cierto grado de diferenciación como son los etioplastos. Por ello, el ritmo de los eventos que ocurren durante el enverdecimiento de hojas etioladas es muy diferente al desarrollo normal de cloroplastos en la germinación de semillas (Walden et al . ,1981).

El cultivo *in vitro* de células vegetales de plantas superiores constituye otro modelo para el estudio del desarrollo del cloroplasto y subsecuente enverdecimiento celular (Rogers et al. , 1987). Así, el proceso de enverdecimiento de callos *in vitro* es un modelo que ha resultado adecuado para el estudio de la biogénesis del cloroplasto, ya que es un sistema que permite investigar la modificación de factores químicos (fuente de carbono, hormonas) y físicos (luz, y temperatura) partiendo de células indiferenciadas para inducir su diferenciación bioquímica a través de la manipulación de estos factores, al ir sumando condiciones óptimas que favorezcan el desarrollo natural de los cloroplastos (Bender, 1987).

Este modelo también permite realizar cambios genéticos en las células y seleccionar caracteres deseables en las plántulas regeneradas a través del proceso de organogénesis.

Los cultivos fotoautotróficos no requieren de una fuente de carbono adicional al CO₂ ambiental para su crecimiento (Turgeon, 1989). En cambio, las células de cultivos fotomixotróficos si dependen de un suministro externo de azúcares como fuente de carbono orgánico, a pesar de poseer la capacidad de sintetizar clorofila, desarrollar cloroplastos y asimilar CO₂ al igual que un cultivo fotoautotrófico, sin embargo esto se debe a que los fotomixotróficos no fijan tanto CO₂ y sintetizan menor cantidad de clorofila que los fotoautotróficos (Nagai et al . , 1989).

La mayoría de los cultivos *in vitro* fotoautotróficos y fotomixotróficos que se han establecido han sido con plantas tipo C3, en cambio hay poca información de éste proceso en plantas C4 . Esto probablemente debido a que el metabolismo del carbono es más complejo en plantas C4 en relación al que presentan los cloroplastos en plantas C3 (Edwards et al . , 1983).

La especialización bioquímica y estructural de las plantas C4 aún no está totalmente entendida. Se desconoce como estas plantas integran de una manera más eficiente el proceso fotosintético, logrando así incrementar su productividad, siendo más productivas que las plantas C3 (Edwards et al . , 1983).

Por lo antes mencionado, el presente trabajo se hizo con el fin de contribuir al conocimiento del metabolismo de carbono en plantas C4. Para esto se planteó establecer un cultivo de maíz *in vitro*, donde se pudieran realizar estudios de diferenciación y desarrollo de cloroplastos. Además de estudiar algunos de los

eventos bioquímicos relacionados con el proceso fotosintético aunados a los cambios morfológicos generados en las células.

Con el fin de establecer un cultivo fotomixotrófico e inducir enverdecimiento celular variando la fuente de carbono orgánico y suministrando CO₂ se planteó la siguiente hipótesis para estudiar la biogénesis del cloroplasto :

B.1. HIPOTESIS.

Si se manipulan adecuadamente factores como: la luz (fotoperiodo), temperatura y hormonas en el medio nutritivo base, la fuente de carbono sería el elemento decisivo para inducir enverdecimiento estable en cultivos de callos blancos de maíz, provocando la formación de cloroplastos y logrando así establecer un cultivo fotomixotrófico *in vitro* .

La hipótesis se fundamenta en trabajos previos, donde se ha visto que los factores antes mencionados (luz, temperatura, **fuente de carbono**, etc.) juegan un papel decisivo en el proceso de enverdecimiento en cultivos de células *in vitro*. Aunque no se conoce claramente como el tipo de fuente de carbono influye en éste proceso. De ahí el planteamiento de la hipótesis.

Para probar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos :

OBJETIVOS GENERALES.

1. Establecer un cultivo *in vitro* de células de maíz (*Zea mays* L. var. VS-22) que enverdezca homogéneamente y adquiriera un carácter fotomixotrófico.
2. Optimizar dicho cultivo *in vitro* y correlacionar parámetros bioquímicos indicadores del proceso fotosintético con el desarrollo de los cloroplastos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener un cultivo de maíz (*Zea mays* L. var. VS- 22) de callo blanco en condiciones de crecimiento óptimas a partir del cual se induzca el enverdecimiento del callo.
2. Determinar el efecto de la fuente de carbono, y suministro de CO₂ sobre el enverdecimiento homogéneo del callo de maíz.
3. Cuantificar los siguientes parámetros durante el proceso de enverdecimiento celular :
 - a) Clorofila total.
 - b) Relación de las clorofilas a / b.
 - c) Proteína Rubisco (Ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa).
 - d) Actividad de la enzima Rubisco.
4. Hacer un estudio histológico de las células de maíz para conocer la estructura y ultraestructura del cloroplasto durante el proceso de enverdecimiento.

B.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Con el fin de inducir enverdecimiento en cultivos *in vitro* de maíz (*Zea mays*, L.) y establecer en estos el carácter fotomixotrófico se contó con un cultivo de callo blanco en condiciones de crecimiento óptimo, a partir del cual se siguió el modelo experimental de "capa delgada" (Vargas, 1992).

Inicialmente se utilizó el genotipo de la variedad **VS-22** de maíz de donde se obtuvo el callo como fuente primaria. También se juzgó conveniente comparar su respuesta al enverdecimiento celular con la de callos de maíz de la variedad **Tuxpeño**, la cual ha sido descrita (Solís et al., 1989). El callo se indujo en medio sólido R4 (Sánchez de Jiménez et al., 1988) y se resembró en medio R2 (Sánchez de Jiménez et al., 1988) a partir del cual se establecieron variantes para manipular la fuente de carbono orgánico, así como el uso de ciertos fitoreguladores. La composición de los medios R2 y R4 se describen en el apéndice.

Para inducir enverdecimiento se tomaron en cuenta factores básicos que han permitido establecer cultivos fotomixotróficos y fotoautotróficos como son relación y tipo de fitoreguladores (Yamada et al., 1978), intensidad luminosa (Gillot et al., 1991) y fuente de carbono (La Rosa et al., 1984, Dalton et al., 1977).

Los callos seleccionados para inducir enverdecimiento se expusieron a condiciones de fotoperíodo 18h luz / 6h oscuridad, lo cual se determinó previamente haciéndose antes un análisis de la duración del período de horas luz / horas oscuridad que mejor respuesta dió. Se hicieron evaluaciones de la intensidad luminosa sobre la superficie del callo que favoreciera un mejor

desarrollo de cloroplastos, optando por una intensidad de 120 mE.m².seg⁻¹, similar a la que ya se había probado que induce la formación de cloroplastos en cultivos de soya (Gillot et al . , 1991).

Posteriormente el cultivo de callo en " capa delgada " se expuso a dos condiciones diferentes: a) a una atmósfera rica en CO₂ 3%, bajo fotoperiodo previamente establecido y b) bajo condiciones normales de aire, en horas oscuridad. El callo en ambas condiciones se sembró sobre medio sólido de enverdecimiento (medio de Murashige y Skoog, 1962) modificado con vitaminas de Green (Green Phillips, 1975).

Para evaluar la influencia de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento del callo se diseñaron distintos protocolos en donde se usaron las siguientes sustancias: sacarosa, glucosa, lactosa y almidón a concentraciones equimolares con respecto a la sacarosa (igual concentración molar) que se usó como control, esto con el fin de evaluar la influencia de cada factor sobre el enverdecimiento celular en dichos cultivos de maíz.

En cuanto a las hormonas que se utilizaron en el medio MS modificado fueron: cinetina y BAP que son fitorreguladores que inducen enverdecimiento celular (Solís et al . , 1989 ; Horn et al . , 1983; Sánchez de Jiménez et al . , 1988). Los parámetros a medir fueron: cuantificación de clorofila total y relación de **clorofilas a / b**, como indicadores del proceso de enverdecimiento, (Bruinsma, 1963), cuantificación de proteína (Bradford, 1976) y detección y actividad enzimática de Rubisco (Nato y Mathieu, 1978). Así mismo, se realizó un estudio histológico tomando muestras de tejido calloso para hacer observaciones microscópicas de los cambios morfológicos ocurridos en las células durante el proceso de enverdecimiento (Solís et al . , 1989)

D. MATERIALES Y METODOS.

D.1. Material biológico.

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*, L). de las variedades VS-22 y Tuxpeño, obtenidas de la productora Nacional de Semillas (PRONASE) y del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) respectivamente. Las semillas se almacenaron en sacos de manta, en un lugar fresco, seco y en obscuridad.

D.2. Preparación de Medios de Cultivo.

La preparación de los distintos medios de cultivo se hizo apartir de soluciones concentradas. Las cuales están basadas en el medio de Murashige-Skoog (1962). Las modificaciones realizadas, la composición de este medio y las cantidades se indican en el apéndice. Se mezclaron las soluciones en agua (destilada y desionizada) con agitación constante, suplementandose con hidrolizado de caseína, fuente de carbono, y los reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5.8 con soluciones de KOH ó HCl. Por otra parte el agar se disolvió por separado con agua calentándose hasta disolverlo completamente, posteriormente ambas mezclas se juntaron, aforándose al volumen deseado. El medio una vez vaciado en frascos gerber o tubos de ensaye, se esterilizó durante 15 minutos en una autoclave a una presión de 1.2 Kg.cm⁻².

D.3. Inducción del callo.

Para inducir la formación de callos de maíz se emplearon embriones de semillas maduras, las cuales se disectaron manualmente, manteniéndose en refrigeración hasta su uso. Los embriones antes de sembrarse fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 12% en una relación v/v, con dos gotas de tween 20, y ocho de un desinfectante comercial (microdIn) durante 12 minutos, en matraces estériles Erlen-Mayer de 250 ml, se pusieron cien embriones por matraz. Una vez transcurrido el tiempo señalado, se enjuagaron cuatro veces con 100 ml de agua destilada estéril, y fueron sembrados en 20 ml de medio de inducción sólido R4 (apéndice) (Sánchez de Jiménez et al. , 1988), colocándose cuatro embriones por frasco. Posteriormente se incubaron por un período de tres semanas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y en obscuridad.

D.4. Resiembra del Callo

Los callos obtenidos durante el proceso de inducción fueron resembrados dos veces antes de pasar al establecimiento de cultivo " en capa " para su enverdecimiento. La primera resiembra se realizó en medio de mantenimiento sólido R2 (Sánchez de Jiménez et al . , 1988) usando 2,4-D 2ppm y sacarosa al 3%. En esta resiembra el escutelo del callo fue retirado debido a que en previos experimentos se observó un mayor crecimiento sin este tejido.

La segunda resiembra se hizo en distintos medios de pre-enverdecimiento, donde se emplearon diferentes tipos de fuente de carbono orgánico a distintos porcentajes. Los reguladores de crecimiento usados en esta resiembra fueron 2,4-D, 0.5 ppm y cinetina 0.01 ppm.

Tanto la primera como la segunda resiembra se hizo en 10 ml de medio sólido en tubos de ensaye. Los callos resebrados se incubaron por dos semanas en obscuridad a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. La tercera resiembra correspondió al sistema de establecimiento de cultivos "en capa" en donde se probaron distintos medios de enverdecimiento. Se usaron las citocininas: BAP 0.1 ppm y cinetina 0.1 ppm, ambas se han utilizado frecuentemente en medios para inducir el enverdecimiento. La combinación de estas hormonas fue reportada en Solís et al (1989) y Vargas, (1992) como exitosa en el enverdecimiento de callos de maíz de la variedad Tuxteño. La composición exacta de todos los medios mencionados así como el protocolo de los mismos se indica en el apéndice.

D.5. Establecimiento de cultivos "en capa" con CO_2 .

Este tipo de sistema de cultivos "en capa" se realizó con el callo obtenido del subcultivo de la segunda resiembra, el cual antes de pasar a su forma de cultivo "en capa" fue limpiado, retirándose del inóculo las porciones organogénicas formadas y partes necrosadas del callo.

Después se tomaron porciones de 0.5g del callo y se dispusieron geoméricamente en capa sobre la superficie del medio de enverdecimiento sólido. El volumen de medio para este tipo de cultivo fue de 50 ml para dos callos "en capa" por caja petri. Cada inóculo se presionó suavemente contra la superficie extendiéndose homogéneamente sobre el medio formando una capa de callo compacta y delgada.

Posteriormente estos cultivos fueron expuestos durante 14 días a una atmósfera enriquecida con una mezcla de aire y CO_2 al 3% proveniente de un tanque de gas Custom, en una cámara de acrílico transparente, con un fotoperíodo de 8

horas luz / 6 horas oscuridad bajo una intensidad luminosa de $120 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

En el periodo de horas oscuridad los cultivos eran sacados de la cámara con gas y expuestos a condiciones normales de aire, sin abrir las cajas petri, para evitar una posible contaminación. La intensidad luminosa se midió en un "Quantum " LI-1858 (LI-Cor inc).

D.6. Establecimiento de cultivos en capa sin CO₂.

En el caso de este tipo de cultivos, se siguió el mismo protocolo descrito para el cultivo de callos " en capa " con CO₂, la única diferencia fué que no se suministro esté gas al sistema, el tiempo de la incubación fué de catorce días, momento en el cual se tomaron las muestras para posterior análisis bioquímico e histológico.

D.7. Cuantificación de clorofila.

Para cuantificar las clorofilas el callo se liofilizó, el polvo obtenido fué homogenizado con una solución de acetona fría al 80 % en un mortero a 4°C en oscuridad. La proporción fué de 1ml de acetona por gramo de muestra. El extracto obtenido se centrifugó en una microcentrifuga a 10,500 rpm. durante 15 minutos. El sobrenadante se leyó a 645 y 663 λ en un espectrofotómetro Beckman (Método de Bruinsma, 1963). Coeficiente de extinción molar(ϵ) para clorofila a : en 645 λ $\epsilon = 7.93$; 663 λ $\epsilon = 8.15$ y para clorofila b : en 645 λ $\epsilon = 18.99$; 663 λ $\epsilon = 19.53$. (Ziegler, 1965).

D.8. Cuantificación de Proteína.

La cuantificación de proteína se hizo de acuerdo a la técnica descrita por Bradford, (1976). Se usó azul de Coomassie G-250 y BSA como proteína estándar. La concentración se calculó por interpolación a la curva patrón.

D.9. Detección de la proteína Rubisco por Dot-Blot.

La detección de Rubisco se hizo siguiendo el método de Dot-blot de acuerdo al siguiente protocolo: Se maceró el callo con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino el cual se homogenizó en una relación 1:1 peso / volumen con buffer de extracción cuya composición fue la siguiente: tricina 0.1 M pH 8.1, MgCl 10mM, EDTA 5 mM, NaHCO₃ 10mM, DTT 10mM, PMSF 0.5 mM.

El extracto se centrifugó a 10,500 rpm en una microcentrifuga por 15 minutos; con el fin de concentrar la proteína en la muestra al sobrenadante resultante se le agregó PEG 50 % llevándose a un porcentaje final de 17 %, después se agitó por un minuto en un vortex, manteniéndose en reposo, durante 30 minutos a 4°C, luego se centrifugó nuevamente por 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió con 300µl de buffer de extracción, y se cuantificó proteína ajustando todas las muestras a la misma cantidad. Las muestras fueron colocadas sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (Schleicher and Shuell, NC) en alcuotas de 2µl. La membrana se incubó con una solución de saturación al 5 % (leche descremada y 0.05 % de Tween), durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Una vez saturada se seco y se lavo dos veces durante 15 minutos en buffer (NaCl 0.15M y 50mM de tris, pH 7.4).

Posteriormente para reconocer a la Rubisco se utilizaron anticuerpos específicos contra la holoenzima de esta proteína a una dilución de 1:500. Como segundo anticuerpo (comercial) se utilizó anti **Ig-G** de conejo unido a una peroxidasa, a una dilución de 1:1500. Para revelar el producto de la reacción se usó 4- cloro-naftol y 44µl de H₂O₂ al 30 % (Torret, 1991).

Aparte de las muestras problema que se colocaron sobre la membrana, se usó un control positivo de extracto de hoja, callo blanco(**CB**) como punto de inicio del proceso de enverdecimiento y **BSA** como control negativo.

D.10. Detección de la proteína Rubisco por Western-Blot

El Western-Blot (Towbin et al . , 1979) fué otro método que se utilizó para detectar Rubisco en las muestras de callos de maíz.

Se hizo una electroforesis (Towbin et al . , 1979) en gel de acrilamida al 12% con SDS y se corrió a 25mA. Una vez terminada la electroforesis las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Schleioher and Shouell) de 0.45µm, en una cuba de transferencia (BioRad Trans-Blot).

Después de la transferencia se comprobó la presencia de las proteínas sobre la membrana con rojo de Ponceau al 1% en ácido acético. Posteriormente la membrana fué saturada en solución al 5%, procediéndose desde éste punto como la técnica descrita anteriormente para el **Dot-Blot**.

Se utilizaron anticuerpos específicos contra la Rubisco y anti **Ig-peroxidasa** de conejo como segundo anticuerpo. Se reveló con el sustrato de la peroxidasa como a continuación se describe: 4-cloro-1-naftol, y 44µl de H₂O₂al 30 %. La técnica se desarrolló según Torrent (1991).

El producto de la reacción, en forma de precipitado azul sobre la banda de proteína reconocida por el anticuerpo apareció entre 5 y 30 minutos, la reacción se paró diluyendo con agua. La membrana se secó y se guardó en la oscuridad y en frío para su mantenimiento.

D.11. Cuantificación de la actividad enzimática de Rubisco.

Para determinar la actividad enzimática de Rubisco en callos de maíz, se maceraron las muestras con nitrógeno líquido y se homogenizaron con el mismo buffer de extracción que se utilizó para el Dot-Blot en una relación 1:1 (peso:vol.).

El extracto obtenido se centrifugó a 10,500 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga, al sobrenadante resultante se le agregó PEG al 50 %, llevándolo a un porcentaje final de 17 %. Después se agitó por un minuto en un vortex y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos y a 4°C, volviendo a centrifugar el precipitado obtenido se resuspendió en buffer de extracción.

Para realizar el ensayo enzimático las muestras se trataron con solución de activación ($MgCl_2$ 100 mM, $NaHCO_3$ 100mM) combinando 9 volúmenes de muestra por 1 volumen de solución de activación, dejándose incubar 3 minutos a 4°C. De ésta mezcla se tomaron 30 μ l y se añadieron a 30 μ l (extracto de callo) de medio de reacción colocado en viales de cristal para centelleo, iniciando así la reacción. La mezcla de ensayo para la reacción enzimática consistió de buffer de ensayo de ensayo pH 8.1 (tricina 320 mM, $MgCl_2$ 64 mM, DTT 16 mM), RuBP 3mM y $NaH^{14}CO_2$ 10 mM, en un volumen final de 60 μ l.

La reacción se llevó a cabo a 0, 15, 60 y 90 segundos a una temperatura de $28 \pm 1^\circ C$, y se detuvo añadiendo 200 μ l de HCl 3N en metanol. Posteriormente las

muestras se evaporaron en baño María dentro de una campana de extracción para eliminar el CO₂ radiactivo que no se incorporó en la reacción. El residuo de la muestra se resuspendió con 50 µl de agua desionizada, y 5 ml de líquido de Bray (Bray, 1960). La presencia de radioactividad incorporada en las muestras se detectó en un contador de centelleo Minaxi B Tri-Carb, 4000 Series.

D.12. Técnicas Histológicas.

Para realizar el análisis histológico se tomaron pequeñas porciones de callo de los distintos cultivos " en capa ", las muestras se tomaron aleatoriamente de la superficie del cultivo. Las muestras que se analizaron por microscopía electrónica fueron las correspondientes a los medios: glucosa 1 % sin CO₂, almidón 1 % con CO₂ y almidón 1 % sin CO₂, las cuales fueron fijadas a los 14 días de iluminación, bajo condiciones de fotoperíodo 18 horas luz / 6 horas oscuridad.

D.12.1 Microscopía Electrónica.

La porción de callo se fijó en glutaraldehído 2 % en una relación vol:vol en un buffer de fosfatos 0.15M, pH 7.2 y a 4±1°C por dos horas. Se posfijó en tetraóxido de osmio 2 % también por dos horas. Posteriormente se deshidrató en etanol y se embebió en Epon. Se utilizó un ultramicrotomo OmU3 Reichert realizándose cortes de 350Å. Para contrastar las muestras se usó nitrato de uranio y citrato de plomo (Sánchez de Jiménez et al. , 1988). Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico JOEL 1200 EX II.

E. Resultados

E.1. Inducción y crecimiento de callos de maíz.

Para inducir enverdecimiento celular en callos de maíz, fué necesario contar con un cultivo de callo blanco en condiciones de crecimiento óptimo, el cual se mantuviera en forma sistemática.

En anteriores experimentos realizados por Vargas, (1992); sobre la inducción y crecimiento de callos de maíz, se reportaron los medios R4 y R2 (Sánchez de Jiménez, 1988) como propicios para inducir y promover un buen crecimiento, así como el mantenimiento de dichos cultivos de maíz. Por lo cual se optó por el uso de estos medios, para evaluar el crecimiento del callo blanco inducido, de las variedades **VS-22** y **Tuxpeño**, realizandose una curva de crecimiento donde se cuantificó el peso fresco del callo, cada 48 horas, hasta que se dejó de apreciar el incremento de peso en el tiempo.

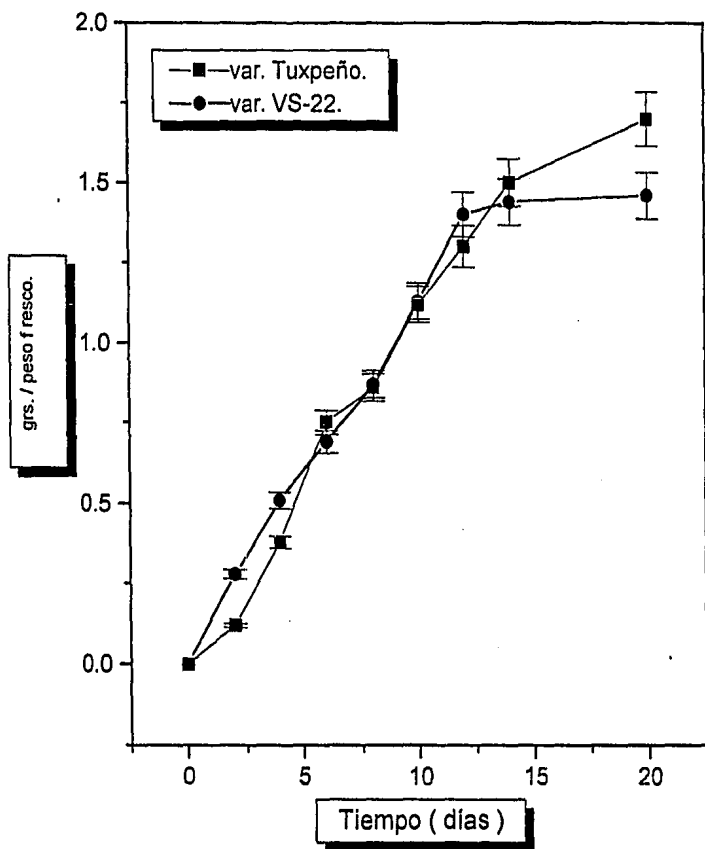
Ambas variedades presentaron un crecimiento favorable usando medio R2 suplementado con mcpp 2ppm y cinetina 0.1ppm; lo que permitió establecer cultivos de callos de maíz, e inducir enverdecimiento (ver gráfica 1).

E.2. Enverdecimiento del callo.

E.2.1. Medición cualitativa del enverdecimiento de callos.

En el proceso de enverdecimiento de los callos de maíz y antes de las mediciones cuantitativas de los parámetros bioquímicos fué necesario contar con una escala de tonalidades que permitiera referir el color adquirido por el callo en el transcurso del experimento; esto ayudaría a seleccionar los tratamientos y condiciones propicias para lograr promover el enverdecimiento del callo.

GRAFICA 1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CALLOS BLANCOS DE MAÍZ EN MEDIO R2 (MCPP Y CINETINA) DE LAS VARIIDADES VS-22 y TUXPEÑO.



A cada color de la escala se le asignó un número de acuerdo a la intensidad del tono verde. El número 1 correspondió a la menor intensidad de verde en la escala, los números sucesivos indican una mayor intensidad del color mencionado (ver figura 8).

E.2.2. Influencia del genotipo en el enverdecimiento del callo.

En el presente trabajo se utilizaron dos genotipos diferentes de maíz, la variedad **VS-22** y **Tuxpeño**, en el primero se encontró un enverdecimiento parcial, además de observarse puntos de color verde intenso sobre la superficie del callo, incluso después de 7 días de iluminación con fotoperíodo (8h luz/8h oscuridad).

En el caso de los callos de **Tuxpeño**, se apreció un color parecido al de la variedad **VS-22** con un enverdecimiento un poco más homogéneo en ciertas partes de la superficie y algunos puntos verdes que en número iban de 4 a 5 y mostraban una tonalidad de 5 y 6 (ver figura 8), dichos puntos se observaron incluso a los 5 días de iluminación. En experimentos anteriores se reporta una gran parte de enverdecimiento sobre la superficie de callos de **Tuxpeño** (Solls, et al., 1989).

E.2.3. Efecto de la fuente de carbono orgánico en el enverdecimiento de callos de maíz.

En éste trabajo una de las metas principales fué conocer el efecto de la fuente de carbono en el proceso de biogénesis del cloroplasto, de ahí que todas las demás factores de crecimiento, se mantuvieron constantes.

10
11

12

Escaia de tonalidades.

13

14

Figura 8. La gama de colores mostrada indica las tonalidades adquiridas por los cultivos de callos de maíz (*Zea mays*) durante el proceso de enverdecimiento. La numeración se indica de manera ascendente.

Las fuentes de carbono que se utilizaron fueron: sacarosa, lactosa, glucosa y almidón todas a diferentes porcentajes pero a iguales concentraciones equimolares (iguales concentraciones en molaridad, aunque sus porcentajes sean diferentes). Los primeros experimentos fueron exploratorios para identificar las mejores condiciones de inducción del proceso de enverdecimiento de los callos y se hicieron apreciaciones visuales en base al color y características de los cultivos.

La **tabla 1** muestra las intensidades adquiridas durante el proceso de enverdecimiento por los cultivos de callos de la variedad **VS-22** durante el proceso de enverdecimiento, usando distintas fuentes de carbono en el medio (ver figura 8).

E.2.4. Efecto del CO₂ sobre el enverdecimiento de cultivos de maíz.

La influencia del CO₂ sobre la respuesta al enverdecimiento de los callos de maíz fué mejor a la obtenida en los cultivos que no se expusieron a una atmósfera enriquecida con CO₂, la concentración a la que se expusieron los cultivos fué del 3%. Las **tablas 2 y 3** muestra la tonalidad adquirida en los cultivos de callos (var. **VS-22** y **Tuxpeño**) que se sometieron a la influencia de CO₂ con distintas fuentes de carbono, ver figura 8.

E.3. Efecto de la fuente de carbono y CO₂ en la síntesis de clorofila.

La cuantificación de clorofila total en los cultivos de callos de la variedad **VS-22** fué ligeramente mayor en comparación con la variedad **Tuxpeño**. Los niveles de concentración de la clorofila total en los tratamientos: almidón 2%, glucosa 1% y almidón 1% sin suministro externo de CO₂ fué de 8.52µg.g⁻¹, 9.90µg.g⁻¹,

Tabla 1. Efecto de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento de callos de maíz (var. VS-22).

Fuente de carbono	Color adquirido por el cultivo de callos de maíz.
Sacarosa 2% ^{c.CB}	1
Sacarosa 1% Lactosa 1% ^e	2
Lactosa 2% ^e	2
Sacarosa 1% Almidón 1% ^e	3
Almidón 2% ^e	3
Glucosa 1% ^e	3
Almidón 1% ^e	4

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición "en capa". Fotoperiodo 18h luz/6h oscuridad, $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y ^e: Tratamientos experimentales (ver figura 8).

Tabla 2. Efecto del CO₂ y de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento de los cultivos de maíz (var. VS-22).

Fuente de carbono	Color adquirido por los cultivos de callos de maíz
Sacarosa 2% c.CB	1
Almidón 2% *	3
Glucosa 1% *	3
Almidón 1% *	4

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz/6h oscuridad, $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$, temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y *: Tratamientos experimentales (ver figura 8).

Tabla 3. Efecto del CO₂ y de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento de los cultivos de maíz (var. Tuxpeño).

Fuente de carbono	Color adquirido por los cultivos de callos de maíz
Sacarosa 2% c.CB	1
Almidón 2% *	3
Glucosa 1% *	3
Almidón 1% *	4

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz/6h oscuridad, $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$, temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y *: Tratamientos experimentales (ver figura 8).

10.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco respectivamente a los 14 días de fotoperiodo (ver tabla 4).

En el caso de la variedad Tuxpeño el nivel para los mismos tratamientos y bajo las mismas condiciones fué de 5.90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 6.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 10.82 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco respectivamente (ver tabla 5).

Los tratamientos de: **sacarosa 2%**, **sacarosa 1% + lactosa 1%**, **lactosa 2%** y **sacarosa 1% + almidón 1%**, solo se probaron con la variedad VS-22 y los niveles de clorofila total de todos estos tratamientos a los 14 días de fotoperiodo y sin CO₂ fué de 2.04 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 5.17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 5.28 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 8.38 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco respectivamente. En la tabla 4 se presentan los resultados de cada uno de estos tratamientos, señalando la cantidad de clorofila a y b encontrada por $\mu\text{g} / \text{g}^{-1}$ peso fresco.

Los cultivos a los que se les suministro CO₂ al 3% fueron: **almidón 2%**, **glucosa 1%** y **almidón 1%** en el caso de la variedad VS-22 donde los niveles de clorofila total registrados fueron 9.69 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 10.42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 11.32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente de peso fresco. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos en cada uno de estos tratamientos. El nivel de clorofila total en los tratamientos: **almidón 2%**, **glucosa 1%** y **almidón 1%** de la variedad Tuxpeño con CO₂ fué de 8.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 9.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 11.12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco (ver tabla 7).

La gráfica 2 muestra el efecto de la fuente de carbono sobre la síntesis de clorofila total en ambas variedades de maíz (**var. VS-22 y Tuxpeño**) y la gráfica 3 el efecto del CO₂ y la fuente de carbono sobre la síntesis de clorofila total también en ambas variedades ya mencionadas.

Tabla 4. Efecto de la fuente de carbono sobre la síntesis de clorofila en cultivos de callos de maíz (var. VS-22).

Fuente de carbono	Clorofila a µg / g peso fresco	Clorofila b µg / g peso fresco	a / b µg / g peso fresco	Clorofila total µg / g peso fresco
Sacarosa 2% c.CB	1.05±0.2	0.98±0.4	1.07±0.3	2.04±0.3
Sacarosa 1% Lactosa 1% *	3.37±0.2	1.80±0.4	1.88±0.3	5.17±0.2
Lactosa 2% *	3.50±0.4	1.78±0.5	1.97±0.4	5.28±0.3
Sacarosa 1% Almidón 1% *	5.40±0.3	2.98±0.2	1.82±0.3	8.38±0.4
Almidón 2% *	5.62±0.2	2.90±0.1	1.94±0.3	8.52±0.2
Glucosa 1% *	6.71±0.1	3.19±0.3	2.1±0.2	9.90±0.3
Almidón 1% *	7.52±0.2	3.40±0.3	2.22±0.3	10.92±0.3

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, 120µE.m.sec⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y *: Tratamientos experimentales. Las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

Tabla 5. Efecto de la fuente de carbono sobre la síntesis de clorofila en cultivos de callos de maíz (var. Tuxpeño).

Fuente de carbono	Clorofila a µg / g peso fresco	Clorofila b µg / g peso fresco	a / b µg / g peso fresco	Clorofila total µg / g peso fresco
Almidón 2% *	3.60±0.3	2.30±0.4	1.57±0.3	5.90±0.2
Glucosa 1% *	4.05±0.4	2.48±0.5	1.64±0.3	6.63±0.3
Almidón 1% *	6.68±0.3	3.96±0.4	1.74±0.2	10.82±0.5

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, 120µE.m.sec⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y *: Tratamientos experimentales. Las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

Tabla 6. Efecto de la fuente de carbono y CO₂ sobre la síntesis de clorofila total en cultivos de callos de maíz (var. VS-22).

Fuente de carbono	Clorofila a µg / g peso fresco	Clorofila b µg / g peso fresco	a / b µg / g peso fresco	Clorofila total µg / g peso fresco
Almidón 2% *	6.22±0.6	3.47±0.4	1.80±0.5	9.69±0.3
Glucosa 1% *	6.72±0.5	3.70±0.3	1.82±0.4	10.42±0.2
Almidón 1% *	7.87±0.2	3.45±0.4	2.29±0.4	11.32±0.1

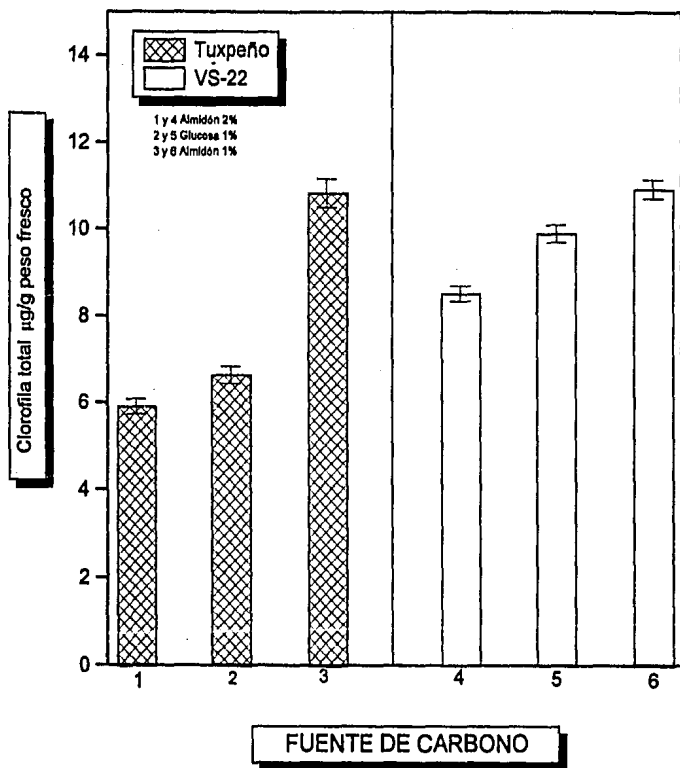
Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz/6h oscuridad, 120µE.m⁻¹.seg⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c,cb} y *: Tratamientos experimentales. Las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

Tabla 7. Efecto de la fuente de carbono y CO₂ sobre la síntesis de clorofila total en cultivos de callos de maíz (var. Tuxpeño).

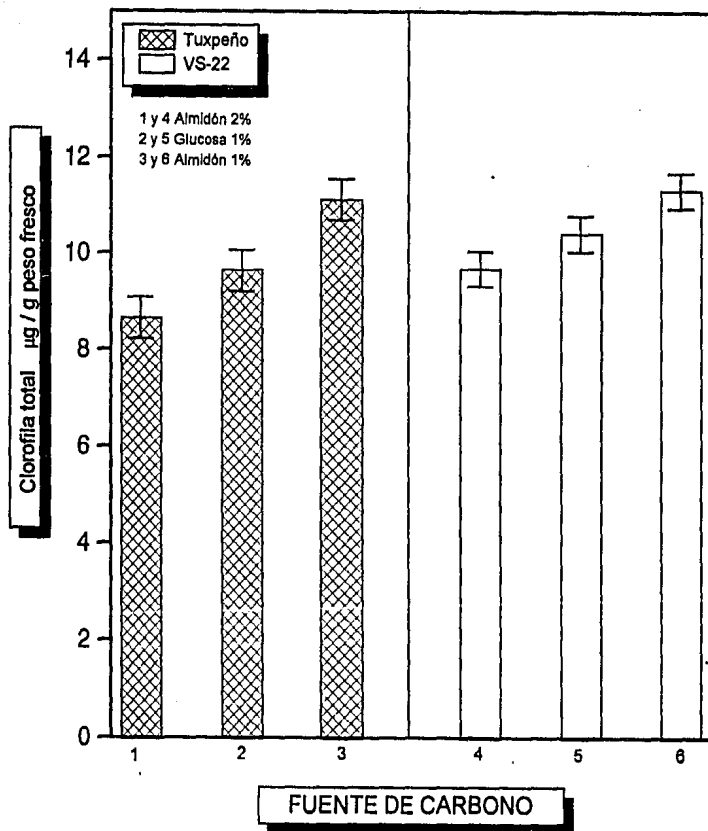
Fuente de carbono	Clorofila a µg / g peso fresco	Clorofila b µg / g peso fresco	a / b µg / g peso fresco	Clorofila total µg / g peso fresco
Almidón 2% *	5.35±0.3	3.31±0.3	1.62±0.4	8.66±0.5
Glucosa 1% *	6.28±0.3	3.36±0.4	1.62±0.5	9.64±0.5
Almidón 1% *	7.32±0.2	3.80±0.3	1.93±0.4	11.12±0.4

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz/6h oscuridad, 120µE.m⁻¹.seg⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c,cb} y *: Tratamientos experimentales. Las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

Gráfica 2. Comparación del efecto de la fuente de carbono sobre la síntesis de clorofila total en cultivos de callos de maíz de las variedades VS-22 y Tuxpeño.



Gráfica 3. Comparación del efecto de la fuente de carbono y suministro de CO₂ en la síntesis de clorofila total en cultivos de maíz (var. VS-22 y Tuxpeño).



De acuerdo a las distintas fuentes de carbono que se utilizaron para inducir enverdecimiento, se observó que el contenido de clorofilas fué mayor en los cultivos de callos donde se usó almidón 1% y glucosa 1%, observandose un ligero incremento de estos pigmentos usando las mismas fuentes de carbono pero con la exposición de los cultivos a una atmósfera enriquecida con CO₂. Lo anterior se puede observar en las gráfica 3

E.4. Efecto de la fuente de carbono y CO₂ en la acumulación de proteína.

Los rangos de proteína total cuantificada en los cultivos de callos de maíz de la variedad **VS-22**, donde únicamente se varió la fuente de carbono se muestran en la tabla 8. Los mismos cultivos de esta misma variedad expuestos a un ambiente de CO₂ presentaron rangos ligeramente más elevados con respecto a los cultivos mencionados. Los resultados de cada uno de los anteriores cultivos en cuanto a la cuantificación de proteína se presentan en la tabla 8.

En el caso de la variedad **Tuxpeño** los valores de proteína total de los tratamientos: almidón 2%, glucosa 1% y almidón 1% sin CO₂ fué de 89.78µg.proteína.g⁻¹, 94.27µg.proteína.g⁻¹, 117.70µg.proteína.g⁻¹ de peso fresco y el de los cultivos con los mismos azúcares pero con suministro de CO₂ fué de 90.42µg de proteína g⁻¹, 95.32µg de proteína g⁻¹ y 122.43µg de proteína g⁻¹peso fresco (ver tabla 9).

Se apreció un ligero aumento en el contenido de proteína en los cultivos tratados con CO₂ con respecto a los no tratados con este gas, aunque este incremento fué poco significativo, lo que indica que ambas variedades siguieron la misma tendencia (tablas 8 y 9).

Tabla 8. Efecto de la fuente de carbono y del CO₂ sobre el contenido de proteína en los cultivos de callos de maíz (var. VS-22).

Fuente de carbono	Proteína total (sin CO ₂) µg / g peso fresco	Proteína total (con CO ₂) µg / g peso fresco
Sacarosa 2% ^{c.CB}	125.15±0.2	137.45±0.3
Sacarosa 1% Lactosa 1% ^e	139.30±0.2	145.89±0.4
Lactosa 2% ^e	150.22±0.3	169.85±0.2
Sacarosa 1% Almidón 1% ^e	179.89±0.3	182.24±0.2
Almidón 2% ^e	190.90±0.6	198.78±0.3
Glucosa 1% ^e	198.72±0.5	220.54±0.2
Almidón 1% ^e	224.76±0.4	272.15±0.2

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición "en capa". Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, 120µE.m⁻¹.seg⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y ^e: Tratamientos experimentales. las muestras se analizaron estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

Tabla 9. Efecto de la fuente de carbono y del suministro de CO₂ sobre el contenido de proteína en los cultivos de callos de maíz (var. Tuxpeño).

Fuente de carbono	Proteína total (sin CO ₂) µg / g peso fresco	Proteína total (con CO ₂) µg / g peso fresco
Almidón 2% ^e	189.78±0.3	190.42±0.2
Glucosa 1% ^e	190.27±0.3	195.32±0.4
Almidón 1% ^e	220.70±0.4	230.43±0.5

Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición "en capa". Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, 120µE.m⁻¹.seg⁻¹, temperatura de 26±1°C. Grupo control y callo blanco^{c.CB} y ^e: Tratamientos experimentales. Las muestras fueron analizadas estadísticamente por desviación estandar. Cada experimento se repitió tres veces.

E.5. Presencia de Rubisco en cultivos de maíz.

E.5.1. Dot - blot.

La presencia de Rubisco se detectó en todas las muestras de cultivos donde se varió la fuente de carbono y también en los cultivos donde se suministró CO₂ aunque no se obtuvo la misma intensidad de la mancha, al revelar la membrana de nitrocelulosa.

Se observó una mayor intensidad en los cultivos de callos cuya fuente de carbono fué: sacarosa 1% + almidón 1%, almidón 2%, glucosa 1%, y almidón 1% sin CO₂, siendo aún más intensa la mancha en los dos últimos tratamientos mencionados (ver figura 9). Se obtuvo también que en estos mismos tratamientos, pero ahora con la influencia externa de CO₂, la intensidad de la mancha registrada por el anticuerpo contra la Rubisco fué ligeramente mayor con respecto a los anteriores donde no se suministró CO₂. Dentro de estos cultivos se observó una mayor intensidad en los cultivos que contenían glucosa 1% y almidón 1%. La figura 10 presenta la intensidad mostrada por los cultivos de callos de maíz de la variedad VS-22, bajo la influencia de CO₂.

Para lograr una referencia y apreciación correcta de las intensidades de las manchas que indican la presencia de Rubisco por Dot-blot, se usaron muestras que sirvieron como control: control positivo ~~extracto de~~ hoja de maíz y como controles negativos BSA y callo blanco (CB) de maíz. El control positivo mostró manchas muy intensas, esto debido a la gran cantidad de proteína Rubisco que presentan las hojas. Por otra parte, en el control negativo de BSA no se apreció ninguna reacción positiva, debido a que es una proteína de origen animal y la Rubisco es una proteína típica de las plantas.

Detección de Rubisco por Dot-blot. La figura muestra la intensidad de cada una de las manchas obtenidas de los tratamientos variando la fuente de carbono sin suministro de CO₂ (var. VS-22).

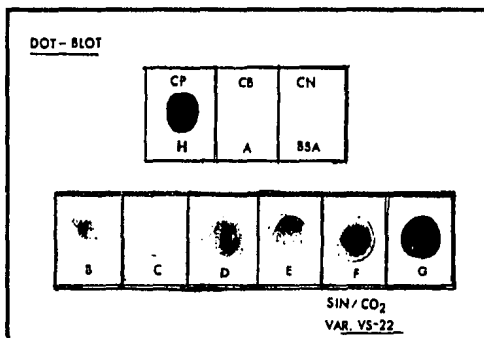


Figura 9. Dot- blot de cultivos de maíz enverdecidos sin CO₂ (var. VS-22). Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ". Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, intensidad luminosa de 120μE.m⁻². seg⁻¹y temperatura de 26±1°C. Las letras indican:

H= Control positivo de hoja de maíz.—15μg proteína.2μl
 CB= (A)= Control negativo de callo blanco de maíz. —15μg proteína.2μl
 BSA= Control negativo de suero de albúmina de bovino. —15μg proteína.2μl.

A=CB=Sacarosa 2% — 15μg proteína.2μl
 B= Sacarosa 1% + Lactosa 1% —15μg proteína.2μl
 C= Lactosa 2% —15μg proteína.2μl
 D= Sacarosa 1%+ Almidón 1% —15μg proteína.2μl
 E= Almidón 2% —15μg proteína.2μl
 F= Glucosa 1% —15μg proteína.2μl
 G= Almidón 1% —15μg proteína.2μl

Detección de la proteína Rubisco por Dot-blot. La figura muestra la intensidad de cada una de las manchas obtenidas de los tratamientos variando la fuente de carbono con suministro de CO₂ (var. VS-22).

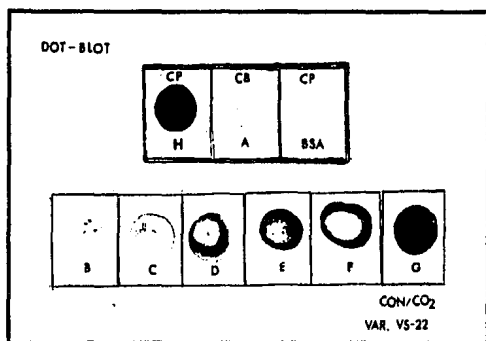


Figura 10. Dot-blot de cultivos de maíz enverdecidos con CO₂ (var. VS-22). Los callos se incubaron durante 14 días en los medios de enverdecimiento en una disposición " en capa ": Fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, intensidad luminosa de 120µE.m⁻². seg⁻¹ y temperatura de 26±1°C. Las letras indican:

H= Control positivo de hoja de maíz.—15µg proteína.2µl
 CB= (A)= Control negativo de callo blanco de maíz. —15µg proteína.2µl
 BSA= Control negativo de suero de albúmina de bovino. —15µg proteína.2µl.

A=CB=Sacarosa 2% — 15µg proteína.2µl
 B= Sacarosa 1% + Lactosa 1% —15µg proteína.2µl
 C= Lactosa 2% —15µg proteína.2µl
 D= Sacarosa 1%+ Almidón 1% —15µg proteína.2µl
 E= Almidón 2% —15µg proteína.2µl
 F= Glucosa 1% —15µg proteína.2µl
 G= Almidón 1% —15µg proteína.2µl

En el caso del control negativo de callo blanco (CB) se observó una mancha sumamente tenue apenas perceptible, esto indica la poca cantidad de Rubisco en la muestra.

Las muestras fueron colocadas sobre la membrana de nitrocelulosa en alícuotas de 2 μ l (20 μ g proteína. 2 μ l⁻¹). La figura 9 muestra las distintas intensidades adquiridas por los cultivos de callos de maíz, variando la fuente de carbono orgánico de la variedad VS-22, así como las de los controles. La figura 10 presenta la intensidad de las manchas en los cultivos tratados con las mismas fuentes de carbono ya señaladas, pero ahora con suministro externo de CO₂ (var. VS-22).

E.5.2. Western - blot.

Las muestras analizadas por **Western-blot** para detectar a la proteína **Rubisco** en los cultivos de maíz fueron: glucosa 1% sin CO₂, almidón 1% sin CO₂ , y almidón 1% con CO₂ (var. **Tuxpeño**). Todas estas muestras reaccionaron positivamente con los anticuerpos específicos contra Rubisco, apreciándose bandas menos intensas y más delgadas, con respecto a las observadas en los controles, lo que indica que la Rubisco sí se encuentra presente en las muestras de los cultivos tratados con las fuentes de carbono mencionadas, aunque no en la misma concentración en todos los controles utilizados (controles positivos: Rubisco purificada y extracto crudo de hoja).

La banda que mostró una mayor intensidad fué la correspondiente al tratamiento de almidón 1% con CO₂, siguiendo en intensidad la de almidón 1% sin CO₂, la banda correspondiente al tratamiento de glucosa 1% sin CO₂ fué menos intensa con respecto a las anteriores (ver figura 11).

Los controles positivos que se emplearon fueron Rubisco purificada ($5\mu\text{g}$ proteína. $5\mu\text{l}^{-1}$) y extracto crudo de hoja ($40\mu\text{g}$ proteína. $80\mu\text{l}^{-1}$). La banda del primer control fué más intensa y más gruesa que la segunda muestra control, esto se explica porque el volumen muestra de hoja contiene otras proteínas además de Rubisco, lo que reduce la concentración de está proteína en la muestra, y por lo tanto el anticuerpo reacciona sobre una menor cantidad de Rubisco dando como resultado una banda más delgada y menos gruesa en comparación con la muestra de Rubisco purificada (ver figura 11).

La figura 11 muestra el Western-Blot, donde se observan las distintas bandas de los tres tratamientos (glucosa 1% sin CO_2 , almidón 1% sin CO_2 y almidón 1% con CO_2) así como los controles.

E.6. Actividad enzimática de Rubisco en cultivos de maíz.

Antes de realizar el ensayo enzimático para medir actividad de Rubisco, se precipitaron las muestras con PEG al 17% (Vargas, 1992), esto con el fin de concentrar la enzima y ampliar la posibilidad de encontrar actividad en las muestras de los cultivos de callos de maíz.

El control positivo de hoja mostró actividad, la cual se incrementó con respecto al tiempo. Al tiempo cero las cuentas por minuto registradas fueron: 1443.0 en tanto que a los 15, 60, y 90 segundos las cuentas registradas por el contador de centelleo fueron: 56 547.0, 88 280.5, 107 471.0 cuentas por minuto (cpm) respectivamente. Lo anterior indica la velocidad de fijación de $\mu\text{mol}^{14}\text{CO}_2$ por minuto catalizado por la cantidad de enzima presente en la muestra de hoja.

Detección de Rubisco por Western-blot en cultivos de maíz con y sin CO₂

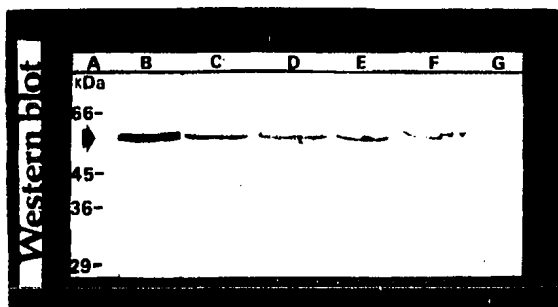


Figura 11. Detección de la proteína Rubisco por Western-blot. La figura muestra la intensidad de las bandas obtenidas en los distintos tratamientos variando la fuente de carbono, con y sin suministro de CO₂ en los cultivos de callos de maíz de la variedad Tuxpeño.

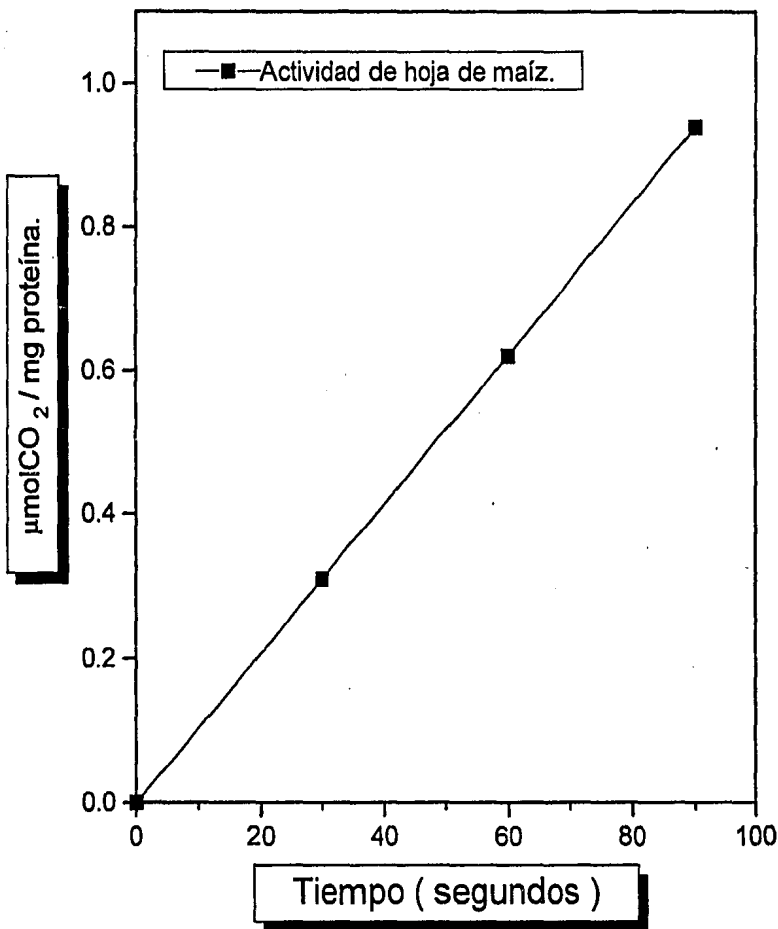
- A= Marcadores moleculares — 10 μ l⁻¹ proteína 5 μ l⁻¹
B= Control positivo: Rubisco purificada — 5 μ l⁻¹ proteína 5 μ l⁻¹
C= Control positivo: extracto crudo de hoja — 80 μ l⁻¹ proteína 100 μ l⁻¹
G=Control negativo: suero de albúmina de bovino— 80 μ l⁻¹ proteína 100 μ l⁻¹
- D= Almidón 1% con CO₂— 80 μ l⁻¹ proteína 100 μ l⁻¹
E= Almidón 1% sin CO₂ — 80 μ l⁻¹ proteína 100 μ l⁻¹
F= Glucosa sin CO₂ — 80 μ l⁻¹ proteína 100 μ l⁻¹

La **gráfica 4** muestra la actividad enzimática de Rubisco encontrada en hojas de maíz (var. Tuxpeño). Las cuentas por minuto se expresan en $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mg}$ de proteína .

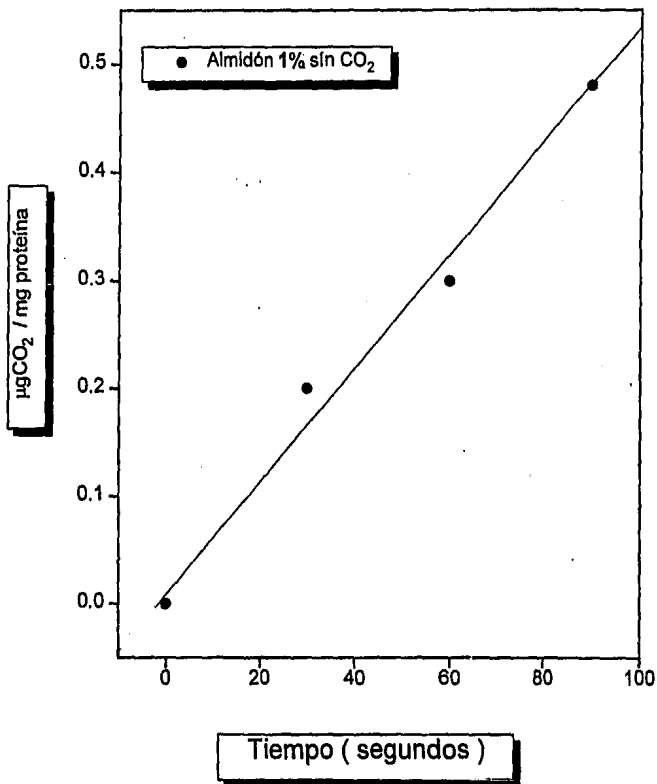
En el caso de las muestras problema se detectó ligera actividad de la enzima Rubisco en los cultivos de callos que contenían almidón 1% sin CO_2 (var. Tuxpeño), registrándose al tiempo cero 387.0 cpm, a los 15, 60, y 90 segundos de reacción se registraron 1436.50, 1695.00 y 2594.00 cpm, respectivamente; esto indica que la Rubisco presente en la muestra tenía cierta actividad, que aunque baja fué capaz de fijar el $^{14}\text{CO}_2$ suministrado en el ensayo enzimático (ver **gráfica 5**).

En las muestras de almidón 1% con CO_2 y glucosa 1% sin CO_2 no se registró actividad de la enzima Rubisco, de acuerdo a los resultados obtenidos en el Dot-blot y Western-blot la Rubisco se encuentra presente aunque no en su forma activa .

GRAFICA 4. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE RUBISCO
EN HOJA DE MAÍZ (var.TUXPEÑO).



GRAFICA 5. Actividad enzimática de Rubisco en cultivos de callos de maíz variedad **Tuxpeño**.



E.7. Análisis histológico de los cultivos de maíz.

Tratamiento con glucosa 1% sin CO₂

Los cultivos de callos de maíz correspondientes al tratamiento de glucosa 1% sin CO₂ (var. VS-22), bajo condiciones de fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad, con una intensidad luminosa de 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ y a temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$, presentaron desarrollo de cloroplastos. Las características de estos organelos encontrados en este tratamiento fueron: presencia de gránulos de almidón que de acuerdo a la panorámica general del análisis histológico por microscopía electrónica iban de 3 a 10 gránulos por cloroplasto.

También del análisis total de la muestra algunos cloroplastos presentaban pocos tilacoides aunque, había otros que presentaban una cantidad regular de estos. Por otra parte no se observó grana, en ninguna de las muestras analizadas con este tratamiento (ver figura 12).

En el caso de este mismo tratamiento (glucosa 1% sin CO₂) pero de la variedad **Tuxpeño**, los cloroplastos encontrados mostraron características similares a las de la variedad VS-22, siendo el número de gránulos de 3 a 13 por organelo, habiendo incluso algunos completamente saturados de almidón, los tilacoides comparados con la variedad VS-22 mostraron una mayor diferenciación, siendo más abundantes, engrosados y no presentaron tantos globulos lipídicos (Figura 13).

Tratamiento de almidón 1% sin CO₂

El análisis histológico por microscopía electrónica en los tratamientos de almidón 1% sin CO₂ de la variedad VS-22 reveló la presencia de cloroplastos con las siguientes características: de acuerdo a la observación total de la muestra, los cloroplastos no contenían gránulos de almidón, aunque algunos sí los presentaron, siendo estos muy pequeños y con forma de esferas dentro del organelo. Los tilacoides en esta muestra se encontraban distribuidos en forma dispersa sobre la superficie del estroma y en poca cantidad. No se observó la presencia de grana, aunque sí una ligera tendencia a formarse, ya que algunos tilacoides presentaban un cierto agrupamiento, esto se puede apreciar si se observa con detenimiento la figura 14.

Otra característica que se observó fue la presencia de glóbulos lipídicos en casi todos los cloroplastos de la muestra, (Figura 14). En cuanto a las características de los cloroplastos observados en las muestras de los cultivos correspondientes al tratamiento de almidón 1% sin CO₂ pero de la variedad Tuxpeño, se apreció que en estos organelos los tilacoides se encontraban en una cantidad regular y no totalmente bien distribuidos en el estroma, apreciándose en algunas partes de los cloroplastos la presencia de grana y muy pocos glóbulos lipídicos. La figura 15 muestra algunas de estas características mencionadas.

Tratamiento de almidón 1% con CO₂ .

En el caso de los cultivos de callos de maíz de la variedad VS-22, cuya fuente de carbono fue almidón 1% con suministro externo de CO₂ y bajo las mismas condiciones de los tratamientos anteriores, se encontraron cloroplastos que presentaban tilacoides bien diferenciados y distribuidos sobre la superficie del

estroma del organelo. Otro aspecto importante que se observó fué la presencia de ciertas regiones que contenían grana aunque no bien desarrollada.

Por otra parte se apreció también la presencia de una cantidad regular de glóbulos lipídicos distribuidos sobre toda la superficie del cloroplasto(**Figura 16**).

Los cloroplastos encontrados en la variedad **Tuxpeño** con almidón 1% y con CO₂, presentaron gran cantidad de tilacoides que cubrían toda el área del estroma del cloroplasto, los tilacoides presentaban ligeros engrosamientos en determinadas zonas y otras más delgadas esto se puede apreciar si se observa con detenimiento las figuras 17 y 18.

Cabe señalar que en todos los tratamientos mencionados se apreció gran actividad celular, presentando numerosos ribosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, e incluso el núcleo celular. Un caso especial de esta muestra (**almidón 1% con CO₂ var. Tuxpeño**) fué la presencia de un cloroplasto muy diferente a los observados en la generalidad de la muestra e incluso a todas las demás muestras de los distintos tratamientos señalados, (**Figura 19**).



Figura 12. El cloroplasto (X50 000) que se observa corresponde al tratamiento de glucosa 1% (var. VS-22) sin suministro de CO₂. Las condiciones de incubación fueron 14 días de fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad 120μE.m⁻².seg. 26±1°C. Observandose los grandes gránulos de almidón. Las letras indican: (A) gránulos de almidón, (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (REG) retículo endoplásmico rugoso (R) ribosoma, (T) tilacoides.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

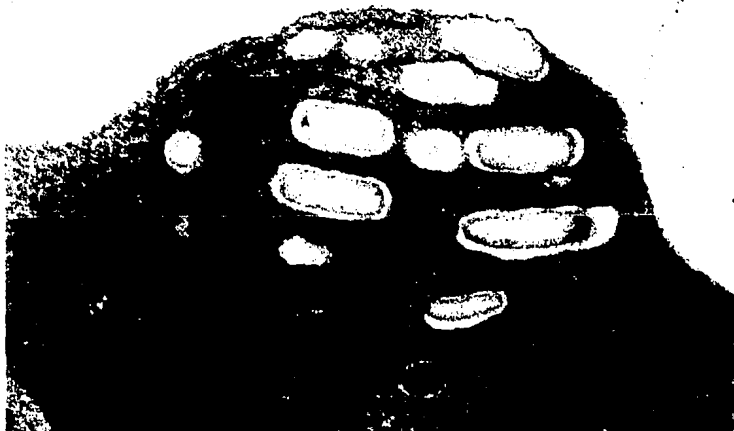


Figura 13. Cloroplasto observado en cultivos de callos de maíz (var. *Tuxpeño*) con glucosa 1% sin CO₂. El cloroplasto presenta gran cantidad de gránulos de almidón no sé observa grana aunque si tilacoides bien diferenciados. Los cultivos se incubaron 14 días en fotoperiodo 14 días de fotoperiodo 18h luz / 6h oscuridad y a una intensidad luminosa de 120 μ E.m⁻².seg. 26 \pm 1°C. Observandose los grandes gránulos de almidón. Las letras indican: (A) gránulos de almidón, (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (R) ribosoma, (T) tilacoides, (GL) globúlo lípidico.



Figura 14. Cloroplasto (15 000X) encontrado en cultivos de callos de maíz(var. VS-22) con almidón 1% sin suministro de CO₂. Los cultivos se incubaron durante 14 días con fotoperiodo de 18h luz/6h oscuridad con una intensidad luminosa de 120 μ E.m⁻².seg⁻¹ y a una temperatura de 26 \pm 1°C. Observese los grandes gránulos de almidón. Las letras indican (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC), (T) tilacoide, (GL) globúlo lípido. Los puntos que se observan dispersos en el citoplasma son ribosomas.



Figura 15. La fotomicrografía corresponde al tratamiento dealmidón 1% con suministro de CO_2 de cultivos de maíz variedad VS-22. El cloroplasto presenta formación de grana aunque no muy predominante. Notesé los globúlos lípidicos que aparecen como puntos negros dentro del cloroplasto. (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (G) grana, (T) tilacoide, (GL) globúlo lípidico, (R) ribosoma. Los puntos que se observan dispersos en el citoplasma son ribosomas. (15 000X)



Figura 16. La fotomicrografía muestra un cloroplasto (15 000X) encontrado en cultivos de callos de la variedad Tuxpeño cultivados con almidón 1% sin CO₂, se puede apreciar los tilacoides que ocupan la parte central del estroma del cloroplasto no se observa grana ni formación de gránulos de almidón. Notesé la gran cantidad de ribosomas en el citoplasma. Las letras indican (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (T) tilacoides, (GL) globulo lipídico, (R) ribosoma, (REG) retículo endoplásmatico rugoso. Los puntos que se observan dispersos en el citoplasma son ribosomas.

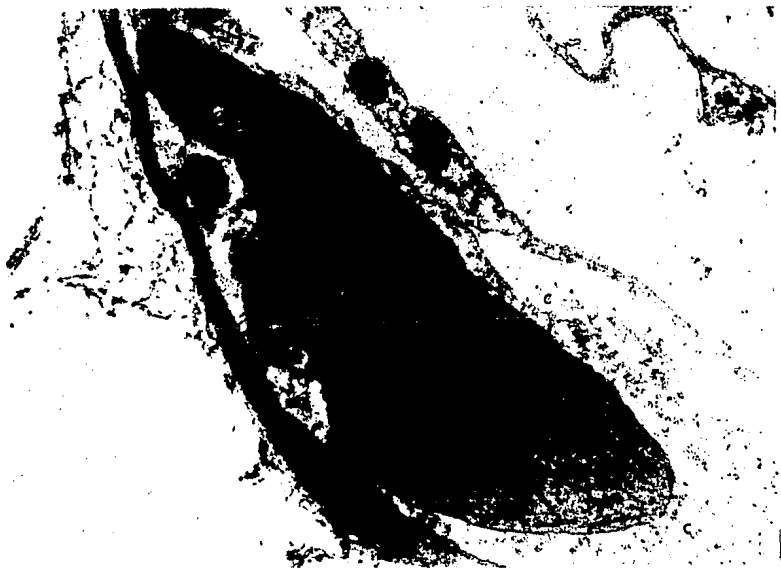


Figura 17. Los cloroplastos (15 000X) que se observan corresponden a cultivos de maíz incubados en almidón 1% con CO_2 (var. Tuxpeño). Notese la gran cantidad de globúlos lípidicos entre los tilacoides. Observé también las mitocondrias y la gran cantidad de ribosomas en las tres células que se aprecian en la muestra. Las letras indican: (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (T) tilacoide, (GL) globúlo lípidico, (REG) retículo endoplásmatico rugoso. Los puntos que se encuentran dispersos en las células son ribosomas.

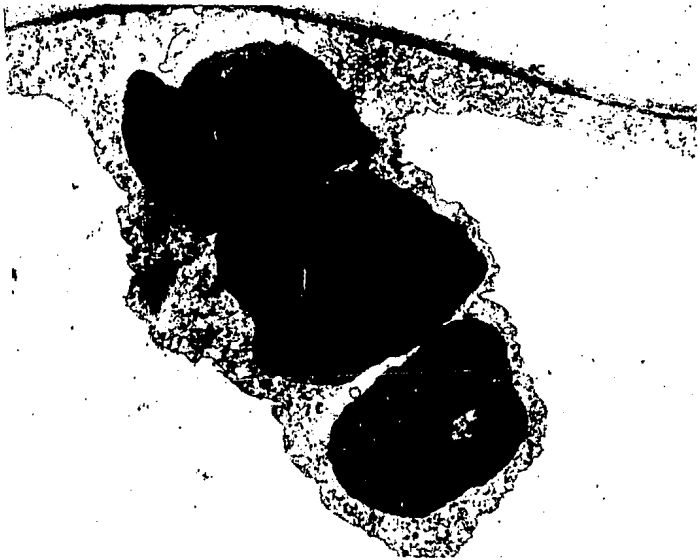


Figura 18. La fotomicrografía muestra tres cloroplastos encontrados en cultivos de callos de maíz de la variedad *Tuxpeño*, incubados en almidón 1% y suministro externo de CO_2 . Los cloroplastos presentan abundantes tilacoides que cubren casi todo el estroma del organelo. Observese los grandes gránulos de almidón. Las letras indican: (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (T) tilacoide, (GL) globúlo lípido. Los puntos que se encuentran dispersos en las células son ribosomas.

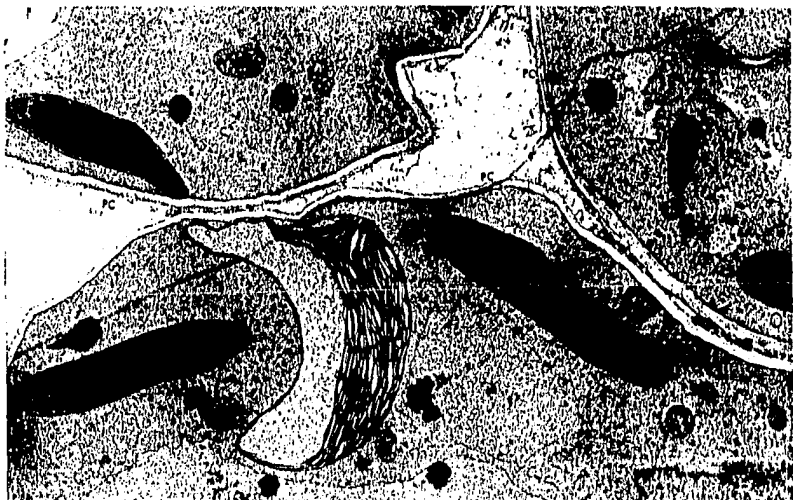


Figura 19. La fotomicrografía muestra dos tipos de cloroplastos (20 000X) encontrados en los cultivos de callos de maíz (var. VS-22) incubados con almidón 1% y CO₂. Observese las mitocondrias y la gran cantidad de ribosomas en el citoplasma de las célula. (C) citoplasma, (E) estroma, (M) mitocondria, (PC) pared celular, (T) tilacoide, (GL) globúlo lípidico, (R) ribosoma.

F. DISCUSION.

Los primeros experimentos que se realizaron para inducir enverdecimiento en los cultivos de callos de maíz de las variedades **VS-22** y **Tuxpeño** fueron exploratorios para determinar las mejores condiciones de inducción del proceso de biogénesis del cloroplasto.

Las pruebas se realizaron inicialmente con cultivos de la variedad **VS-22** en los cuales se emplearon distintas fuentes de carbono, haciéndose previamente una evaluación de los azúcares y concentraciones a utilizar, ya que el tipo de carbono y su cantidad son factores que determinan el desarrollo de cloroplastos, síntesis de clorofila y el proceso fotosintético en general (Widholm, 1992).

Las mejores condiciones de enverdecimiento obtenidas con la variedad **VS-22** se probaron con éxito en los cultivos de callos de la variedad **Tuxpeño**, la cual ya había sido investigada por Solís y colaboradores (1989). Esto sugiere que el genotipo de la planta no es tan importante como las condiciones que inducen un balance metabólico adecuado para permitir el establecimiento del proceso de biogénesis del cloroplasto.

En el caso de los reguladores de crecimiento que se adicionaron a los medios de cultivo fueron citocininas (BAP y cinetina), éstas son compuestos que estimulan aparentemente el desarrollo de cloroplastos induciendo la síntesis de **mRNA** que codifica para proteínas de estos organelos fotosintéticos (Flores y Tobin, 1986); además de que incrementan los niveles de clorofila y el número de cloroplastos por célula; así como el desarrollo gradual de tilacoides (Kumar et al., 1984).

Aquí tales factores se mantuvieron constantes en todos los sistemas en concentraciones óptimas previamente definidas (Solís et al. , 1989) ya que la finalidad de este trabajo fué conocer el efecto de la fuente de carbono sobre el enverdecimiento en el proceso de biogénesis del cloroplasto.

Inicialmente en los cultivos de la variedad **VS-22** se usó como fuente de carbono sacarosa a distintos porcentajes, utilizando como control cultivos de sacarosa 2%; con estos cultivos se obtuvieron los niveles más bajos de clorofila total. Los demás cultivos incubados con adición de esta misma azúcar en el medio (sacarosa 1% + lactosa 1% y sacarosa 1% + almidón 1%) mostraron también bajos niveles en relación al contenido de clorofilas totales pero mayores con respecto a la sacarosa al 2%. De estos sistemas de cultivo mencionados el que mostró un nivel alto de clorofila total fué el de sacarosa 1% + almidón 1% presentando incluso valores más altos con respecto a los medios de cultivo que contenían lactosa (tabla 4). Dicho sistema de cultivo mostró buenas posibilidades de inducir enverdecimiento en los callos de maíz. Se ha reportado que altas concentraciones de sacarosa inhiben la acumulación de clorofila (Widholm, 1992).

La Rosa y colaboradores (1984) mostraron que concentraciones de sacarosa en porcentajes de 0.75 a 2.5% inhiben la acumulación de estos pigmentos fotosintéticos en cultivos de papa, e incluso la actividad enzimática de PEPcase y Rubisco. Neumann y Raafat (1973) mostraron también un decremento en el contenido de clorofila al adicionar sacarosa a cultivos de zanahoria, indicando lo mismo Edelman y Hanson (1971) en este mismo tipo de cultivos.

Vargas, (1992), reportó en cultivos de maíz el uso de sacarosa 3 y 2% obteniendo mejores resultados con sacarosa 2%, dicha concentración favoreció la acumulación de clorofilas e incluso la presencia de Rubisco; por otra parte esta misma concentración de sacarosa se usó como control en este trabajo como ya se indicó, los resultados obtenidos a pesar de cuantificar la clorofila y detectar a la Rubisco no fueron muy favorables al menos en comparación a otras fuentes de carbono utilizadas. Cabe señalar que las condiciones generales usadas para el establecimiento de los cultivos por Vargas, (1992), y por Solís y colaboradores (1989) fueron diferentes a los que se manejaron en el presente estudio, independientemente de la concentración y del tipo de azúcar empleado.

Otro de los experimentos con la variedad VS-22, lo constituyó el uso de lactosa en el medio, estableciéndose dos sistemas de cultivo con este disacárido (sacarosa 1% + lactosa 1% y lactosa 2%). Los resultados mostraron una mayor cantidad de clorofila así como mayor intensidad de la señal de Rubisco detectada por el sistema de Dot-blot , en los sistemas que contenían lactosa 2% (tabla 4 y figura 9). Sheen, (1990) ha reportado que la lactosa no inhibe la expresión de ciertos promotores de genes de proteínas fotosintéticas, lo que significa que dependiendo de la proteína fotosintética de que se trate, este disacárido puede originar una inhibición diferencial sobre la expresión de los promotores de genes respectivos. En el caso de la sacarosa esta sí inhibe la expresión de ciertos promotores de genes para proteínas fotosintéticas (Sheen, 1990).

En las variedades **VS-22** y **Tuxpeño** se usó glucosa 1% para promover enverdecimiento en cultivos de maíz; el uso de esta fuente de carbono fué reportada por Lavergne y colaboradores (1992) como exitosa para promover enverdecimiento en callos de maíz provenientes de nódulos (zona entre mesocótilo y epicótilo). Con la utilización de glucosa en el medio se obtuvieron los niveles más altos de clorofila sin mencionar hasta ahora el uso de almidón 1% que se discutirá más adelante. Además de glucosa también se adicionó CO₂ al 3% para tratar de promover aún más el enverdecimiento y conocer su efecto sobre este proceso en los cultivos. Se establecieron dos sistemas experimentales con glucosa: cultivos incubados en un ambiente enriquecido con CO₂ al 3% y otro incubado sin este gas. Muchos cultivos fotoautotróficos y algunos pocos fotomixotróficos son incubados bajo la influencia de una atmósfera enriquecida con CO₂ ya que los primeros carecen generalmente de la adición de alguna fuente de carbono (La Rosa et al. , 1984; Nagai et al., 1989 y Widholm, 1992).

Los callos de la variedad **VS-22** con glucosa 1% que no se incubaron con CO₂ mostraron valores menores de clorofila total con respecto a los que sí se incubaron con este gas (tabla 4 y 5). En el caso de la variedad **Tuxpeño** estos presentaron resultados similares, menor cantidad de clorofila total en cultivos no expuestos al CO₂ en comparación a los que se expusieron a este ambiente rico en CO₂ (tablas 6 y 7). Los análisis semicuantitativos por **Dot-blot** y **Wester-blot** fueron positivos en los tratatamientos con suministro de CO₂ y sin CO₂ lo que indicó la presencia de Rubisco en los callos en ambas variedades (Figuras 9, 10 y 11).

En lo que respecta a los cloroplastos encontrados en estos cultivos (var.**VS-22** y **Tuxpeño**) tratados con **glucosa 1%** (con CO₂ y sin CO₂) estos mostraron una característica predominante, la acumulación de grandes gránulos de almidón, aparte de la carencia de grana. Los niveles obtenidos de las proporciones de clorofilas **a / b** para **VS-22** (tabla 4 y 5) y **Tuxpeño** (tabla 6 y 7) indican valores cercanos a los registrados para cloroplastos del mesófilo, sin embargo las características de estos muestran más parecido con cloroplastos de la vaina del haz (Figuras 12 y 13) que carecen de grana y presentan almacenamiento de almidón , esto debido probablemente a que no han alcanzado su madurez total, y el desarrollo de grana se ha visto afectado o también quizá al hecho de que la acumulación de clorofila esté limitada en el sistema impidiendo la formación de grana (Mohr, 1977).

Lavergne y colaboradores, (1992) encontraron en sus cultivos de maíz incubados con glucosa 1% un solo tipo de cloroplastos, los cuales mostraron características de tipo mesófilo, observando cloroplastos que carecían de almidón y otros con gránulos de este polisacárido. Los niveles de clorofila encontrados por Lavergne colaboradores, (1992) son similares a los reportados en este trabajo, así como a los encontrados en cultivos fotomixotróficos por Yamada, (1985) en plantas C3 y por Kennedy y colaboradores, (1977); Seeni y Gnanam, (1983) en plantas C4 .

Con la adición de **almidón 1%** en los medios de cultivo de las variedades **VS-22** y **Tuxpeño** se logró enverdecer gran parte de las superficies de los callos de maíz, dispuestos " en capa " de ambas variedades. El uso de este polisacárido ha sido reportado por Horn et al. , (1983), en cultivos fotomixotróficos de un

híbrido *N. tabacum* y *N. glutinosa*, y por Ranch y Giles (1980) que lo han usado en una concentración de 3% en cultivos de callos de *Datura innoxia*; además de Blair et al . , (1988) y Xu et al . , (1988).

Aparte del uso de almidón 1% en el sistema se suministró CO₂, estableciéndose cultivos incubados en un ambiente rico en CO₂ y otros cultivos sin la influencia de este gas. En la variedad **VS-22** ambos sistemas de cultivo (almidón 1% con CO₂ y almidón 1% sin CO₂) mostraron los valores más altos de clorofilas totales así como de la proporción a / b de estos pigmentos fotosintéticos (tablas 4 y 5), de todas las demás fuentes de carbono utilizadas para promover el enverdecimiento durante el proceso de biogénesis del cloroplasto. La diferencia entre el uso y no uso de CO₂ entre ambos tipos de cultivo fué muy poca, siendo ligeramente más elevados los rangos de clorofilas totales en los callos crecidos con CO₂.

El análisis de Dot - blot para la Rubisco en estos cultivos resultó positivo siendo las señales para ambos tipos de variedades bastante marcadas (figuras 9 y 10) lo que indicaría una mayor cantidad de esta proteína con respecto a los otros sistemas de cultivo con fuente de carbono distintas al almidón. Una de las preguntas que surge de todo esto es como el almidón es asimilado por las células de los callos de maíz y su efecto sobre el contenido de clorofila en los cultivos durante el proceso de enverdecimiento.

De acuerdo a la literatura, el uso de almidón para inducir crecimiento genera este proceso lentamente, observándose por otro lado la acumulación rápida de clorofila (Blair et al . , 1988; Xu et al . , 1988). Esto sugiere una posible degradación paulatina del almidón, por la liberación tal vez de enzimas hidrolíticas al medio, que proporciona energía limitada al cultivo permitiendo la

acumulación de clorofila y no su inhibición (Blair et al . , 1988; Xu et al . , 1988). Esto es una posible explicación aunque no se conoce con certeza el efecto del almidón en dichos procesos.

Por otra parte los cloroplastos encontrados en estos cultivos (var. VS-22) de acuerdo al análisis de microscopía electrónica, muestran características morfológicas similares a los cloroplastos del mesófito. Los cloroplastos encontrados en los cultivos que tenían únicamente almidón 1% sin CO₂ muestran muy poca cantidad de grana (Figuras 14), en tanto que los incubados en almidón 1% con suministro de CO₂ (var. VS-22) presentan más cantidad de grana (Figura 15). Las proporciones de clorofilas encontradas en ambos cultivos son cercanas a las que se encuentran en cloroplastos del mesófito (Amtzen y Briantais 1975, Kanai y Edwards 1973).

En lo que respecta a los cultivos con almidón 2% (gráficas 2,3 y tablas 8,9) mostraron valores de clorofilas y proteínas totales menores, con respecto a cultivos que contenían un porcentaje menor de almidón (almidón 1%), incluso la señal para Rubisco por **Dot-blot** (Figuras 9 y 10) fué también menos intensa con respecto a los callos cultivados en almidón 1%, lo cual indicaría probablemente que porcentajes altos de almidón en el sistema, inhiben el contenido de clorofila por acumulación de disacáridos formados por la degradación de almidón ya que posiblemente cuando la concentración es alta de este polisacárido (almidón) la velocidad de asimilación y degradación es baja permitiendo que se acumulen los disacáridos e inhiban de alguna manera la formación de clorofila en los cultivos. Este mismo cultivo (almidón 2%) en comparación con medios que contenían sacarosa y lactosa mostró niveles más altos.

Por otra parte, en lo que respecta a cultivos de la variedad **Tuxpeño** incubados también con almidón 1% sin CO₂ y almidón con CO₂ ambos mostraron resultados similares a los de la variedad **VS-22**, en cuanto a los parámetros evaluados anteriormente (tabla 6 y 7), observandose sin embargo, en esta variedad (**Tuxpeño**) un enverdecimiento más homogéneo.

En el caso de los cloroplastos observados en la variedad **Tuxpeño** (Figura 16, 17 y 18) y en ambos tipos de cultivos (almidón 1% con CO₂ y almidón 1% sin CO₂) las características morfológicas que presentan son similares a los cloroplastos de la vaina del haz, sin embargo, en lo que respecta a la proporción de clorofila **a / b** no corresponde a este tipo de cloroplastos. En este trabajo no se hicieron estudios acerca del desarrollo de **anatomía tipo Kranz**, característica que correlaciona el origen de estos cloroplastos y el metabolismo del carbono fotosintético de los mismos. En trabajos realizados sobre la biogénesis de cloroplastos en la variedad **Tuxpeño** se ha reportado la presencia de cloroplastos del tipo de la vaina del haz, sin embargo, en dichos estudios no observaron la presencia de la anatomía tipo **Kranz**, en ninguno de los estadios de enverdecimiento de los callos de maíz (Solís et al . , 1989). Roy y Kumar (1989) obtuvieron resultados similares a los anteriores en cuanto a la ultraestructura de los cloroplastos formados en callos de maíz, sin observar también la presencia de anatomía **Kranz**.

La detección de Rubisco en ambos cultivos de esta variedad **Tuxpeño** (almidón 1% sin CO₂ y almidón 1% con CO₂) resultó positiva con el sistema de Western-blot, mostrando mayor intensidad en las señales de reconocimiento para la

Rubisco los cultivos que fueron incubados en un ambiente de CO₂ lo que indica una mayor cantidad de esta proteína en los callos de maíz (Figura 11).

Comparando de manera general los resultados mostrados entre ambas variedades (**var.VS-22** y **Tuxpeño**), bajo iguales condiciones de fuente de carbono, hormonas, intensidad luminosa y 14 días de fotoperiodo la variedad **VS-22** presentó los niveles más altos de clorofilas totales e incluso el contenido de proteína total fué mayor, con respecto a la variedad **Tuxpeño**, aunque tales diferencias fueron poco significativas. Por otra parte, el enverdecimiento en **VS-22** se apreció en gran parte de la superficie del callo, pero no de manera completamente homogénea; en contraste a los cultivos de la variedad **Tuxpeño** donde el enverdecimiento presentó una distribución más homogénea. Los demás parámetros evaluados entre ambas variedades mostraron poca diferencia entre sí. Por lo tanto debido a que las diferencias entre ambas variedades no fueron muy significativas, presentando la misma tendencia en general en cuanto al enverdecimiento durante el proceso de biogénesis del cloroplasto de los cultivos de callos de maíz, nuestros resultados indican que el genotipo al menos en estas condiciones no tuvo influencia.

Tal vez las posibles causas de estas pocas diferencias en cuanto a la respuesta al enverdecimiento de ambas variedades, serían atribuidas a las condiciones de tratamiento y tiempo de almacenaje de las semillas de donde se tomaron los explantes para inducir el callo (Roberts, 1983). Con respecto al primer punto, las semillas de la variedad **VS-22** fueron tratadas comercialmente con un fungicida a diferencia de las de **Tuxpeño** que eran semillas no tratadas

El efecto de las distintas fuentes de carbono utilizadas sobre el contenido de proteína total determinada en los sistemas de cultivo de ambas variedades se desconoce, así también como el efecto del suministro de CO₂; tal vez ambos factores desencadenan procesos metabólicos relacionados con la síntesis de proteínas, o con otras vías que se relacionan con la síntesis y degradación de azúcares como fuente de energía; sin embargo dentro de los objetivos de este trabajo, tales efectos no se contemplaron.

La inducción del carácter fotomixotrófico en las variedades **VS-22** y **Tuxpeño** que fué parte de uno de los objetivos principales de este estudio, solo pudo lograrse parcialmente en cultivos con almidón 1% sin CO₂. Los valores detectados mediante el ensayo enzimático, indicaron actividad de Rubisco; aunque el registro de tal actividad fué bajo (gráfica 5). Esto a pesar de que se mostraron niveles de la proteína Rubisco significativamente altos en los cultivos (Figuras 9, 10 y 11).

Se conoce actualmente que la integración de las subunidades de la Rubisco en forma de holoenzima activa requiere de la presencia en el cloroplasto de proteínas llamadas chaperoninas (Ellis y vander Vies, 1991), cuyo masa molecular aproximada es de 60KD. Estas proteínas se unen a la subunidad grande de Rubisco para mantenerla soluble y ayudar a su ensamblaje correcto con la subunidad pequeña, produciendo el complejo activo de la enzima Rubisco (Ellis y vander Vies, 1991). Por otra parte se ha demostrado que la Rubisco activasa, enzima específica del cloroplasto, cataliza la activación de la Rubisco *in vivo* (Salvucci et al . , 1985). Esto indicaría que probablemente para que hubiera actividad enzimática de Rubisco ó para que esta fuese más evidente

en los callos de maíz se requeriría la presencia de estas proteínas en el sistema durante el proceso de diferenciación de cuya función dependería el ensamblaje de la Rubisco y la activación de la holoenzima. En el caso de la variedad **VS-22** no se hicieron ensayos enzimáticos para determinar la presencia de actividad enzimática de Rubisco, sin embargo; de acuerdo a la tendencia similar con la variedad **Tuxpeño** se esperaba el mismo resultado.

En relación al efecto de luz sobre el enverdecimiento en este trabajo se optó por el uso de una intensidad luminosa de $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, ya que intensidad igual a esta y similares, se ha probado que inducen la formación de cloroplastos maduros, en distintos tipos de callos. En cultivos de callos de (espinaca) ***Spinacia oleracea*** (Dalton y Street, 1976), (clavel) ***Dianthus caryophyllus*** (Rabelle, 1988), (arbusto escocés) ***Cytus scoparius*** (Yamada y Sato, 1978), (maíz) ***Zea mays*** (Aoyagi y Bassham, 1986), (soya) ***Glycine max*** (Gillot et al . , 1991).

El uso de distintas intensidades luminosas según la literatura ha mostrado buenos resultados en cuanto a la obtención de cloroplastos maduros en algunas especies (Kennedy et al . , 1977; Aoyagi y Bassaham, 1986; Gillot et al . , 1991) lo que indicaría que la intensidad de la luz no sería un factor limitante para el desarrollo de cloroplastos, siempre y cuando se sobrepase el umbral de intensidad mínimo para el desarrollo de estos organelos.

En cuanto a las condiciones de fotoperíodo y luz continua en éste estudio se optó por el primero, ya que Vargas, (1992) reportó mejores resultados con régimen de luz-obscuridad en cultivos de callos de maíz variedad **VS-22**. Tanto los factores

de intensidad luminosa y fotoperíodo fueron condiciones constantes para ambas variedades de maíz (**var.VS-22** y **Tuxpeño**), en todos los tratamientos.

El establecimiento del sistema de cultivos " en capa " para la inducción del enverdecimiento de células de maíz *in vitro* fué reportado por Vargas, (1992); mismo sistema que se siguió en este trabajo para estudiar el efecto de la fuente de carbono durante el proceso de biogénesis del cloroplasto. En otros reportes sobre la inducción del enverdecimiento de cultivos *in vitro* en plantas C4, se ha involucrado el manejo de callos en su forma irregular de crecimiento, lo que favorece la formación de zonas organogénicas (Nabors et al . , 1982; Aoyagi y Bassham,1986 ; Nelson y Langdale,1989 ; Solis et al . , 1989 ; Lavergne et al . , 1992).

Los resultados aquí mostrados revelan la utilidad de este sistema, ya que se propició enverdecimiento en ambas variedades de maíz (**var.VS-22** y **Tuxpeño**), y se minimiza la existencia simultánea de zonas no diferenciadas, zonas en proceso de diferenciación y zonas enverdecidas; además de que durante el proceso de enverdecimiento, la biogénesis de cloroplastos se pudo apreciar tanto en las etapas iniciales de su formación así como etapas de madurez de estos organelos fotosintéticos, en forma más sincrónica que en trabajos anteriores (Solis et al . , 1989 y Vargas 1992).

G. CONCLUSIONES.

1.- Los callos incubados en medios que contenían sacarosa como fuente de carbono, mostraron los niveles más bajos en todos los parámetros evaluados durante el enverdecimiento, lo que confirma que el azúcar está inhibiendo la síntesis de clorofila la cual es un factor importante en el proceso de enverdecimiento de cultivos de callos.

2.- Las mejores condiciones que condujeron a la biogénesis del cloroplasto fueron las siguientes: incubación de callos en medio R2 con vitaminas de Green, BAP 0.1ppm y cinetina 0.1ppm como hormonas, almidón 1% como fuente de carbono, suministro de CO₂ y 14 días de fotoperiodo 18 horas luz / 8 horas oscuridad a una intensidad luminosa de 120µE.m⁻².seg⁻¹.

3.- La glucosa (1%) indujo enverdecimiento en los cultivos de callos observándose formación de cloroplastos del tipo de la vaina del haz con acumulación de grandes gránulos de almidón.

4.- El establecimiento del carácter fotomixotrófico se logró parcialmente en los callos incubados con almidón 1% sin suministro de CO₂, debido a la baja actividad de Rubisco.

5.- La influencia del CO₂ no fué determinante en la inducción del enverdecimiento, sin embargo; aunado con las distintas fuentes de carbono mostró los niveles más altos de los parámetros evaluados excepto actividad de Rubisco.

6.- La acumulación de Rubisco en ambos cultivos se encuentra en niveles suficientes para mostrar actividad pero parece requerir de otras proteínas para lograr un correcto ensamblaje y / o activación adecuada

7.- El uso de cultivos " en capa " es un sistema que permitió el enverdecimiento homogéneo de las células, lo cual lo hace propio para estudiar distintos eventos de la biogénesis del cloroplasto.

H. BIBLIOGRAFIA.

- Aoyagi, K. and Bassham, J. A. 1986.** Appearance and accumulation of C4 carbon pathway enzymes in developing maize leaves and differentiating maize A188 callus. *Plant Physiol.* 80: 322-333.
- Arntzen, C. J. and Briantais, J. M. 1975.** Chloroplasts structure and function. In Bioenergetics of photosynthesis. Edited by Govindjee *Academic Press*, New York. pp.51-113.
- Avelange, M. H. Sarrey, F., and Rebelle, F. 1990.** Effects of glucose feeding on respiration and photosynthesis in photoautotrophic *Dianthus caryophyllus* cells. *Plant Physiol.* 94:1157 - 1162.
- Barber, J. 1976.** Topics in photosynthesis, the intact chloroplast. *Elsevier, Amsterdam*, vol. I. pp. 476.
- Bassi, R., Peruffo, A. D. B. Barbato, R. and Ghisi, R. 1985.** Differences in chlorophyll protein complexes and composition of polypeptides between thylakoides from bundle sheaths and mesophyll cell in maize. *Eur. J. Biochem.* 146 : 589 - 595.
- Bender, L. 1987.** Fixation and metabolism of carbone dioxide by photosynthetically active carrot callus cultures. *Can. J. Bot.* 65 : 1768-1770.
- Bidwell, R. G., 1982.** Plant Physiology. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. pp.645.
- Blair, L. C., Chastain, C. J., and Widholm, J. M. 1988.** Photosynthesis and photoassimilation of glucose during photomixotrophic growth of *Marchantia polyforma* cells in suspension culture. *Plant Cell Rep.* 7: 266-269.
- 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.
- 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
- Chagvardieff, P. , Pean, M. , Carrier, P. and Dimon, B. 1990.** Oxygen exchange during growth of photomixotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. *Plant Physiol. Biochem.* 28:231-238.
- Dalton, C.C. and Street, H. E. 1976.** The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea*, L.). *In vitro.* 12: 485-494.
- Dalton, C.C. and Street, H. E. 1977.** The influence of applied carbohydrates on the growth cell and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea*, L.). *Plant Sci. Lett.* 10:157-164.
- Edelman, J. , and Hanson, A.D. 1971.** Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *Planta.* 98:150-156.
- Edwards, G. E. and Huber, S. 1981.** The C4 pathway. In : Biochemistry of plants. (Hatch, M. y Boardman, N. eds). Academic Press, Inc. New York. ISBN 0-12-675408-x . vol. 8. pp: 237-281.
- Edwards, G. E. and Walker, D. A. 1983.** C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications. Oxford. ISBN 0-632-00767-2. pp: 275-367.
- Ellis, R. J. 1979.** The most abundant Protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* 4: 241-244.
- Ellis, R. and van der Vies, S. 1991.** Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60 : 321-347.
- Essau, K. 1965.** Plant Anatomy. *John Wiley & Sons, Inc.* New York. pp.767.
- Flores, S. , and Tobin, E. M. 1986.** Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba* : apparent post-transcriptional regulation. *Planta.* 168 : 340-349.
- Gaff, D. F. , Zee, S. Y. , O' Brien, T. P. 1976.** The fine structure of dehydrated and reviving leaves of *Borga nitida* labill. A desiccation tolerant plant. *Aust. J. Bot.* 24 : 225-236.

- Gibbs, M. and Latzko, E. 1979.** Photosynthesis II, photosynthetic carbon metabolism and related processes. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Springer Verlag, Berlin , vol 6. pp. 578.
- Gillot, M. A. , Erdos, G. , and Buetow, D. E. 1991.** Light-induced chloroplast differentiation in soybean cell in suspension culture. *Plant Physiol.* 96 : 962-970.
- Green, C. and Phillips, R. L. 1975.** Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop S.* 14: 417-421.
- Hall, J. , Flowers T. and Roberts, R. 1982.** Plant cell structure and metabolism. Published Longman, Inc. New York. pp.195.
- Hatch, M. D.1977.** C4 pathway of photosynthesis : mechanism and physiological function. *Trends Biochem. Sci.* 2: 199-202.
- Hatch, M. D. and Boardman, N. K. 1981.** Photosynthesis, the biochemistry of plants. A comprehensive Treatise, Academic, New York, N. Y. , vol. 8 : pp. 521.
- Horn, M. E. , Sherrard, J. H. , and Widholm, J. M. 1983.** Photoautotrophic growth of soybean cell in suspension culture. I. Establishment of photoautotrophic cultures. *Plant Physiol.* 72: 426-429.
- Hüsemann, W. , and Barz, W. 1977.** Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant.* 40 : 77-81.
- Hüsemann, W. 1981.** Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum*. *Protoplasma.* 109: 415-431.
- Hüsemann, W. , Herzbeck, H. , and Robenek, H. 1984.** Photosynthesis and carbon metabolism in photoautotrophic cell suspensions of *Chenopodium rubrum* from different phases of batch growth. *Physiol. Plant.* 62 : 349-355
- Hüsemann, W. , Amino, S. , Fischer, K. , Herzbeck, H. , and Callis, R. 1990.** In Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. (H.J.J. Nijkamp, L. H. W. VanDer Plas. and J. Van Aartrijk, eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, The Nether lands. pp. 373-378.

- Kanal, R. , and Edwards. 1973.** Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Plant Physiol* 51: 1133-1137.
- Kennedy, R. A ; Barnes, J. E. and Laetsch, W. 1977.** Photosynthesis in C4 plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 59 : 600-603.
- Kirk, J. T. O. , Tilney-Bassett, R. A. E. 1978.** The plastids: Their chemistry, structure, growth and Inheritance. New York : Elsevier / North-Holland Biomedical Press. pp.650.
- Kisaki, T. , Hirabayashi, S. , and Yano, N. 1973.** Effect on the age of tobacco leaves on photosynthesis and photorespiration. *Plant Cell Physiol.* 14 : 505-514.
- Kumar, A. , Bender, L. , and Neumann, K. H. 1984.** In vitro growth and chlorophyll formation in mesophyll callus tissue on sugar free medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3: 11-28.
- Kumar, A. , Bender, L. y Thorpe, T. A. 1988.** Activities of Ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and ¹⁴C-bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. *Plant Physiol.* 87: 675-679.
- 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. M. and Price, I. 1969.** Development of dimorphic chloroplasts of sugar cane. *Amer. J. Bot.* 56 : 77-81.
- Laetsch, W. M.1971.** Chloroplast structural relationships in leaves of C4 plants. In : photosynthesis and photorespiration. Hatch, M. D. , Osmond, C.B. y Slatyer, R. O. (Eds). *Wiley-Interscience*, New York, N.Y. pp.323.
- Laetsch, W. M. 1974.** The C4 syndrome : a estructural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 27-42.
- La Rosa, P.C. , Hasegawa, P. M. , and Bressan, R. A. 1984.** Photoautotrophic potato cells : transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol. Plant.* 61: 279-286.

- Lavergne, D. , Nato, A. , Dupuis, J. , Pean, M. and Chagvardieff, P. 1992.** Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C₃ photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 84 : 292-300.
- Lawlor, D.W. 1990.** Photosynthesis: metabolism, control and physiology. Produced by Logman. Singapore. ISBN pp.262.
- Miyahi, S. 1977.** Photosynthetic organelles, structure and function, special tissue on plant and cell physiology. Center for Academic Publications. Japan, vol. 3. pp 460.
- Mohr, H. 1977.** Phytochrome and chloroplast development. *Endeavour.* 1:107-114.
- Mullet, J. E. 1988.** Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 : 475- 502.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-479.
- Nabors, M. , Kroskey, C. and 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. and 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. and 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.
- Nelson, T. and Langdale, J. 1989.** Patterns of leaf development in C₄ plants. *The Plant Cell.* 1:3-13.
- Neumann, K. H. , and Raafat, A. F. 1973.** Further studies on the photosynthesis of carrot tissue cultures. *Plant Physiol.* 51: 685-690.

- Neumann, K. H. , and Bender, L. 1987.** Photosynthesis in cell and tissue culture systems. In : *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.
- Neumann, K. H. , Gross, U. , and Bender, L. 1989.** In " *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures* " (W. G. W. Kurz, ed.), Springer-Verlag, Heidelberg. vol II, .pp. 281-291.
- Nishida, K. , Sato, F. and Yamada, Y. 1980.** Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cell. *Plant Cell Physiol.* 21:47-55.
- Ongun, A. and Stocking, C. 1965.** Effect of light and dark on the intracellular fate of photosynthetic products. *Plant Physiol.* 40 : 8225-831.
- Passingham, J. V. 1980.** Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:113-129.
- Pike, K. A. and Leech, R. M. , 1987.** The control of chloroplast number in wheat mesophyll cell. *Planta.* 170 : 416-420.
- Rabelle, F. 1988.** Photosynthesis and respiration in air-grown and CO₂-grown photoautotrophic cell suspension cultures of carnation. *Plant Sci.*54:11-21.
- Ranch, J. P. and Giles, K. L. 1980.** Photosynthetic carbon metabolism in cultured photoautotrophic cells of *Datura innoxia*. *Ann. Bot. (London)* 46: 667- 683.
- Rao, K. K. , Hall, D. O. and Cammack, R. 1981.** The photosynthetic apparatus, in biochemical evolution. dir. H. Gutfreund. *Cambridge University Press.* pp. 150-202.
- Roberts, D. and Laetsch, W. 1974.** Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiol.* 54: 148-159.
- Robertson, E. 1983.** Loss of seed viability during storage. *Adv. Res. Technol. Seed.* 8: 9-34.
- Roeske, C. A. , Wildholm, J. M. , and Ogren, W. L. 1989.** Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophic cell suspension cultures at low and high CO₂. *Plant Physiol.* 91 : 1512-1519.

- Rogers, S. , Ogren, W. L. and Widholm, J. M. 1987.** Photosynthetic characteristics of a photoautotrophic cell suspension culture of soybean. *Plant Physiol.* 84 : 1451-1456.
- 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. Abstracts 0768.
- Salvucci, M. , Portis, A. and Ogren, W. 1985.** A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase / oxygenase activation *in vivo*. *Photosyn. Res.* 7 : 193-201.
- Sánchez de Jiménez, E. , Vargas, M. , Aguilar, R and Jiménez, E.1988.** Age-dependent responsiveness to cell differentiation, stimulus in maize callus culture. *Plant Physiol. Biochem.* 28: 723-732.
- Sato, F. , Nishida, K. and Yamada, Y. 1980.** Activities of carboxylation enzymes and products of $^{14}\text{CO}_2$ fixation in photoautotrophically cultured cells. *Plant Sci. Lett.* 20:91-97.
- Sato, F. , Nakagawa, N. , Tanio, T. , and Yamada, Y. 1981.** An improved medium for the photoautotrophic culture of *Cytisus scoparius* link cell. *Agric. Biol. Chem.* 45 : 2463-2467.
- Seeni, S. and Gnanam, A. 1983.** Photosynthesis in cell suspension culture of a C4 plant, *Glisekia pharmaceoides* L. *Plant Cell Physiol.* 24 : 1033-1041.
- Sheen, J. 1990.** Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plan Cell.* 2 : 1027-1038.
- Solis, C. , Sánchez de Jiménez, E. , Loyola- Vargas, V. M. , Cárabez, A. and Lotina-Hennsen, B. 1989.** The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of C3 and C4 Plant. *Plant Cell Physiol.* 30 (5) : 609-616.
- Stumpf, P. K. , and Conn, E. E. 1980.** The biochemistry of plants. vol.1. In the *Plant Cell*, dir. N. E. Tolbert. Academic Press, Londres.
- Thomson, W. W. and Whatley, J. M. 1980.** Development of non-green plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:375-394.
- Torrent, M. 1991.** Manual del curso: " Mecanismos de acción de fitoreguladores en el desarrollo y germinación de semillas ". Facultad de Química " . UNAM. pp:1-3.

- Towbin, H. , Stachlein, T. and Gordon, J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4350-4354.
- Trebs, A. and Avron, M. 1977.** Photosynthetic electron photophosphorylation. *Encyclopedia of Plant Physiology. New series . Springer-Verlag. Berlin, vol.5. pp. 730.*
- Turgeon, R. 1989.** The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 : 119-138.
- Usada, H. , Kanai, R. and Takeuchi, M. 1971.** Comparison of carbon-dioxide fixation and fine-structure in various assimilatory tissue of *Amaranthus-retroflexus* L. *Plant Cell Physiol.* 12:917-930.
- Vargas, S. M. 1992.** Biogénesis de cloroplastos en cultivo de células de maíz (*Zea mays* L. var VS-22) en enverdecimiento. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp. 134.
- Walden, R. and Leaver, C. J. 1981.** Synthesis of chloroplast proteins during germination and early development of cucumber. *Plant Physiol.* 67:1090-1096.
- Whatley, J. M. 1979.** Plastid development in the primary leaf of *Phaseolus vulgaris* : variation between different types of cells. *New Phytol.* 82:1-10.
- Widholm, J. M. 1992.** Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures. International review of cytology. *Academic Press. Inc. Vol. 132. pp:109-175.*
- Xu, C. , Blair, L. C. , Rogers, S. M. , Govindjee, D and Widholm, J. M. 1988.** Characteristics of five new photoautotrophic suspension cultures including two *Amaranthus* species and a cotton strain growing on ambient CO₂ levels. *Plant Physiol.* 88:1297-1302.
- Yamada, Y. , Sato, F. and Hagimori, M. 1976.** Photoautotrophism in green cultured cells. In : *Frontiers of plant tissue culture. (Thorpe, T. ed.). Univ. Calgary. Canada. pp: 453-462. ISBN*
- Yamada, Y. , and Sato, F. 1978.** Photoautotrophism in green cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 19:691-699.

Yamada, Y. , Sato, F. and Watanabe, K. 1982. Photosynthetic carbon metabolism in cultured photoautotrophic cells. Proc.5 th Int. Cong. *Plant Tissue and cell culture*. Tokio. pp:249-250.

Yamada, Y. , 1985. Photosynthetic potetial of plant cell cultures. In : *Advances in Biochemical Engeneering / Biotechnology : Plant Cell Culture*. Vol. 31 (A Fiechter, ed.). pp: 89-98. Springer-Verlag. New York. NY. ISBN 0-387-15489-2.

Ziegler, R. , and Egle K. 1965. Zur quantlitativen analyse der chloroplast pigmente. I Kritische uberprufung der spektralphotometrischen chorophyllbestimmung. *Beitr Biol Pflanzen* 41:11-37.

I. APENDICE.

Composición de las soluciones stock del medio (MS) de Murashige-Skoog, (1962).

Solución	Composición	g.L ⁻¹	Concentración final en el 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 .7H ₂ O	0.9457	9.45
	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

Vitaminas de Green, (Green and Phillips,1975).

Solución	Composición	ml.L ⁻¹	Concentración final en el medio R (mg.L ⁻¹)
H	Ac. nicotínico	13	1.3
I	Tiamina	1.25	0.25
J	Piridoxina	2.5	0.5
K	Glicina	7.7	7.7

Sustancias adicionales, (Green and Phillips,1975).

Sustancia	g.L ⁻¹	ml.L ⁻¹	Concentración final en el medio R (mg.L ⁻¹)
Asparagina	2.23	100	223
Pantotenato	0.1	2.5	0.25

**PREPARACION DE MEDIO DE INDUCCION
MEDIO R4**

Soluciones stock	ml. L. medio ⁻¹
A	10
B	50
C	10
D	10
E	10
F	10
G	10
H	5
I	5
J	5
K	2
Hidrollizado de caseína	200mg
Sacarosa	3%
mcpp	4ppm
Cinetina	0.01ppm
Fitigel	2.5g

**PREPARACION DE MEDIO DE CRECIMIENTO
MEDIO R2**

Soluciones stock	ml. L. medio ⁻¹
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	200mg
Sacarosa	3%
mcpp	2ppm
Cinetina	0.01ppm
Fitagel	2.5g

Protocolo de medios

Experimento A

(Tratamiento con sacarosa 2%)

Induccion de callo

Medio R4

1a. Resiembra del callo

Medio R2
sacarosa 2%
cinetina 0.01ppm
mcpp 2 ppm

2a. Resiembra del callo

Medio de Pre-enverdecimiento
sacarosa 2%
cinetina 0.01ppm
2,4-D 0.5ppm

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento
BAP 0.1ppm
cinetina 0.1 ppm
Sacarosa 2%

Experimento B

(Tratamiento con sacarosa 1% + lactosa 1%)

Inducción de callo

Medio R4

1a. Resiembrado del callo

Medio R2

sacarosa 3%
cinetina 0.01ppm
mcpp 2ppm

2a. Resiembrado del callo

Medio de pre- enverdecimiento

sacarosa 1.5%
lactosa 0.5%
cinetina 0.01ppm
2,4-D 0.5ppm

3a. Resiembrado del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1
BAP 0.1 ppm
sacarosa 1% lactosa 1%

Experimento C

(Tratamiento con lactosa 2%)

Inducción de callo

Medio R4

1a. Resiembra de callo

Medio R2

sacarosa 3%
cinetina 0.01ppm
mcpp 2 ppm

2a. Resimbra del callo

Medio de pre-enverdecimiento

2-4, D 0.5 ppm
cinetina 0.01 ppm
sacarosa 0.5% lactosa 1.5 %

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1ppm
BAP 0.1 ppm
Lactosa 2 %

Experimento D

(Tratamiento con sacarosa 1% + almidón 1%)

Inducción de callo

Medio R4

1a. Resiembra del callo

Medio R2

cinetina 0.01ppm
mcpp 2 ppm
sacarosa 3%

2a. Resiembra del callo

Medio de Pre-enverdecimiento

2-4, D 0.05ppm
cinetina 0.1ppm
sacarosa 1.5 % almidón 0.5%

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1ppm
BAP 0.1 ppm
sacarosa 1% almidón 1%

Experimentos E

(Tratamiento con almidón 2%)

Inducción del callo

Medio R4

1a. Resiembra del callo

Medio R2

mcpp 2 ppm
cinetina 0.01ppm
sacarosa 3%

2a. Resiembra del callo

Medio de pre- enverdecimiento

2-4, D 0.5ppm
cinetina 0.01ppm
sacarosa 1% almidón 1%

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1ppm
BAP 0.1ppm
almidón 2%

Experimentos F
(Tratamiento con Glucosa 1%)

Inducción de callo

Medio R4

1a. Resiembra del callo

Medio R2

mcpp 2ppm
cinetina 0.01ppm
sacarosa 3%

2a. Resiembra del callo

Medio de Pre-enverdecimiento

2-4, D 0.05ppm
cinetina 0.1ppm
vitaminas de Green
asparagina
pantotenato
sacarosa 2%

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1ppm
BAP 0.1ppm
vitaminas de Green
asparagina
pantotenato
glucosa 1%

Experimentos G

(Tratamiento con almidón 1%)

Inducción de callo

Medio R4

1a. Resiembra del callo

Medio R2

asparagina
mcpp 2ppm
cinetina 0.01ppm
sacarosa 3%

2a. Resiembra del callo

Medio de Pre-enverdecimiento

2-4, D 0.05ppm
cinetina 0.1ppm
vitaminas de Green
asparagina
pantotenato
sacarosa 2%

3a. Resiembra del callo

Medio de enverdecimiento

cinetina 0.1ppm
BAP 0.1ppm
vitaminas de Green
asparagina
pantotenato
Almidón 1%