

8  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS MOVIMIENTOS ORIENTADOS DE  
LOS CLOROPLASTOS DE *Vallisneria spiralis*  
MEDIANTE CAMBIOS DE ABSORBENCIA Y  
REFLECTANCIA DIFUSA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**JUAN FERNANDO ARROYO ESTRADA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO ALFRED GARCIA JIMENEZ



MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Estudio de los movimientos orientados de los cloroplastos de  
Vallisneria spiralis mediante cambios de absorbencia y reflectancia difusa.

realizado por Juan Fernando Arroyo Estrada

con número de cuenta 8131877-9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Federico Alfred García Jiménez

Propietario

Dr. Barbarín Arregín Lozano

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

M. en C. Agustín Quiroz Flores

Suplente

Biol. David Behavides Velázquez

Consejo Departamental de Biología

## Agradecimientos:

Al que me enseñó a construir mi primer troncomóvil, Francisco Prado. A las niñas morenitas y güeritas que perseguían a mi hermano en el Kinder. Por supuesto a mi Maestra Lourdes de tercero de primaria que nos tenía rodeado de puras niñas (cosa que no aproveche). A Enrique Zarate que promovió en mí el primer reto, el poder saltar la barda en la escuela. Maestra Alicia de quinto que me restregó el 5 que saque en un periodo, lo que impidió que estuviera en la escolta; a mi Maestra de sexto que me despertó al tema del amor hacia las mujeres, por supuesto platónico; a mis primeros amigos Guillermo y Benito, que me tenían mucha paciencia; a los que me revolcaron constantemente en la tarima, claro jugando. A mi maestra de Biología que me enseñó como no se debe de aprender la ciencia; a toda los alumnos de la Secundaria 21 que suspiraron ¡ah! al unísono; a Javier Reyes que cree que Dios existe pese a todo; a Laura y Patricia que me tienen paciencia y saben que me río; a José Luis M<sup>2</sup> que me asombro con su habilidad en la pintura; a Lourdes Barbosa que me tiene una infinita paciencia y afecto (aunque usted no lo crea después de 15 años); a Alicia y su infinita capacidad de imaginación; a los alumnos de las opciones técnicas del CCT Navalpan; al des.... que me mando ¡ahh!; por supuesto, aunque no está a Clarita por todo lo que pasamos juntos; no podría faltar a Latournier que nos decía: ¡pero que hacen aquí, cámbiense de carrera!, y yo .....necio. Al Fósil mayor (Raúl) que me decía que esto es de resistencia; al mismísimo Chory que no quería hacer las tareas cuando yo le decía; al límites (Miguel) que ahora sí tendió a infinito y desapareció; a Betty y Lupe por sus sonrisas tan oportunas; al Alfredo por su constancia, necesidad e incredulidad; a Luis Felipe que cree que se, o es un santo; al Programa Jóvenes hacia la Investigación, por todo lo que aprendí, de las personas que participaron (Dr. Boldu, Dra. Zubieta, Ana N., Eva, maestros, alumnos y personal administrativo). A los colegios Hispano Ingles y Hamilton por su presión para que terminara esto. A mi esclavo, que es casi un hermano (Ricardo). Al mismísimo eclipse del 91 y todo lo ocurrido al rededor de este, y todo lo que me dejó (tanto experiencias, como amigos: Arturo, Carlos, la Yudoka, Lupe, Pavel, Hugo, y otros). A todos tesisistas del Instituto de Química; a Argelia por sus locas manías de vivir y ver la vida; a Patricia por su necesidad de seguir ahí. Al buen amigo José (mejor conocido en el bajo mundo como Joe), por su valiosa ayuda en todo momento. A Javier Mantoya por su original forma de VER ¡TODO!. A las gentes que no entienden ¡NADA! de lo que hago. A Mayte, por mostrarme la verdad de la vale.....

A las personas del laboratorio 2.4a: al ausente Nelson, a la siempre presente Alba, a Hector por mi bata repleta de selenio, a Chelito y Eva por ocupar espacios iguales en tiempos diferentes.

A muchos que no mencione pero que de alguna manera ayudaron, influenciaron, modificaron, presionaron a ser lo que soy, ..... ¡gracias mill.

Por supuesto y de manera muy especial a mis padres, que sin su apoyo y cariño  
no podría haber echo nada. Gracias.

A todos mis hermanos y SOBRINITOS, por su afecto y comprensión.

Al Dr. Federico por su infinita paciencia. Gracias.

A mi niña, por creer en mi.

## Índice

Resumen.....	2
Introducción .....	3
Fotosíntesis .....	3
Reacciones luminosas .....	4
Reacciones oscuras .....	7
Irradiación fotosintética .....	8
Radiación solar .....	10
Movimiento de los cloroplastos. ....	12
Movimiento de cloroplastos en Vallisneria.....	18
Movimiento de cloroplastos y cambios de absorbencia .....	21
Factores que modifican el movimiento de los cloroplastos .....	22
Ubicación Taxonómica .....	24
Objetivos .....	25
Material y Método .....	26
Resultados .....	31
Discusión.....	65
Conclusión.....	77
Referencias .....	79

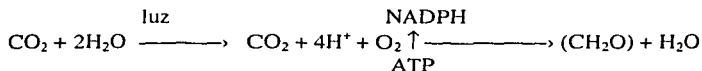
## Resumen

El proceso de la fotosíntesis involucra la conversión de la energía luminosa del sol en energía química. Entre los mecanismos de regulación fotosintética esta sin duda el movimiento de los cloroplastos. Se ha descrito que la luz induce re-orientación de los cloroplastos en numerosos organismos fotosintéticos. Sin embargo no está del todo claro cuales son los parámetros que modifican la orientación de los cloroplastos. De los tres tipos de luz utilizados para irradiar las muestras, la luz azul (404 nm) mostró un mayor cambio en la disminución de la absorbencia con un descenso de absorbencia cercano a 0.2, no así la luz verde en donde no se observaron cambios significativos. La posición de los cloroplastos más significativa ocurrió de una cobertura total del 100% al 25% con luz azul irradiada con  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Los cloroplastos en racimo se presentan en las muestras irradiadas con  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , en un tiempo de 42 minutos, dicha posición se caracteriza, porque los cloroplastos rodean al núcleo y se encuentran generalmente en la parte inferior de la célula. Así mismo, después de que las plantas fueron sometidas a un filtro azul para irradiación diaria, se observaron diferencias importantes de comportamiento en el descenso de la absorbencia al irradiar las muestras con luz azul (404 nm), verde (575 nm), roja (720 nm) y blanca. Se encontraron diferencias en las cantidades de pigmentos después de la irradiación con luz azul (condición de dos semanas). Las cantidades fueron: para la clorofila a de  $3.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ , la clorofila b de  $1.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ , y la total de  $5.8 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( para la condición de dos semanas). Antes de la irradiación las cantidades fueron: para la clorofila a de  $9.32 \mu\text{g}/\text{ml}$ , la clorofila b de  $3.78 \mu\text{g}/\text{ml}$  y la total de  $13.10 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Se encontraron cambios estructurales en las membranas tilacoidales en los cloroplastos de las plantas que fueron irradiadas por dos semanas bajo luz azul, cubriendo las membranas tilacoidales en su totalidad al cloroplasto.

## Introducción

### Fotosíntesis

La característica más importante de las plantas es su habilidad para atrapar energía del sol y fijar el  $\text{CO}_2$  atmosférico en diferentes moléculas orgánicas. Este proceso de fotosíntesis provee la mayor cantidad de entrada de energía libre a la biosfera; algo de esta energía atrapada en la asimilación fotosintética es transferida al proceso de la respiración y a compuestos con alta energía que pueden ser usados para síntesis y mantenimiento del proceso. La tasa neta de fijación de  $\text{CO}_2$  por plantas fotosintéticas resulta de la diferencia entre la cantidad total de fijación de  $\text{CO}_2$  menos la tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  en el proceso de respiración. La reacción completa de la fotosíntesis puede representarse como se indica a continuación:



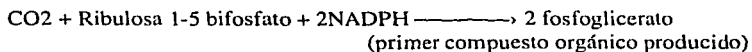
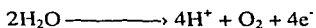
El efecto neto es la descomposición de dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  y la producción de una mol de  $\text{O}_2$  por cada mol de  $\text{CO}_2$ , el cual es reducido al nivel de azúcar ( $(\text{CH}_2\text{O})_6$ ). Las diferentes reacciones individuales ocurren en organelos especializados llamados cloroplastos, los cuales están formados por una doble membrana y contienen un conjunto de vesículas llamadas tilacoides, arregladas en pilas (granás) o en membranas simples. Las membranas tilacoidales simples se denominan membrana estromal. Los grana se encuentran contenidos en una matriz



llamada estroma. La fotosíntesis puede ser convenientemente tratada en tres componentes separados (Jones 1992):

- i) Las reacciones luminosas, en las cuales la energía radiante es absorbida y usada para generar compuestos con alta energía: ATP y NADPH.
- ii) Las reacciones oscuras, las cuales incluyen la reducción bioquímica del CO<sub>2</sub> a azúcares usando los compuestos energéticos sintetizados (ATP y NADPH) en las reacciones luminosas.
- iii) El abastecimiento de CO<sub>2</sub> del ambiente al sitio de reducción en los cloroplastos y su reducción en presencia del ciclo de Calvin.

La formación de O<sub>2</sub> que ocurre solamente en presencia de luz, y la reducción del bióxido de carbono, que no precisa de luz, son por lo tanto, procesos separados y distintos (Leningher 1978).



### **Reacciones luminosas**

Los procesos primarios en fotosíntesis son la absorción de energía solar por pigmentos localizados en el grana y en las lamelas estromales de los cloroplastos. Los principales pigmentos, las clorofilas, son más efectivas para absorber en el rojo y en el azul, mientras que los carotenos y otros pigmentos accesorios permiten la

absorción de otros tipos de longitudes de onda en el intervalo de 400 - 700 nm (radiación fotosintéticamente activa). La cantidad y el tipo de pigmento varía considerablemente en las diferentes especies (Dennis y col. 1990). En plantas verdes la clorofila está incluida en complejos entre proteínas, clorofila y carotenos: los complejos cosechadores de luz (LHC), los complejos de antena del Fotosistema I (PSI) y los complejos de antena del Fotosistema II (PSII) (Albertson P.A.1995).

La radiación absorbida causa la excitación, la cual converge en las moléculas de los pigmentos de centros de reacción (P680 y P700) cuyos electrones pueden excitarse si la energía disponible corresponde a lo requerido por el receptor. La radiación fotosintéticamente activa para las plantas superiores está dentro del espectro electromagnético de la luz en el rango de 400 a 700 nm (del azul al rojo). La luz azul es aproximadamente 1.5 veces más energética que la luz roja, esta radiación está controlada por los dos centros de reacción, pero la excitación de la clorofila por luz azul es muy inestable, decae rápidamente a un estado de baja excitación y libera calor. La energía liberada cuando la excitación de los electrones retorna al estado basal puede controlarse en los centros de reacción causando una separación de cargas y por lo tanto un flujo de electrones que ocasiona la formación de NADPH, así como ATP formado por el flujo de protones a través de la membrana, o bien perderse por fluorescencia. A temperatura ambiente, *in vivo*, la mayor fluorescencia proviene de la

clorofila del PSII, esta fluorescencia puede ser medida para probar la funcionalidad de la fotosíntesis.

En el caso de una operación exacta de los sistemas fotosintéticos, se requiere de un balance de excitación de los dos fotosistemas y la energía transferida entre los dos es regulada por el grado de fosforilización de proteínas de LHC, si se aumenta la fosforilización se incrementa la funcionalidad del PSI. La separación de cargas en el PSII lleva a la reducción de un primer aceptor, la feofitina, y desde aquí es transportado a través de una serie de futuros aceptores ( $Q_A$ ,  $Q_B$ , plastoquinona, etc.), que impulsan la fosforilización de ADP mediante el flujo de protones y la reducción de  $NADP^+$ . La oxidación de P680 ( $PSII^+$ ) es compensada por un flujo de electrones a partir del rompimiento de una molécula de agua, este último paso completa el flujo de electrones no cíclico de  $H_2O$  al  $NADP^+$ . En esta vía, una molécula de  $NADP^+$  es reducida a NADPH por cada 2 electrones y un protón. El acoplamiento de este flujo de electrones con el flujo de protones genera ATP e involucra un mecanismo quimiosmótico. No está del todo claro cuántas moléculas de ATP pueden generarse por un flujo no cíclico de electrones, pero se cree que son 2 ATP por cada par de electrones.

## Reacciones oscuras

Las plantas pueden clasificarse en los tres grupos siguientes:  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM, con base en las vías bioquímicas por las cuales fijan el  $CO_2$ . Existen características anatómicas y fisiológicas fundamentales, pero las diferencias a las que nos referiremos son las formas de fijación del  $CO_2$ . Las Plantas  $C_3$  usan la enzima ribulosa difosfato carboxilasa (RUBP carboxilasa o Rubisco) para la primera fijación del  $CO_2$  en el cloroplasto, para formar dos compuestos de tres carbonos llamados 3-fosfoglicerato, a partir de estos se obtienen hexosas y se regenera la ribulosa bifosfato (ciclo de Calvin), usando la energía del ATP y NADPH (sintetizados en la fase luminosa).

En las plantas  $C_4$ , la primera reacción de carboxilación participa la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) produciendo oxalacetato (OAA) que es el primer producto de fijación, el cual rápidamente se reduce a otro compuesto de 4 carbonos (malato o aspartato). El siguiente paso en estas plantas es la transformación de dichos compuestos de 4 carbonos en las células de la vaina del haz, donde se libera el  $CO_2$  recuperándose el fosfoenol piruvato. El bióxido de carbono liberado es refijado usando la enzima normal  $C_3$  del ciclo de Calvin (Stryer 1993).

El metabolismo ácido de Crasulaceas (vía CAM) es una mezcla de las dos vías anteriores. Primero existe una fijación inicial usando PEP carboxilasa y una

subsecuente carboxilación y refijación por la rubisco. En este caso, sin embargo, la carboxilación inicial ocurre durante la noche cuando grandes cantidades de ácidos de cuatro carbonos se acumulan en vacuolas de las células del mesófilo. Durante el día, la enzima málica actúa en la descarboxilación del malato almacenado y provee de  $\text{CO}_2$  como sustrato para las enzima de tipo  $\text{C}_3$ .

### **Irradiación fotosintética**

Existen factores físicos y químicos que determinan la actividad fotosintética de los organismos. La luz es uno de los factores más importantes, ya que es la fuente energética principal de la actividad fotosintética de los organismos fotosintéticos (Dawes 1986).

Históricamente la intensidad de la luz fue medida en términos de lumen, ésta fue definida como la cantidad de radiación que llega de la fuente por unidad de tiempo, evaluada en términos de estandarizar una respuesta visual (unidad fotométrica). Posteriormente se utilizó la unidad de pie candela o lux, unidades fotométricas que se refieren a mediciones de luz visible y con respuesta espectral igual a la del ojo humano (Biggs 1984). Posteriormente los fotobiólogos medían la energía luminosa incidente en la superficie en términos de la energía en watts por metro cuadrado ( $\text{wm}^{-2}$ ). En el Sistema Internacional de Unidades (SI), el watt es considerado una unidad de energía radiante. Sin embargo las reacciones

fotoquímicas en fotosíntesis dependen tanto del número de fotones que inciden en la superficie, como de la energía contenida en esos fotones, por consiguiente es más lógico expresar la irradiancia fotosintéticamente activa en términos del número de cuanta (fotones) que inciden en una unidad de superficie por unidad de tiempo (densidad de flujo fotónico o cuanta). La densidad de flujo fotónico (Q) en una región particular de la longitud de onda se mide en unidades de  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , donde una mol es  $6.023 \times 10^{23}$  (número de Avogadro) fotones o cuanta. Sin embargo el Einstein (E) se define como  $6.023 \times 10^{23}$  cuanta (Q) y puede ser expresado como  $E \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La unidad más práctica para expresar la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) es el número de fotones en el espectro de 400 a 700 nm, que inciden por unidad de tiempo en una unidad de superficie ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  o  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Así, la irradiancia solar que llega a la superficie de la Tierra a máxima totalidad del Sol es de aproximadamente  $950 \text{ W m}^{-2}$  ó  $95\,000 \text{ lux}$  en el cual la densidad de flujo de fotones de la radiación fotosintéticamente activa para las plantas superiores (400 - 700 nm) es de  $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Hall y Rao 1987).

## Radiación solar

La radiación solar es una de las características más importantes del ambiente que influye en las plantas para su crecimiento y captación de energía. La cantidad y calidad de la energía que cae sobre la tierra varía estacional y diariamente, pero en promedio es de  $1.94 \text{ cal/g (Cal) cm}^{-2} \cdot \text{min.}^{-1}$ , recibida a luz directa perpendicular al Sol por fuera de la atmósfera de la Tierra. Esta 1.94 cal. es conocida como la constante solar y representa uno de los componentes más fundamentales y vitales en el conocimiento de nuestro ambiente (Barbouret 1987). Existen varias formas de cómo la energía del Sol llega a la superficie de la hoja. La radiación solar puede llegar directa o indirectamente, por la nubes, por la radiación reflejada del suelo u otros objetos en el hábitat. De la energía que llega al nivel del mar una parte es absorbida por los diferentes componentes de la atmósfera, siendo el valor alrededor de 1.3 cal., en un día soleado de verano (Barbouret 1987).

De la energía que penetra al agua, una proporción se refracta en la superficie, dependiendo del ángulo de inclinación solar, que puede ser desde un 2 % hasta un 89 % (de 5 grados de inclinación hasta 89 grados). Esencialmente toda la luz absorbida por un cuerpo de agua, es afectada por 4 componentes naturales en un ecosistema acuático: el agua por sí misma, los pigmentos amarillos disueltos, las partículas inanimadas (tripton) y por supuesto por la biota fotosintética, que puede ser tanto el

componente del fitoplancton presente, como las algas y las macrófitas acuáticas (Kirk 1983).

Para los organismos fotosintéticos es importante captar y responder a los diferentes estímulos luminosos que se presentan durante el día y a lo largo del año, en hábitats y condiciones muy diversas (Kirk 1983). Este problema lo han solucionado respondiendo mediante movimiento de las hojas (Fotonásticos, Koller 1990) hasta las adaptaciones celulares, como el movimiento de los cloroplastos (Haupt & Scheuerlein 1990).



## Movimiento de los cloroplastos

En los primeros trabajos en que se observó el movimiento de cloroplastos, se notó que la luz jugaba un papel importante en la distribución de éstos en la célula (Stahl 1880, Bohm 1863 y Senn 1908, tomado de Haupt 1990, figura 1).

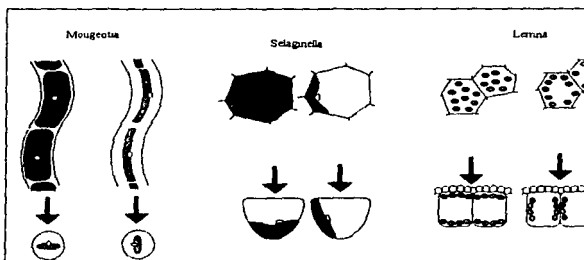


Figura 1 Ejemplos de que la luz induce el movimiento de los cloroplastos, las flechas indican la dirección de la luz (Hemming 1968).

Hemming en 1968, propuso 4 tipos de posiciones de los cloroplastos que eran:

**Díastrofe:** Los cloroplastos se separan en dos grupos en las paredes; esto ocurre con luz débil y en la obscuridad.

**Apóastrofe:** Los cloroplastos se alinean a las paredes, bordeando a la célula.

**Paráastrofe:** Los cloroplastos se alinean a las paredes para protegerse de la luz muy intensa.

**Epíastrofe:** La posición de células de *Funaria* y *Lemna* en luz difusa.

Estas posiciones las consideró basándose principalmente en observaciones realizadas en *Lemna* y *Funaria*, y dependen de la intensidad y dirección de la luz.

Posteriormente Seitz en 1972, observó en varios organismos tres tipos de movimientos de cloroplastos dependiendo de la luz. Los primeros eran los movimientos fototácticos de orientación entre la pared periclinal y anticlinal. Los segundos la rotación, en los cuales los cloroplastos participan acelerando la corriente citoplasmática y los terceros cuando la luz pasiva controla la movilidad de los cloroplastos en la centrifugación (grado de centrifugabilidad).

En 1979, Britz y Seitz distinguen el movimiento de cloroplastos y la corriente citoplasmática dentro de la célula como fenómenos a respuestas diferentes. En general Britz propone que el movimiento de cloroplastos está en función de la intensidad de la luz y de los fotorreceptores (figura 2). Él propone tres tipos de respuesta que dependen de la intensidad de la luz:

*Epistrofe*. Los cloroplastos se localizan en la parte de arriba y abajo de la célula y se observa en luz tenue o débil.

*Parastrofe*. En esta posición los cloroplastos se colocan en las paredes y se observa con luz intensa.

*Apostrofe*. Los cloroplastos se localizan al azar dentro de la célula y ocurre cuando el organismo está en un período de oscuridad.

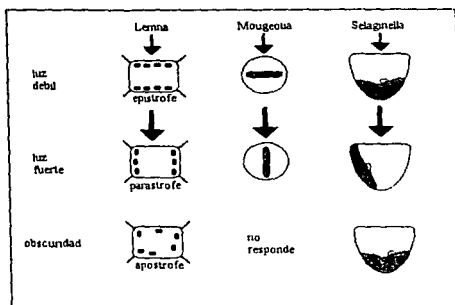


Figura 2 En tres de las especies más comúnmente estudiadas, la luz induce el movimiento de los cloroplastos a tres posiciones características, que están en función de la intensidad de la luz. Las flechas indican la dirección de la luz, las delgadas indican una luz tenue y las flechas gruesas una luz intensa.

Por otro lado, el movimiento de los cloroplastos (Haupt 1982) está sujeto a dos tipos de respuestas, el primero está influenciado por la intensidad de la luz pero no por su dirección y afecta la corriente citoplasmática y por lo tanto la distribución de organelos (fotodinesis). En el segundo los cloroplastos se re-orientan en la célula y su resultado depende de la intensidad y dirección de la luz (movimientos fototácticos).

Haupt y Scheuerlein (1990) mencionan que la distribución de los cloroplastos está en función de la dirección e intensidad de la luz, además de hacer una clara diferencia entre las respuestas que son mediadas por fotoreceptores cuyos pigmentos cloroplastos a tres posiciones características, que están en función de la intensidad de la luz, además de hacer una clara diferencia entre las respuestas que son mediadas por fotoreceptores cuyos pigmentos están actuando cerca de la luz azul-UV (flavinas, criptocromo) y los pigmentos cuya

luz absorbe preferentemente en rojo/rojo-lejano (fitocromo). Menciona además que existen tres posiciones de los cloroplastos:

- 1) en la oscuridad, en la cual los cloroplastos parten de una posición alrededor de las células del mesófilo
- 2) a una intensidad baja, en la cual los cloroplastos están perpendiculares a la fuente,
- 3) en intensidades altas, en la que los cloroplastos se acomodan paralelamente a la fuente de iluminación.

En general existen muchas posiciones de los cloroplastos que están en función de estímulos y condiciones muy diversas. Sin embargo, desde el punto de vista ecofisiológico se pueden considerar dos patrones extremos que están en función de las bajas intensidades, muy por debajo del punto de compensación de la fotosíntesis y las que están por encima de este punto, las cuales se presentan a altas intensidades (Haupt 1990). Estas respuestas varían notablemente en los diferentes organismos: algas, briofitas y plantas acuáticas (Britz 1979, Haupt 1990), ya que ellos están sujetos a condiciones ambientales muy diversas, además de presentar diferencias importantes en su maquinaria fotosintética (Dennis y Turpin 1990)

En hojas de *Egeria densa* la corriente citoplasmática es inducida por luz, pero además por compuestos químicos como la L histidina, la cual en una concentración de 0.1 mM es suficiente para inducir el movimiento (movimientos quimiotácticos, Tazawa et. al. 1991).

En 1979, Nultsch encontró que la luz induce un desplazamiento de cromatóforos y un cambio concomitante de transmitancia en algas marinas. Al estudiar 42 especies de algas marinas, encontró que 21 especies registraban cambios de transmitancia al ser irradiadas con luz blanca, y encontró además que en los géneros *Fucus* y *Laminaria* existe una relación entre la intensidad de la irradiación y los cambios de transmitancia.

Mizukami en 1981, encontró que en el alga verde *Bryopsis plumosa*, los cloroplastos irradiados con luz azul entre 380 y 500 nm es la más efectiva para provocar la acumulación de los cloroplastos, siendo poco efectiva la luz roja (600 - 700 nm) a una intensidad de  $37.2 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Además encontró que podía inhibir el movimiento de los cloroplastos con colchicina en una concentración de  $1 \mu\text{M}$  y no así con citocalicina a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . Mizukami propone que en el alga verde *Bryopsis plumosa* el movimiento de los cloroplastos está mediado por flavinas.

Britz en 1976 encontró que en el alga *Ulva lactuca*, el movimiento de los cloroplastos está influenciado por ritmos circadianos, fenómeno que es diferente al de la inducción del movimiento de los cloroplastos por la luz, que presentan *Enteromorpha linza* (L), *E. Intestinalis* (L) y *Monostroma grevillei*. El provocó el movimiento de los cloroplastos a las paredes de la célula con la irradiación a intensidades superiores a los  $1560 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 80\,000$  lux).

Los cromatóforos del alga café *Dictyota dichotoma* muestran tres arreglos característicos que son: a baja intensidad, altas intensidades y en la obscuridad. Los cloroplastos de *Dictyota dichotoma* se colocan paralelos a la cara con luz blanca a  $234 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 12,000 \text{ lux}$ ) y luz azul a  $115 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 25 \text{ W m}^{-2}$ ) según Nultsch y Ruffer 1981.

En el protonema del helecho *Adiantum capillas-veneris* L., la luz orienta el movimiento de los cloroplastos, provocando una acumulación de éstos en la cara frontal bajo las siguientes condiciones: con luz roja lejana de  $552 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 120 \text{ W m}^{-2}$ ), luz roja de  $920 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $200 \text{ W m}^{-2}$ ) y con luz azul de  $46 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 10 \text{ W m}^{-2}$ ). Presentan un movimiento negativo a intensidades de  $460 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 100 \text{ W m}^{-2}$ ) con luz roja lejana, luz roja con  $46 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 10 \text{ W m}^{-2}$ ) y  $105.8 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 23 \text{ W m}^{-2}$ ) con luz azul (Yatsuhashi y Wada 1990).

**Movimiento de cloroplastos en *Vallisneria*.**

Para el movimiento de los cloroplastos en *Vallisneria*, Seitz, en 1967 menciona, que a altas intensidades existe una rotación de los cloroplastos, una disminución de la viscosidad del citoplasma de las células, así como una variación en la centrifugabilidad de los cloroplastos. También observó que primero se inicia la rotación de los cloroplastos del mesófilo, a una intensidad de  $1.95 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 10^2 \text{ lux}$ ), y después de los cloroplastos de la epidermis a una intensidad de  $195 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\approx 10^4 \text{ lux}$ ). Encontró que la irradiación con luz con un máximo en 450 nm es más efectiva para inducir el movimiento de los cloroplastos, comparada con la irradiación con luz roja (680 nm), obteniendo un efecto 5 veces mayor en la rotación de los cloroplastos del mesófilo, al utilizar la irradiación con luz azul (456.5 nm) comparada con la irradiación con luz roja (586.9 nm). Un efecto 12 veces mayor ocurre también en el movimiento de los cloroplastos en las células de la epidermis (irradiación con luz azul comparado con luz roja). Este efecto en la irradiación en el azul lo atribuye a las flavinas y el efecto en el rojo a la clorofila.

Izutani y col. en 1990, al estudiar el movimiento de cloroplastos en células de la epidermis de *Vallisneria spiralis*, inhibieron el movimiento de los cloroplastos con citocalasina con  $100 \mu\text{g/ml}$ , irradiando las células con luz azul (450 nm) y con luz roja (650 nm). Observaron que los cloroplastos irradiados a bajas intensidades se

colocan en posición anticlinal con respecto a la fuente de iluminación (perpendiculares a la superficie de la célula). Y a intensidades altas los cloroplastos se mueven a una posición periclinal (paralelos a la superficie de la célula). Encontraron que la luz azul (a una intensidad de  $5.95 \text{ w/m}^2 \approx 27.37 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ) es la más efectiva para inducir el movimiento a la posición anticlinal. En cambio la luz roja produce un aumento en la relación cloroplasto/área de la célula, con una intensidad de  $1.88 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1} (\approx 0.41 \text{ W/ m}^2)$ .

El movimiento de los cloroplastos también puede ser producido por sustancias químicas (quimiodinosis). Takagi y Nagai (1983) observaron que era más fácil inducir el movimiento de los cloroplastos en células del mesófilo y después en células de la epidermis, encontraron que cuando el calcio libre en el citoplasma decrece, induce corrientes citoplasmáticas. Sin embargo cuando el calcio libre aumenta, se detiene la corriente citoplasmática en células del mesófilo de *Vallisneria*, observaron también que la luz roja lejano produce un incremento de calcio en el citoplasma. Takagi y Nagai en 1985, encontraron que la luz roja lejano ( $650 \text{ nm} \approx 8,74 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ) es la más efectiva para inducir la corriente citoplasmática. En cambio la luz roja en células del mesófilo ( $750 \text{ nm} \approx 5.52 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ), es la mas efectiva para inducir la corriente citoplasmática. La luz roja (650 nm) es más efectiva para inducir el movimiento de los cloroplastos. Esta induce el movimiento de la corriente citoplasmática y es 5 veces más efectiva que la azul



(445.5 nm). Además, cuando aplicaban EGTA después de 2 horas, los cloroplastos se colocaban en el centro de la célula. Esta posición de los cloroplastos colocados en el centro de la célula ha sido descrita por otros autores (Rojas y García 1993), los cuales mencionan que con una irradiación con luz blanca a una intensidad de  $1656 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y  $253 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , los cloroplastos se colocan en el centro de la célula, encontrando para estas intensidades, porcentajes de cobertura de 28 % y 31.5 % respectivamente.

Según Takagi y Nagai en 1985, se han establecido varios tipos de motilidad celular, y estos dependen de la interacción de la actina y miosina. En el caso de *Vallisneria* los microfilamentos están compuestos principalmente de F actina y establecidos en la capa ectoplásmica en células epidérmicas (Yamaguchi y Nagai 1981) y en células del mesófilo (Takagi y Nagai 1983), además se ha encontrado que la citocalasina  $\beta$  inhibe la corriente en células del mesófilo (Isihigami y Nagai 1980)

### **Movimiento de cloroplastos y cambios de absorbencia**

El movimiento de los cromatóforos en algas es fácilmente estudiado por la medición de los cambios de transmitancia (Britz 1976, Nultsch 1979, Nultsch y Ruffer 1981). Así mismo, diferentes autores han medido los cambios de absorbencia en el espectrofotómetro para corroborar la relación existente entre el movimiento de los cloroplastos y los cambios en la absorbencia, tanto en macrofitas acuáticas como en algas (Reveles y col. 1996, Rojas y García 1993, Salcedo 1991, Benavides 1985).

Por otra parte, el efecto del movimiento de los cloroplastos en los cambios de absorbencia de la radiación fotosintéticamente activa sobre la hoja, depende principalmente de la anatomía de la hoja y es de esperarse que sea más pronunciada en hojas con una simple capa de células y menos pronunciada en aquellas que desarrollan parenquima en empalizada y múltiples capas de células (Brugnoli y Bjorkman 1992).

Los cambios de distribución de los cloroplastos de una posición mínima (parástrofe) a máxima (epístrofe) distribución de la superficie puede disminuir o aumentar respectivamente, dependiendo de la luz absorbida por la célula. El resultado es que los cambios de transmitancia de la luz nos pueden dar un método indirecto de la observación en el estudio del movimiento de los cloroplastos (Britz 1979).

## **Factores que modifican el movimiento de los cloroplastos**

Además de la luz existen una infinidad de factores internos que son indispensables para el movimiento de los cloroplastos como son: la concentración del  $Ca^{++}$  y ATP, la conformación del citoesqueleto, así como la modificación de la temperatura, entre otros.

Según Takagi y Nagai (1985), existen varios tipos de motilidad de las células basados en interacciones entre los filamentos de actina y miosina. En el caso de *Vallisneria* los microfilamentos están compuestos principalmente de F actina y establecidos en la capa ectoplásmica, las células de la epidermis (Yamaguchi y Nagai 1981), y en células del mesófilo (Takagi y Nagai 1983)

En plantas superiores el número de tilacoides puede variar de 5 a 20 membranas (que están formando un grana), y el número de granas varían de 40 a 60 por cloroplasto (Kirk 1983). Sin embargo, en las plantas de sombra se han encontrado características diferentes, como los cloroplastos de *Alocasia*, donde se han apreciado hasta 100 membranas tilacoidales (Anderson y col., 1973). Sin embargo Albertson P.A. (1995), en una revisión, menciona que la proporción de zonas apesada y no apesada es de 80 % a 20 % de las membranas tilacoidales en diferentes especies. Estos cambios estructurales son importantes, al parecer, para realizar el mecanismo fotosintético de manera más efectiva.

Además, dentro de los factores internos que modifican el movimiento de los cloroplastos tenemos las dimensiones de las células. Varias células epidérmicas tienen una forma plano convexa y cuando se irradian con luz colimada, el efecto de foco depende de los siguientes aspectos: la curvatura de la célula, las paredes, del diámetro de la célula, así como de los pigmentos y el número de los cloroplastos. Además es importante la cantidad, calidad y dirección de la luz, cuando la luz es directa es mayor el efecto de lente que cuando se tiene la luz difusa (Vogelman 1993).

Es bien sabido que algunas plantas están adaptadas a ambientes de alta irradiancia (heliophytes) y otras a ambientes de baja irradiación (sciophytes). Individuos que son del mismo genotipo y que crecen en condiciones contrastantes de luz exhiben diferencias morfológicas y fisiológicas importantes, inclusive para las hojas de un mismo individuo a diferentes condiciones de luz. Plantas que crecen en la sombra presentan diferentes características, tales como: la presencia de hojas más largas y anchas, menos gruesas, menos densas las células del mesófilo y presentan largos internodos. Estas adaptaciones incrementan la eficiencia de la utilización de la luz, incrementan el área para captar la luz, reducen la reflexión de la luz y están asociadas con gran variedad de adaptaciones bioquímicas a ambientes de baja cantidad de luz (Barbouret 1987).

**Ubicación taxonómica de *Vallisneria spiralis***

(Lot y col., 1986)

<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Familia</b>	Hidrocharitaceae
<b>Genero</b>	<i>Vallisneria</i>
<b>Especie</b>	<i>Vallisneria spiralis</i>

### **Objetivos**

El efecto de la calidad de la luz en el movimiento de los cloroplastos no está del todo claro. Al parecer, la luz roja, rojo lejano y azul, son las más efectivas para provocar un movimiento de los cloroplastos. Sin embargo, Brugnoli y Bjorkman en 1992, mencionan que sólo las longitudes de onda inferiores de 500 nm son efectivas para producir un movimiento de los cloroplastos. Así mismo, Haupt (1990) menciona que sólo en casos excepcionales el sistema rojo/rojo lejano del fitocromo produce un cambio en el movimiento de los cloroplastos.

Desafortunadamente no existe un consenso de cuál tipo de luz es la más efectiva para el movimiento de los cloroplastos, ni qué intensidad de luz es la mas efectiva para producir los cambios de absorbencia.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivos los siguientes puntos :

Estudiar el efecto que tienen los cambios de absorbencia en muestras irradiadas bajo luz azul (404 nm), verde (575 nm), roja (720 nm) y blanca, así como su relación con cambios de cobertura y posición.

Estudiar el efecto que tiene el movimiento de los cloroplastos mediante cambios de absorbencia en las siguientes condiciones:

Intensidad.  
Temperatura.

Concentración de CO<sub>2</sub>.  
Inhibidores.

Encontrar la relación entre el movimiento de los cloroplastos, su cobertura y cambios de absorbencia y reflectancia difusa.

Estudiar el efecto que tiene en el movimiento de los cloroplastos una prolongada irradiación con luz azul mediante las siguientes condiciones :

Cambios de absorbencia.

Cambios de estructura de las membranas  
tilacoidales.

Cambios en composición de los pigmentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Plantas

Las plantas de *Vallisneria spiralis* se colocaron en tanques de 30 litros de capacidad, se mantuvieron en períodos de iluminación de 1 hora, con un régimen de temperatura que fue de 10 °C a 25 °C (valores mínimos y máximos). De cada fragmento de la planta se cortaban los primeros 3 cm (ápice de la hoja), para después tomar un fragmento de 4 cm, que se colocaba en solución APW (artificial pond water), por 24 hrs. de obscuridad. Cinco horas antes de comenzar el experimento, la muestra se colocaba en una cubeta de polipropileno, sujeta con un vidrio de cobre objetos de 4.3 cm. x 1 cm., la cual se sujeta con una pedazo de tubo Tygon, a un costado de la cubeta. Los fragmentos de *Vallisneria* se prepararon en un cuarto oscuro, bajo una intensidad de  $2 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$  de luz verde.

Las plantas que fueron colocadas a dos semanas de irradiación de luz azul se colocaron en tanques pequeños de 10 cm. de ancho x 10 cm. de largo x 40 cm. de altura, y fueron transplantadas un mes antes de colocarles el filtro azul, que tenía un máximo de paso en el azul en 392 nm.

### Irradiación

La irradiación de las muestras fue realizada con un proyector de diapositivas Reflecta modelo Diamator AFIR, la fuente de iluminación fue calibrada en  $\mu\text{E} * \text{m}^{-2}$

\*  $s^{-1}$ , con un Sensor cuántico, marca LI-COR modelo LI-185A, modificando la distancia a la muestra. Con el propósito de irradiar la muestra con diferentes tipos de luz, se colocó un filtro de paso que tenía los máximos en 404 nm (azul), 575 nm (verde) y 720 nm (roja), y el blanco se utilizó sin filtro (cubriendo el espectro de 400 a 700 nm).

### **Técnicas**

Se realizaron lecturas de cambios de absorbencia de cada muestra, cada seis minutos, haciendo un barrido entre 350 nm y 700 nm. Las lecturas de cambios de absorbencia fueron tomadas con un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV160U. La absorbancia (A) fue calculada de las mediciones de transmitancia (T) y reflectancia difusa (R) (Brugnoli E. 1992), para los cuales se utilizó un accesorio de reflectancia modelo RSA-SZ-16, y un estándar de referencia Spectrolon™ SRS 99-010, del mismo equipo.

Para sacar el porcentaje de absorbencia en cada muestra, se dejaba la muestra en la obscuridad a las 3 de la tarde; y al siguiente día, se procedió a sacar la absorbencia máxima en luz blanca de 70  $\mu E$ , en un tiempo de 42 min., y posteriormente se dejaba en la obscuridad por 5 horas más, se procedió a correr el experimento en las condiciones de cada sección, luz azul, luz roja, luz verde, etc.



Para sacar esta relación en función de la luz blanca se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Absorbencia} = \frac{K_{24} - (A_i - A_n)}{K_{24}}$$

En donde:

$K_{24}$  = diferencia máxima en luz blanca 70  $\mu\text{E}$

$A_i$  = absorbencia inicial, tiempo cero

$A_n$  = absorbencia a un tiempo dado

Para la observación del movimiento orientado de los cloroplastos se buscaron las diferentes posiciones, mencionadas por diferentes autores, para lo cual se empleó un microscopio óptico marca Meopta, modelo 155732. Para fotografiar las coberturas de los cloroplastos en relación a la célula, se iluminó con luz verde (575 nm) a una intensidad de 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (debido a que no afecta el movimiento de los cloroplastos, de acuerdo con Izutani en 1990) utilizándose un cámara Cannon modelo 160, y con una película Plus X pan de Kodak. Posteriormente se imprimieron las fotografías en papel fotográfico y se escanearon en un Scan Jet.4C (Hewlett Packard), y se calculó el área de los cloroplastos, en una computadora, con el paquete Imager Pro-Plus.

Para la determinación de flavinas, se colectaron varios fragmentos de cada lote al azar hasta tener un peso total de 0.5g de fragmentos de *Vallisneria* los cuales se

machacaron en 8 ml de una solución amortiguadora de 0.05 M de boratos y se sumergió posteriormente en nitrógeno líquido, para terminar de romper todas las células. El homogenado fue centrifugado a 35,000g por 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para determinar las flavinas totales. El contenido de flavinas fue determinado por absorbencia a 370 nm con un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV160U.

La determinación de clorofila a, clorofila b y total, se realizó empleando una extracción de pigmentos fotosintéticos en una mezcla de acetona y agua en una proporción 8:2 y se determinó espectrofotométricamente la concentración de las clorofilas mediante la técnica descrita por A. San Pietro (1971), empleando un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV160U.

Con el fin de conocer la posición de las membranas tilacoidales, se recurrió al estudio en microscopia electrónica. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % por 4 horas y se pos-fijaron con tetróxido de osmio 2.5 % por dos horas. Las muestras se deshidrataron en acetonas graduales que van del 30 al 100 % con cambios de 15 minutos cada uno. Se infiltró en una solución Epon-Acetona 1:1 por 24 horas colocándose en el desecador. Transcurrido el tiempo se cambiaron a Epon por 2 horas en rotación, a continuación se incluyó en Epon colocándose las muestras en moldes planos y se introdujeron en la estufa de polimerización a 60 °C durante 48 horas. Por último se cortaron las muestras en un ultramicrotomo LKB, para obtener

cortes semifinos y finos. Los primeros se colorearon con azul de toluidina, para ser observados y fotografiados con el microscopio fotónico y los segundos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observados y fotografiados con ayuda de un Microscopio electrónico modelo EM-9.

En los experimentos de  $\text{CO}_2$ , la solución APW fue burbujeadá 1 hora con hielo seco, para tener una solución saturada de  $\text{CO}_2$ . Para tener una solución libre de  $\text{CO}_2$  la solución APW se hirvió y al enfriarse se le colocó una trampa de NaOH al 10 %, para impedir el acceso del  $\text{CO}_2$ . La determinación de  $\text{CO}_2$  se realizó por titulación con Na OH 0.0227 N (Brower y Zar 1984).

## Resultados

### Absorbencia

En la gráfica 1 se muestra el espectro de absorción de *Vallisneria spiralis*, con las lecturas antes y después de irradiar la muestra. En este espectro se muestran picos máximos en 680, 650, 620, 575, 480, 440, 390 y 380 nm, entre los cuales se encuentra un descenso desigual en los diferentes puntos. En los diferentes picos máximos se observó que en 680, 480 y 440 nm ocurren las máximas diferencias (datos no mostrados), sin embargo en los picos 390 y 380 nm las diferencias son intermedias. Así, las diferencias más bajas fueron para 620, 650, y 575 nm. Estos barridos se tomaron en cuenta para saber en qué pico se tomarían las lecturas de cambios de absorbencia y se seleccionó el de 680 nm por tener las máximas diferencias de cambios de absorbencia. En la gráfica 2, se muestran los cambios de absorbencia con respecto al tiempo para las hojas de *Vallisneria spiralis* irradiadas con luz de diferentes tipos. Con la irradiación con luz verde se observa que los cambios de absorbencia llegan a un máximo a los 30 minutos, con una absorbencia de 0.858 y posteriormente muestran un ligero aumento hasta los 42 minutos con una absorbencia de 0.886. En la irradiación con luz roja, se observa un decremento de la absorbencia hasta 0.532 a los 42 minutos y un ligero aumento a los 42 minutos hasta 0.61 de absorbencia. En lo que respecta a la irradiación con luz blanca se observó un descenso de hasta 0.383 de absorbencia a los 42 minutos. Y el máximo descenso lo

registró la irradiación con luz azul, la cual llegó hasta  $-0.102$  de absorbencia a los 42 minutos.

En lo que respecta a cambios de cobertura, en todas las condiciones se partió de la obscuridad total con un 100 % (figura 1-a); la luz azul registró un mínimo de cobertura de 28 % a los 42 minutos (figura 1-b). Se notaron coberturas mínimas de 45.09 % para la luz roja y 48.76 % de cobertura mínima para la luz blanca (todos a los 42 minutos).

Al irradiar con luz verde, se observó su poca efectividad para producir los cambios de cobertura, sin embargo se generó un decremento hasta de un 65 %. En la distribución de los cloroplastos dentro de la célula, fue posible ver que en la obscuridad los cloroplastos se colocan en la parte del fondo de la célula (figura 1-c) y sólo con la irradiación con luz azul se pudo observar una posición característica en racimo (figura 1-d), presentándose muy característicamente a los 42 minutos, en la cual los cloroplastos rodean al núcleo de la célula. En las demás posiciones no se encontró un patrón de la posición de los cloroplastos y en general se encontraban alrededor de las paredes internas de la célula.

## Roja-Azul-Roja

Los fragmentos de *Vallisneria spiralis* fueron irradiados primero con luz roja, después con luz azul y por último con luz roja ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ , para todos los casos); los resultados se muestran en la gráfica 4. Se observa que al irradiar con luz roja no presentan cambios importantes de absorción y al irradiar con luz azul (a los 15 minutos) la absorbencia decae hasta 0.34. Posteriormente, la muestra se irradia con luz roja y no cambia substancialmente pues va de 0.34 hasta 0.39 de absorbencia, por lo que el efecto del fitocromo es poco importante en esta planta con la intensidad de luz irradiada.

## Intensidades

Se evaluó el efecto que tenía la irradiación con luz azul bajo diferentes intensidades. En la gráfica 5 se ve el efecto que tienen las diferentes intensidades de luz azul, en donde se observa que cuando las hojas son irradiadas con  $3.5 \mu\text{E}$ , la absorbencia cambia paulatinamente de 1 en el tiempo cero, hasta 0.668 a los 42 minutos de exposición. En las muestras que fueron irradiadas con  $6.2 \mu\text{E}$ , el descenso máximo fue hasta 0.474 de absorbencia, se observo a los 42 minutos. Así mismo, las muestras irradiadas de *Vallisneria spirallis*, que fueron irradiadas con  $12 \mu\text{E}$  de luz azul presentaron un decremento hasta 0.264 de absorbencia a los 42

minutos, y por último, en las plantas que fueron irradiadas con 70  $\mu\text{E}$  el descenso máximo fue a los 42 minutos, con un cambio hasta -0.167 de absorbencia.

### **Efecto de la temperatura**

En la gráfica 7 se observa el efecto de la temperatura en los cambios de absorbencia en muestras irradiadas con luz azul de 70  $\mu\text{E}$  en hojas de *Vallisneria spirallis*. En esta gráfica se observa que a las temperaturas de 3 °C, 10 °C y 40 °C, se muestran un comportamiento similar, obteniendo descensos máximos de absorbencia de 0.655, 0.510 y 0.557 respectivamente. En los cambios de absorbencia para 30 °C su descenso máximo fue de 0.172 a los 42 minutos. Así mismo para las muestras irradiadas a una temperatura de 20 °C, se observaron los máximos decrementos hasta -0.235 de absorbencia. En la gráfica 8 se muestran los cambios máximos absolutos de absorbencia a los 42 minutos a diferentes temperaturas. Además, en los diferentes espectros de absorción de hojas intactas de *Vallisneria spirallis* (gráfica 9), se observa que las muestras que tienen los máximos cambios son para aquellas que estuvieron sujetas a una temperatura de 20 °C seguidas por una temperatura de 30 °C, y los menores cambios para las temperaturas de 3, 10 y 40 °C. Así mismo, los espectros de las hojas antes y después de irradiar no muestran cambios diferentes a los esperados en las disminuciones de los picos (gráfica 9). Siendo los mayores

cambios para 680, 480 y 440 nm, para los picos en 390 y 380 nm las diferencias son intermedias. Finalmente las diferencias más bajas fueron para 620, 650, y 575 nm.

### **Efecto del CO<sub>2</sub>**

Para encontrar el efecto del CO<sub>2</sub> en los cambios de absorbencia al irradiar fragmentos de hojas de *Vallisneria spiralis*, se probaron tres concentraciones de CO<sub>2</sub>, las cuales fueron 0.0125, 0.02 y 1.32 mg/ml de CO<sub>2</sub> (baja, normal y alta respectivamente). En la gráfica 10 se observan los resultados de este efecto con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>. Se encontró que a una concentración de 0.02 mg/ml de CO<sub>2</sub> y 1.32 mg/ml de CO<sub>2</sub> (normal y alta), no ocurren diferencias al tiempo final (42 minutos) y se da un descenso máximo de 0.39 para los dos casos. Sin embargo, sí se encontró un efecto cuando las muestras se colocaban con una concentración de 0.0125 mg/ml de CO<sub>2</sub> (baja), obteniendo una disminución máxima a los 42 minutos con un descenso de la absorbencia de 0.567.

### **Inhibición de los cambios de absorbencia**

En la gráfica 11 se observa el efecto del KI y KCl en los cambios de absorbencia de hojas de *Vallisneria spiralis*, en donde se observa que el KI inhibe los cambios de absorbencia al ser irradiados con luz azul ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ) y encontrándose que el KCl no inhibe los cambios de absorbencia de hojas de



*Vallisneria spiralis*, al ser irradiados con luz azul ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ). Por otro lado, se estudio el efecto de la colchicina en los cambios de absorbencia, en la gráfica 12 se observa que a una concentración de 20 mg/ml de colchicina, inhibe el cambio de absorbencia hasta en un 60 %, al ser irradiadas las muestras con luz azul ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ).

### **Segunda derivada**

Además se evaluó el efecto de la luz azul en los cambios de absorbencia sin esfera de integración y con esfera de integración en muestras con 24 horas de obscuridad e irradiadas posteriormente con luz azul ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ) durante 42 minutos. Aquí no se encontraron diferencias que pudieran cuantificarse ya que presentaban desviaciones muy altas. Se presentan los datos de 4 muestras en la Tabla 1 y 2, en las cuales se puede observar un patrón general de aumentos o decrementos. La gráfica 13 nos muestra ejemplos de los aumentos o decrementos en hojas vivas de *Vallisneria spiralis* en un barrido de 350 a 800 nm antes y después de ser irradiadas con luz azul ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ).

### **Absortancia, Reflectancia difusa y Transmitancia**

Los cambios de absortancia en hojas vivas de *Vallisneria spiralis* a diferentes longitudes de onda se observaron partiendo de la obscuridad y se irradiaron por 42 minutos (gráfica 14). Se observa que los decrementos de absortancia son más pronunciados en hojas irradiadas con luz azul, con una respuesta intermedia para el blanco, y menor para la luz roja en donde los cambios son muy ligeros. Por último, se observaron los cambio casi nulos para las muestras irradiadas con luz verde ( $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$  para todas las condiciones anteriores).

Los decrementos de absortancia obtenido son causados por incrementos de transmitancia y reflectancia difusa (gráficas 15 y 16). Los datos fueron obtenidos de muestras en que se partía de la obscuridad y se irradiaban con diferente luz por 42 minutos. En los cambios de reflectancia difusa se observa que los máximos aumentos fueron para la luz azul y los mínimos cambios para luz roja. En las muestras irradiadas con luz blanca se experimentaron descensos de la zona de 800 a 700 nm y de 640 a 540 nm, con ligeros aumentos de 500 a 400 nm. Las muestras irradiadas con luz verde muestran descensos de 800 a 700 nm y de 400 a 500 nm, descensos menores que los irradiados con luz blanca. Así mismo, para los cambios de transmitancia en hojas de *Vallisneria spiralis* en la gráfica 16, se muestra que las hojas irradiadas con luz azul muestran los máximos aumentos de transmitancia en todo el espectro, las muestras irradiadas con luz blanca muestran cambios mayores

en la zona de 400- 500nm (aunque no tan grandes como el azul), y no presentan cambios las muestras al irradiarlos con luz verde.

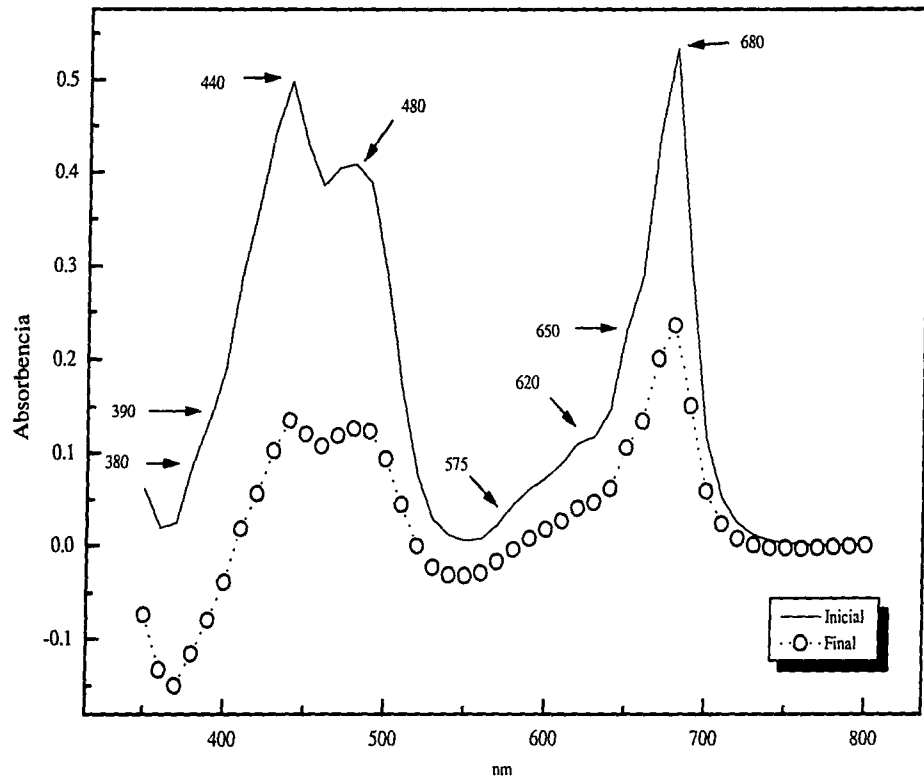
En la gráfica 17 se muestran los cambios de reflectancia difusa registrados, así como de transmitancia, en donde se observa que la luz azul es la que provoca mayores cambios, principalmente en la transmitancia, seguida por la luz blanca y por ultimo la luz roja y verde .

### **Azul (dos semanas)**

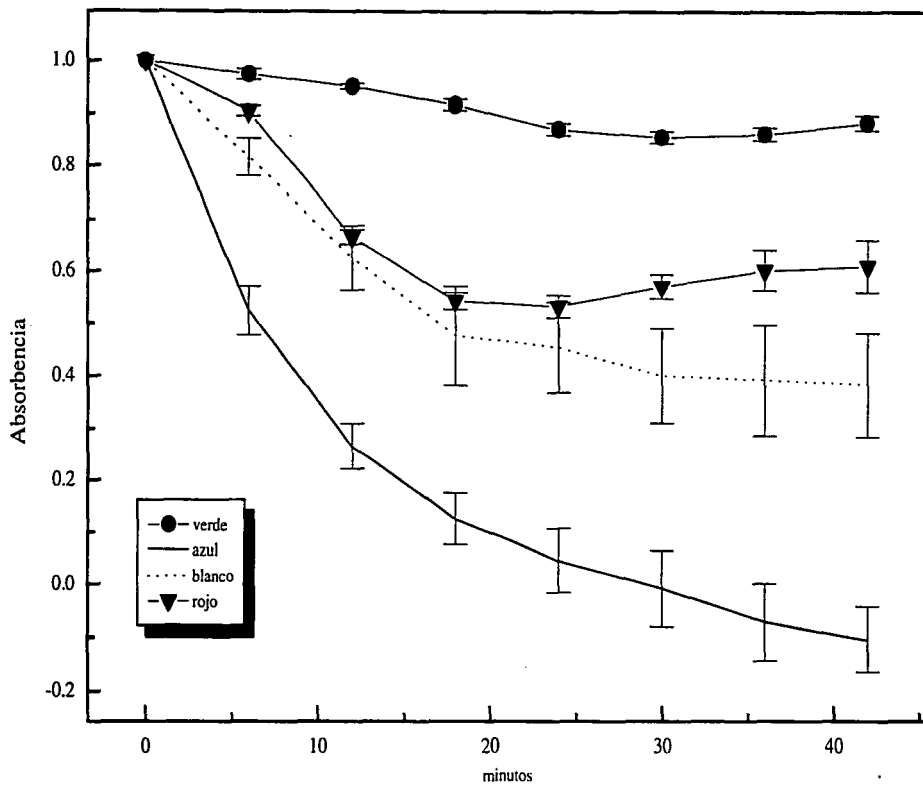
Para los cambios de absorbencia de las plantas que se colocaron 2 semanas bajo un filtro azul, se observó que la irradiación en hojas vivas de *Vallisneria spiralis* con luz azul, es la que tiene un mayor efecto en el descenso de la absorbencia. Su valor desciende hasta -0.819; y al mayor efecto en la irradiación con luz azul es seguida por la irradiación con luz blanca con un descenso máximo de 0.305, a los 42 minutos para ambos casos (gráfica 18). En el caso de la irradiación con luz verde no se observaron cambios significativos y la irradiación con luz roja mostró un ligero aumento en la absorbencia hasta 1.13. Las coberturas no mostraron cambios considerables de la cobertura ni de posición.

Sin embargo en lo que se refiere a los cambios estructurales de los cloroplastos en las plantas que fueron irradiadas dos semanas bajo luz azul, se encontraron diferencias muy importantes de alargamiento de las membranas

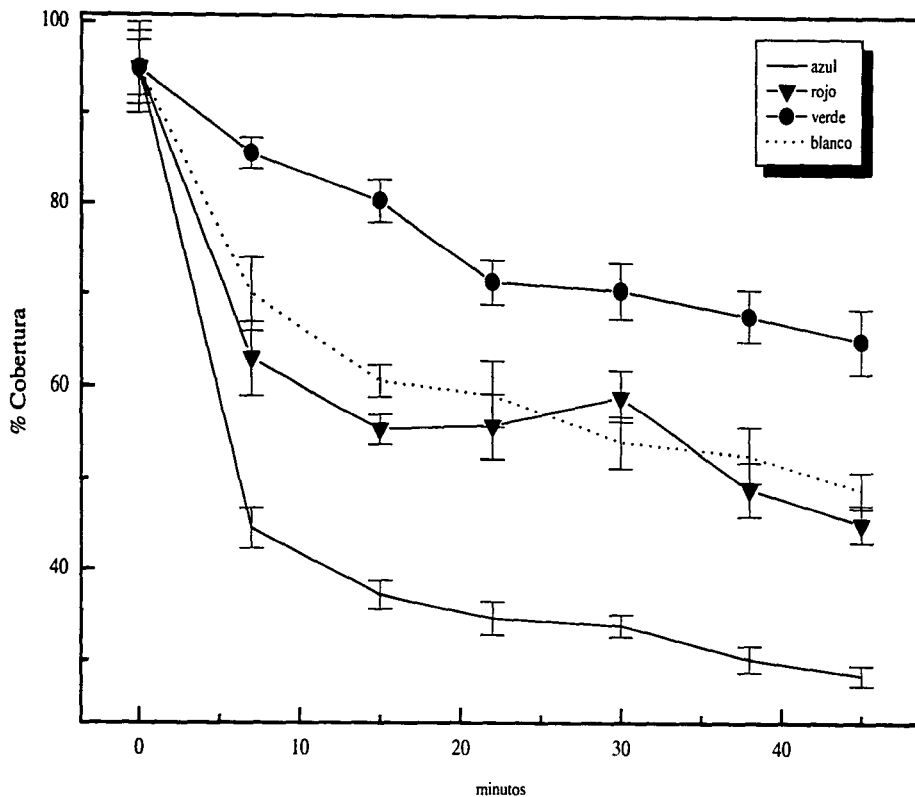
tilacoidales, cubriendo en su totalidad al cloroplasto (figura 2-A). Además se encontraron diferencias en la cantidad de clorofila a y b y la total en las muestras antes y después de la irradiación. Antes de la irradiación las cantidades para la clorofila **a** fueron de 9.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , para la clorofila **b** de 3.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y para la clorofila **total** de 13.10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mientras que después de la irradiación con luz azul (condición de dos semanas) las cantidades fueron: para la clorofila **a** de 3.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la clorofila **b** de 1.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y la **total** de 5.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



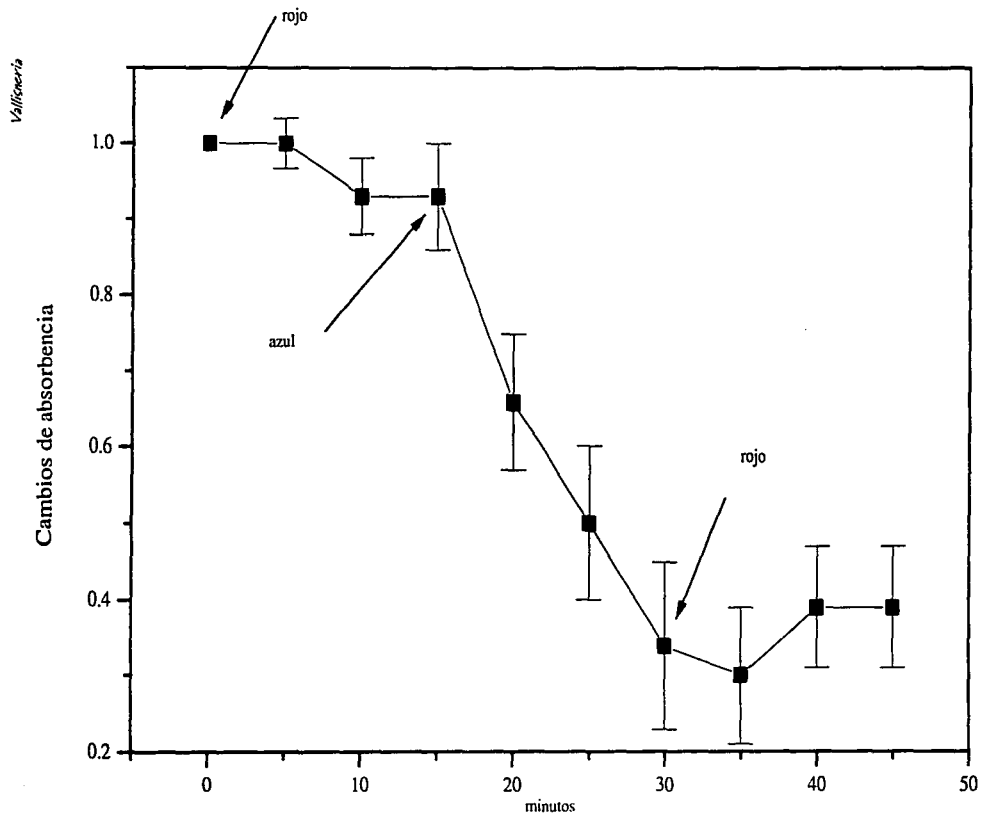
Gráfica 1.- Cambios de absorbancia de *Vallisneria spiralis*, irradiados con luz azul 70 uE.



Grafica 2.- Cambios de absorbancia en 680 nm de *Vallisneria spirallis* irradiada con diferentes calidades de luz (70 uE para todos los casos).

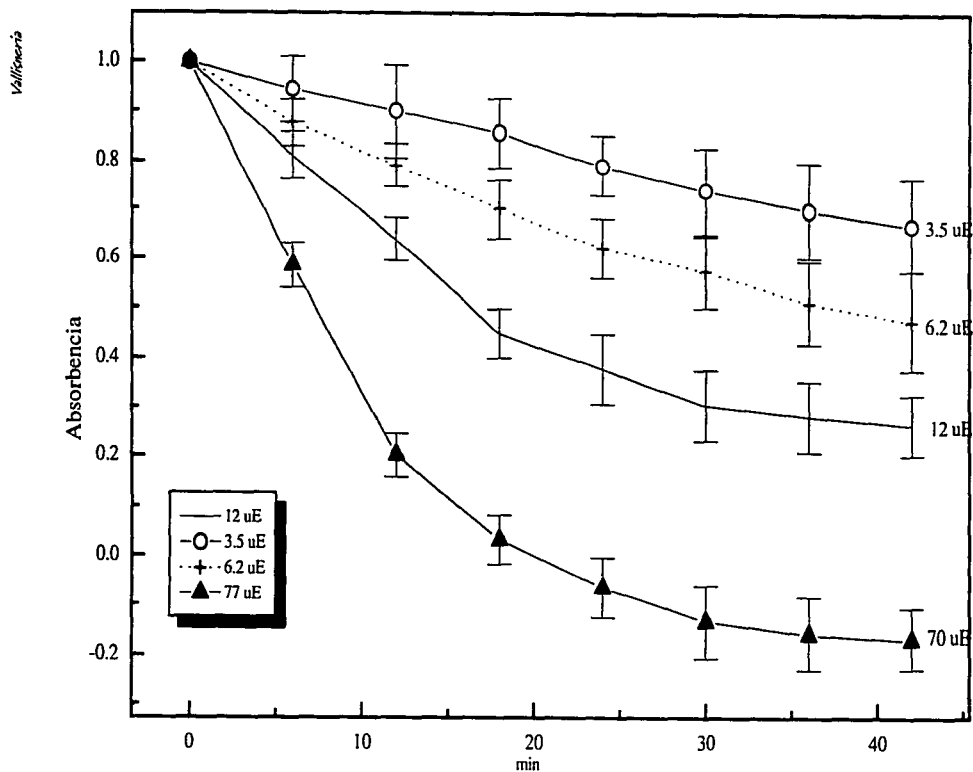


Grafica 3.- Cambios de cobertura de los cloroplasto de *Vallisneria spiralis* por irradiacion con luz azul, verde, roja y blanca (70 uE para todos los casos).

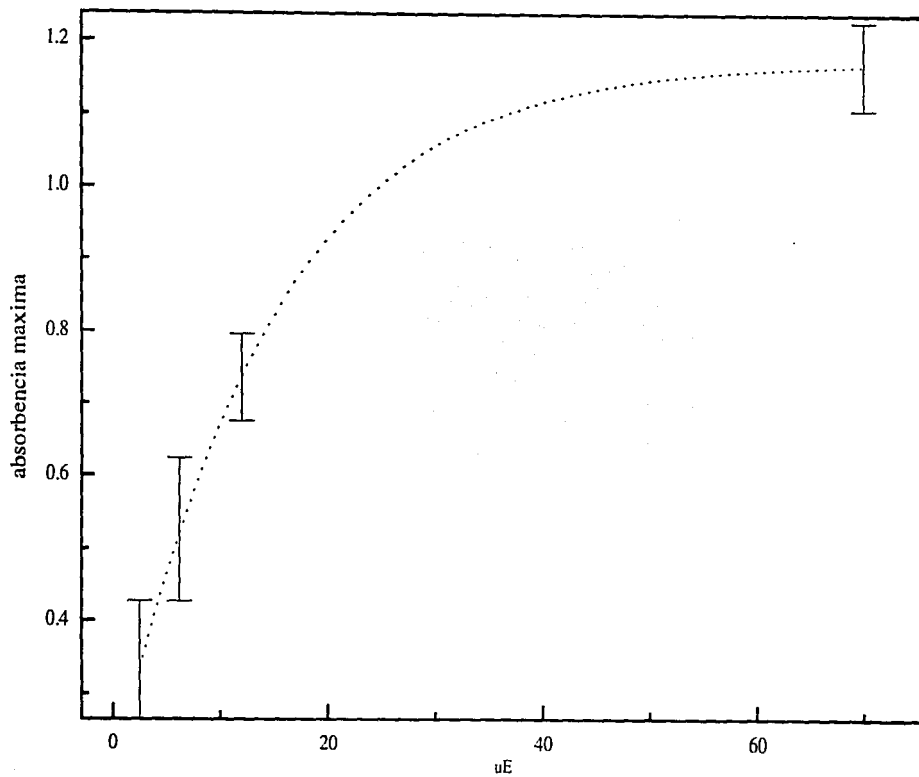


Gáfica 4.- Cambios de absorbancia en 680 nm de *Vallisneria spirallis* por irradiación con luz roja- azul - roja ( luz azul 70 uE y luz roja 70 uE)

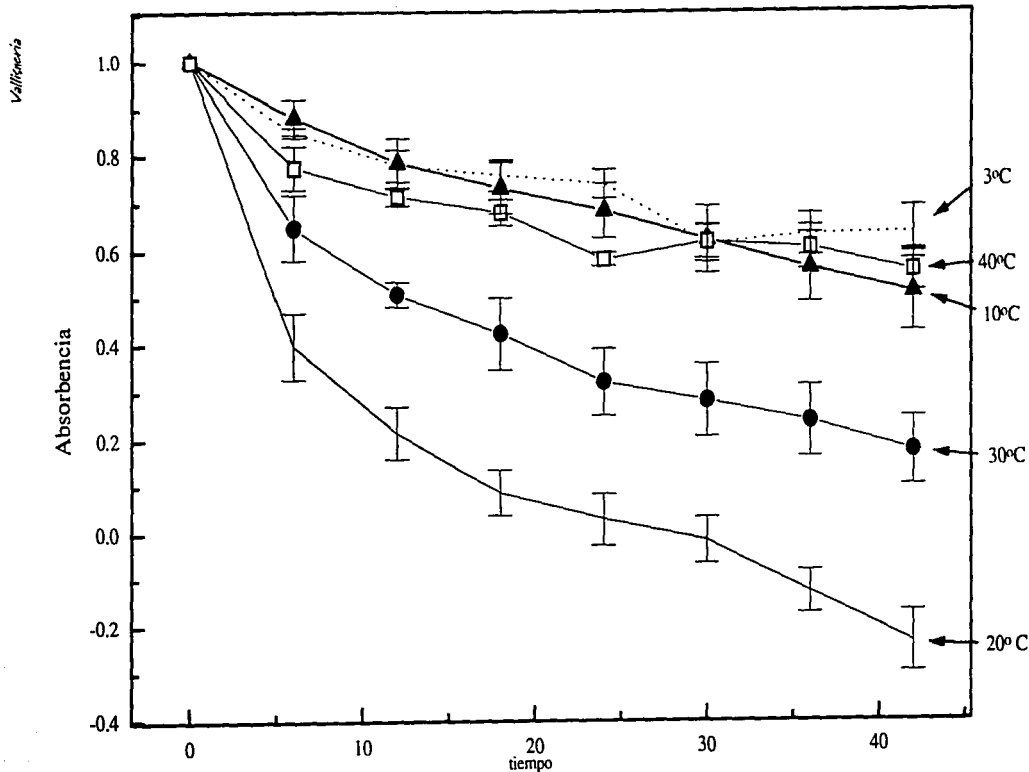




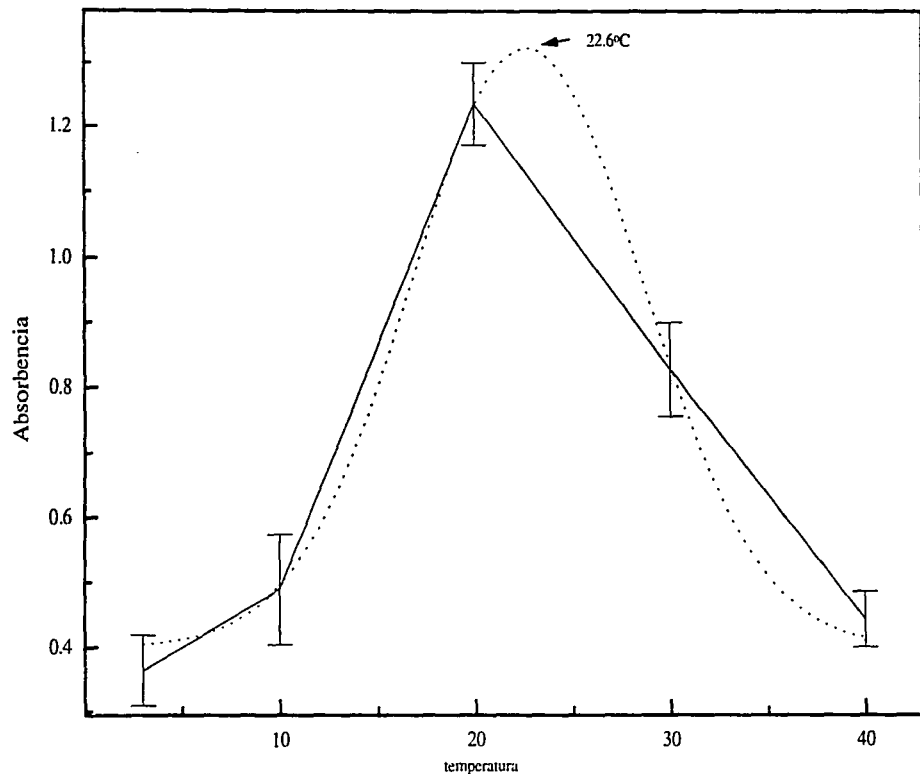
Gráfica 5.- Cambios de absorbancia de *Vallisneria spirallis* irradiados con luz azul bajo diferentes intensidades



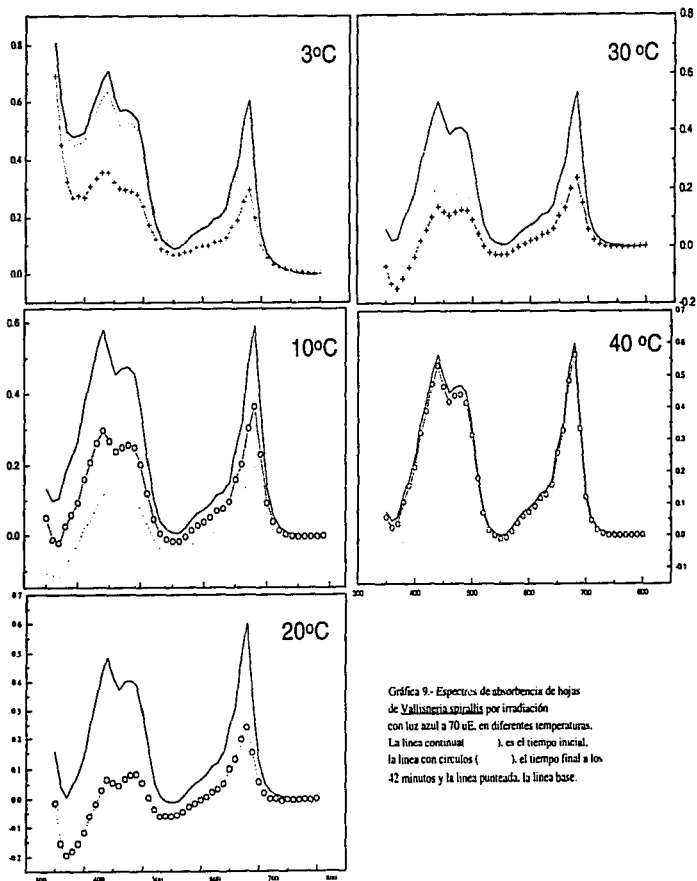
Grafica 6.- Cambios de absorbancia de *Vallisneria spiralis* por irradiación con luz azul, bajo diferentes intensidades



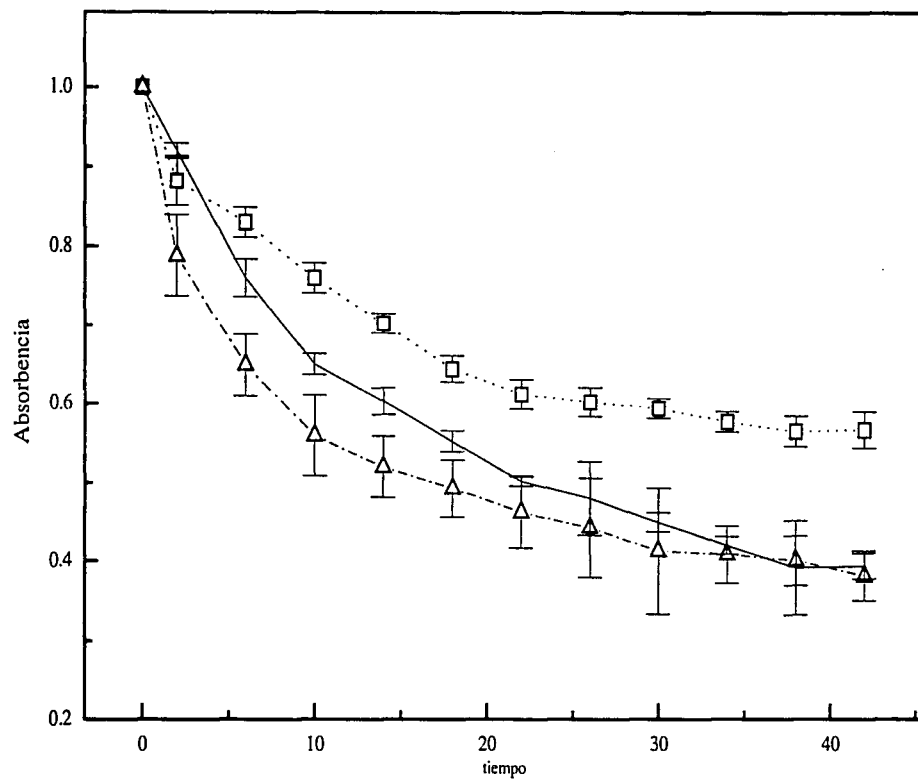
Grafica 7.- Cambios de absorbancia (a 680 nm) de *Vallisneria spiralis* a diferentes temperaturas, por irradiación con luz azul 70 uE.



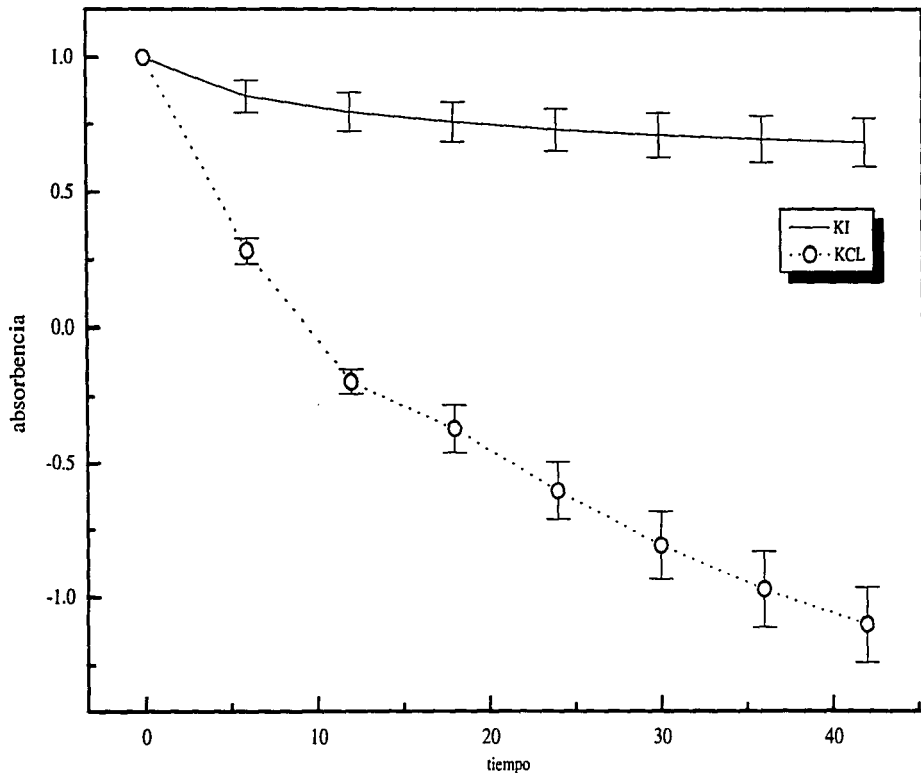
Grafica 8.- Cambios maximos de absorbencia (a 680 nm) de *Vallisneria spiralis* a diferentes temperaturas, por irradiación con luz azul 70 uE

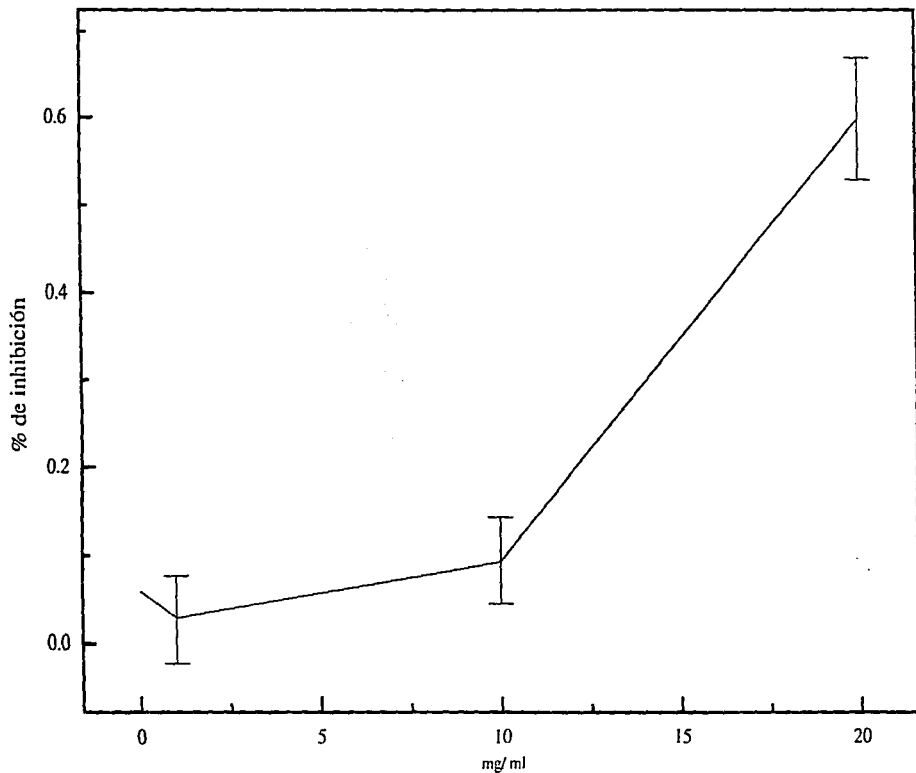


Gráfica 9.- Espectros de absorción de hojas de *Vallisneria spiralis* por irradiación con luz azul a 70 uE. en diferentes temperaturas. La línea continua ( ) es el tiempo inicial, la línea con círculos ( ) el tiempo final a los 42 minutos y la línea punteada, la línea base.



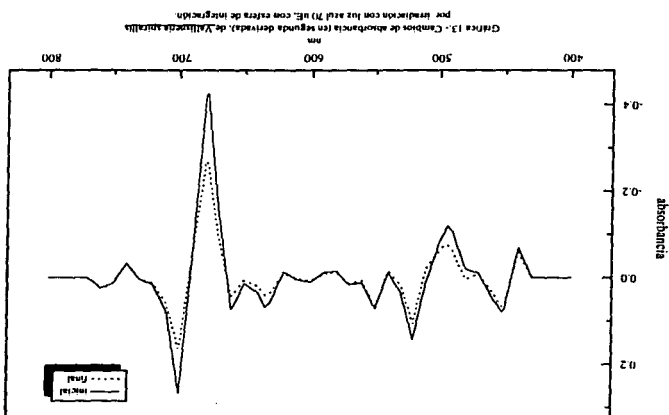
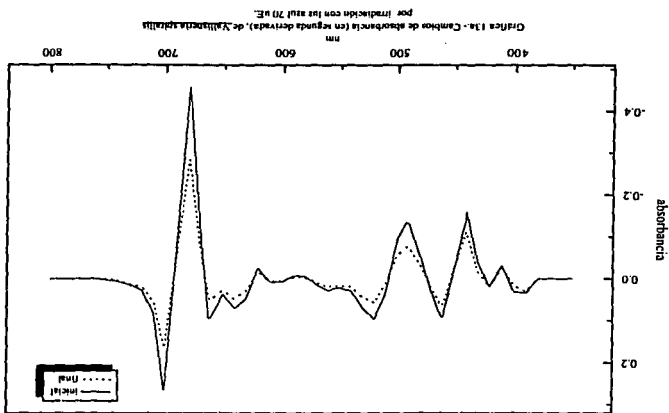
Grafica 10 - Cambios de absorbancia de *Vallisneria spirallis* por irradiación con luz blanca, bajo diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (con una concentración de — 1.32 mg CO<sub>2</sub>/ml ··· 0.0125 mg CO<sub>2</sub>/ml - - - Δ - 0.02 mg CO<sub>2</sub>/ml)

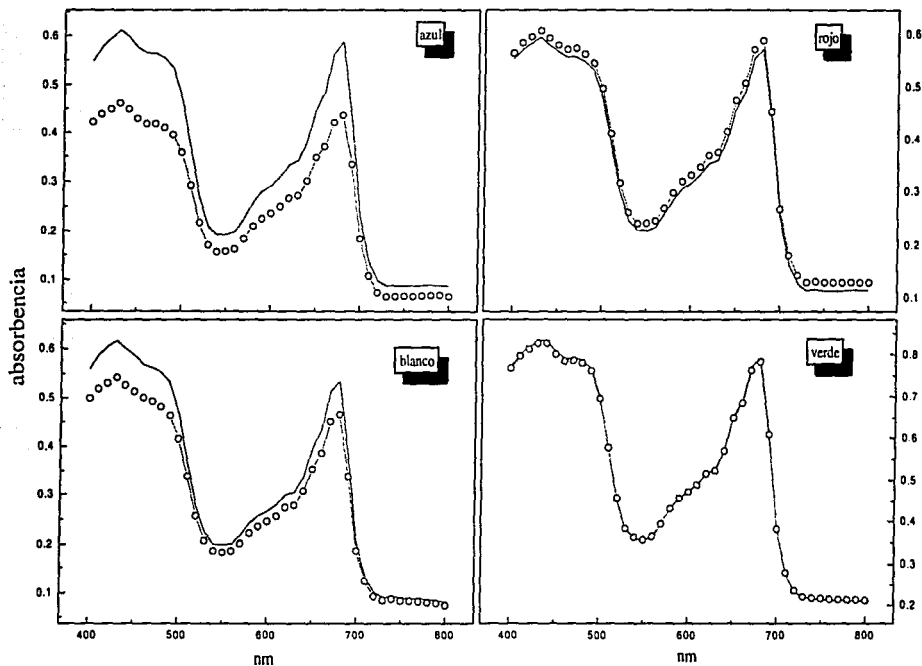




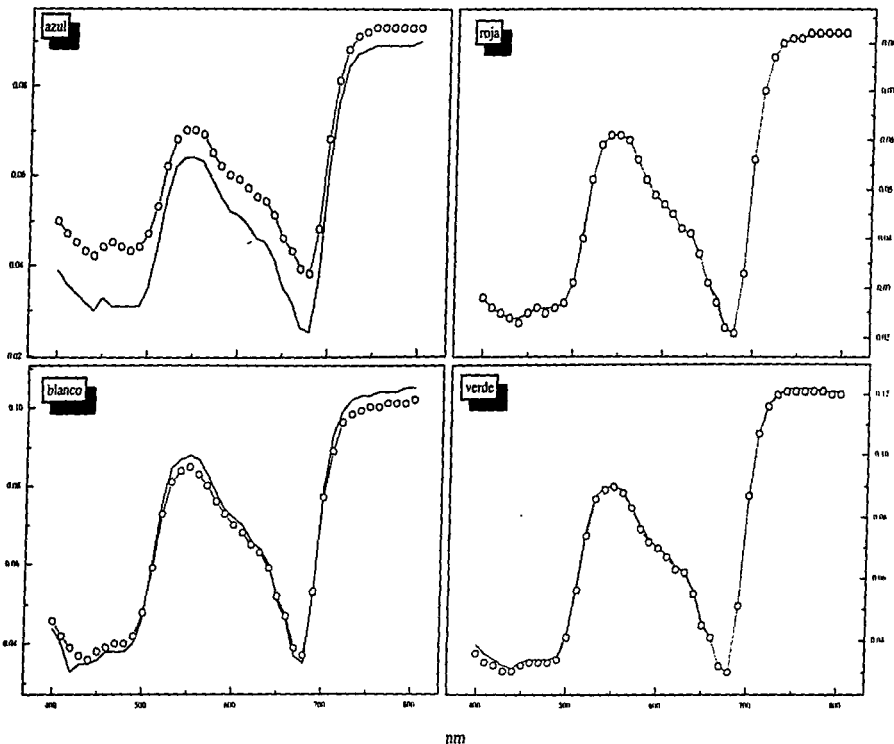
Gráfica 12.- Inhibición de los cambios de absorbencia de *Vallisneria spiralis* por irradiación con luz azul (70 uE), en presencia de colchicina



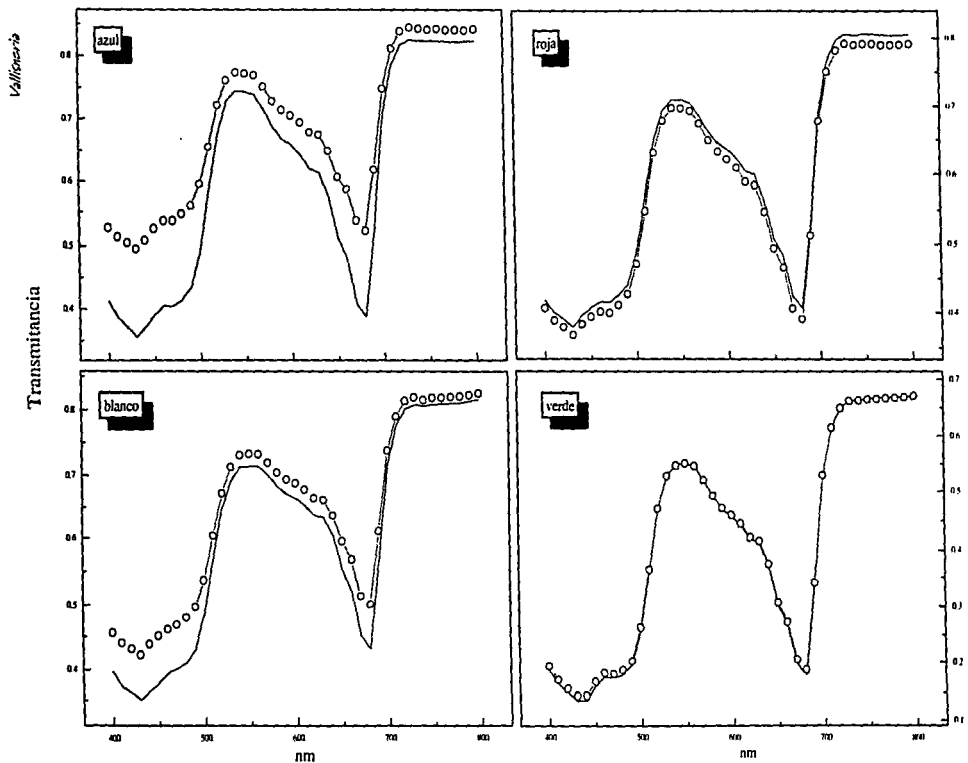




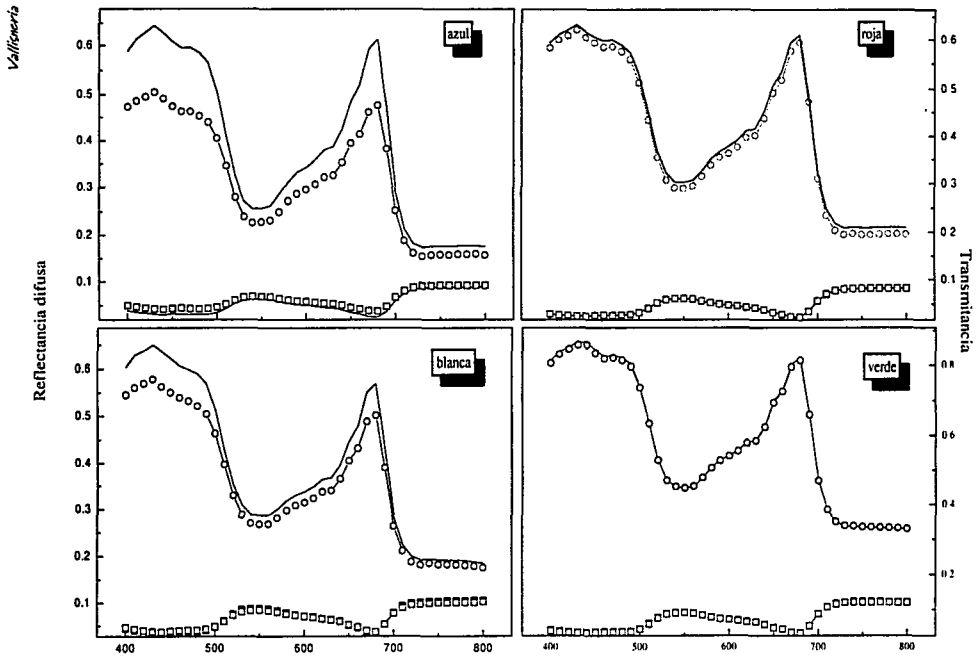
Gráfica 14.- Cambios de absorbancia en hojas de *Vallisneria spiralis* por irradiación con diferentes calidades de luz, luz blanca, verde, azul y roja, 70 uE para todos los casos. La línea continua es el tiempo inicial, y la línea con círculos es el tiempo final (42 minutos).



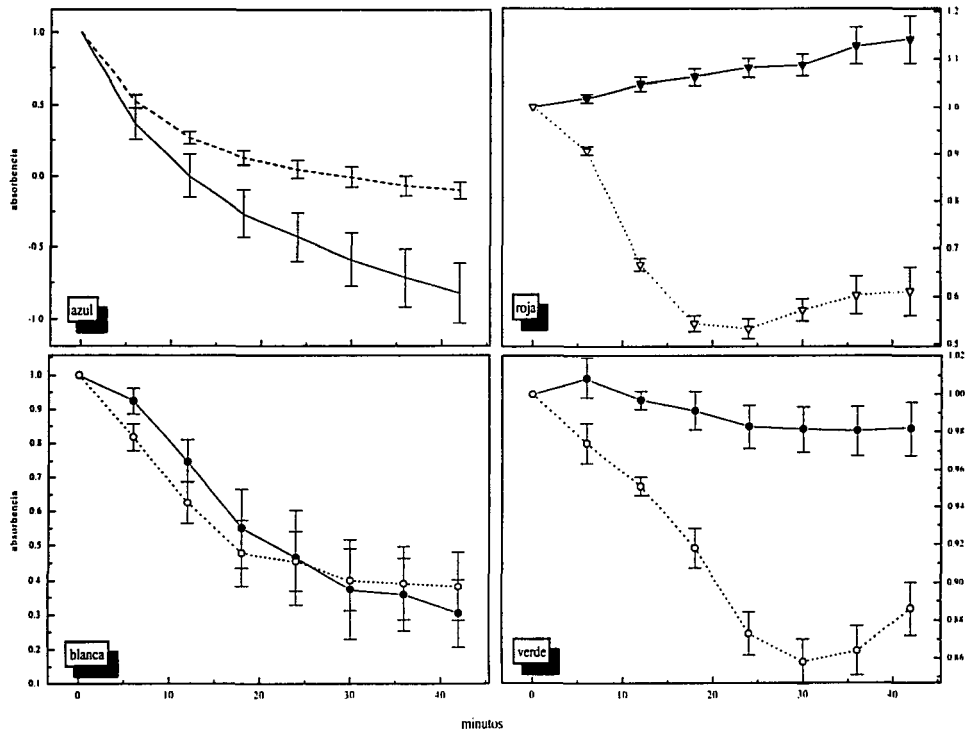
Gráfica 15.- Cambios de reflectancia difusa, de *Vallisneria spirallis*, por irradiación con diferentes calidades de luz ( 70 uE para todos los casos ). La línea continua es el tiempo inicial, y la línea con círculos es el tiempo final ( 42 minutos )



Gráfica 16.- Cambios de transmittancia, de *Vallisneria spirallis*, por irradiación con diferentes calidades de luz ( 70 uE para todos los casos ). La línea continua es el tiempo inicial, y la línea con círculos es el tiempo final ( 42 minutos )



Gráfica 17.- Cambios de reflectancia difusa y transmitancia en hojas de *Vallisneria spiralis* por irradiación con diferentes calidades de luz 70 uE. La transmitancia corresponde a las graficas superiores de cada cuadro. La line continua es el tiempo inicial, y la linea con círculos es el tiempo final ( 42 minutos ).



Gráfica 18. - Cambios de absorbancia en 680 nm, de *Vallisneria spirallis* por irradiación con diferentes calidades de luz (70 uE para todos los casos), en condiciones normales y en dos semanas bajo luz azul (A). La line continua en cada gráfica representa a la condición de dos semanas de luz azul line punteada condiciones normales

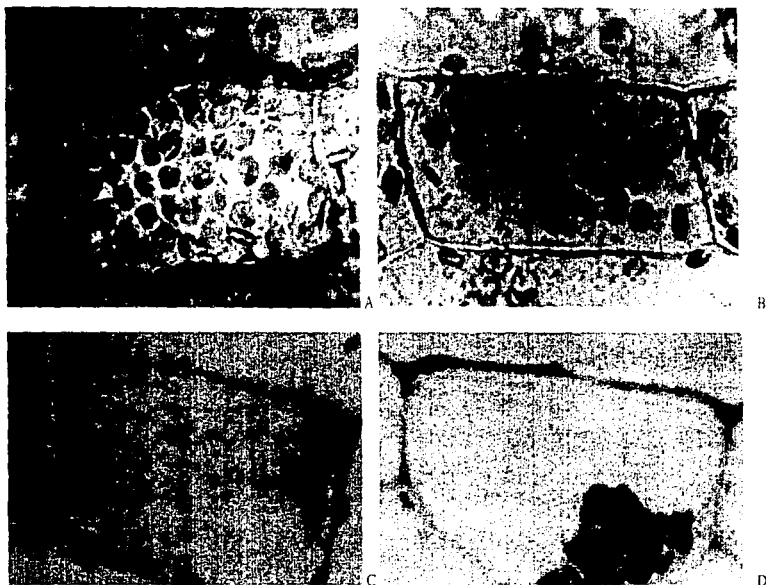


Figura 1 Muestra los diferentes arreglos de los cloroplastos de las células de *Vallisneria spiralis* en diferentes condiciones. Las fotografías A y B muestran coberturas de los cloroplastos ( en relación a la célula). En la figura 1-A la planta está en la obscuridad y la figura 1-B los cloroplastos a los 42 minutos con luz azul ( fotografías frontales). Las fotografías C y D muestran las posiciones que toman en la obscuridad y después de ser irradiados con luz azul por 42 minutos, respectivamente ( fotografías laterales ).

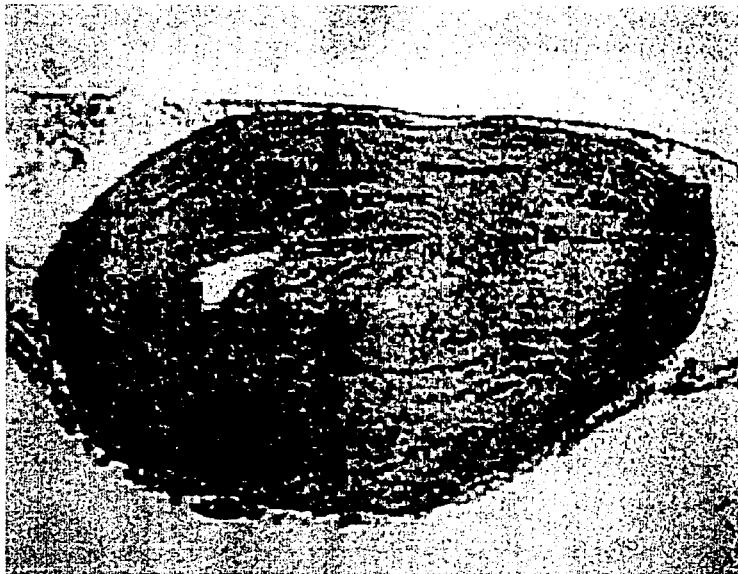


Figura 2A Se muestra la disposición de las membranas tilacoidales de los cloroplastos de *Vallisneria spiralis* irradiados con dos semanas de luz azul.



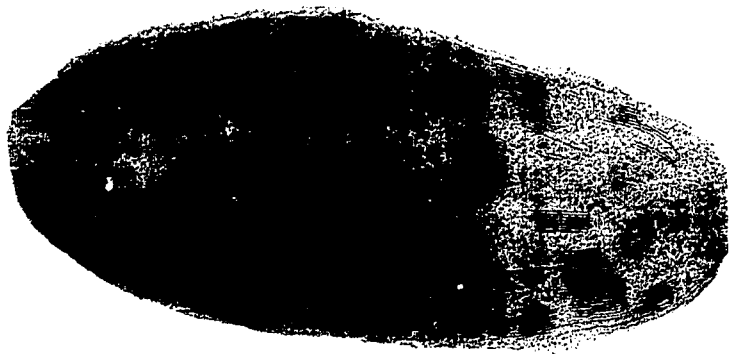


Figura 2B Se muestra la disposición de las membranas tilacoidales de los cloroplastos de Vallisneria spiralis antes de iniciar la irradiación.

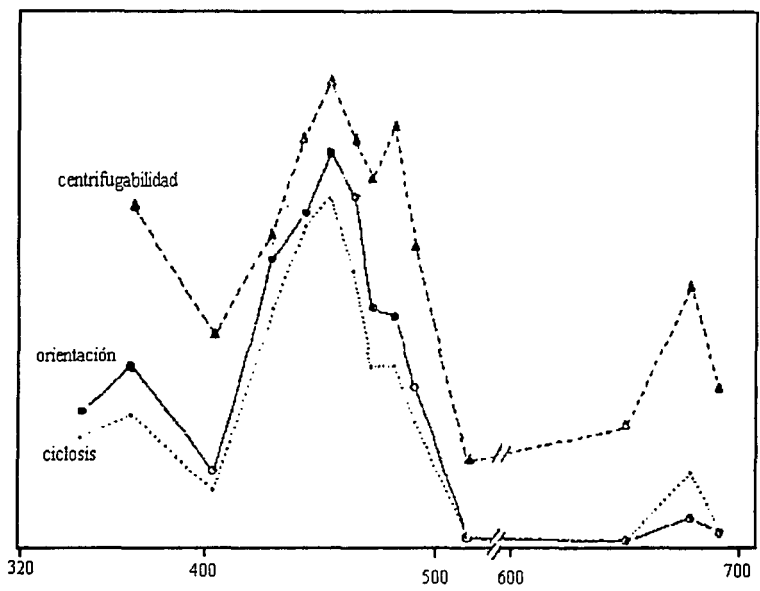


Figura 3.- Espectro de acción del movimiento de los cloroplastos en *Vallisneria spiralis*.

Tabla 1 Lecturas en *transmitancia* de Máximos y mínimos observados, (con esfera de integración) utilizando segunda derivada de hojas viva de *Vallisneria spirallis*, irradiada con luz azul 70 uE (diferencias - decrementos y + aumentos netos)

		uno		dos		tres		cuatro		Asignación
1	705.5, 703, 704 máximo	702- 703	-10.8	701.5- 703	-12.2	701- 702	-10.1	701.5- 703	-11.2	PSI
2	683, 680.5, 682 mínimo	680.5- 680	+15	680- 680.5	+17.3	679.5- 680	+14.7	680- 680.5	+15.5	PSII
3	662.5, 662, máximo	661	-1.5	661	-1.8	661	-2.2	661	-2.0	clorofila a
4	650, 649.5, mínimo	648	-0.4	647- 648	-0.7	647	-0.5	647	-0.6	clorofila b
5	633.5, 634, 633 máximo	633.5- 633	-3.1	633.5- 633	-3.5	632	-2.6	633.5- 633	-3.0	clorofila b
6	618.5, 618 mínimo	617.5	+1.1	617.5- 617	+1.2	617- 617.5	+1.1	617- 617.5	+1.0	clorofila b
7	604.5, 604, 605 máximo	603.5- 604.5	-1	604.5	-1.2	603.5- 605	-0.9	603.5- 605	-1	clorofila b
8	582, 553.5, 584 mínimo	583.5- 585	+0.5	584.5- 582	+1	583.5- 584	+0.5	584.5- 582	+0.7	plastocianina 520, 575, 597,
9	562 máximo	561	-0.6	561	-0.6	561	-0.1	561	-0.4	Cyt b/f
10	553 mínimo	552	-1	552	-1.2	552	-0.5	552	-0.8	citocromo f 554, 540
11	531, 532 mínimo	529.5- 532	-2.4	529.5- 532	-2.3	532	-1.3	532	-2.0	feofitina 536, 544, 546.5
12	496, 499.5 máximo	495.5- 498.5	+4.5	494.5- 497	+5.1	494.5- 495.5	+4.1	494.5- 497	+4.8	Xantofila
13	457.5, 460 mínimo	453.5- 452.5	-0.8	453- 451	-1.2	451.5- 449	-1.2	453.5- 452.5	-0.8	Ferredoxina, oxidada y reducida 463'470, 483
14	438 máximo	434.5- 432.5	+1.4	434.5- 430.5	+1.7	430.5	+1.9	434.5- 430.5	+1.5	Flavina

Tabla 2 Lecturas en absorbancia de Máximos y mínimos observados, (espectofotométricamente) utilizando segunda derivada de hojas viva de *Vallisneria spirallis*, irradiada con luz azul 70 uE (diferencias - decrementos y + aumentos netos)

		uno		dos		tres		cuatro		Asignación
1	705.5, 703, 704 máximo	705.5	-256	705.5	-.101	699- 700.5	-.273	669.5- 700.5	-.203	PSI
2	683, 680.5, 682 mínimo	679.5	+435	679.5	+1.173	679- 679.5	+457	679.5	+349	PSII
3	662.5, 662, máximo	662-661	-.12	662- 661	-.043	661	-.130	661.5- 661	-.100	clorofila a
4	650, 649.5, mínimo	647- 647.5	-.02	647.5- 648	-.008	646- 647	-.019	647- 647.5	-.014	clorofila b
5	633.5, 634, 633 máximo	635-637	-.069	636- 637	-.03	635- 635.5	-.066	635- 636.5	-.058	clorofila b
6	618.5, 618 mínimo	619.5- 620	+0.017	620- 621	+0.008	620- 620.5	+0.017	620	+0.015	clorofila b
7	604.5, 604, 605 máximo	605.5- 605	-.01	605- 604	-.005	605- 604.5	-.011	606	-.009	clorofila b
8	582, 553.5, 584 mínimo	586.5- 585.5	+0.008	584.5	+0.004	586.5- 584.5	+0.009	586.5- 587	+0.007	plastocianina 520, 575, 597,
9	562 máximo	562	-.017	562	.008	562	-.018	560	-.015	Cyt b <sub>6</sub> f
10	553 mínimo	555	-.006	550	-.004	557.5- 556.5	-.015	558.5- 556.5	-.013	citocromo f 554, 540
11	531, 532 mínimo	546-544	-.007	530	-.024	544.5	-.007	546- 544	-.007	feofitina 536, 544, 546.5
12	496, 499.5 máximo	491-492	+1.199	492.5- 491	+0.057	491- 492.5	+1.112	491- 490	+0.095	Xantofila
13	457.5, 460 mínimo	458-460	+0.099	461- 462	-.029	458.5- 459.5	-.130	458.5- 460.5	-.087	Ferredoxina, oxidada y reducida 463' 470, 483
14	438 máximo	439-440	+15	440- 440.5	+0.048	438.5- 440	+1.176	439.5	+1.128	Flavinas

Tabla 3 Diferentes trabajos en el movimiento de los cloroplastos en *Vallisneria*.

Autor	Organismo	Tiempo Máximo	Pretratamiento obscuridad	Mayor cambio nm $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{Sec}^{-1} *$	Menor cambio nm intensidad	Células de la epidermis o mesófilo	Medición	Observación	
Seitz 1967	<i>Vallisneria spiralis</i>	20 min.	12 horas	450 nm 1.95	680 nm	Mesófilo Epidermis	Lux	Altas Flavinas  Menor Fitocromo	
Takagi y Nagai 1985	<i>Vallisneria gigantea</i>	40 min.	12 - 18 horas	650 nm 8.7	445.5 nm	Mesófilo	$\text{W}/\text{m}^2$		
Izutani y col 1990	<i>Vallisneria gigantea</i>	60 min.	12 horas baja 200 lx 10 h 2700lx 2 h  alta 200 lx 12 h	Altas 450 nm 27.37  Bajas 650 nm 1.88	650 nm   450 nm	Epidermis	$\text{W}/\text{m}^2$		
Takagi y col 1991	<i>Vallisneria gigantea</i>		12 - 18 horas	451 nm 24		Epidermis	$\mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{Sec}^{-1} *$		Centrifugabilidad
Rojas y García 1993	<i>Vallisneria spiralis</i>	5 min.	2 horas	blanca 2.3	blanca	Epidermis	$\text{W}/\text{m}^2$		Cobertura
García y col. 1996	<i>Vallisneria spiralis</i>	42 min.	24 horas	404 nm 70	575 nm 70	Epidermis	$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{Sec}^{-1} *$	Cobertura y absorbancia	
Sinclair y Hall 1995	<i>Vallisneria americana</i>	30 min.		72.5	635 nm	Epidermis	$\text{W}/\text{m}^2$	Adaxial abaxial	

## DISCUSION

Al estudiar los cambios de absorbencia de fragmentos de hojas de *Egeria densa*, Benavides (1985) y Salcedo (1991), mencionan que un problema importante que se tiene con estas técnicas, es que los fragmentos de hoja se pueden desprender provocando lecturas incorrectas de absorbencia. Sin embargo, esto se solucionó sujetando la muestra con un cubre objetos de 4.3 cm x 1 cm, el cual se sujetó con una pedazo de tubo Tygon, a un costado de la cubeta, con esto se impedía que la muestra se moviera. Así mismo, otra consideración importante de la metodología utilizada fue que de cada fragmento de hoja ya montado en la cubeta se obtuvo la lectura de la diferencia máxima de absorbencia ( $K_{24}$ ), en 680 al ser irradiada con luz blanca  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , esto con la finalidad de poder comparar el efecto que tenía cada tipo de luz. Sin embargo los trabajos que han utilizado las mediciones de transmitancia o absorbencia para ver el efecto de la irradiación en el movimiento de los cloroplastos han descuidado este factor (Britz 1976, Nultsch 1979, Benavides 1985, Salcedo 1991, Rojas 1993).

Existen limitaciones en este trabajo, y una de las mas importantes es que no se midió la funcionalidad fisiológica en los experimentos. Esto se debe principalmente por que no se contaba con un equipo para determinar el oxígeno o la incorporación de  $\text{CO}_2$  al ser irradiadas, lo cual nos podría dar una medida de la eficiencia

fotosintética en cada condición expuesta, y en consecuencia será objeto de un estudio posterior.

### Irradiación

Al irradiar los fragmentos de *Vallisneria spiralis* con una intensidad de  $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$  se encontró que la más efectiva para provocar un descenso de la absorbencia fue la luz azul (404 nm), lo que nos indica la participación del criptocromo para provocar los cambios de absorbencia. Los resultados difieren a lo encontrado por Takagi y col. (1985), ellos encontraron que la luz mas efectiva para inducir una corriente de los cloroplastos es la roja (650 nm), sin embargo ellos utilizan una intensidad de  $8.7 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ , intensidad que es mucho menor a la utilizada en este trabajo. Yatsunhashi y col. (1985), reportaron que los fotorreceptores a luz azul (criptocromo) y el fitocromo funcionan como pigmentos importantes en el movimiento de los cloroplastos en *Adiantum protonemata*. Los resultados que obtiene Izutani y col (1990) son similares al los del presente trabajo, ellos encontraron que la luz azul (450 nm) a intensidades que ellos llaman altas ( $27.37 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ ) es más efectiva para inducir un movimiento en los cloroplastos, sin embargo, mencionan que a intensidades bajas la mejor respuesta está dada por la luz roja (650 nm) a intensidad de  $1.8 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ .

## **Pre-tratamiento**

En la tabla 3 se observan las diferentes condiciones experimentales para el estudio de *Vallisneria*. En ella se puede pensar que las condiciones de pre-tratamiento, es decir, las condiciones a las cuales las muestras las colocan en la obscuridad, han sido diferentes. En este trabajo se encontró que el tiempo óptimo para el pre-tratamiento es de alrededor de 24 horas (datos no mostrados), se observó que el descenso máximo en la absorbencia es de 24 horas en la obscuridad y a las 48 horas no existe diferencias importantes en cuanto al descenso de absorbencia, sin embargo, cuando se utilizaron tiempos de 12 horas a 2 horas, se observaba un descenso pero no era el descenso máximo que registraba el tejido. En todos los trabajos los tiempos de pre-tratamiento varían de 2 horas hasta 24 o 48 horas, esta condición es importante ya que de esto depende la respuesta de la planta. Así mismo, las condiciones de iluminación utilizadas por diferentes autores son diferentes, desde 1955 Seitz menciona que las respuestas del movimiento de los cloroplastos están dadas por, respuestas a intensidades que están por arriba y abajo del punto de saturación fotosintética. Sin embargo ningún trabajo considera éste como un factor importante (Takagi y col 1985, Izutani y col 1990, Takagi y col 1991, Rojas y col 1993), en éste trabajo nuestra limitante fue no contar con una fuente más potente para irradiar las muestras por arriba de  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . No obstante, al comparar el efecto de la luz azul, luz verde y luz roja con el espectro de acción de Seitz (figura 3)



se observan situaciones muy parecidas, en donde las longitudes en el azul son mas efectivas para inducir la orientación de los cloroplastos, después estaría la roja y por último la verde.

## **Cobertura**

En los cambios de cobertura, también se observa que la irradiación con luz azul fue la que provocó una mayor respuesta (disminución de la cobertura), sin embargo no se encontraron diferencias en la cobertura de los cloroplastos en relación a la célula al ser irradiados con luz blanca y roja, además de encontrarse un descenso no esperado con la luz verde. Al parecer estos resultados pueden deberse a que sólo se realizaron medidas de coberturas de los cloroplastos en relación a las células de la capa adaxial de la hoja sin considerar las coberturas de la células adaxiales, ya que estas células epidérmicas tanto de la capa adaxial y como de la capa abaxial contribuyen junto con las células del mesófilo a modificar los cambios de absorbencia de toda la hoja. Sin embargo, se observa que la luz azul es la que produce un mayor cambio tanto en la cobertura como en los cambios de absorbencia de las hojas de *Vallisneria spiralis* al ser irradiadas con  $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ . Esta observación concuerda con Izutani (1990), el cual observó que la relación mínima de cloroplastos / área de la célula es la menor cuando las hojas son irradiadas con luz azul (450 nm).

La posición de los cloroplastos colocados en el centro de la célula ha sido descrita también por pocos autores. Rojas y col. en 1993, mencionan que a una intensidad de  $1656 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , y  $253 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  con luz blanca, los cloroplastos se colocan en el centro de la célula, teniendo porcentajes de cobertura de 28 % y 31.5 % respectivamente. En este trabajo se observó que con una irradiación con luz azul, a una intensidad de  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  se produce una mayor disminución en los cambios de absorbencia, atribuidos al movimiento de los cloroplastos en las células epidérmicas. Además, en este trabajo se encontró que la luz azul a los 42 minutos produce una disminución de la cobertura de los cloroplastos hasta en un 28 %, en la cual los cloroplastos se encontraban rodeando al núcleo, posición que se piensa que toma la célula para protegerse de un daño por aumento de la densidad de flujo de fotones. Sin embargo, esta posición en racimo no la describen la mayoría de los autores, mencionándola sólo en algunos casos como patológica (Izutani y Nagai, 1990). No se ha estudiado la importancia de la posición en racimo en estas condiciones, se cree que en este proceso esta posición sea de importancia para la planta como una protección de la maquinaria fotosintética. Un mecanismo puede ser el de disminuir la cantidad de cloroplastos expuestos a la luz en un tiempo suficiente, para que se repare la maquinaria como la proteína D1 del PSII. Se ha visto que en tilacoides aislados el tiempo de vida media de la proteína D1 a intensidades altas, es

de 30 minutos (Aro y col., 1993). Sin embargo se tendría que corroborar esta condición en tejido intacto.

### **Rojo Azul Rojo**

Otra evidencia importante para denotar la participación del criptocromo en el movimiento orientado de los cloroplastos se encontró al irradiar muestras con pulsos de luz Roja, Azul y Roja en la cual se observa que la luz azul provoca una disminución importante en la absorbencia, que sin duda está reflejada en el movimiento de los cloroplastos. Este efecto concuerda con el reportado por Brugnoli y Bjorkman (1992), en el cual sólo pulsos de luz azul son efectivos para inducir cambios en la transmitancia causados por el movimiento de los cloroplastos, sin embargo en este caso no parece haber un efecto muy importante del fitocromo.

### **Intensidades**

Al irradiar las hojas de *Vallisneria spiralis* a diferentes intensidades, se observa (gráfica 6) un comportamiento de saturación que podría estar alrededor de los  $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (con una aproximación asintótica después de 42 minutos), sin embargo, estos experimentos no son concluyentes en relación con la fotosíntesis, debido a que falta el parámetro fisiológico que nos daría un comportamiento de saturación en la producción de oxígeno.

## Temperatura

El efecto que tiene la temperatura sobre los cambios de absorbencia es claramente marcado en la gráfica 8, en donde al correlacionar los datos con un comportamiento tipo Gauss, se obtiene que la temperatura óptima para el movimiento de los cloroplastos de *Vallisneria spiralis* se observa una máxima actividad a los 22.6 °C y una inhibición a temperaturas por arriba, cercanas a los 40 °C, y por abajo, cercanas a 10 °C. Se cree que un factor importante que se está afectando es a toda la maquinaria de la fotosíntesis (PSII, PSI, proteínas), pero principalmente a la ATP sintetasa. Seitz (1972) propone un mecanismo transductor para el movimiento orientado de los cloroplastos basado en la formación de un gradiente de ATP, y muy probablemente éste mecanismo sea afectado por el efecto de la temperatura.

## Bióxido de carbono

Al analizar el efecto del CO<sub>2</sub> sobre el movimiento de los cloroplastos se puede observar que no existen diferencias importantes en el efecto de las concentraciones de CO<sub>2</sub> y los cambios de absorbencia (1.32 mg CO<sub>2</sub>/ ml y 0.2 mg CO<sub>2</sub>/ ml), sin embargo, cuando se realiza la irradiación en una concentración de 0.0125 mg CO<sub>2</sub>/ ml existe un retardo en el descenso de la absorbencia, resultados que son opuestos a los reportados por Benavides (1985), quien encontró que en *Egeria densa* en una

concentración de  $\text{CO}_2$  de 2mM  $\text{CO}_2$  (alta), se mantiene la absorbencia inicial aun después de irradiar las muestras con luz blanca. Un factor que puede jugar un papel importante en el proceso de disposición del bióxido de carbono, es que las muestras no se agitaban la solución de APW, condición que puede aumentar la capa de agua inmóvil en torno a la hojas de *Vallisneria spiralis* y por lo tanto afectar la difusión del bióxido de carbono.

### **Inhibición**

Una evidencia importante de la participación de la fotosíntesis en el movimiento orientado de los cloroplastos de *Vallisneria spiralis*, con una intensidad de  $70 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$  es el efecto inhibitor de KI y su ausencia en presencia de cantidades similares de KCl. Tiende a indicar que en presencia de un inhibidor de la fotosíntesis hay cambios notables de las tendencias del decaimiento de la absorbencia, y que por lo tanto nos da un indicio de que la fotosíntesis está fuertemente relacionada con el movimiento orientado de los cloroplastos. Este experimento además aporta una evidencia del papel regulador que pueden tener el movimiento orientado de los cloroplastos en la fotosíntesis.

## Segunda derivada

Lichtenthaler y col., en 1996, encuentran que con la observación de espectros de absorción de hojas de tabaco al aplicarle la segunda derivada, se pueden encontrar diferencias importantes en el contenido de clorofila. También Gitelson y col. (1996) realizan mediciones de la concentración de clorofila mediante mediciones de reflectancia difusa en hojas vivas alrededor de 700 nm, encontrando correlaciones importantes con estas simples observaciones. Es de particular interés hacer mención de la importancia de estas técnicas, pues con observaciones en espectrofotómetro (con esfera y sin esfera de integración) usando la segunda derivada, se pueden encontrar correlaciones importantes de la funcionalidad de los componentes fotosintéticos involucrados en el proceso de protección, cuando hay un aumento de la densidad de flujo de electrones. En nuestro caso se observaron cambios de interés en las zonas de flavinas, xantofilas, plastocianina y PSII, tanto al utilizar la esfera de integración como sin hacerlo. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de los espectros de segunda derivada.

## **Esfera de integración**

Se sabe que el movimiento de los cloroplastos tiene un efecto importante en la absorción de la luz por la planta (Benavides 1985, Brugnoli y col. 1992, Sinclair y Hall en 1995 y García 1996), sin embargo no se tenía una evidencia experimental concluyente de la función de aminorar las altas intensidades de luz por el movimiento de los cloroplastos, al menos en el caso de *Vallisneria* (Demming-Adams y Adams III, 1992). Dentro del mecanismo de fotoprotección de las plantas por un exceso de luz se han encontrado un sin número de factores, entre los cuales está sin duda el movimiento de los cloroplastos, sin embargo no se ha determinado hasta que punto participa en la utilización, protección y un posible daño por exceso de la densidad de flujo de fotones (Demming-Adams 1992, García y col 1996). Como se mencionó anteriormente no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de los espectros de segunda derivada, sin embargo existen evidencias que a irradiación de luz, con tiempos cortos (aproximadamente 12 minutos) existe una disminución de la funcionalidad del PSII ( Park 1996 ) y por lo tanto del transporte de electrones a través del PSI. Al disminuir la funcionalidad del PSII, es de particular importancia el movimiento de los cloroplastos, ya que al irradiar fragmentos de *Vallisneria spiralis* en los tiempos iniciales (1 a 10 minutos), existe un decaimiento brusco de la absorción causando un concomitante

incremento en la transmitancia y reflectancia difusa muy marcado sobre todo al irradiar con luz azul, blanca y roja (gráficas 14, 15 y 16).

### **Pretratamiento por dos semanas con luz azul**

Al someter a *Vallisneria spiralis* por dos semanas a un patrón de irradiación bajo un filtro azul (392 nm), se observa que existen diferencias importantes del comportamiento del decaimiento de la absorbencia al ser irradiados con luz azul, roja y verde. Esto sin duda nos habla de un reacomodo importante de las moléculas fotosintéticas y también se encontraron cambios importantes en la relación de la clorofila a/b que pasó de 2 a 2.4 a las dos semanas de irradiación con luz azul. Se han reportado cambios en la estructura de los cloroplastos (Haupt 1990). Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de el papel que tienen estos cambios y cómo afectan al movimiento de los cloroplastos. En los cambios de apilamientos membranales, Punnett (1981) menciona que los cambios estructurales en las membranas tilacoidales ocurren en unas cuantas horas, sin embargo Deng y col. (1989), sólo observaron cambios importantes en las membranas tilacoidales a tiempos de exposición de 2 semanas.

En este trabajo se observó que al mantener las muestras por un período de dos semanas bajo luz azul, se ocasiona un cambio en la estructura de las membranas tilacoidales haciéndolas más largas y aumentando la separación entre ellas ocupando



todo el cloroplasto. Esta condición tiene que ver sin duda con la optimización de la luz por parte de la maquinaria fotosintética, ya que existen cambios en el decaimiento de absorbencia de las hojas de *Vallisneria spiralis* al aumentar la densidad de flujo de fotones. Es importante observar que el efecto de cambios de absorbencia al ser irradiados con luz azul no cambia mucho, sin embargo al ser irradiados con luz verde y roja cambia notablemente el comportamiento incluso en la dirección. Esto sin duda se puede deber al reacomodo que tuvo desde el cambio en la composición de los pigmentos fotosintéticos y el reacomodo morfológico de las membranas tilacoidales, que sin duda nos dan una respuesta diferencial del fenómeno.

## Conclusión

El movimiento de los cloroplastos en la célula responde a la intensidad y dirección de la luz que incide sobre la planta; responde cuando son bajas intensidades, por abajo del punto de saturación de la fotosíntesis, provocando un máximo de absorbencia. En contraste, el movimiento en respuesta a las altas intensidades de luz y tiempo, provoca un decremento de la absorbencia, en donde los cloroplastos asumen una posición para protección por un exceso de luz (Haupt y Scheuerlein, 1990). Si bien este concepto de dos tipos de respuestas, las que están por abajo y encima del punto de saturación de la luz, ha sido descrito por Zurzycki desde 1955, todos los trabajos del movimiento de los cloroplastos de *Vallisneria* se han enfocado a intensidades por debajo del punto de saturación fotosintética (Seitz 1967, Kirk 1983, Takagi y Nagai 1985, Izutani y col 1990, Takagi y col 1991, Rojas y col 1993, García y col 1996), por lo tanto, un punto importante por resolver será analizar las respuestas de este movimiento de los cloroplastos, tomando en cuenta parámetros fisiológicos (mediciones de Oxígeno, incorporación de CO<sub>2</sub>), efecto de inhibidores fotosintéticos (DCMU, 2-4D, KI entre otros), efecto de concentraciones de inhibidores de la síntesis de tubulina; todo esto por arriba y por abajo del punto de saturación fotosintética.

En el mecanismo de fotoprotección de las plantas por un exceso de luz, se han encontrado un sin número de factores entre los cuales está, sin duda, el movimiento de los cloroplastos, sin embargo no se ha determinado hasta qué punto participa en la utilización, protección y un posible daño por exceso de la densidad de flujo de fotones. Por esta razón es necesario trabajo futuro que obligadamente a partir de lo encontrado en este estudio, tienda a determinar la participación del movimiento de los cloroplastos en *Vallisneria spiralis*, en forma relativa y cuantitativa dentro de los mecanismos que tienen las plantas para la regulación, la fotoprotección o el daño por el aumento en la densidad de flujo de fotones.

## Referencias

- Albertson P.A. (1995). The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane - a model for the domain organization Photosynthesis Research 46: 141 - 149.
- Anderson J.M., Goodchild D.J. and Boardman N.K.(1973). Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants. Biochim. Biophys. Acta 325: 573 - 583.
- Aro E. Virgin I. And Andersson B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophysica Acta, 1143: 113-134.
- Barbouret M.G., Burk J.H. and Pitts W.D. (1987). Terrestrial plant ecology . Cumming publishing company, Inc. 634 pp..
- Benavides V.D.(1985). Captación del carbono y movimientos orientados de los cloroplastos en *Egeria densa* Planch. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F.
- Biggs W.W. (1984). Radiation Measurement and Instruments, *LI-COR*. 20 pp.
- Britz S.J., Nultsch W. and Briggs W. (1976). Automatic monitoring of a Circadian Rhythm of Change in light transmittance in *Ulva*. Plant. Physiol 58: 17 - 21.
- Britz S. and Briggs W. (1976). Circadian rhythmus of cloroplast orientation and photosynthetic capacity in *Ulva*. Plant. Physiol 58: 22 - 27.
- Britz S.J. (1979). Movements of cloroplast and nuclear migration. Enciclopedia of Plant Physiology
- Brower J.E. and Zar J. H.. (1984). Field & Laboratory methods for General Ecology. Wm C. Brown Publishers, pp. 226.
- Brugnoli E. and Bjorkman (1992). Cloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll flourescence and measurements of light-induced absorbance changes related to  $\Delta pH$  and zeaxanthin formation . Photosynth Res. 32: 23 - 35.
- Dawes C.J. (1986). Botánica marina, editorial Limusa, México, 673 pp.
- Demming-Adams and Adams III W.W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 43: 599 - 626.
- Deng X.W., Tonkyn J.C. Peter G.F., Gruiissem W.(1989) Post- transcriptional control of plastid mRNA accumulation during adaptation of chloroplasts to different light quality environments Plant Cell 1: 645-654.

Dennis D.T. and Turpin D.H. (1990). Plant physiology Biochemistry and Molecular Biology. Logman Scientific & Technical .

Duell-Paff and Wellmann E.(1982). Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley ( *Petroselinum hortense* Hoffm.) cell suspension cultures. *Planta* 156: 213-217.

Font Quer P.(1975). Diccionario de Botánica. Editorial Labor. pp.68 y 823.

García F., Arroyo J. y Guzmán A. ( 1996 ) Estudio preliminar de los cambios de absorbancia de lo cloroplastos de *Vallisneria spiralis* y su relación con los cambios de posición y estructura. III Congreso de la Asociación Mexicana de Microscopía. Cancun Sep 1996, PB02

Gitelson A.A., Merzlyak M.N. and Lichtenthaler H.K (1996). Detection of Red Edge Position and Chlorophyll Content by Reflectance Measurements Near 700 nm *J. Plant Physiol* 148: 501 508.

Hall D.O. and Rao K.K. (1987). Photosynthesis. Edward Arno Publishers, 122 pp.

Haupt W.(1982). Light mediated movement of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant. Physiol* 33: 205-233.

Haupt W. and Scheurlein (1990). Chloroplast movement. *Plant Cell Environ.* 13: 595-614.

Hemming V. (1968). Light and chloroplast movements. *Symp Soc. Exp. Biol.* 22: 329-352.

Ishigami and Nagai R. (1980). Motile apparatus in *Vallisneria* leaf cell- II Effects of cytochalasin B and lead acetate on the rate and direction of streaming. *Cell Struct. Funct.* 5: 13-20.

Izutani Y. Takagi S. and Nagai R. (1990). Orientation movements of chloroplasts in *Vallisneria* Epidermal cells: Different effects of light at low-and high-fluence rate. *Photochem Photobiol* 51: 105-111.

Jones H.(1992). Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press. 428 pp.

Kine O. (1975). Marine Ecology Vol. II Physiological mechanism Part 2 John Wiley. Great Britain. 992 p.

Kirk J.T.O. (1983). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press Great Britain, 410 pp..

Koller D. (1990). Light-driven leaf movements. *Plant, Cell and Environment*, 13: 615- 632.

- Lehninger A. L. (1978). Biochemistry .Second edition .Worth Publishers Inc. 1104 pp.

Lichtenthaler H.K., Gitelson A. and Lang M. (1996). Non-Destructive Determination of Chlorophyll Content of Leaves of a Green and Aurea Mutant of Tobacco by Reflectance Measurements J. Plant Physiol 148: 483 - 493.

Lot A., Novelo A. y Ramirez-García P. (1986). Listados florísticos de México. Angiospermas Acuáticas Mexicanas . UNAM., México D.F. 60 pp.

Mizukami M. And Wada S. (1981). Action Spectrum for light - induced. Chloroplast Accumulation in a Marine Coenocytic green alga, *Bryopsis plumosa*. Plant Cell Physiol 22: ( 7 ) 1245 - 1255.

Nultsch W. Pfau J. (1979). Ocurrence and Biological Role of light - Induced Chromatophore Displacements in Seaweeds Mar. Biol. 51: 77 - 82.

Nultsch W and Ruffer (1981). Do correlation exist between chromatophore arrangement and photosynthetic activity in seaweeds. Mar. Biol. 62: 111-117.

Park Y. Chow W.S. and Anderson J.M. (1996). Chloroplast movement in the shade plant *Tradescantia albiflora* Helps protect photosystem II against light stress. Plant Physiol. 111: 867 - 875.

Punnett T., Hilfer S.R. and Brown J. (1981). Chloroplast thylacoids undergo rapid rearrangements in vivo. Journal of Cell Biology 91: A287.

Reveles M.B., García F. Y Collera Ofelia (1996). Movimiento orientado de cloroplastos en *Ruppia maritima* ( Potamogetonaceae ). ΦYTON 58(1/2): 83-91.

Rojas N. and García J. (1993). Phototactic movements of chloroplasts and their relation to photosynthetic activity in *Vallisneria spiralis* L.. ΦYTON 54 (1): 29-35.

Salcedo C. (1991). Absorción y movimiento de los cloroplastos en la macrofita acuática *Egeria densa* Planch. Tesis de Licenciatura. ENEP Zaragoza, UNAM México.

San Pietro A.(1971). Methods in Enzimology. Vol. XXIII. Photosynthesis Parte A. Academic Press. Nueva York: 473 - 476.

Seitz K. (1967). Wirkungsspektren für die Starklichtbewegung der Chloroplasten, die Photodinese und die lichtabhängige Viskositätsänderung bei *Vallisneria spiralis ssp torta* . Z. Pflanzenphysiol Biol 56, S 246 - 261.

Seitz K. (1972). Primary processes controlling the light induced movement of chloroplasts. Acta Protozool XI, 26: 225- 235.

Sinclair J. Hall C. (1995). Photosynthetic energy storage in aquatic leaves measured by photothermal deflection. *Photosynthesis Research* 45: 157 - 168.

Stryer L. (1993). *Bioquímica*. Editorial Reverté. Barcelona España. Tomo I 549 pp.

Takagi S. and Nagai R. (1983). Regulation of cytoplasmic streaming in *Vallisneria*. Mesophyll cells. *J. Cell Sci.* 62: 385 - 405.

Takagi S. and Nagai R. (1985). Light-Controlled cytoplasmic Streaming in *Vallisneria*. Mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 26 (5): 941-951.

Tazawa M., Kurosawa S., Amino S., Tominaga Y., Sakano K., Matsumoto T., (1991). Induction of cytoplasmic streaming and movement of chloroplast induced by L-Histidine and derivatives in leaves of *Egeria densa*. *Plant cell physiol.* 32(2) 253 - 260.

Vogelmann T.C. (1993). Plant tissues optic. *Ann Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 231-51.

Williamson R.E.(1993). Organelle movements. *Ann Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 181-202.

Yatsunami H., Kadota A. and Wada M. (1985). Blue and red-light action in photoorientation of chloroplasts in *Adiantum protonemata* *Planta* 165: 43 -50.

Yamaguchi Y., and Nagai R.(1981). Motile apparatus in *Vallisneria* leaf cell. I. Organization of microfilaments. *J. Cell Sci.* 48: 193-205.

Yatsunami H. Wada M. (1990). High-fluence rate responses in the light - oriented chloroplast movement in *Adiantum protonemata*. *Plant Science* 68: 87 - 94.