

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**REGULACION POR LUZ DEL METABOLISMO
INTERMEDIARIO EN LAS PLANTAS
SUPERIORES**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA DEL PILAR GARRIDO ASPERO**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Introducción.....	1
Capítulo I	
Morfología de los cloroplastos en las plantas superiores.....	3
Clasificación de las plantas según su tipo de fotosíntesis.....	8
Fotosíntesis.....	11
Capítulo II	
Almacén de energía por acumulación de almidón.....	19
Asimilación de nitrógeno.....	21
Reducción del sulfato.....	23
Metabolismo de lípidos.....	24
Síntesis de proteínas.....	24
Capítulo III	
Aislamiento de cloroplastos.....	27
Preparación y propiedades de cloroplastos aislados....	28
Clasificación de los cloroplastos.....	31
Polarografía.....	32
Capítulo IV	
Generalidades.....	37
Mecanismos por los cuales las enzimas son activadas por luz.....	40
Mecanismos de desactivación en la oscuridad.....	45

La luz como un desactivador de enzimas.....	47
 Capítulo V	
Enzimas del ciclo de Calvin	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.....	52
Fructosa 1, 6-difosfatasa.....	54
Ribulosa-5-fosfato cinasa.....	60
Enzimas del ciclo de Hatch-Slack	
Fosfoenol piruvato carboxilasa.....	60
Malato deshidrogenasa-NADP.....	64
Piruvato dicinasa.....	71
Nitrato reductasa.....	74
Nitrito reductasa.....	79
Glutamino sintetasa.....	80
Glutamato sintasa.....	84
Metabolismo del azufre.....	85
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	90
Protein cinasa.....	92
Síntesis de ácidos grasos.....	95
ATPasa.....	95
 Capítulo VI	
Regulación por la luz de la expresión genética.....	106
 Conclusiones.....	 111
 Bibliografía.....	 112

ABREVIATURAS

AOA	Acido oxalacético
APS	Adenosin fosfosulfato
CAM	Crassulacean acid metabolism
CCCP	Carboxil cianida m-clorofenilhidrazona
Clo	Clorofila
DCMU	3-(3', 4'-diclorofenil)-1, 1-dimetilurea
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dPGA	1, 3-difosfoglicerato
DSPD	Disalicildieno propanodiamina
DTNB	5, 5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
Fd _{ox}	Ferredoxina oxidada
Fd _{red}	Ferredoxina reducida
Fd-tio	Ferredoxina-tiorredoxina
FDP	Fructosa difosfato
GAP	Gliceraldehido-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HEPES	Acido-(N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2) etanosulfónico
LEM	Mediadores del efecto luminico

MA	Metilamina
MES	Acido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MSO	Metionina sulfoximina
OAS	O-acetilserina
α -OG	α -oxoglutarato
PAP	Fosfoadenosin fosfato
PAPS	Fosfoadenosin fosfosulfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PF	Peso fresco
PGA	3-fosfoglicerato
Pi	Fósforo inorgánico
Pir	Piruvato
PS-I	Fotosistema I
PS-II	Fotosistema II
Tricina	N-tris (hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano

ENZIMAS

APScinasa	Adenosin fosfosulfato cinasa
FDPasa	Fructosa 1,6-difosfatasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GFDasa	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamino sintetasa
MDH	Malato deshidrogenasa
NIR	Nitrito reductasa

NR	Nitrato reductasa
PAL	Fenilalanilamonioliasa
PEPCasa	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PFC	Fosfofructocinasa
RPC	Ribulosa-5-fosfato cinasa
Rubisco	Ribulosa 1, 5-difosfato carboxilasa-oxigenasa
SHDFP	Sedoheptulosa 1, 7-difosfato fosfatasa

I N T R O D U C C I O N

La vida en la Tierra depende de un gran número de factores, pero especialmente de la presencia de la luz solar. Sin la presencia de la luz solar no se llevaría a cabo, entre otros muchos, el proceso de la fotosíntesis. Este proceso biológico es fundamental para el mantenimiento de la vida, ya que al efectuarse produce la biomasa que mantiene una gran parte del ciclo biológico. Además de que hace algunos millones de años fue el responsable de que apareciera el oxígeno en la atmósfera terrestre y por ende el proceso de la respiración y los organismos aerobios.

De tal manera que es evidente la importancia que tiene el estudio del proceso de la fotosíntesis y la función regulatoria que en él tiene la luz. Especialmente porque ha diferencia de lo que se pensaba hace algunos años, la luz no solo interviene en la fotólisis del agua, sino que también participa de la regulación de las actividades enzimáticas que intervienen en la asimilación del CO_2 , así como en muchos otros procesos tales como la asimilación del amonio y la reducción de los sulfatos.

El presente trabajo tiene como objeto hacer una revisión de

la literatura más reciente en lo que respecta a la función reguladora que tiene la luz en los procesos enzimáticos que se llevan a cabo en la célula vegetal, y analizar tanto las diferentes hipótesis de como se lleva a cabo este proceso como la metodología empleada en este tipo de estudios.

C A P I T U L O I

LOS CLOROPLASTOS Y LA FOTOSINTESIS

La importancia de las plantas radica en su capacidad de crecer usando como fuente de energía la luz solar y al CO_2 del aire como fuente de carbono. Junto con el agua y otros elementos del suelo. Este proceso se lleva a cabo en los cloroplastos, organelos presentes en las células de los tejidos fotosintéticos, y se le denomina fotosíntesis.

1. MORFOLOGIA DE LOS CLOROPLASTOS EN LAS PLANTAS SUPERIORES

Los cloroplastos están formados por tres componentes principales: una doble membrana externa, el estroma o parte soluble que contiene a la maquinaria enzimática responsable del proceso de asimilación del CO_2 y las membranas laminares internas que contienen a los pigmentos fotosintéticos que están involucrados en las reacciones biofísicas de captura y conversión de energía. Estas membranas internas forman unos sacos, los tilacoides, que generalmente se encuentran apilados formando unas estructuras llamadas granas, (Fig. 1.1). La membrana externa es selectivamen-

te permeable y con ello regula el movimiento de los metabolitos. El estroma es en su mayor parte proteína, de la cual aproximadamente el 50% corresponde a la enzima ribulosa 1, 5-difosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco).

En el estroma de los cloroplastos también se encuentran presentes grancs de almidón y otras partículas, así como otros cuerpos conocidos como plastoglobulinas, que funcionan como almacén de materia lipídica y están formados principalmente por plastoquinonas y tocoferil quinonas (Coombs y Greenwood, 1976). Los cloroplastos también tienen ribosomas, los cuales están presentes en el estroma, lo que le da a los cloroplastos la capacidad para sintetizar algunas proteínas. El cloroplasto también tiene ADN, y por lo general posee alrededor de 20 copias del cromosoma.

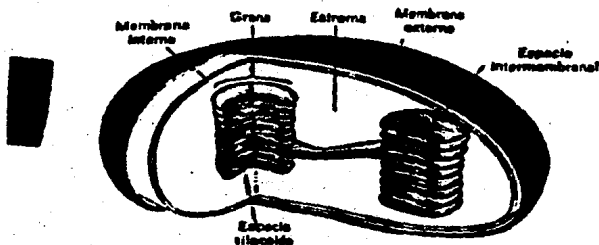


Figura 1.1. Esquema de un cloroplasto. Redibujado de Stryer (1979).

Las membranas cloroplásticas consisten esencialmente de una bicapa de lípidos en la cual están embebidas varias proteínas.

Las bicapas de lípidos pueden ser esencialmente fluidas bajo condiciones fisiológicas, permitiendo un rápido intercambio de lugares entre moléculas de lípidos y sus vecinos en cualquiera de las dos mitades de la bicapa.

Se debe hacer notar que solo la mitad del peso seco de los tilacoides son lípidos, hay un contenido considerable de proteína. Las moléculas de proteínas embebidas en la membrana frecuentemente hacen que haya una disminución en la movilidad de las moléculas de los lípidos adyacentes, por lo que debe haber un considerable grado de orden en los lípidos en algunas áreas de la membrana de los tilacoides que contienen un gran número de complejos protéicos (Hiller y Raison, 1980). Alrededor del 26% de los lípidos presentes son pigmentos fotosintéticos, los cuales deben mantenerse en la orientación adecuada para permitir la transferencia de energía en los complejos cosechadores de luz. Los otros lípidos presentes son los glucolípidos (monogalactosil y digalactosil diglicéridos (Fig. 1.2), junto con algún sulfoquinovosil diglicérido (Quinn y Williams, 1983) (Tabla 1.1).

La mayoría de los ácidos grasos presentes en los lípidos del cloroplasto son ácidos C_{18} y contienen una o más dobles ligaduras, lo que provoca la fluidez en la membrana.

Algunas de las proteínas del tilacoide pueden estar débilmente adheridas a las membranas, a través de fuerzas iónicas, a los grupos polares de los lípidos de las membranas (proteínas extrínsecas), otras pueden estar localizadas en el interior de la membrana hidrofóbica, requiriendo detergentes para removerlas de

las membranas (proteínas intrínsecas). mientras que otras proteínas pueden extenderse completamente sobre la membrana (Fig. 1.3)

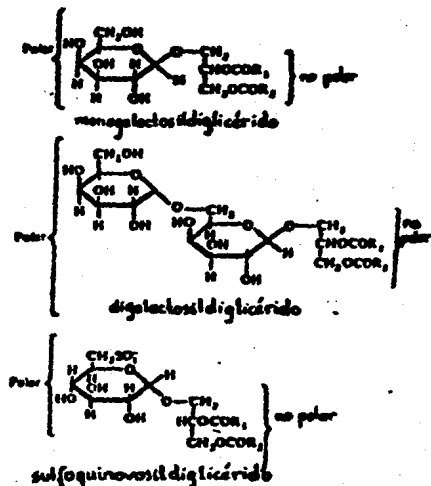


Figura 1.2. Estructura de los galactolípidos del cloroplasto y de sulfoquinovosil diglicérido. Redibujado de Halliwell (1984).

En la tabla 1.1 se puede observar que la composición de lípidos de la membrana externa y de la membrana tilacoidal es muy diferente. Quizá haya alguna interconversión de galactolípidos de la membrana durante el aislamiento (Witernanz et al., 1981) mediante la acción de una enzima localizada en la superficie externa de la membrana externa (Dorne et al., 1982).

Las membranas contienen varias actividades enzimáticas, tales como la de ATPasa, galactosiltransferasa (Douce y Joyard, 1979; Williams et al., 1979), adenilato cinasa (Murakami y Strotman, 1978), las enzimas de la síntesis y degradación del ácido fosfatídico (Joyard y Douce, 1979) y las enzimas para la

interconversión de los pigmentos xantofílicos.

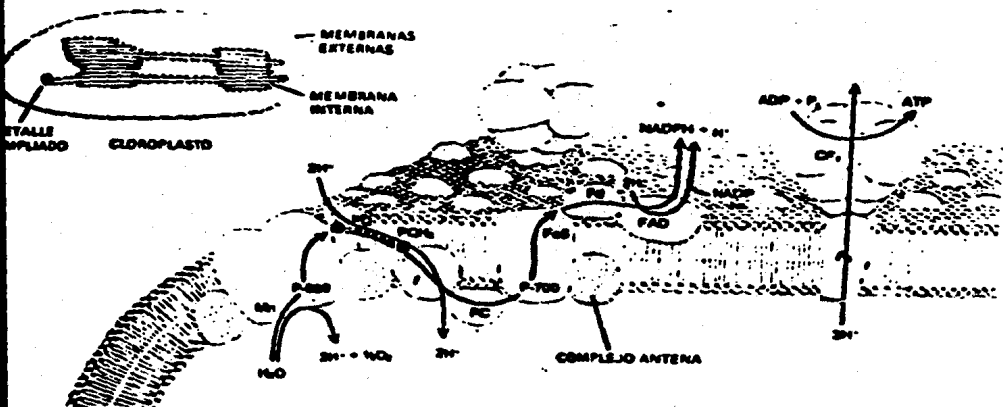


Figura 1.3. Estructura de la membrana del cloroplasto. Redibujado de Hinkle y Richard (1978).

En las regiones en donde las membranas están apiladas para formar los grana, una cara de la membrana interior (conocida como la cara EF_s, por "apilada") está densamente poblada con partículas grandes, de 13-17 nm de diámetro y de 8-9 nm de altura (Coombs y Greenwood, 1976). Las partículas son menos numerosas en las caras EF_f (EF_f) de los tilacoides no apilados. Cuando las membranas tilacoidales son suspendidas en un medio de baja concentración de sal, las regiones apiladas desaparecen y las membranas aparecen libremente extendidas sin perder su actividad fotosintética. Se ha sugerido que el complejo protéico clorofila *a/b* juega un papel importante en el apilamiento de los tilacoides. Al contrario de la cara EF_s, la cara PF localizada del lado opuesto, contiene partículas de 8 nm de diámetro, las cuales se encuentran tanto en los tilacoides granales como en los estro-

males.

Las partículas EF probablemente contienen los centros de reacción PS II rodeados por su complejo cosechador de luz. Existen algunos tipos diferentes de PF, algunos de los cuales contienen a los centros de reacción PS I (Kyle et al., 1983). Los tilacoides apilados en los grana tienen poca actividad de PS I, la mayoría está en los tilacoides estromales. Por el contrario, hay mucho más PS II en los tilacoides apilados.

2. CLASIFICACION DE LAS PLANTAS SEGUN SU TIPO DE FOTOSINTESIS

A las distintas clasificaciones existentes para catalogar a los vegetales según criterios morfológicos y fisiológicos, se añadió a principio de los sesentas, un nuevo tipo de división, basado en el mecanismo inicial de asimilación del CO_2 durante la fotosíntesis. De esta forma, actualmente tenemos tres tipos de plantas dependiendo del tipo de fotosíntesis que lleven a cabo: plantas C_3 , plantas C_4 y plantas CAM (crassulacean acid metabolism) (Moyle, 1976).

En las plantas C_3 el primer producto que resulta de la fijación del CO_2 es un compuesto de 3 átomos de carbono, el 3-fosfoglicerato, mientras que en las plantas C_4 y en las plantas CAM el compuesto inicial es de 4 átomos de carbono. En estas dos últimas plantas el período de fijación del CO_2 es distinto, diurno para las plantas C_4 y nocturno para las plantas CAM.

La diferencia entre las plantas C_3 y las C_4 no es solamente

en la forma de asimilar el CO_2 , sino también anatómica. En las hojas de las plantas C_3 todas las células contienen cloroplastos idénticos, mientras que en las hojas de las plantas C_4 existen dos tipos de cloroplastos, los que se encuentran presentes en las células del mesófilo y los que se encuentran en las células de la vaina vascular (Fig. 1.4 y 1.5).

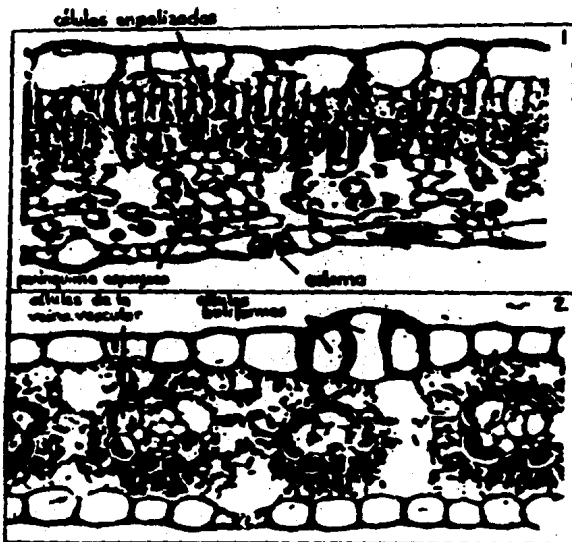


Figura 1.4. Anatomía de una hoja de una planta C_3 (1), rosa y de una planta C_4 (2), maíz. La fotografía está tomada de Fahh (1982).

En su gran mayoría, los vegetales son del tipo C_3 . Desde las bacterias fotosintéticas, las cianofitas o algas verdi-azules, hasta las coníferas, la casi totalidad de las especies pertenecen a este tipo, dicho de otra manera, todas las algas, musgos, helechos y árboles son C_3 así como la mayoría de las plantas

cultivadas como trigo, cebada, remolacha, papa, arroz, tabaco, jitomate, etc.



Figura 1.5. Microfotografía de cloroplastos de una planta *C. Canavalia ensiformis* (A) y de una planta *C. Zea mays* (B). Las fotografías fueron tomadas por el Dr. A. Cárabez del Ins. Fisiología Celular y forman parte de las publicaciones de Lotina et al. (1987) y Parra (1984)

Solamente entre las plantas con flores, las angiospermas, se manifiestan los otros tipos de fotosíntesis. Las plantas CAM forman un grupo aparte, entre las cuales se encuentran las cactáceas, un grupo de plantas que se encuentran adaptadas a las condiciones desérticas. En este grupo también se encuentran las orquídeas y algunas euforbias. En cuanto a las plantas *C.*, con excepción de algunos helechos y una o dos coníferas, todas las demás pertenecen a 18 familias de las que se conocen actualmente

cerca de un millar de especies. Las plantas C_4 son numerosas entre las cañas, los papiros, los amarantos y las compuestas, especialmente entre las gramíneas, de las que se conocen cerca de 600 especies C_4 . Las más conocidas entre los cereales originarios de climas cálidos son: maíz, sorgo y mijo. La mayoría de las otras especies prefieren las condiciones ecológicas de las regiones tropicales secas: fuerte insolación, temperaturas elevadas y baja humedad. Las plantas C_3 que crecen en forma natural en las zonas templadas viven sobre suelos salados, como la espartina, o sobre las márgenes de las lagunas temporales, en condiciones que en cierta forma implican un déficit de agua.

No se conocen plantas C_4 entre las familias de plantas más primitivas como las magnolias (Moore, 1982, 1983). Se piensa que la aparición de las plantas C_4 data del período carbonífero (hace unos 35 millones de años) en una época en la que la tasa de oxígeno en el aire ya se encontraba cercana a su nivel actual.

Una docena de plantas actuales contienen a la vez especies C_3 y C_4 . Incluso en el mismo género dos especies vecinas pueden pertenecer a uno u otro tipo. Este es el caso del armuelle (*Atriplex*), una planta pequeña pariente de la espinaca y la remolacha. También se conocen algunos casos de plantas con características tanto de planta C_3 como de planta C_4 .

3. FOTOSINTESIS

La fotosíntesis se puede definir como el proceso mediante el cual las plantas elaboran materia orgánica a partir de CO_2 atmos-

férico y energía lumínica. Este fenómeno se puede dividir en dos pasos: a) reacciones dependientes de la luz, las cuales involucran la absorción de la luz, la fotólisis del agua con liberación de oxígeno y la donación de electrones que son acarreados en la cadena transportadora de electrones para la reducción del NADP^+ a NADPH y para la síntesis del ATP, estas reacciones se llevan a cabo en las membranas de los tilacoides con la participación de los fotosistemas I y II (Fig. 1.6). La luz también se requiere para la activación de algunas de las enzimas de la asimilación del CO_2 . El segundo paso (b) es la asimilación del CO_2 en la cual se utilizan tanto al NADPH como al ATP generados durante la absorción de la luz. Sin embargo, no todo el poder reductor se utiliza en este proceso, parte de él se usa en otras vías metabólicas, tal y como se analizará en el capítulo 5.

La energía lumínica atrapada por los pigmentos fotosintéticos es utilizada para trasladar electrones desde un donador hasta un aceptor. Para las plantas superiores el donador de electrones es el agua, cuya hidrólisis produce O_2 (Radmer y Ollinger, 1980). Por el contrario, las bacterias fotosintéticas utilizan otros donadores de electrones, como el H_2S . En este caso se libera S elemental como subproducto.

El proceso fotosintético principia cuando los cuantos de luz son absorbidos por los pigmentos fotosintéticos: las clorofilas (a y b) (Fig. 1.7), los carotenos y las xantofilas. La clorofila a absorbe luz en la parte azul del espectro (420-435 nm) y en la roja (660-680 nm) (Fig. 1.8) aunque la forma exacta del espectro de absorción depende de la polaridad del medio ambiente en el

cual se encuentre la molécula de clorofila. La parte electrofili-
ca de la molécula de clorofila es la responsable de la absorción
de la luz, en tanto que la parte larga de fitol, altamente hidro-
fóbica, probablemente ayude a mantener a la molécula de clorofila
dentro de la membrana del tilacoide.

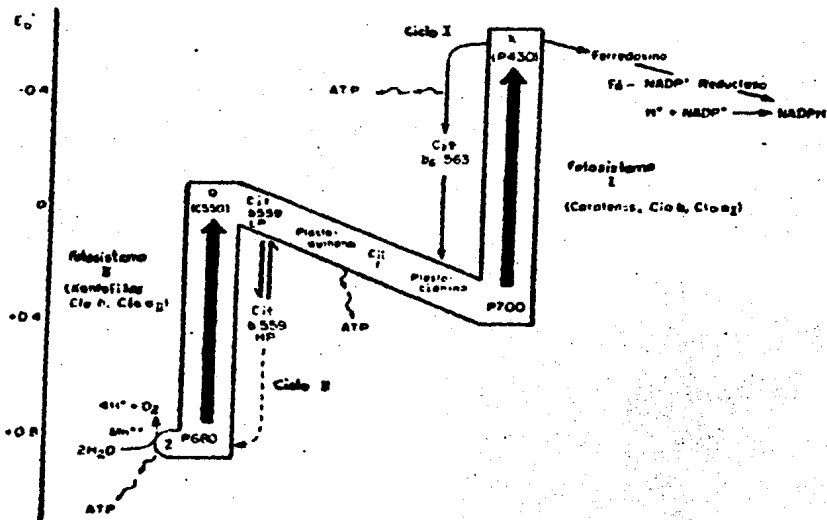


Figura 1.6. Esquema 2 del transporte de electrones fotosintético.
Redibujado de Jensen (1980).

La absorción de la energía luminica por las clorofilas o por
otros pigmentos resulta en la formación de estados de mayor
excitación electrónica. La absorción de un quantum de luz azul
por las clorofilas resulta en la formación del estado de singu-
lete, el cual produce un estado de mayor excitación que la absor-

ción de un quantum de luz roja (primer estado de excitación). El estado de excitación formado por la luz azul pierde su exceso de energía como calor en una forma extremadamente rápida, por lo que ambos tipos de luz producen finalmente el mismo estado de excitación de la molécula de clorofila. La energía absorbida puede ser perdida por emisión de un fotón dando fluorescencia, por calor a través de diferentes procesos o puede ser transferida a otra molécula, como por ejemplo una molécula de clorofila adyacente.

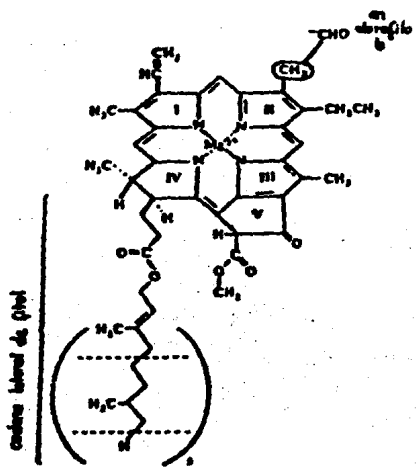


Figura 1.7. Estructura de las clorofilas a y b. Redibujado de Halliwell (1984).

La representación aceptada del transporte electrónico fotosintético es el modelo original de Hill y Bendall (1960) (Fig. 1.6). De acuerdo con este modelo el fotosistema II oxida al agua liberando O_2 y reduciendo al componente Q, mientras que el fotosistema I reduce al componente electrónico X y oxida al P-700. Q es un componente que produce un cambio en la absorbancia a 550 nm, por lo que se le conoce como C-550, en tanto que X es un

pigmento que produce un cambio de absorción a 430 nm por lo que se le denomina P-430.

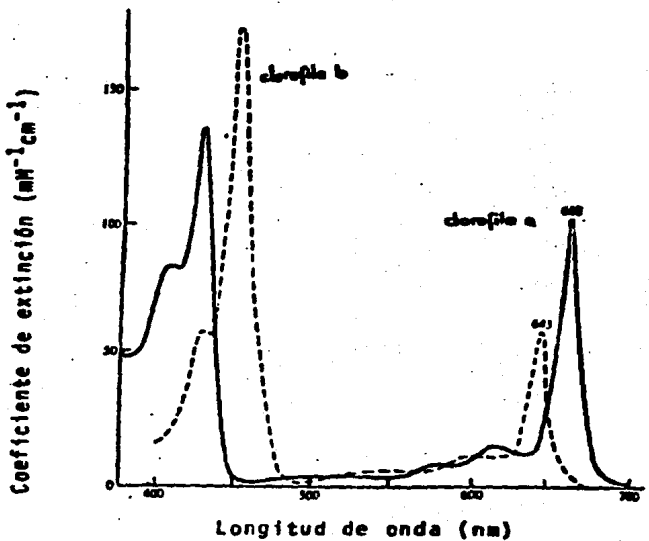


Figura 1.8. Espectro de absorción de las clorofilas a y b en acetona. Redibujado de Halliwell (1984).

El P-700 es reducido por Q vía las reacciones exergónicas del transporte electrónico que están acopladas a la fosforilación del ADP. La oxidación del agua también provee de protones y un potencial de membrana que dirige la fosforilación de una segunda molécula de ADP. Estos dos pasos de producción de ATP ocurren durante el flujo de electrones no cíclico llamado fotosforilación no cíclica. Los intermediarios del flujo electrónico en esta parte de la cadena son el citocromo b-559 (bajo potencial), la plastoquinona (PQ), el citocromo f y la plastocianina (PC), en este orden. El sitio de fosforilación está probablemente entre PQ

y el citocromo f.

El aceptor electrónico de bajo potencial del fotosistema I, el componente X, puede transferir energía para formar al NADPH vía la ferredoxina y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa. Alternativamente, la energía del aceptor primario, X, puede regresar al citocromo f ó a la PC a través de la vía del citocromo b. En esta última instancia, el transporte electrónico traza un circuito cerrado utilizando sólo al fotosistema I. Este proceso recibe el nombre de transporte electrónico cíclico y a la concomitante formación de ATP se le denomina *fotofosforilación cíclica*.

El grupo de reacciones que se lleva a cabo en el estroma del cloroplasto fueron elucidadas por el grupo de M. Calvin durante la década de los 50s usando trazadores radiactivos. Calvin y su grupo demostraron que el CO₂ se une a la ribulosa 1, 5-difosfato, en una reacción catalizada por la Rubisco, produciendo 2 moléculas de ácido 3-fosfoglicérico, el cual después de una serie de interconversiones, regenera a la ribulosa 1, 5-difosfato y produce glucosa. Esta ruta metabólica se conoce con el nombre de *Ciclo de Calvin* (Fig. 1.9).

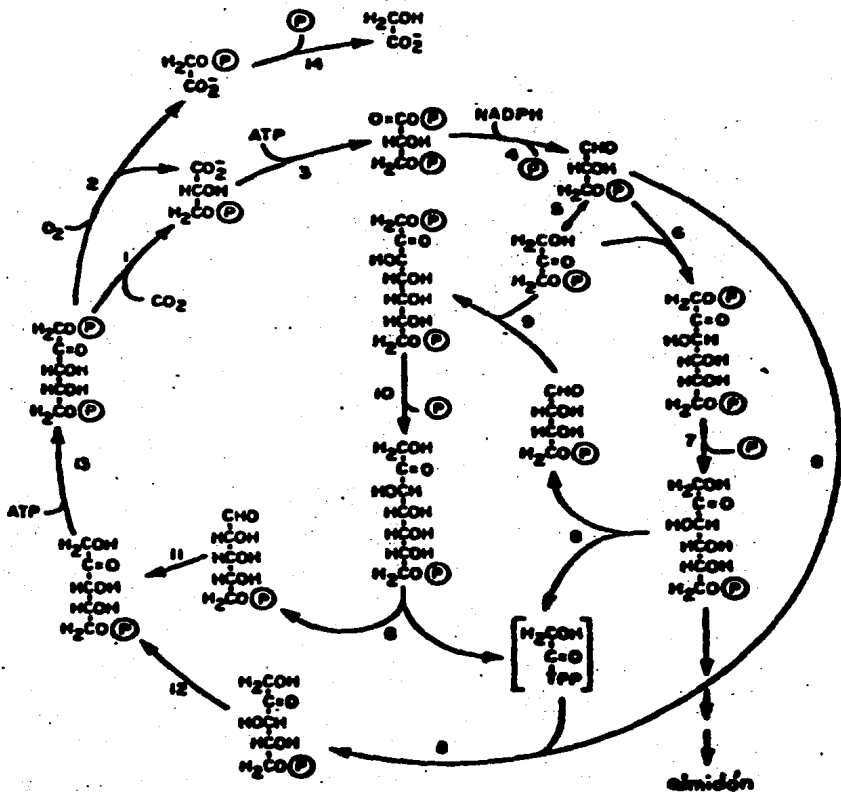


Figura 1.9. Esquema que muestra el conjunto de reacciones que conforman el Ciclo de Calvin. Redibujado de Jensen (1980). Las enzimas son: (1 y 2) Rubisco, (3) gliceraldo-3-P cinasa, (4) gliceraldeido-3-P deshidrogenasa, (5) triosa-P-isomerasa, (6) aldolasa, (7) fructosa 1,6-difosfatasa, (8) transcetolasa, (9) aldolasa, (10) sedoheptulosa 1,7-diP fosfatasa, (11) ribosa-5-P isomerasa, (12) ribulosa-5-P epimera, (13) ribulosa-5-P cinasa y (14) fosfoglicolato fosfatasa.

Tabla 1.1. Composición de lípidos de fracciones subcelulares de hojas de Vicia faba

Fracción	Lípidos presentes como % del total de lípidos			
	Monogalactosil diglicérido	Digalactosil diglicérido	Fosfati- dil coli- na	Fosfati- dil gli- cerol
Membrana cloroplástica	29	32	29	9
Membrana de los tilacoides	65	26	3	6

Datos tomados de Leach y Murphy (1976)

C A P I T U L O I I

BIOQUIMICA DEL CLOROPLASTO

1. ALMACEN DE ENERGIA POR ACUMULACION DE ALMIDON

La velocidad de la fotosíntesis, que se lleva a cabo en las hojas, parece responder proporcionalmente a la velocidad a la cual los productos fotosintéticos son transportados y utilizados. La fijación del CO_2 durante la fotosíntesis frecuentemente se reduce cuando se acumulan grandes cantidades de almidón en los cloroplastos. Las bajas temperaturas evitan el rompimiento y translocación del almidón, de tal manera que después de una noche fría la fotosíntesis disminuye, ya que el almidón se encuentra acumulado en los cloroplastos. Si las plantas tienen grandes requerimientos de almidón, entonces el almidón no se acumula durante el día y las velocidades de fotosíntesis serán mayores, comparadas con las de plantas con poco gasto del almidón producido. Esta relación sugiere que la fotosíntesis podría ser indirectamente inhibida por la acumulación de almidón, cuando la translocación es limitada. La sacarosa endógena de las hojas, también

parece tener un pequeño efecto adverso en la velocidad de fotosíntesis.

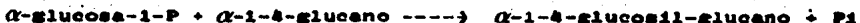
Se ha propuesto que la disminución en la velocidad de fotosíntesis en cloroplastos con alto contenido de almidón, se debe a la distorsión física de los cloroplastos por los granos de almidón.

La biosíntesis del almidón se lleva a cabo a través de la siguiente reacción:



El primer paso de la reacción de síntesis del almidón es catalizado por la enzima: ADP-glucosa pirofosforilasa. La regulación metabólica de la formación de almidón aparentemente se lleva a cabo en esta enzima, la cual es alostérica. El segundo paso es catalizado por la enzima α -1-4-glucano (almidón) sintetasa, la cual está íntimamente asociada con el gránulo de almidón.

Existe otra enzima que es capaz de sintetizar almidón, la almidón fosforilasa:



Sin embargo, es probable que esta enzima esté más involucrada en la degradación que en la síntesis.

El almidón almacenado en los cloroplastos durante el día, es

convertido a productos solubles y exportado del cloroplasto durante la noche. Esta observación proviene de experimentos en los que cloroplastos aislados se cargaron con ^{14}C -almidón en la luz y cuando fueron transferidos a la oscuridad se produjeron ^{14}C -glicerato-3-P y ^{14}C -maltosa como los principales productos. Esta moviilización es promovida por fosfato e inhibida por glicerato-3-P.

2. ASIMILACION DEL NITROGENO

A) Reducción del nitrato a amoniaco. La primera enzima de la reducción del nitrato a nitrito, la nitrato reductasa (NR), no está asociada al cloroplasto, aunque es probable que parte de la enzima se encuentra unida a la parte externa de la membrana del cloroplasto. Esta enzima requiere NADH, el cual puede ser proporcionado por el cloroplasto a través del conmutador dihidroxiacetona fosfato: glicerato-3-P.

La reducción del NO_2^- , llevada a cabo por la nitrito reductasa, NiR, está asociada con las reacciones de transporte de electrones de la fotosíntesis. Es inhibida por el 3-(3', 4'-diclorofenil)-1, 1-dimetilurea (DCMU), es insensible a desacoplantes y opera independientemente de la fijación del CO_2 (ver capítulo V). El donador de electrones fisiológico parece ser la Fd- ox .

B) Asimilación de amoniaco y biosíntesis de aminoácidos. Muchas de las reacciones de la biosíntesis de los aminoácidos están compartamentalizadas en algún sitio del cloroplasto. La principal vía por la cual el amoniaco es incorporado en el ácido glutámico

es la de la glutamino sintetasa (GS). Esta enzima posee dos isoenzimas, una de las cuales se localiza en el estroma del cloroplasto, la GS₂, y la reacción que cataliza es la siguiente:



La GS requiere Mg²⁺ y es regulada por la carga energética de la célula y puesto que estas condiciones cambian durante la transición luz-oscuridad, es probable que esta enzima sea regulada por la luz. En el capítulo V de este trabajo se hará un análisis más detallado de este proceso.

La segunda parte de esta reacción es catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT), la cual cataliza la transferencia reductiva del grupo amida de la glutamina al grupo carbonilo del 2-oxoglutarato produciendo dos moléculas de ácido glutámico. En el cloroplasto esta reacción utiliza Fd_{ox} en lugar de NAD(P)H.

La otra vía de asimilación del nitrógeno, la vía de la glutamato deshidrogenasa (GDH), es poco significativa en el cloroplasto, entre otras cosas por su baja cantidad y su poca afinidad por NH₄⁺. Sin embargo, si está presente como en los cloroplastos de *Catharanthus roseus* (Gamboa, Murillo y Loyola-Vargas, 1987; datos no publicados) y se encuentra unida a la lamela tilacooidal, por lo cual es difícil extraerla.

Hasta ahora, la evidencia experimental sugiere que los otros aminoácidos también son sintetizados en los cloroplastos. Como la mayor parte del carbón fijado en la fotosíntesis sale del cloroplasto como triosa fosfato y es metabolizado a 2-oxoglutarato,

oxaloacetato o piruvato, estos precursores deben reingresar al cloroplasto para la biosíntesis de los aminoácidos. Algunas de las enzimas involucradas han sido determinadas en el cloroplasto. Por ejemplo, en la familia del aspartato, la aspartato cinasa, la diamino pimelato descarboxilasa y la homoserina deshidrogenasa han sido localizadas en el cloroplasto. Las reacciones de síntesis de la metionina también parecen estar íntegramente localizadas en los cloroplastos.

Los aminoácidos aromáticos también son sintetizados en los cloroplastos, y las enzimas necesarias para su síntesis han sido localizadas en el cloroplasto, incluyendo a la corismato sintasa (Moudale y Coggins, 1986). Sin embargo, es importante hacer notar aquí que también se ha localizado un juego completo de isoenzimas de la vía de los aminoácidos aromáticos en el citoplasma, cuyo significado aún es materia de especulación. Puesto que el último paso de la síntesis de los aminoácidos es catalizado por una aminotransferasa, es lógico esperar que exista un abundante rango de ellas en el cloroplasto, tal y como ha sido determinado.

3. REDUCCION DEL SULFATO

El sulfato pasa a través de la membrana del cloroplasto a través de la vía del translocador de fosfatos, este sulfato es utilizado para la síntesis de cisteína, tal y como lo demuestran los experimentos con cloroplastos aislados utilizando $^{35}\text{SO}_4$, sugiriendo que los cloroplastos poseen toda la maquinaria de síntesis para este aminoácido y de asimilación del SO_4 . La prin-

principal enzima involucrada en este proceso. La tiosulfato reductasa-Fd dependiente que cataliza la reducción del tiosulfato a sulfato requiere de la transferencia de $6e^-$ y ha sido aislada y purificada de cloroplastos.

4. METABOLISMO DE LÍPIDOS

La síntesis de los ácidos grasos es un proceso que requiere de grandes cantidades de ATP y NADPH, los cuales se encuentran en forma abundante en el cloroplasto. La primera enzima de la vía de síntesis de los ácidos grasos, la acetil-CoA sintetasa se encuentra localizada en el estroma de los cloroplastos y utiliza ATP, CO_2 y acetil CoA para producir malonil-CoA. El proceso es bastante complejo ya que el CO_2 es primero unido estrechamente a la membrana del tilacoide, en un proceso dependiente de la luz y de ATP, aparentemente a una proteína acarreadora que se encuentra en la membrana. La unión es inhibida por avidina. El complejo de la ácido graso sintetasa, que utiliza al malonil-CoA producido por la acetil-CoA sintetasa y a la acetil-CoA, también se encuentra en el estroma de los cloroplastos. Este sistema produce ácidos grasos de hasta 16 átomos de carbono. Para producir ácidos grasos más largos, se requiere de una maquinaria enzimática adicional, la cual también se encuentra en el estroma del cloroplasto.

5. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Los cloroplastos poseen ADN, ARN y ribosomas 70s. El genoma del cloroplasto tiene la capacidad potencial para codificar alrededor de 125 polipéptidos de 50.000 daltones. Cuando se vió que el

cloroplasto poseía ADN. ARN y ribosomas se pensó que los cloroplastos eran autónomos y probablemente capaces de crecer como organelos aislados en cultivo. Sin embargo, aunque el cloroplasto posee todos los componentes necesarios para la autonomía biológica, no sintetiza todas sus proteínas. Muchos de los genes que codifican proteínas para la estructura y función del cloroplasto están localizados en el núcleo y hay evidencia creciente de que la mayoría de las proteínas cloroplásticas son sintetizadas en los ribosomas 80s del citoplasma.

Los cloroplastos aislados de chicharo o de espinaca cuando son incubados en presencia de ^{35}S -metionina o de $^{14}\text{CO}_2$ son capaces de incorporar la marca radiactiva a proteínas. El análisis de los productos de la síntesis de proteínas por cloroplastos aislados mediante electroforesis en geles de acrilamida indican la presencia de 37 bandas. Dos de las bandas poseen 50% de la marca total. Una de estas dos bandas ha sido identificada como la subunidad grande de la Rubisco. El segundo mayor producto de la síntesis de proteínas en el cloroplasto está firmemente unido a la membrana de los tilacoides, sugiriendo que es parte del sistema de transporte de electrones, o posiblemente parte estructural de la membrana. Entre los otros productos de la síntesis de proteínas en cloroplastos aislados se encuentran 3 de las 5 subunidades de la ATPasa.

En los cloroplastos se han encontrado dos tipos de ribosomas, unos libres en el estroma y otros unidos a las membranas. Se ha sugerido que los ribosomas libres sintetizan a la subunidad grande de la Rubisco y a otros polipéptidos solubles, en tanto

que los ribosomas unidos a la membrana podrían sintetizar los componentes de los tilacoideas, los cuales son polipéptidos hidrofóbicos.

Otro proceso muy importante que llevan a cabo los cloroplastos es el procesamiento de péptidos. Las proteínas que son sintetizadas fuera del cloroplasto, como la subunidad grande de la Rubisco, generalmente son sintetizadas de un peso mayor que el que se encuentra en la proteína nativa, lo que sugiere que, al igual que la mitocondria, los cloroplastos son capaces de transportar estos péptidos desde el citoplasma hasta el estroma mediante el corte de una parte del péptido al pasar a través de la membrana.

C A P Í T U L O I I I

M E T O D O L O G Í A

En este capítulo analizaremos brevemente la metodología que se emplea en el aislamiento de los cloroplastos y en la medida de los efectos de la luz sobre las actividades enzimáticas y su dependencia de la actividad fotosintética.

1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

Los métodos de aislamiento que son frecuentemente usados para obtener cloroplastos para el estudio del transporte de electrones y de la fotofosforilación y en algunas ocasiones para el estudio de la actividad enzimática involucra la homogenización por 10 a 15 segundos del tejido en un amortiguador, que contiene un osmótico (NaCl o sacarosa, o algún otro compuesto inerte como sorbitol o manitol), a 4°C seguido de filtración a través de gasa. El filtrado usualmente se sujeta dos ciclos de centrifugación diferencial: uno a baja velocidad (500 x g por 2 min) para remover los núcleos y restos celulares, seguida por una segunda centrifugación a 6000 x g por 15 minutos para empaquetar a la

preparación de cloroplastos. En la tabla 3.1 se muestran los procedimientos más utilizados en la extracción de cloroplastos.

La membrana de los cloroplastos aislados de los tejidos de las hojas es muy frágil y fácilmente se rompe o se pierde cuando la preparación de los cloroplastos se prolonga. De aquí que el paquete de cloroplastos aislados puede contener cloroplastos de integridad variable: algunos cloroplastos pueden permanecer completamente intactos, pero la mayor parte puede haber perdido gran parte de su contenido por el daño causado a la membrana, mientras que en otros se pierde completamente tanto la membrana como el contenido estromal. Sin embargo, los organelos dañados aún son capaces de liberar oxígeno, llevar a cabo la fotosforilación y reducir los aceptores de electrones que se añaden bajo condiciones apropiadas de ensayo, pero son incapaces de fijar CO_2 a velocidades significativas debido a la pérdida de la maquinaria responsable de este proceso. La tabla 3.1 muestra también algunas velocidades típicas de fijación de CO_2 y actividades enzimáticas en cloroplastos rotos.

2. PREPARACION Y PROPIEDADES DE CLOROPLASTOS AISLADOS

A pesar de los datos mostrados en la tabla 3.1 es posible obtener preparaciones de cloroplastos en las cuales el porcentaje de cloroplastos intactos sea elevado. Los métodos de preparación usualmente empleados involucran una combinación de medio de aislamiento especial, breve molienda de las hojas en un homogenizador eficiente, como un politrón y una centrifugación rápida para separar los organelos dañados durante la homogenización.

Para hacer más rápida la preparación, la centrifugación preliminar para remover los restos celulares se puede sustituir por una filtración en gasa.

La calidad de la fracción de cloroplastos intactos obtenida por los diferentes procedimientos (por ejemplo el porciento de organelos intactos totales capaces de fijar CO_2 a altas velocidades) depende de muchos factores, no solo de la experiencia de la persona que lleva a cabo el aislamiento. Entre los factores que pueden afectar el aislamiento de los cloroplastos intactos se tiene la naturaleza de la planta de la cual se van aislar los cloroplastos, por ejemplo sólo se han aislado cloroplastos intactos de plantas tales como: espinaca (*Spinacea oleracea*), trigo (*Triticum aestivum*), girasól (*Helianthus annuus*) y chícharo (*Pisum sativum*). Otro factor que puede afectar el aislamiento de los cloroplastos es la presencia de almidón, ya que durante la centrifugación los gránulos de almidón pueden atravesar la membrana de los cloroplastos dañándolos. Este problema puede ser superado, cosechando las hojas al inicio del período de luz en lugar de al final de una prolongada iluminación. Sin embargo, esto dependerá de la finalidad de cada experimento.

Las variaciones en las plantas pueden ser minimizadas por el crecimiento de éstas bajo condiciones ambientales controladas (Walker, 1980), como cuando se utilizan sistemas hidropónicos. En la tabla 3.2 se muestran los métodos más comúnmente empleados para aislar cloroplastos capaces de fijar CO_2 a altas velocidades.

Uno de los amortiguadores más comúnmente empleados en el aislamiento de los cloroplastos es el de fosfatos, pero debe tenerse cuidado de que la concentración empleada no alcance niveles que puedan dañar el proceso fotosintético (Walker, 1980). Cuando éste es el caso, se pueden utilizar otros amortiguadores, tales como MES, HEPES o TRICINA, pero no se puede asumir que éstos sean metabólicamente inertes, por ejemplo, algunos de ellos pueden actuar como donadores de electrones al FAD (Nelson et al., 1972; Halliwell y Butt, 1972). Sin embargo poseen la ventaja de no interferir en la fijación del CO_2 y por ello son ampliamente utilizados.

Para proteger al cloroplasto de la oxidación, ya sea por compuestos fenólicos o por la presencia de peróxido de hidrógeno, se añade ascorbato o dehidroascorbato.

Con frecuencia se añaden sales de Mg y EDTA. El Mg^{2+} parece ser esencial para el buen resultado de los ensayos de fotofosforilación en cloroplastos rotos, pero éste no es requerido para la fijación del CO_2 por los cloroplastos de hoja de espinaca (Avron y Gibbs, 1974) y cuando se presenta a concentraciones de 1 mM o mayores inhibe severamente la fijación del CO_2 (Huber, 1979).

El porcentaje de cloroplastos intactos que se puede obtener para una preparación rápida convencional, puede ser mejorado si la pastilla se lava con un medio que no contenga cationes metálicos (sorbitol 0.33 M, Tris-HCl 0.5 mM pH 7.5) (Nakatani y Barber, 1977). La inclusión de EDTA en el medio de homogenización, algunas veces mejora la obtención de cloroplastos intactos, como en

el caso de Avena sativa y girasol (Hampp y Ziegler, 1980; Edwards et al., 1978).

La espinaca es la planta que más se ha utilizado para el aislamiento de cloroplastos por la suavidad de sus hojas y su bajo contenido de compuestos fenólicos.

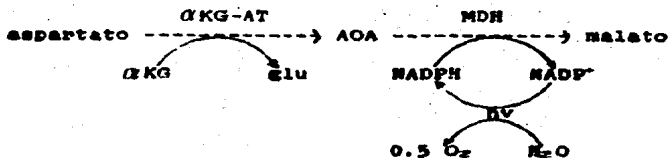
3. CLASIFICACION DE LOS CLOROPLASTOS

Los cloroplastos intactos aislados, capaces de fijar CO_2 a altas velocidades, han sido usados para describir una variedad de procesos metabólicos y para ello se utiliza una clasificación que fue introducida por Hall (1972), la cual se reproduce en la tabla 3.3 con las modificaciones propuestas por Halliwell (1984). El criterio utilizado para determinar la integridad de los cloroplastos es la exclusión de compuestos. Por ejemplo, la membrana es impermeable a la ferricianida ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), por lo que no puede ser reducida por cloroplastos que tengan su membrana intacta (cloroplastos del tipo A). Algunas veces la membrana se encuentra parcialmente dañada y entonces, aunque los cloroplastos aparezcan íntegros cuando se ven al microscopio, la ferricianida puede penetrar al interior del cloroplasto y ser reducida, estos cloroplastos han perdido parte de los intermediarios del Ciclo de Calvin, pero mantienen gran parte de las enzimas responsables de la transformación del CO_2 fijado (cloroplastos tipo B). Si el daño a la membrana es mayor, causa la pérdida de un mayor número de componentes estromales (cloroplastos tipo C). El rompimiento de los cloroplastos tipo A por choque osmótico y posterior lavado de la fracción estromal produce cloroplastos tipo D.

Las fracciones cloroplásticas del tipo A siempre contienen algún tipo de cloroplastos de los tipos B y C, debido a los daños que se producen durante el aislamiento.

4. POLAROGRAFIA

Los procesos de regulación por luz han sido estudiados polarográficamente mediante un electrodo de oxígeno, en cloroplastos aislados intactos. Este proceso se basa en el hecho de que si se libera O_2 en respuesta a la adición de un sustrato fisiológico, esta liberación reflejará el consumo de equivalentes reductores producidos a partir de agua mediante reacciones lumínicas. No obstante la naturaleza indirecta de este método para monitorear una reacción oscura, proporciona un método simple y sensible y además establece el origen de los equivalentes reductores. Así mismo, el electrodo de oxígeno puede usarse para monitorear los procesos que están unidos a reacciones acopladas a la luz. Por ejemplo, la activación de la aspartato alfa cetoglutarato-amino transferasa de los cloroplastos puede estimarse como dependiente de la liberación de O_2 (Anderson y Done, 1977a) de acuerdo con la reacción:



En este ejemplo, el AOA producido a partir del aspartato por

transaminación es reducido en una segunda reacción catalizada por la MDN-NADP dependiente de luz. El metabolismo del aspartato a malato involucra el transporte de 2 electrones, éstos son suministrados por el agua vía el NADPH con la liberación de 0.5 moles de O_2 por mol de aspartato transaminado.

Tabla 3.1. Fijación de CO₂ y actividad específica de algunas enzimas en cloroplastos de espinaca aislados por diferentes métodos (Halliwell, 1984).

Método de aislamiento	Velocidad de fijación de CO ₂ (*)	Actividad de las enzimas (µmol h ⁻¹ mg clorofila ⁻¹)		
		Rubisco	GFPasa-NADP	FDPasa
A	5	7.8	104	43
B	7	8.5	210	46
C	123	28	505	101

* (µmol h⁻¹ mg clorofila⁻¹)

Método A. Igual que para B utilizando sacarosa como osmótico.

Método B. La homogenización se lleva cabo en NaCl 0.35 M en un amortiguador de Tris-HCl pH 8. Se filtra y se centrifuga por 4 min a 2000 x g. Se resuspende en NaCl 0.35 M (2 a 3 ml) y se diluye hasta 40 ml con NaCl 0.35 M. Se vuelve a centrifugar a 2000 x g por 4 min. La pastilla se resuspende nuevamente en NaCl 0.35 M.

Método C. Método de Jensen y Bassham (1966).

Tabla 3.2. Métodos comúnmente usados para el aislamiento de cloroplastos capaces de fijar CO_2 a altas velocidades (Halliwell, 1984).

Método de Jensen y Bassham (1966)

Las hojas de espinaca (10 g) son homogenizadas a alta velocidad por 5 s en sorbitol 0.33 M, NaNO_3 2 mM, EDTA 2 mM, 2 mM de ascorbato de sodio, 20 mM de NaCl, 1 mM de MgCl_2 , 0.5 mM K_2HPO_4 en MES 50 mM ajustado a pH 6.1 con NaOH. El homogenado es pasado a través de 6 capas de muselina y centrifugado a 2000 x g por 50 s. La pastilla es resuspendida en un medio similar excepto que el amortiguador utilizado es de HEPES en lugar de MES.

Método de Walker (1971)

Las hojas se homogenizan brevemente en un polytrón en una solución fría de sorbitol 0.33 M, EDTA 2 mM, MgCl_2 1 mM, ascorbato de sodio 2 mM, K_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, en amortiguador de HEPES ajustado a pH 7.6 con NaOH.

Tabla 3.3. Tipos de preparaciones cloroplásticas (Halliwell, 1984).

Tipo	Otras descripciones	Método de preparación	Membrana	Velocidad fijación CO ₂ (*)	Propiedades de permeabilidad
A	Cloroplastos intactos	Molienda rápida y centrifugación en medio especial	Intacta	50-200	Impermeable al NADP ⁺ y a la ferricina.
A ₂	Cloroplastos intactos	Como el tipo A	Intacta	50	Como el tipo A
B	Cloroplastos enteros	Centrifugación (2 a 3 veces)	Dañada	5	Permeable
C	Cloroplastos rotos	Molienda rigurosa	Rota	0	Como B
D	Lamelas	Choque osmótico	Eliminada	0	Como B
E	Fragmentos	Choque osmótico	Eliminada	0	- - -
F	Partículas	Sonicación	- - - -	0	- - -

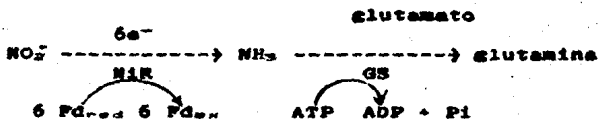
*($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg clorofila}^{-1}$)

C A P I T U L O I V

MODELOS DE REGULACION POR LUZ

Generalidades

Durante la fotosíntesis, la luz no solo se requiere para la síntesis de ATP y del NADPH, como generalmente se piensa, sino que también se requiere para la activación o inactivación de algunas de las enzimas que están involucradas en la fijación del CO_2 , así como de otras que no lo están, como son las de la asimilación de sulfatos, la reducción de los ácidos dicarboxílicos, la modificación covalente de algunas enzimas y la asimilación del NH_4^+ . A lo largo de este capítulo las reacciones metabólicas que consumen ATP ó Pd generados por la luz se referirán como reacciones acopladas a la luz. Por ejemplo, los cloroplastos aislados catalizan la siguiente reacción:



Esta secuencia, la cual involucra a las enzimas Nir y glutamino sintetasa (GS) respectivamente, utiliza a la Pd_{red} y al ATP

generados por la luz.

También existe evidencia de que los enlaces de fosfato, ricos en energía, generados por la luz y los equivalentes reductores formados dentro del cloroplasto, son utilizados en el citoplasma. Sin embargo, en este caso el acoplamiento de la luz a reacciones en el citoplasma es indirecto e involucra a la fosforilación acoplada a la luz y/o la reducción de un metabolito dentro del cloroplasto, como por ejemplo el malato. (Heldt, 1976) el cual es transportado a través de la membrana del cloroplasto y los equivalentes de poder reductor son recuperados como ATP y NADH por procesos oxidativos en otros compartimentos celulares. Esto se debe al hecho de que la membrana del cloroplasto es impermeable a las formas oxidadas y reducidas de la Fd y del NADPH (Anderson, 1981) y al ATP y ADP (Heber, 1974; Walker, 1976). En la tabla 4.1 se muestran algunos ejemplos de reacciones acopladas a la luz.

En el ciclo de Calvin se han encontrado hasta ahora 5 enzimas regulables por luz (Anderson, 1973). Para determinar el mecanismo de la activación por luz de estas enzimas se han empleado inhibidores del transporte de electrones no cíclico, como el DCMU. El uso de este inhibidor ha permitido determinar que la GFDasa de Lemna (Ziegler y Ziegler, 1966), la Rubisco, la MDH-NADP y la GFDasa (Avron y Gibbs, 1974; Anderson y Avron, 1976; Hatch, 1977) requieren de algún componente formado durante el transporte de electrones no cíclico para ser activadas. El DCMU, también inhibe la activación, por luz de la GFDasa y de la FDPasa en cloroplastos aislados (Champigny y Bismuth, 1976).

Los experimentos realizados con este tipo de inhibidores sugieren que existe más de un reductor fotosintético responsable de estas reacciones de activación. Por ejemplo, trabajando con la disalicildienopropanodiamina (DSPD), que es un inhibidor del transporte de electrones no cíclico a nivel de la ferredoxina soluble, muestra efectos diferenciales sobre la activación por luz de la GFDasa y de la MDH-NADP, las cuales son insensibles al DSPD en tanto que la SHDFF sí es sensible. Estos resultados sugieren la existencia de por lo menos dos reductores, uno de los cuales (el que activa a la RPC, a la MDH-NADP y a la GFDasa) se encuentra unido a las membranas, entre el aceptor primario, el PS-I y la ferredoxina en la cadena de transporte de electrones no cíclico. El segundo reductor, el que activa a la SHDFF (Shurmann y Buchanan, 1975) y presumiblemente a la FDPasa, (Buchanan et al. 1967, 1971) probablemente es la misma ferredoxina o un factor dependiente de ésta.

Otro grupo de inhibidores que se ha utilizado es el de los reactivos que modifican covalentemente los grupos sulfhidrilo. Entre estos compuestos se tiene al arsenito y al yodoacetato, los cuales (10^{-4} M) inhiben la activación por luz de la RPC en cloroplastos intactos.

Por último, otro inhibidor, el cual solo ha sido pobremente entendido, es el gliceraldehído. Recientemente Bahr y Jensen (1978) determinaron que el gliceraldehído inhibe parcialmente la activación dependiente de luz en cloroplastos intactos y dicha activación depende en gran parte de la concentración de los intermediarios del ciclo de Calvin que caen entre la fructosa 1,

6-difosfato y la ribulosa-5-fosfato.

Una línea diferente de investigación, también con cloroplastos aislados, generó evidencia para un mecanismo alternativo que es independiente de un reductor. Este mecanismo alternativo se basa en el hecho de que la luz produce alcalinización del estroma (de 7 a 8). Al mismo tiempo, la luz provoca la salida de Mg^{2+} desde el interior del tilacoide hacia el estroma.

1. MECANISMOS POR LOS CUALES LAS ENZIMAS SON ACTIVADAS POR LUZ

A) Mecanismo mediado por un efector. El grupo de Ziegler (1965, 1968) ha sugerido que tanto el NADPH como el ATP constituyen el mecanismo por el cual las enzimas del cloroplasto son moduladas por la luz. Por ejemplo, en el caso de la GFDasa de hojas de *Vicia faba*, el ATP y el NADPH pueden producir un cambio estructural en la enzima incrementando así su actividad catalítica (Müller et al., 1969, Müller, 1972 Pupillo y Piccari, 1975). Este mecanismo requiere de Ca^{2+} y de la presencia de Pi. Sin embargo, experimentos llevados a cabo por Anderson y Avron (1976) sugieren que el NADPH no es mediador de la actividad por luz. La Rubisco también es activada por diferentes efectores, incluyendo al ATP y al NADPH.

B) Mecanismo mediado por iones. Desde hace algunos años se sabe que algunas enzimas del cloroplasto presentan rígidos requerimientos de Mg^{2+} y pH. Los estudios realizados por Racker y Schroeder (1958) con la FDPasa y los del grupo de Horecker y Racker (Hurwitz et al., 1956; Weissbach et al., 1956; Racker,

1957) llevados a cabo con la Rubisco y la RPC revelaron que estas enzimas tienen un requerimiento de Mg^{2+} y necesitan pH alcalino. Así mismo, determinaron que cambios muy pequeños en estos factores producían cambios drásticos en la actividad de las enzimas.

C) Mecanismo mediado por proteínas. Se tiene evidencia de varios laboratorios de que las proteínas regulatorias juegan un papel muy importante en la activación de las enzimas del cloroplasto. Dichas proteínas funcionan como un enlace entre las enzimas reguladas y el reductor generado fotoquímicamente. Este hecho surgió de la observación de que las ferredoxinas no interactúan con la FDPasa y que había otro componente, "un factor protéico", que era requerido (Buchanan et al., 1971; Shurmann y Buchanan, 1975; Buchanan et al., 1976). Se observó que el DTT podía sustituir a la ferredoxina siempre y cuando estuviera dicho "factor protéico" (Anderson 1974). El factor protéico fue purificado y se determinó que consistía de dos componentes: uno llamado tiorredoxina y el otro fue la enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa (Shurmann et al., 1976; Buchanan y Wolosiuk, 1976; Holmgren et al., 1977; Wolosiuk y Buchanan, 1977). La tiorredoxina también ha sido fraccionada en dos diferentes componentes, las tiorredoxinas f y m (Jacquot et al., 1978; Wolosiuk et al., 1979; Buchanan et al., 1979).

Existe evidencia de que la tiorredoxina activa cuatro enzimas del ciclo de Calvin: la FDPasa, la SHDFP, la GADP-NADP, y a la RPC, así como a otras enzimas que no forman parte de este ciclo, como la MDH-NADP (Wolosiuk et al., 1977) y la fenilalanil-amonioliasa (PAL).

Anderson y Avron (1976) formularon y propusieron un mecanismo para la activación por luz de las enzimas del cloroplasto. De acuerdo con ellos, deben existir unos grupos unidos a la membrana, que son utilizados para la modulación. Estos reductores membranales (denominados "mediadores del efecto luminoso" ó LEMs) contienen cisteína, la que se encuentra en el estado oxidado (S-S) en la oscuridad (sensible al sulfito) y en el reducido (-SH) en la luz.

Hasta el momento se conocen dos LEMs. En cloroplastos de chicharo intactos y aislados, la activación por luz de algunas enzimas (RPC, GFDass, MDH-NADP) es insensible al DSPD, mientras que la activación de otra enzima, la SHDFF, sí lo es. Anderson y Avron (1976) sugirieron que estos resultados indican que el componente que activa al primer grupo de enzimas, denominado LEM I, debería ser reducido en algún sitio entre el aceptor primario, el PS-I y la Fd. El activador de la SHDFF, designado LEM II, es reducido a nivel de, o subsecuente a, la Fd. Los dos mecanismos son similares en la medida que sus componentes tiene grupos sulfhidrilos cuya actividad es mediada por luz. Con la evidencia de que se dispone actualmente, es probable que la situación del LEM II es similar o idéntica a la de la tioredoxina. (Fig. 4.1 A).

Existen probablemente tantos LEMs como enzimas moduladas por luz en el cloroplasto (Anderson y Avron, 1976). El LEM-I (G5PD) tiene un pH óptimo de 7.3 y es sensible al NADP⁺ y al NAD⁺ (Anderson y Duggan, 1976). El LEM-II (PDPasa) requiere Mg²⁺ para su actividad, 10 mM es la concentración óptima, concentraciones

mayores son inhibitorias (Chin y Anderson, 1977).

Los mecanismos regulatorios LEM y Fd-tio difieren en un aspecto importante, en la necesidad de factores solubles. El sistema Fd-tio está basado en la intervención de proteínas solubles que se encuentran en el cloroplasto, la ferredoxina-tiorredoxina reductasa y las tiorredoxinas f y m, que son requeridas, además de la Fd, para la activación por luz de ciertas enzimas.

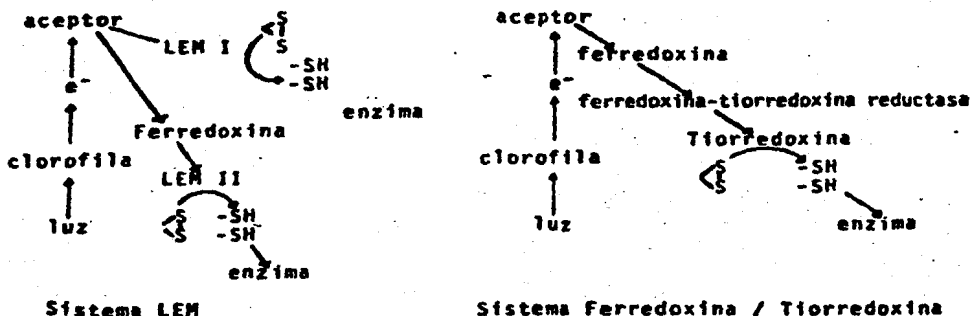


Figura 4.1. A) Localización de los sistemas LEM con respecto al transporte de electrones fotosintético. B) Comparación del sistema LEM y del sistema ferredoxina/tiorredoxina. Redibujado de Buchanan (1980).

Existen evidencias de que la tiorredoxina, la Fd y la ferredoxina-tiorreductasa constituyen un sistema general de la regulación enzimática por la luz. En este sistema, la Fd es usada para reducir, vía ferredoxina-tiorredoxina reductasa, a las dos tiorredoxinas cloroplásticas. Estas tiorredoxinas, una vez redu-

cidas. activan selectivamente a las enzimas claves en la regulación de la vía metabólica.

Las enzimas modulables por luz a través del mecanismo de los LEMs, deben tener tanto al grupo tiol como a los enlaces disulfuro libres para poder llevar a cabo la modulación catalizada por el LEM. El hecho de que la forma activa del LEM, aparentemente contenga tanto los grupos ditiol como disulfuro, sugiere que la regulación mediada por luz involucra cambios en dichos grupos en las enzimas modulables por el LEM activado reductivamente (Anderson et al., 1978) (Fig. 4.2).

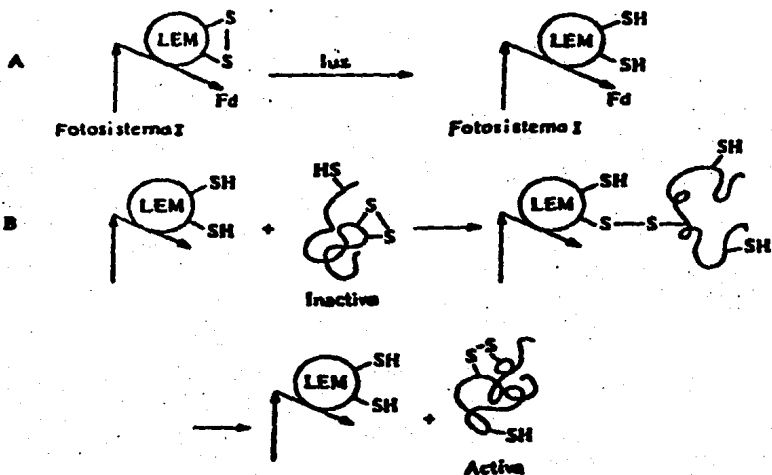


Figura 4.2. Esquema hipotético de la modulación de la actividad enzimática mediada por los LEMs. Redibujado de Anderson (1979).

El sistema LEM es independiente de componentes solubles. Esta diferencia en requerimientos en los factores solubles es una

irreconciliable diferencia entre los dos sistemas. Evidencias actuales sugieren que esta diferencia puede ser en parte experimental.

Existe la posibilidad de que los componentes del sistema Fd-tio puedan estar también adheridos a la membrana del cloroplasto in vivo. Tal unión puede ser la responsable de los resultados aparentemente contradictorios, pero no se puede eliminar la posibilidad de que otras proteínas regulatorias contribuyan a la activación por luz de algunas de las enzimas del cloroplasto.

Se tiene la evidencia de que los resultados obtenidos con DSPD pueden ser engañosos. Recientemente Laasch et al. (1979) concluyeron que la DSPD inhibe el transporte de electrones en múltiples sitios que incluyen además del de la ferrodoxina soluble un sitio entre el PS II y el PS I o antes del sitio de la PC. Además, determinaron que el DSPD actúa como un aceptor de electrones autooxidable y como un inhibidor específico de la fosforilación. Por lo que el uso del DSPD como un inhibidor específico de las reacciones dependientes de la Fd deben tomarse con reserva.

2. MECANISMOS DE DESACTIVACION EN LA OSCURIDAD

Los mecanismos de desactivación en la oscuridad difieren según la enzima involucrada. Las enzimas dependientes del grupo tiol pueden ser clasificadas en tres tipos, basándonos en sus propiedades de desactivación:

Primer tipo. Para su desactivación requieren de un oxidante

soluble, como por ejemplo de una forma oxidada del glutati6n (GSSG) o del ascorbato (dihidroascorbato) los cuales pueden ser formados por el cloroplasto en la oscuridad (Groden y Beck, 1979; Wolosiuk y Buchanan, 1977). Algunas enzimas de este tipo son la FDPasa (Schürmann y Wolosiuk, 1978; Wolosiuk y Buchanan, 1977), la RPC (Wolosiuk y Buchanan, 1978) y la PAL (Nishizawa et al., 1979).

Segundo tipo. La MDH-NADP es la única representante, hasta ahora, de este tipo, que requiere de un oxidante aun no identificado para su desactivaci6n (Wolosiuk et al., 1977). Hay evidencia de que este oxidante se encuentra disponible para la desactivaci6n sólo cuando las membranas son mantenidas en la oscuridad.

Tercer tipo. El ejemplo clásico es la GFDasa. No se conoce el mecanismo de desactivaci6n, mientras que se sabe que es activada por tioredoxina reducida (Wolosiuk y Buchanan, 1978). Los trabajos de Anderson (1973) y Vidal et al. (1977) han revelado que la mayor funci6n de la luz durante el enverdecimiento es la activaci6n de enzimas inactivas preexistentes (Bradbeer, 1969 y 1973). Hay evidencia de que las funciones de la luz durante el enverdecimiento son las de un activador de enzimas, así como la de un promotor de la sntesis de proteínas *de novo*. La principal evidencia para esta conclusi6n fue la demostraci6n de Anderson (1973) y por Vidal et al. (1977) de que las enzimas históricamente asociadas con el enverdecimiento (GFDasa, RPC y MDH-NADP) estaban presentes en chicharos etiolados y semillas de haba y que pueden ser fácilmente detectadas después de una activaci6n por DTT.

Se ha observado que la GFDasa de retoños de cebada crecidos en la oscuridad puede ser activada ya sea por tiorredoxina reducida o por efectores positivos de la enzima (ATP, NADPH, Pi). En las semillas se encuentran todos los componentes del sistema Fd-tio. Por lo tanto parece ser que la luz produce la conversión de las enzimas inactivas (oscuridad) a la forma catalíticamente activa (luz).

Hasta ahora, no es posible determinar cual es la contribución de la síntesis de proteína ~~de novo~~ en relación a la activación dependiente de luz de las enzimas inactivas preexistentes, durante el enverdecimiento.

3. LA LUZ COMO UN DESACTIVADOR DE ENZIMAS.

La luz induce cambios en las concentraciones de G6P y de 6-fosfogluconato, mediante la desactivación de la G6PD.

Además de la G6PD cloroplástica, las hojas contienen una forma citoplásmica que también es desactivada por luz y DTT (Anderson y Avron, 1976; Anderson y Nehrlich, 1977; Anderson et al., 1974). En el citoplasma la fuente del reductor responsable de la desactivación probablemente es obtenida del cloroplasto.

Hay dos posibles reductores involucrados en la desactivación de la G6PD en las plantas. Uno de los reductores, de identidad bioquímica no conocida, se asemeja al DTT. El otro reductor es el NADPH. La desactivación de la G6PD citoplásmica por la luz puede ser causada por un incremento en los niveles del NADPH prevalentes durante el día. De esta manera, la luz podría servir para

suprimir la operación del ciclo de la pentosas fosfato tanto en el cloroplasto como en el citoplasma, incrementando los niveles de los reductores fotosintéticos que desactivan a la G6PD, la primera enzima de la vía.

La luz también desactiva algunas otras enzimas de los tejidos fotosintéticos, incluyendo a la fosfofructocinasa y algunas enzimas del metabolismo del almidón en chícharos (Anderson et al., 1979; Kachru y Anderson, 1975).

La fosfofructocinasa es una enzima de gran interés, ya que aún se desconoce donde se encuentra localizada (Kelly y Latzko, 1975, 1977a, 1977b). Esta enzima es desactivada por la luz en las hojas o por DTT en extractos de hoja (Kachru y Anderson, 1975).

Las evidencias actuales indican que tres de las enzimas involucradas en el metabolismo del almidón (la fosfoglucomutasa, la fosforilasa y la glucosa-6-fosfato isomerasa) son desactivadas por la luz a través de la vía de reacción: DCMU sensible/DSPD insensible (Anderson et al., 1979; Kachru y Anderson, 1975) (Fig. 4.3).

Durante el día, la planta obtiene su energía de la luz absorbida del sol y usa esta energía para reducir al CO_2 a materiales celulares ricos en energía, tales como el almidón. Durante la noche, la planta se convierte, en términos bioquímicos en animal; por la noche la planta debe extraer su energía del rompimiento de compuestos altamente energéticos que fueron sintetizados durante el día. Para este fin, la planta utiliza las vías glucolítica y de las pentosas fosfato, características de orga-

nismos heterótrofos. La planta es capaz de sobrevivir de esta manera hasta que la luz sea nuevamente suministrada. En resumen, la luz es capaz de activar y desactivar ciertas vías metabólicas en los tejidos de las plantas superiores (Fig. 4.4).

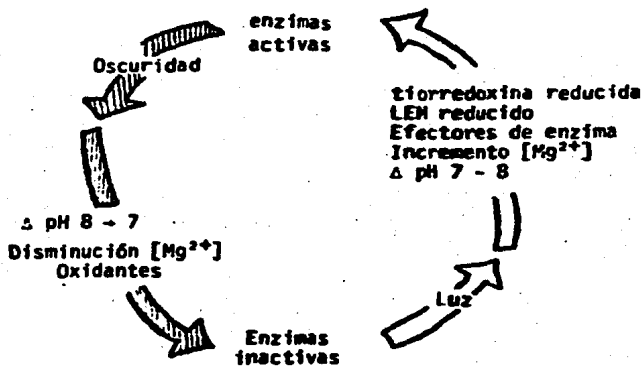


Figura 4.3. Activación de enzimas en cloroplastos por mecanismos dependientes de luz. Redibujado de Buchanan (1980).

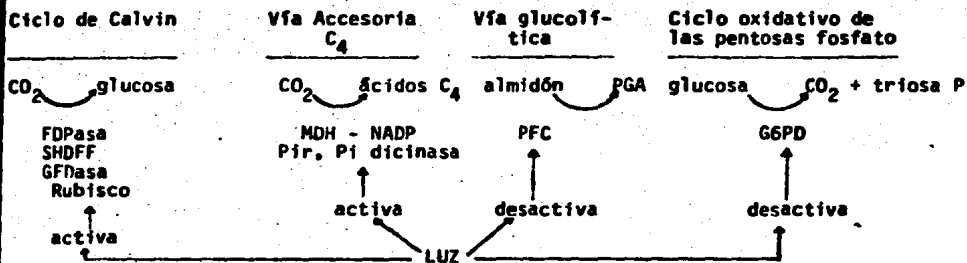


Figura 4.4. Efecto de la luz en algunas enzimas reguladoras de vías del metabolismo del carbón en el cloroplasto. Redibujado de Buchanan (1980).

Tabla 4.1. Algunas reacciones conocidas acopladas a la luz.

Reacción o secuencia	Enzima(s)	Factor de la reacción luminica
Asimilación de nitrógeno inorgánico		
$\text{NO}_2^- \text{ ----} \rightarrow \text{NH}_3$	NiR	Fd _{red}
$\text{NH}_3 + \text{glu} \text{ ----} \rightarrow \text{gln}$	GS	ATP
$\text{gln} + \alpha \text{KG} \text{ ----} \rightarrow 2 \text{glu}$	GOGAT	Fd _{red}
Asimilación de sulfato inorgánico		
$\text{SO}_4^{2-} \text{ ----} \rightarrow \text{APS}$	ATP sulforilasa	ATP
acarreador-S-SO ₃	Tiosulfonato	
acarreador-S-S	reductasa	Fd _{red}
$\text{SO}_3^{2-} \text{ ----} \rightarrow \text{S}^{2-}$	Sulfito reductasa	Fd _{red}
Reducción de AOA		
$\text{AOA} \text{ ----} \rightarrow \text{malato}$	MDH-NADP	NADPH
Reducción de GSSG		
$\text{GSSG} \text{ ----} \rightarrow 2 \text{GSH}$	GSSG reductasa	NADPH
Biosíntesis de prolina		
$\text{glu} \text{ ----} \rightarrow \text{semialdehído glutámico}$	Incierta	NADP ⁺

C A P I T U L O V

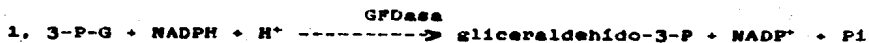
REGULACION POR LUZ DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

En el capítulo I se estudiaron los procesos fotosintéticos y se analizaron las dos vías metabólicas de la fijación del CO₂. En este capítulo se analizan a las enzimas de esas vías que son reguladas por la luz. De estas enzimas se ha excluido a la Rubisco, ya que su mecanismo de regulación por luz se encuentra en controversia y parece ser que es a nivel de expresión genética, y no en la enzima misma, donde se produce la regulación por efecto de la luz.

ENZIMAS DEL CICLO DE CALVIN

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GFDasa) cataliza la tercera reacción del ciclo de Calvin produciendo gliceraldehído-3-fosfato, como se muestra en la siguiente reacción:



y fue la primera enzima que se descubrió era regulada por luz

(Ziegler y Ziegler, 1966).

El grupo de Ziegler, trabajando con una mutante de *Pisum sativum*, descubrió que en contraste con las plantas silvestres, una mutante clorofila menos no era capaz de mostrar un incremento en la actividad de la GFDasa cuando las plantas eran expuestas a la luz (Tabla 5.1). Sin embargo, la cantidad de la enzima era la misma tanto en la luz como en la oscuridad. El mismo fenómeno se presenta cuando las plantas etioladas son pasadas a la luz, o simplemente cuando se iluminan cloroplastos de chícharo (Figura 5.1) (Anderson y Avron (1975). También descubrieron que el DCMU y la salicilaldoxima reducían el efecto del aumento de la actividad de esta enzima por la luz, pero no afectaban la cantidad de la enzima (Tabla 5.2) (Ziegler y Ziegler, 1966).

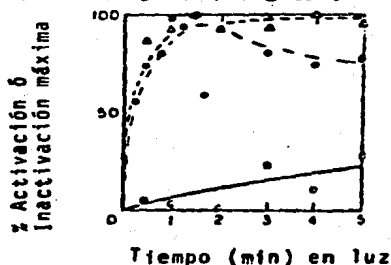


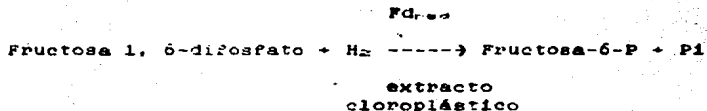
Figura 5.1. Curso del tiempo para la activación de la GFDasa (O); de la MDH-NADP (Δ) e inactivación de la GSPD (●) por la luz en cloroplastos intactos de chícharo. Redibujado de Anderson y Avron (1975).

La azida de sodio, un inhibidor de la respiración y de la fotosíntesis, inhibió el incremento de la actividad de la GFDasa por la luz, mientras que el 2, 4-dinitrofenol, un desacoplante de la fosforilación oxidativa, no afectó dicho aumento a bajas concentraciones, pero a concentraciones mayores (100 μ M) bloqueó completamente la respiración y la fotosíntesis así como el aumento en la actividad de la GFDasa producido por la luz. El arsenito

(100 μ M) disminuye en 55% la activación por luz de esta enzima (Anderson y Avron, 1975). Estos resultados permiten sugerir que el aumento en la actividad de la GFDasa producido por la luz es dependiente de la presencia de clorofila y del flujo de electrones no cíclico de la fotosíntesis (Ziegler y Ziegler, 1966).

Fructosa 1, 6-difosfatasa

La fructosa 1, 6-difosfatasa (FDPasa), una enzima cloroplástica, cataliza la siguiente reacción:



En 1967 el grupo de Buchanan demostró que la FDPasa de cloroplastos de espinaca era activada por la luz vía Fd (Buchanan et al., 1967). La evidencia que se aportó en ese entonces fue la dependencia de Fd en la liberación de Pi a partir de la fructosa 1, 6-difosfato (Fig. 5.2). Experimentos más recientes de enverdecimiento de plántulas de espinacas etioladas también apoyan esta conclusión (Fig. 5.3).

Sin embargo, experimentos posteriores del mismo grupo (Buchanan et al., 1971) revelaron que la Fd no activa directamente a la FDPasa y que se requiere de un factor protéico adicional.

De hecho esta enzima es sumamente compleja. Consiste de un componente protéico, en el cual está presente el sitio activo de la enzima y de un factor protéico y Fd. Estos dos últimos compo-

nentes son indispensables para que la enzima pueda ser activada. Al péptido que porta el sitio activo se le conoce como el componente alcalino de la FDPasa y es muy semejante al componente alcalino de la FDPasa de células de mamífero (Pontremoli et al., 1965) mostrando estimulación por cistamina y DTNB.

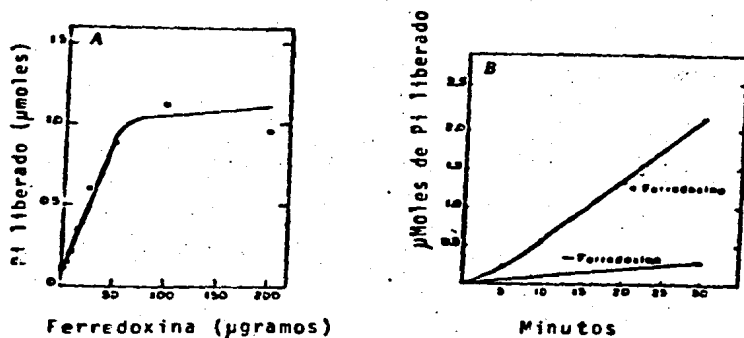


Figura 5.2. A) Efecto de la concentración de Fd en la liberación de Pi a partir de fructosa 1, 6-difosfato. B) Curso de la liberación de Pi en función del tiempo. Redibujado de Buchanan et al. (1967)

La FDPasa de las plantas requiere de Fd... del factor protéico, de Mg^{2+} y glutatión... para que sea completamente activa como lo muestran los resultados de la tabla 5.3 y de la figura 5.4.

Probablemente la luz induce una acumulación de Mg^{2+} en el cloroplasto, suficiente para activar al componente alcalino de la FDPasa o posiblemente la luz funciona por una vía de reductores fotoquímicos, ya que la Fd foto-reducida aumenta 40 veces la liberación de Pi a partir de la fructosa 1,6-difosfato. El DTT y

el metil viológeno pueden reemplazar a la Fd₁, en tanto que cisteína, glutatión₁, 2-mercaptoetanol y ditionito de sodio no la pueden reemplazar (Buchanan et al. 1971). Sin embargo, la presencia del 2-mercaptoetanol aumenta la actividad medible de la enzima (Schürmann y Jacquot. 1979)

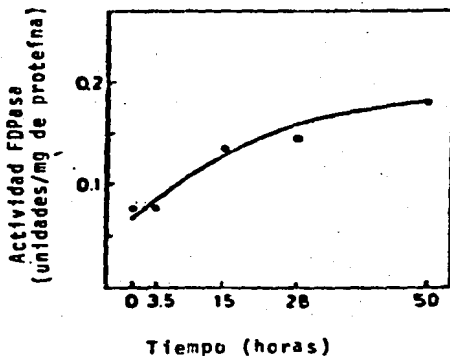


Figura 5.3. Aumento de la actividad de FDPasa con el tiempo de iluminación en plántulas etioladas de espinaca. Redibujado de Chueca et al. (1984).

La FDPasa, ya activada por la Fd, no es afectada por KCN o por agentes quelantes del cobre, ditiocarbamato o cuprozina, pero si es inhibida (97%) por 0.5 mM de EDTA.

Como ya se mencionó en el capítulo 2 el factor proteico es la tiorredoxina, y la tiorredoxina que activa a la FDPasa es la tiorredoxina f. La figura 5.5. muestra la estimulación de la actividad de la FDPasa como una función de la concentración de tiorredoxina.

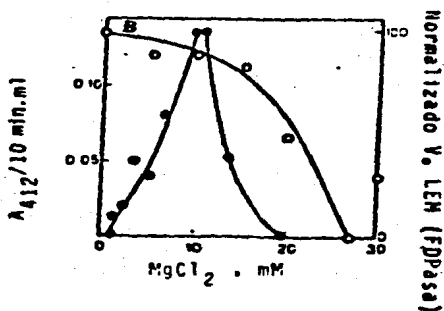
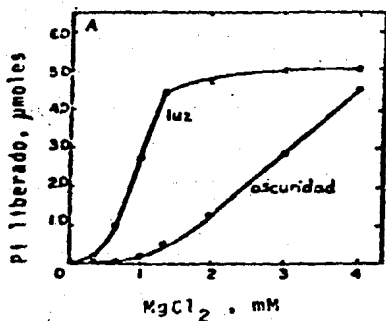


Figura 5.4. Efecto de la concentración de MgCl₂ en la activación de la FDPasa por la Fd. A) Redibujado de Buchanan et al. (1971). B) Redibujado de Anderson et al. (1979). Dependencia de Mg²⁺ del LEM₁; (●) y reducción por el DTNB dependiente de la luz (O).

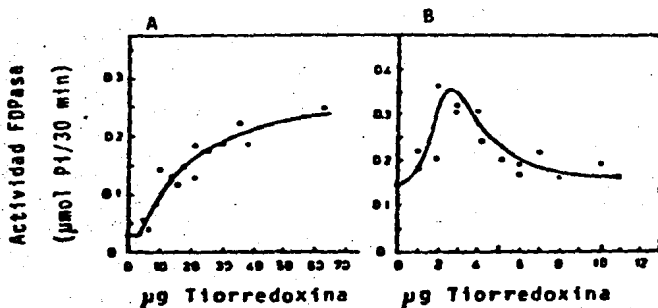


Figura 5.5. Estimulación de la actividad de FDPasa como función de la concentración de tiorredoxina. A) FDPasa de trigo en presencia de tiorredoxina II (O) o tiorredoxina de *E. coli* (●). B) FDPasa de soja más tiorredoxina I de soja (O) o tiorredoxina de *E. coli* (●). Redibujado de Haberer et al. (1985).

Recientemente el grupo de Buchanan ha purificado un nuevo

factor protéico. a partir de hojas de espinaca y de algas verde-azules. que activa a la FDPasa en presencia de luz y en ausencia de Fd (Fig. 5.6). Esta proteína es una proteína Fe-S y se le ha dado el nombre de ferralterina, tiene un peso molecular de 30,000 daltones (Lara et al., 1980a, 1980b). La presencia de la ferralterina sugiere que existe un mecanismo de activación por luz independiente de Fd.

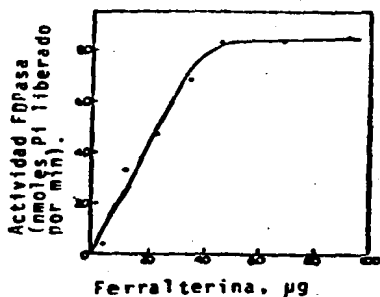


Figura 5.6. Efecto de la concentración de ferralterina en la activación de la FDPasa por la luz. Redibujado de Lara et al. (1980b).

De entre los mecanismos propuestos, la FDPasa es activada a través del LEM-II, como lo demuestra el hecho de que la activación por luz sea inhibida (80%) por DSPD (Anderson et al., 1979).

El grupo de Chueca ha propuesto que por lo menos parte del aumento en la actividad de la FDPasa cuando las plantas son expuestas a la luz (Fig. 5.3) se debe a la síntesis *de novo* de la enzima. Dos líneas de evidencia sugieren dicha conclusión. Primero la cicloheximida (1 µg/ml), un inhibidor de la síntesis de proteínas en los ribosomas 80s, inhibe la síntesis de la FDPasa durante el enverdecimiento de las plántulas etioladas de espinaca. En segundo lugar, durante el enverdecimiento de plántulas de

espinaca etioladas crecidas en presencia de D_2O , la FDPasa sintetizada incorpora el D_2 produciendo una FDPasa "pesada". En un experimento similar, pero esta vez utilizando ^{35}S -metionina, la FDPasa recuperada se encontraba marcada con ^{35}S (Chueca et al., 1984).

La información analizada hasta ahora sugiere que, la regulación por luz, de la actividad de la FDPasa en las plantas, debe estar ejercida por un doble mecanismo: uno rápido, el de la activación-desactivación, llevado a cabo a través de un proceso de reducción-oxidación de la molécula de la enzima, y un segundo mecanismo, el "lento", ocasionado por una inducción-represión de la síntesis enzimática.

Sedoheptulosa 1, 7-difosfato fosfatasa

La sedoheptulosa 1, 7-difosfato fosfatasa (SHDFP) cataliza la reacción:



Esta reacción muestra un requerimiento de Fd_{ox} y un factor protéico (Schürman y Buchanan, 1974; Anderson et al., 1979), así como de Mg^{2+} (Fig. 5.7) y un pH óptimo de 7.8. Esta enzima también puede ser activada por el DTT en ausencia de Fd_{ox} (Anderson, 1974) y es inhibida por arsenito de sodio (100 μM , 54% inhibición) (Anderson y Avron, 1976).

El factor protéico parece ser el mismo que se requiere para la activación de la FDPasa (Schürman y Buchanan, 1974), es decir

el LEM-II (Anderson et al., 1979).

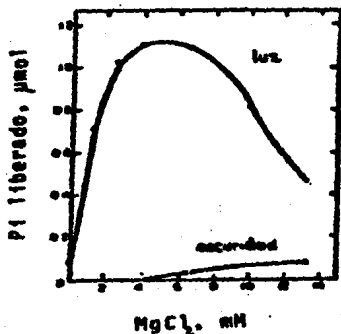


Figura 5.7. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la SHDFP activada por Pd. Redibujada de Schürmann y Buchanan (1974).

Ribulosa-5-fosfato cinasa

La ribulosa-5-fosfato cinasa (RPC) es la última enzima del Ciclo de Calvin y cataliza la fosforilación de la ribulosa-5-P de acuerdo con la siguiente reacción:



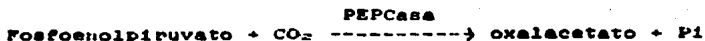
Esta enzima también es regulada por la luz (Anderson et al., 1979), y al igual que las otras enzimas del Ciclo de Calvin reguladas por luz es inhibida por arsenito (100 μM , 90% de inhibición) (Anderson y Avron, 1976).

ENZIMAS DEL CICLO DE HATCH-BLACK

Fosfoenol piruvato carboxilasa

Como se mencionó en el capítulo I, la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) cataliza el primer paso

en la asimilación del CO₂ en las plantas C₄, como se muestra en la siguiente reacción:



y se encuentra localizada en el citoplasma de las células del mesófilo de estas plantas.

El grupo de Hatch demostró que la actividad de la PEPCasa de maíz aumentaba cuando se incrementaba la intensidad de la luz durante el crecimiento de la planta (Hatch et al., 1969) y también demostraron que el incremento en la actividad se debía a una síntesis de novo de la proteína (Graham et al., 1970). Poco después Ting y Osmond (1973) demostraron que la PEPCasa de maíz cambiaba durante las primeras horas de enverdecimiento, causando la transformación de la forma etiolada de la enzima a la forma de la planta verde. Resultados similares se han obtenido en *Salsola soda*. En el experimento mostrado en la figura 5.8 la enzima fue extraída 2 horas después de que las hojas habían sido transferidas a la luz. En la oscuridad la enzima exhibe un claro comportamiento alostérico, el cual disminuye en la enzima extraída de hojas expuestas a bajos niveles de luz y desaparece completamente a altas intensidades lumínicas (Karabourniotis et al., 1983).

Como se mencionó en párrafos anteriores el enverdecimiento de tejidos etiolados bajo luz continua (22.000 lumens/m²) da como resultado un pronunciado incremento en la actividad de la PEPCasa (Fig. 5.9)

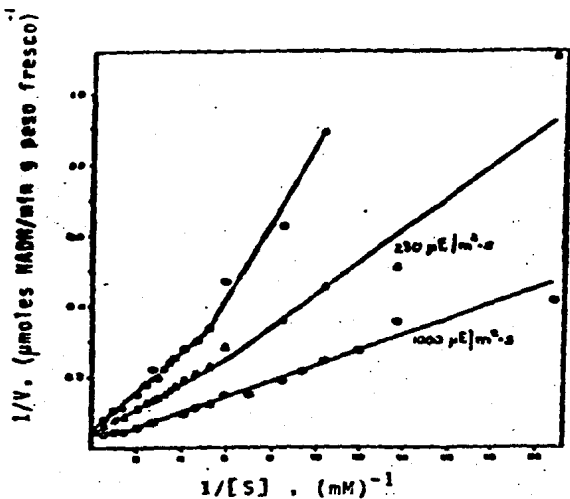


Figura 5.8. Gráficas de Lineweaver-Burk de la actividad de la PEPCase de hojas de plantas crecidas en la oscuridad (\bullet) o en dos diferentes niveles de luz (Δ , \circ). Redibujado de Karabourniotis et al.. (1983).

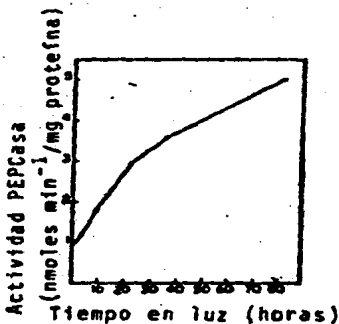


Figura 5.9. Incremento de la actividad enzimática de la PEPCase durante el enverdecimiento de hojas de maíz. Redibujado de Hague y Sims (1980).

Este incremento es función de la intensidad luminica a la que son sometidas las plantas. Por ejemplo, en plantas de maíz crecidas con el mismo fotoperiodo pero diferente intensidad luminica 19.000 y 1.600 lumens/ m^2 la actividad de la PEPCase fue dos veces mayor en la plantas crecidas con alta intensidad luminica (Hague y Sims, 1980).

La activación de la PEPCasa por la luz va acompañada por una inactivación de la enzima cuando las plantas son colocadas en la oscuridad. (Fig. 5.10). Sin embargo, los valores en las medidas en la actividad de la enzima depende mucho de las condiciones del ensayo.

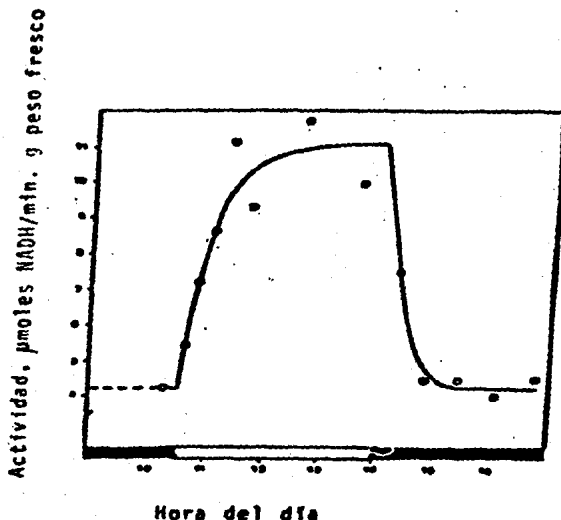


Figura 5.10. Activación/desactivación de la actividad de la PEPCasa en hojas de *Salsola soda* L. durante un ciclo oscuridad/luz/oscuridad. La irradiación fue de 2000 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{s}$. Redibujado de Karabourniotis et al. (1983)

El DCMU abate en 100% la activación por luz de la PEPCasa cuando la enzima es ensayada a altas concentraciones de PEP, pero solo la inhibe parcialmente cuando el ensayo se lleva a cabo a bajas concentraciones de sustrato (Karabourniotis et al., 1983). Estos datos sugieren que el incremento en la actividad máxima es debido a la luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos, en

tanto que el abatimiento del comportamiento alostérico es mediado por un fotorreceptor no fotosintético.

Los datos mostrados también son consistentes con la hipótesis de que la PEPCasa *in vivo* es reversiblemente activada-desactivada a través de un mecanismo de reducción (luz) oxidación (oscuridad) de los grupos sulfhidrilos.

Es importante hacer notar que la PEPCasa de las plantas CAM es afectada por la luz en sentido opuesto, es decir la luz desactiva a la enzima (Manetas, 1982; Von Willert et al., 1979; Winter, 1980). Esta diferencia podría deberse a cualquiera de los sitios regulatorios en las dos aloenzimas o a los distintos efectores generados por la luz en cada caso.

La PEPCasa puede ser activada en la oscuridad con DTT (2 veces) y por glutatión (1.6 veces) (Madhusudana y Anderson, 1983) en células de la epidermis, pero no en otras células de las hojas, lo que puede sugerir que probablemente juegue un papel importante en la apertura de los estomas por la luz.

MALATO DESHIDROGENASA-NADP

La malato deshidrogenasa cataliza la reducción del oxalacetato mediante NADPH según la siguiente reacción:



Esta enzima que se encuentra en las células del mesófilo, tanto de plantas C_3 como de plantas C_4 , también es activada por la luz. Por ejemplo, es activada alrededor de 34 veces cuando se

iluminan el estroma y las membranas tilacoidales de cloroplastos de chicharo (Fig. 5.11-A), o maíz (Fig. 5.11-B) en tanto que ninguno de los dos componentes muestran actividad por separado (Habib y Anderson, 1981; Leegood y Walker, 1983; Scheike y Jacquot, 1983).

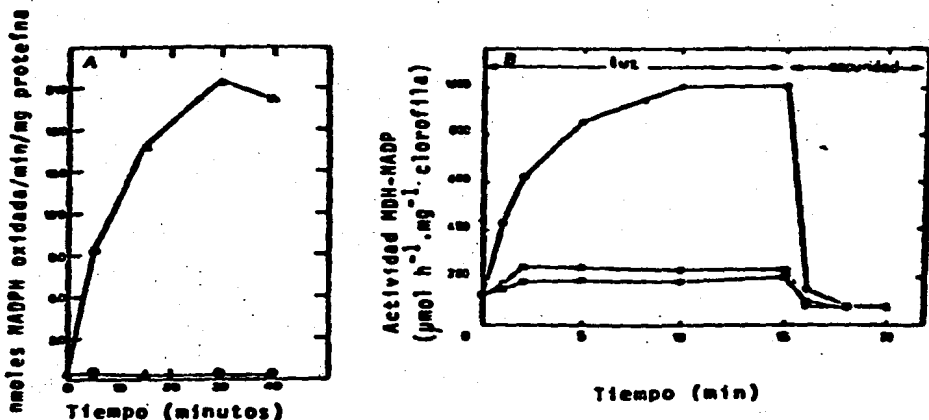


Figura 5.11. A) Activación por luz de la MDH-NADP con membranas tilacoidales y estroma total de cloroplastos de chicharo. Redibujado de Habib y Anderson (1981). B) Activación por luz e inactivación de la MDH-NADP en cloroplastos del mesófilo de maíz en presencia de 5 mM de piruvato (●); 2 mM de AOA (○) y 3 mM de 3-PGA (■). Redibujado de Leegood y Walker (1983).

La dependencia de la luz es una función del sustrato presente. Ya que algunos de ellos pueden funcionar como aceptores de los electrones presentes en el NADPH. Por ejemplo, podría esperarse que el 3-PGA inhibiera la reducción del AOA, como efectivamente lo demostraron Day y Hatch (1981) y Hallberg y Larsson (1981) o del NaHCO₂ (Scheike y Jacquot, 1983). Esta activación

también es función de la presencia o ausencia de O_2 (Fig. 5.12).

La actividad de la MDH-NADP también ha sido medida en presencia de nitrato y de DCMU. El nitrato tiene dos efectos en

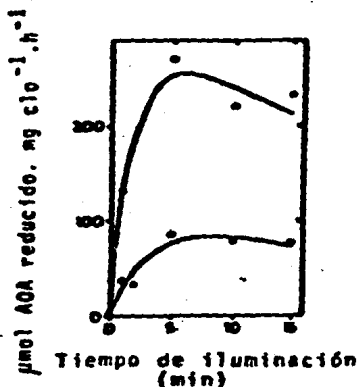


Figura 5.12. Activación por luz de la MDH-NADP en cloroplastos intactos aislados en condiciones aeróbicas (O) o anaeróbicas (●). Redibujado de Scheibe y Jacquot (1983).

los cloroplastos iluminados. El primero es el efecto de un ácido débil y por lo tanto acidifica al estroma (Heber y Walker, 1979), un proceso que causa una inhibición parcial de la activación de algunas enzimas. En el segundo efecto, actúa como un aceptor de electrones ya que la NADP, la enzima que lo reduce es Fd dependiente (Guerrero et al., 1981). Sin embargo, en la oscuridad, o en la presencia de un desacoplante el nitrato no modifica el pH del estroma, y su efecto podría por lo tanto estar confinado a su acción como un aceptor de electrones. La figura 5-13 muestra que cuando los cloroplastos son iluminados en pre-

sencia de piruvato y nigericina. la actividad de la MDH-NADP permanece sin cambio. La adición de nitrito provoca una ligera disminución en la actividad enzimática en concordancia con su acción como un aceptor de electrones débil (Leegood y Walker, 1983).

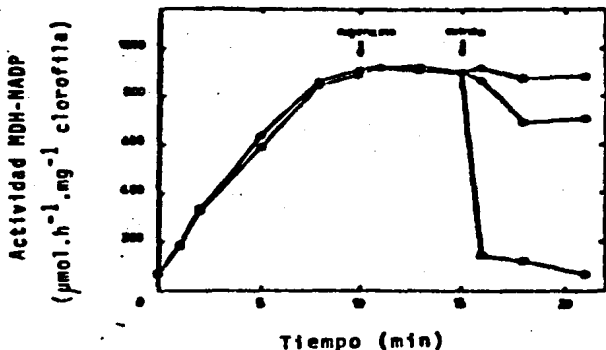


Figura 5.13. Influencia de nigericina ($3 \mu\text{M}$) y nitrito (2 mM) en la actividad de la MDH-NADP en cloroplastos iluminados del mesófilo de maíz en presencia de 5 mM de piruvato en presencia (■) o ausencia (○) de $1 \mu\text{M}$ de DCMU; (○), menos DCMU más nitrito; (□), más DCMU más nitrito. Redibujado de Leegood y Walker (1983).

Otro fenómeno interesante que se ha determinado para la MDH-NADP es su inhibición por NADP. Este efecto ha sido correlacionado con la fotorreducción del NADP a NADPH. De hecho hasta que se reduce el 75% del NADP añadido se inicia la activación por la luz. Los experimentos anteriores, al igual que los experimentos de competencia realizados por los mismos autores sugieren que el NADP compete en el mismo sitio de la enzima inactiva con la

tiorredoxina (Scheibe y Jacquot, 1983).

La activación por luz tiene 3 influencias potenciales. Podría actuar como un interruptor de la enzima en la luz y en la oscuridad. Podría funcionar como un mecanismo reversible para reparar el daño generado por oxidantes generados fotosintéticamente, como el H_2O_2 (Leegood y Walker, 1980), o puede proporcionar un control fino de la actividad enzimática a través de cambios en el pH del estroma o del estado redox de la enzima.

Por lo que respecta a la influencia de los desacoplates en la actividad enzimática indican que el efecto solo se manifiesta cuando el flujo de electrones es limitado por intensidades lumínicas bajas (Leegood y Walker, 1981). Esto podría ser parcialmente una consecuencia del efecto dual de los desacoplates, la disminución en el pH del estroma, el cual a su vez podría inhibir el mecanismo de activación (Heber et al., 1979) o el incremento en el flujo de electrones.

La luz puede ser reemplazada por un donador artificial de electrones, tal como el DTT, y en este caso el efecto inhibitorio del NADP se manifiesta de una manera más pronunciada (Scheibe y Jacquot, 1983).

En resumen, condiciones reductoras activan a la MDH-NADP, probablemente por la conversión de los grupos disulfuro a sulfhidrilo de la proteína, mientras que la inactivación requiere condiciones oxidantes (Hatch, 1973; Jacquot et al., 1981; Kagawa y Hatch, 1977). La incubación de la forma inactiva con DTT + tiorredoxina induce su rápida activación. In vivo, la función

aparente de la luz es generar reductores a través del flujo de electrones no cíclico, el cual media la activación de la enzima, a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa y/o el mediador del efecto lumínico unido a la membrana y la ferral-terrina (Anderson et al., 1981; Buchanan, 1981). En tanto que la presencia de una atmósfera inerte evita la pérdida de la actividad en la oscuridad (Nakamoto y Edwards, 1983).

La MDH-NADP no solo forma parte del ciclo de Hatch-Slack, sino que también tiene otras funciones, como la de sintetizar malato para el funcionamiento de las células guardias, las células que forman los estomas, la apertura por donde las hojas intercambian gases. Esta MDH-NADP también es regulada por luz como se puede apreciar en la figura 5.14.

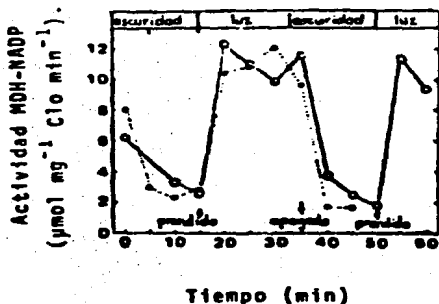


Figura 5.14. Activación por luz e inactivación de la MDH-NADP de células guardia de *Vicia faba*. (●) 5.9 µg cloroplasto; (○) 2.1 µg cloroplasto. Redibujado de Gotow et al. (1985).

La función de la MDH-NADP en las plantas C_3 se encuentra bien establecida, mientras que en las plantas C_4 esta función es menos clara. La velocidad de reducción del AOA dependiente de la luz medida bajo condiciones acoplantes en cloroplastos aislados a partir de la liberación de O_2 es mayor de 65 µmoles/mg cloroplasto x h

(Heber y Krause, 1971; Heber y Kirk, 1975).

Asumiendo, para los propósitos de discusión, que el AOA es reducido in vivo en las plantas C_3 a velocidades que se aproximan a aquellas mostradas para la liberación de O_2 bajo condiciones de acoplamiento en cloroplastos aislados, entonces el metabolismo del malato deberá estar acoplado a un sistema muy activo. Aún no se ha descrito un mecanismo de reducción del malato a las velocidades antes mencionadas en los cloroplastos de las plantas C_3 acoplado a su oxidación.

Muchos autores han propuesto que los equivalentes reductores que se encuentran en el malato generados por la luz pueden usarse en varias reacciones de reducción en el citoplasma (Heber, 1974; Krause y Heber, 1976; Walker, 1976). Por ejemplo, la reducción del nitrato, el cual se lleva a cabo en el citoplasma, es aumentado por la luz (Beever et al., 1965; Nicholas et al., 1976a; Sawhney et al., 1978). En vista de que la membrana del cloroplasto es impermeable a la Fd reducida y al NADPH, éstos no podrán servir directamente como reductores del nitrato. El hecho de que la membrana es libremente permeable al malato vía el translocador de los ácidos dicarboxílicos (Heldt y Rapley, 1970) y puesto que el malato exógeno aumenta la velocidad de reducción del nitrato en la hoja (Nezra y Hageman, 1976; Rathman, 1978) es posible que esta sea la vía por la cual la NR obtiene el poder reductor que necesita. De acuerdo con esta hipótesis el malato formado por la MDH-NADP acoplada a la luz es oxidado en el citoplasma vía una MDH-NADP. Por lo tanto, los equivalentes reductores generados por la luz son atrapados por el NAD^+ y se reduce a NADH, el cual a su

vez puede usarse en varias reacciones citoplásmicas. una de las cuales podría ser la reducción del nitrato (Fig. 5.15)

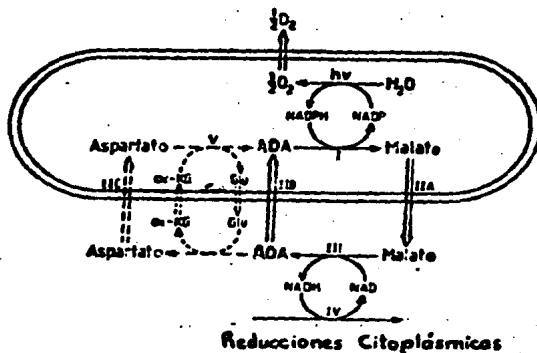


Figura 5.15. El conmutador de los ácidos dicarboxílicos C_4 , para la exportación de los equivalentes reductores generados en la luz en cloroplastos iluminados y su utilización en la reducción de sustratos citoplásmicos. Redibujado de Anderson (1981).

El AOA formado por la oxidación del malato en el citoplasma puede reciclarse al cloroplasto. Este mecanismo se conoce como el conmutador de los ácidos dicarboxílicos C_4 . (Heber, 1974; Krause y Heber, 1976; Walker, 1976).

Se ha propuesto otro mecanismo, conocido como el conmutador PGA/DHAP, el cual involucra la reducción dependiente de luz de PGA a DHAP dentro del cloroplasto y la oxidación de la DHAP dentro del cloroplasto y la oxidación de la DHAP a PGA en el citoplasma (Fig. 5.16) (Kelly y Gibbs, 1973).

PIRUVATO DICINASA

La piruvato dicinasa, la cual regenera al FEP en el ciclo de Hatch-Slack, también es una enzima activada por luz (Fig. 5.17) (Nakamoto y Edwards, 1983). Pero a diferencia de la MDH-

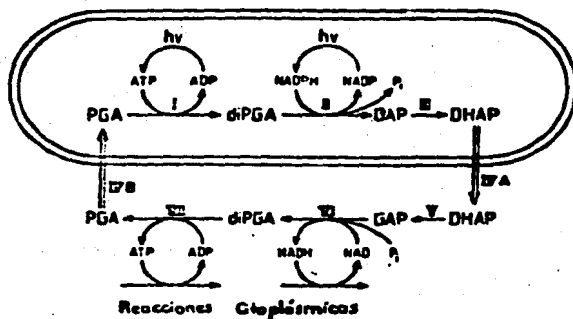
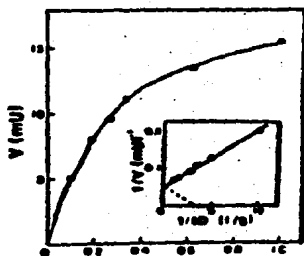


Figura 5.16. Conmutador del PGA-DHAP. Redibujado de Anderson (1981).

NADP. esta enzima puede ser activada en la ausencia de agentes reductores con el DTT, sugiriendo que no se requiere de la reducción/oxidación de la enzima durante el proceso de activación/inactivación, a pesar de que la activación está estrechamente ligada con el transporte de electrones fotosintético (Yamamoto et al., 1974).

Los adenín nucleótidos y el P_i parecen ser metabolitos claves en el control de la activación/inactivación de la enzima. El P_i se requiere para la activación, en tanto que el ATP, el ADP son requeridos para la inactivación (Fig. 5.18) (Chapman y Hatch, 1981; Nakamoto y Sugiyama, 1982).



dicinasa inactiva(g/l)

Figura 5.17. Velocidad de activación de la piruvato dicinasa. Redibujado de Nakamoto y Edwards (1983).

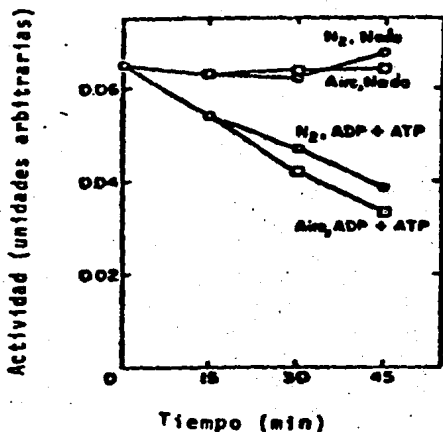


Figura 5.18. Mediación de los adenin nucleótidos en la inactivación de la piruvato dicinasa. Redibujado de Nakamoto y Edwards (1983).

El proceso de inactivación de la piruvato dicinasa también es una función de la presencia o ausencia de O_2 y de la tempera-

tura (Nakamoto y Edwards, 1982). Como ya se mencionó, el mecanismo de activación/inactivación de las enzimas aisladas es a través de un proceso de reducción/oxidación el cual involucra la interconversión de los grupos tiol/disulfuro de la enzima. *In vivo*, en la luz, el poder reductor del transporte de electrones fotosintético es aparentemente utilizado para activar a las enzimas. En la oscuridad, esta fuente de poder reductor no se puede utilizar y entonces la enzima se oxida a través de un factor protéico, posiblemente la tiorredoxina, con O_2 como aceptor final de los electrones. Por lo que en la oscuridad, bajo condiciones anaeróbicas, la enzima podría mantenerse en un estado reducido o sea activa.

El hecho de que el estado activo de la enzima en la oscuridad en presencia de N_2 tienda a incrementarse arriba del estado de preiluminación, sugiere que hay un reductor en el cloroplasto capaz de activar a la enzima, o que este incremento en el nivel de activación en la oscuridad esté asociada con un incremento en el nivel de piridín nucleótidos reducidos en el cloroplasto bajo condiciones anaeróbicas inciertas, los cuales pueden servir como fuente de poder reductor, como ha sido demostrado por Leegood y Walker (1981) para la FDP.

NITRATO REDUCTASA

La luz tiene un efecto estimulatorio en la actividad de la nitrato reductasa en las plantas y tanto la intensidad como la duración de la luz afectan su actividad. Beevers y Hageman (1969) han demostrado que hay una disminución en la cantidad extraída de

NR cuando las plantas fueron puestas en la oscuridad. Beevers y Hageman (1972) también sugirieron que la luz podría afectar la rapidez y utilización del nitrato por cambios en la permeabilidad de la membrana de las células.

Se sabe que la luz estimula la inducción de la NR a través de un incremento en la síntesis de proteínas (Beevers y Hageman, 1972; Travis et al., 1970a, 1970b; Zielke y Filner, 1971).

La temperatura es otro factor que modifica la respuesta de la actividad de la NR en la oscuridad. Bajas temperaturas disminuyen la velocidad de pérdida de actividad de la NR cuando las plantas son expuestas a la oscuridad (Figura 5.19-A). Otro factor que se requiere para la actividad máxima de la NR *in vivo* es la presencia del ión fosfato, como puede apreciarse en la tabla 5.4 (Nicholas et al., 1976a).

La velocidad en el incremento de la actividad de la NR *in vivo* por un periodo de 4 h de luz fue independiente de la temperatura (20, 30 y 40°C) (Figura 5.19-B) (Nicholas et al., 1976a).

La actividad de la NR también es una función de la intensidad y duración de la luz en las plantas pretratadas por 16 h a 30°C en la oscuridad (Fig. 5.20 y 5.21). Bajo altas intensidades de luz (48 klux), la actividad de la NR se incrementó 5 veces en 1 h y 3 veces después de 4 h. Los tratamientos con bajas (6 klux) y medias intensidades de luz (16 klux) tan solo produjeron 3 y 5 veces de incremento en la actividad de la NR respectivamente. Las plantas expuestas a bajas intensidades de luz exhibieron un incremento en las velocidades de la actividad de la enzima cuando

éstas fueron subsecuentemente expuestas a altas intensidades luminicas (Fig. 5.21). A la inversa, plantas expuestas inicialmente a altas intensidades luminicas rápidamente perdieron la actividad de NR cuando se cambiaron a bajas intensidades luminicas (Nicholas, 1976a).

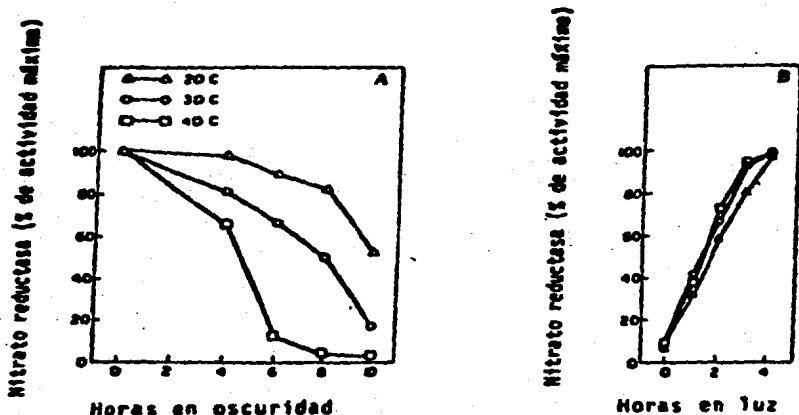


Figura 5.19. A) Efecto de la temperatura *in vivo* en la actividad de la NR en la oscuridad, la actividad máxima fue de 20.2 $\mu\text{moles NO}_2/\text{g PF} \times \text{h}$; B) Efecto de la temperatura *in vivo* en la actividad de la NR durante un periodo de 16 h a 30°C. La actividad máxima fue de 19.1 $\mu\text{moles NO}_2/\text{g PF} \times \text{h}$. Redibujado de Nicholas et al. (1976a).

La disminución *in vivo* de la actividad de la NR durante el periodo de oscuridad y el rápido incremento que sigue al inicio de la iluminación, sugiere que otros factores además de la síntesis de proteínas podrían estar afectando parcialmente la medida de las velocidades *in vivo* de la NR. Otra respuesta a la luz que podría afectar la actividad de la NR es la generación de reductores (NADH) por la vía del proceso fotosintético o por la asimila-

lación de productos de carbono en la vía glucolítica o en el ciclo de Krebs (Klepper et al., 1971).

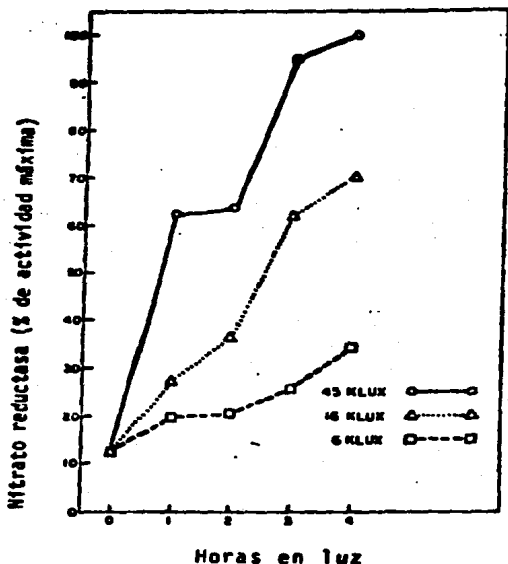


Figura 5.20. Velocidad del incremento de la actividad *in vivo* de la NR en respuesta a varias intensidades de luz seguido de un periodo de oscuridad de 16 h a 30°C. La actividad máxima fue de 25.3 μ moles $\text{NO}_2^-/\text{g PF} \times \text{h}$. Redibujado de Nicholas et al. (1976a).

Una tercera respuesta a la luz la cual podría afectar la actividad de la NR podría ser el incremento de la disponibilidad de nitrato en un macronivel (incremento de la cantidad de nitrato tomado por la planta) o en un micronivel (movimiento de los sustratos al sitio de reducción) (Ferrari et al., 1973).

Si el efecto de la luz fuera por una falta de poder reductor, la adición de éste en forma exógena podría subsanar este defecto. Nicholas et al. (1976b) adicionaron NADH al medio de ensayo *in vivo*, incrementándose significativamente la actividad

de la NR en soya pretratada en la oscuridad por 10 h a 20°C o por 10 h a 30°C (tabla 5.5). Por otro lado la adición de piruvato,

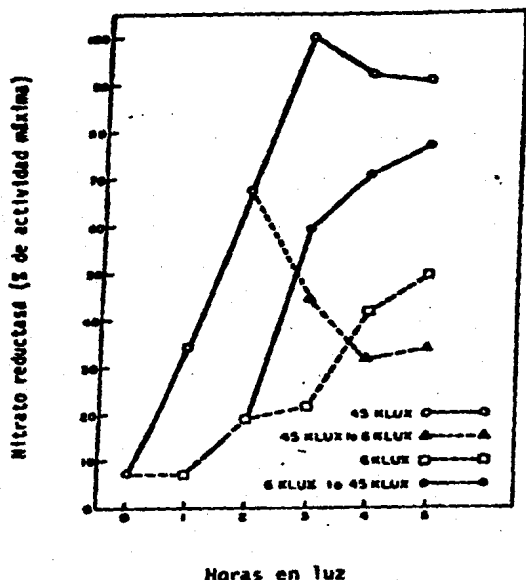


Figura 5.21. Respuesta de la actividad de NR *in vivo* a cambios en la intensidad de luz. Las plantas fueron cambiadas de alta a baja intensidad luminica y de baja a alta intensidad luminica después de 2 h de iluminación. Las plantas fueron previamente puestas en la oscuridad por 16 h a 30°C. La luz fue prendida al tiempo cero. La actividad máxima fue de 20.9 $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g FF} \times \text{h}$. Radibujado de Nicholas et al. (1976a).

citrateo, succinato o malato estimulan la actividad de la NR *in vivo* de la misma manera que la glucosa (tabla 5.6), lo que sugiere que estos compuestos podrían generar el poder reductor requerido para el funcionamiento de la NR. (Klepper et al., 1971) ya que como se sabe la membrana mitocondrial es impermeable al NADH, sin olvidar desde luego que el poder reductor que se encuentra en la mitocondria podría encontrarse disponible en el citoplasma mediante el conmutador malato-aspartato (Lehninger, 1975). Esto en el caso de los tejidos no fotosintéticos. En el

caso de los tejidos fotosintéticos el poder reductor puede ser extraído del cloroplasto mediante el convertidor del malato/oxalato como lo muestran los datos de House y Anderson (1979) (Figura 5.22).

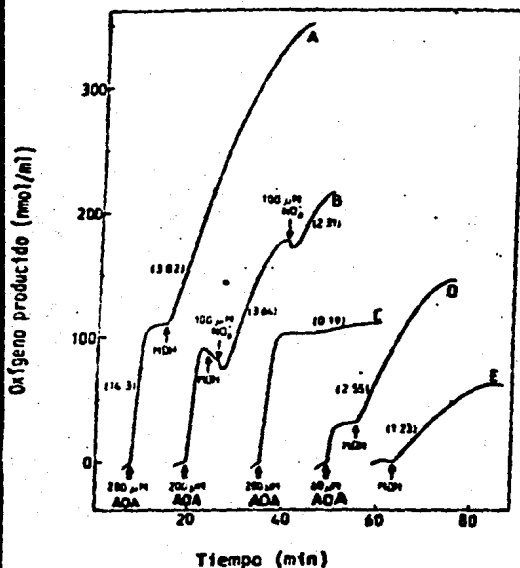


Figura 5.22. Efecto de la MDH-NAD, AOA y NO_2^- en la liberación de O_2 por cloroplastos de chícharo iluminados en la presencia de NR y NAD. Las mezclas de incubación A-E inicialmente contenían cloroplastos (200 μg clo/ml, 69% intactos), NR (0.015 unidades/ml), 1 mM de NAD y 10 mM de DL-gliceraldehído en el medio de incubación de cloroplastos. Además, todas las mezclas de incubación excepto B contenían inicialmente 1 mM de NaN_3 . Las demás adiciones fueron hechas como se muestra. Los valores en paréntesis al lado de las curvas denotan la velocidad de liberación de O_2 en $\mu\text{moles/mg clo} \times \text{h}$. Redibujado de House y Anderson (1980).

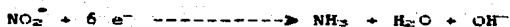
NITRITO REDUCTASA

La nitrato reductasa se encuentra localizada en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos y en los plástidos de las células de las raíces. Tanto la NR como la NiR se encuentran localizadas en las células del mesófilo de las plantas C. (tabla 5.7), es decir en las células en las que se encuentra presente la

fosfoenolpiruvato carboxilasa y en las que se produce la mayor parte del poder reductor en este tipo de plantas (Moore y Black, 1979).

Moore y Black (1979) han determinado que las células del mesófilo de plantas C₃ reducen NO₂⁻ acoplado a la producción fotoquímica de O₂. Esta liberación de O₂ dependiente de NO₂⁻ es dependiente de la luz y es inhibida por la 3-(3, 4-diclorofenil)-1, 1-dimetilurea y estimulada por desacoplantes de la fotofosforilación (Fig. 5.23). La temperatura óptima para que se lleve a cabo este proceso con células aisladas del mesófilo es de 40°C, el pH óptimo de 7.5 y la saturación por luz se alcanza alrededor de 1.5 x 10²² erg/cm² x seg.

La explicación a este fenómeno podría ser que el NO₂⁻ actuara como un aceptor, alterno al NADPH de los electrones provenientes de la cadena fotosintética oxidando de esta manera a la ferredoxina.



La presencia de fosfoenolpiruvato incrementa el consumo de oxígeno durante la reducción del NO₂⁻, lo que sugiere que la carboxilación del PEP o la subsecuente reducción del ácido oxalacético compiten por el poder reductor producido fotosintéticamente.

GLUTAMINO SINTETASA

La glutamino sintetasa cataliza la formación de glutamina a partir de amoníaco y ácido glutámico en cloroplastos de chícharo en una reacción que depende de la luz (Mitchell y Stocking, 1975) y que es inhibida por CCCP. Sin embargo, parece ser que dependiendo del origen del amoníaco, endógeno o exógeno la reacción es o no dependiente de la luz (Ito et al., 1977).

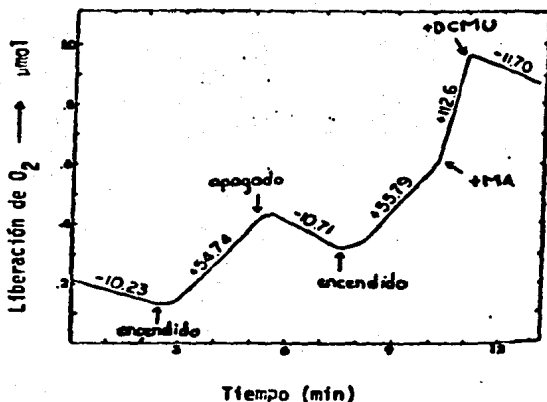


Figura 5.23. Patrón típico de cambio de O₂ en células del mesófilo aisladas de hierba rastrera en presencia de 10 mM de NO₂⁻. El encendido y apagado se refiere a los valores de iluminación en cada línea y está referido a μmoles de O₂ cambiado/mg clo x h: el MA fue adicionado a una concentración de 15 μM y el DCMU a 10 μM. Redibujado de Moore y Black (1979).

Mitchell y Stocking (1975) demostraron que cloroplastos aislados de chícharo fueron capaces de convertir ácido glutámico en glutamina en la luz a una velocidad de 21 μmoles glutamina/mg clo x h. (Fig. 5.24).

Los cloroplastos aislados son capaces de producir glutamina, si bien a muy bajas velocidades, en ausencia de amonio lo que indica la presencia en el cloroplasto de una poza de nitrógeno disponible para la GS (Fig. 5.25). Cuando se adiciona amonio en forma exógena, la producción de glutamina se ve estimulada, alcanzando un máximo a 1 mM de amonio (Fig. 5.25). La adición exógena de ácido glutámico también estimula la formación de glutamina en este sistema (Fig. 5.26).

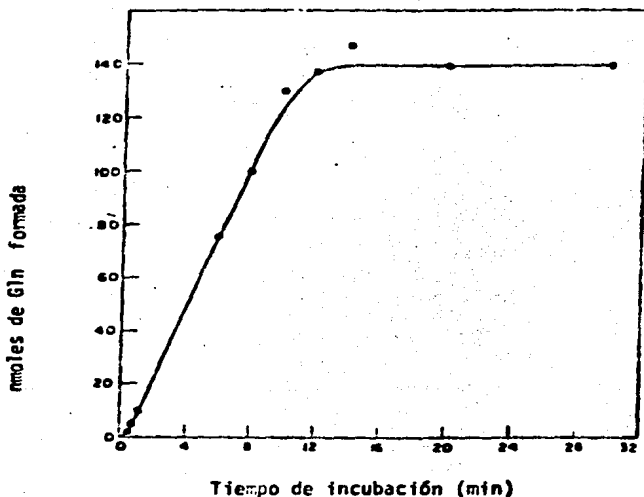


Figura 5.24. Curso del tiempo de la síntesis de glutamina por cloroplastos aislados intactos de chícharo a 25°C y 2.400 ft-C. La mezcla de incubación contenía 6.25 μ moles de glutamato monosódico, 0.125 μ moles de NH₄Cl, 0.31 μ Ci de ¹⁴C-glutamato purificado, cloroplastos equivalentes a 35.5 μ g de clo y solución C a un volumen final de 0.125 ml. El porcentaje de plástidos intactos fue de 54.6%. Redibujado de Mitchell y Stocking (1975).

La formación de glutamina puede llevarse a cabo en la oscuridad, si bien a muy bajas velocidades (tabla 5), en presencia o en ausencia de una fuente exógena de nitrógeno. La luz estimula alrededor de 8 veces la síntesis de glutamina en relación al control en la oscuridad en ausencia de amonio exógeno, cuando se adiciona amonio exógeno (1 mM) el incremento en la síntesis de glutamina llega a 22 veces (tabla 5.8) (Mitchell y Stocking, 1975).

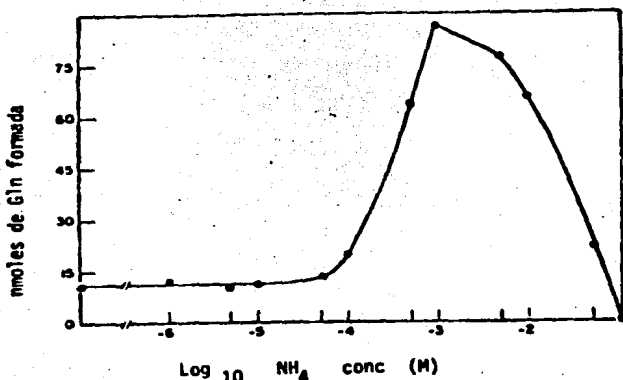


Figura 5.25. Efecto de la concentración de NH_4 en la síntesis de glutamina por 2 min a 25°C y 2,400 ft-C en cloroplastos intactos aislados de chícharo. La mezcla de incubación contenía 6.25 μmoles de glutamato monosódico, 0.34 μCi de ^{14}C -glutamato, diferentes concentraciones de NH_4 , cloroplastos equivalentes a 25.2 μg clo y solución C a un volumen final de 0.125 ml. El porcentaje de cloroplastos intactos en la suspensión fue de 71%. Redibujado de Mitchell y Stocking (1975).

Que la síntesis de glutamina es un proceso dependiente de la luz lo demuestran los experimentos de la tabla 5.8. La sacilalido-

xima (2 mM), un inhibidor de la fotofosforilación cíclica, en presencia de luz roja pero no en presencia de luz blanca inhibe la síntesis de glutamina en forma significativa. Estos datos sugieren que el ATP no cíclico es uno de los factores involucrados en la síntesis de la glutamina. El DCMU, un inhibidor específico del fotosistema II (0.2 μ M), inhibió la producción de oxígeno en un 85% y la síntesis de glutamina en un 25% en luz blanca, mientras que el CCCP (10 μ M) inhibe completamente la síntesis de glutamina tanto en la luz blanca como en la luz roja (Mitchell y Stocking, 1974). En el modelo mostrado en la figura 5.27 se resumen los resultados que muestran el control de la síntesis de glutamina por la luz.

GLUTAMATO SINTASA

La glutamato sintasa cataliza la reacción de síntesis del ácido glutámico a partir de glutamina y ácido alpha-cetoglutarico utilizando un donador de electrones, que puede ser la ferradoxina o el NAD(P)H. Esta es una reacción que también depende de la luz, como lo demuestra el hecho de que cloroplastos intactos aislados de chicharo catalizan la transaminación reductiva del ácido alpha-cetoglutarico por la glutamina y forman dos moléculas de ácido glutámico con la liberación concomitante de 0.5 moles de O_2 (Fig. 5.28) (Dauson y Anderson, 1980).

La reacción, dependiente de la luz, de síntesis del ácido glutámico a partir de la glutamina es inhibida por azaserina (2 mM) y el MSU (0.5 mM) disminuye la velocidad de liberación del O_2 en 63% y cesa completamente después de 16 minutos. La subsecuente

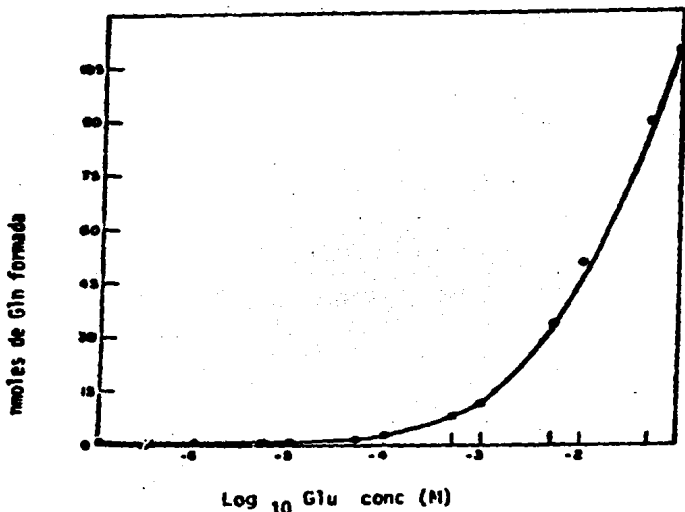


Figura 5.26 Efecto de la concentración de ácido glutámico en la síntesis de glutamina durante 8 min a 25°C y 2,400 ft-C por cloroplastos intactos aislados de chícharo. La mezcla de incubación contenía 0.125 μ moles de NH_4Cl , 0.30 μCi de ^{14}C -glutamato purificado, un rango variable de glutamato monoacídico, cloroplastos equivalentes a 25.4 μg clo y solución C hasta un volumen final de 0.125 ml. El porcentaje de cloroplastos intactos en la suspensión fue de 53.6%. Redibujado de Mitchell y Stocking (1975).

adición de 2 mM de glutamina reinicia la liberación de O_2 (Fig. 5.29) (Dauson y Anderson, 1980).

METABOLISMO DEL AZUFRE

Cloroplastos aislados de espinaca son capaces de reducir el sulfato a sulfito en la luz cuando se añade al sistema ADP, NADP⁺, Fd y glutatión, en tanto que en la oscuridad los extractos

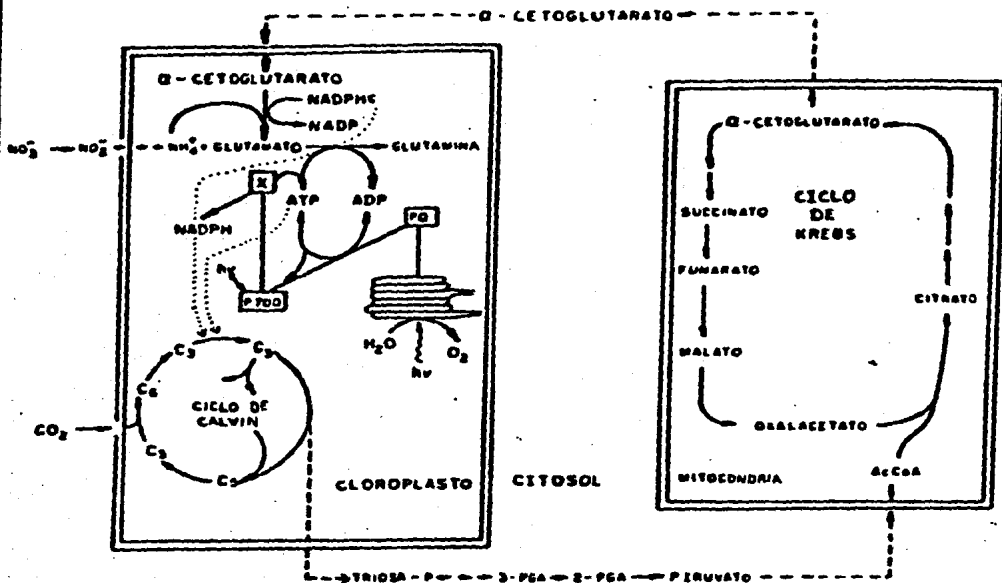


Figura 5.27. Esquema hipotético de la síntesis de glutamina en los cloroplastos, incluye la parte energética y la procedencia de los esqueletos carbonados y del nitrógeno. Redibujado de Mitchell y Stocking (1975).

cloroplásticos son capaces de llevar a cabo la misma reacción si se añade ATP y glutación reducido. Ni la Fd ni el NADPH son necesarios para llevar a cabo la reacción en la oscuridad (Schmidt y Trebst, 1969). La reacción en la luz es inhibida por DCMU (2 μM) (Hock y Anderson, 1978).

La evidencia actual sugiere que el sulfato es activado con ATP, mediante la adenosin-fosfosulfato cinasa, produciendo fosfoadenosin fosfosulfato, el cual es reducido a sulfito, reacción

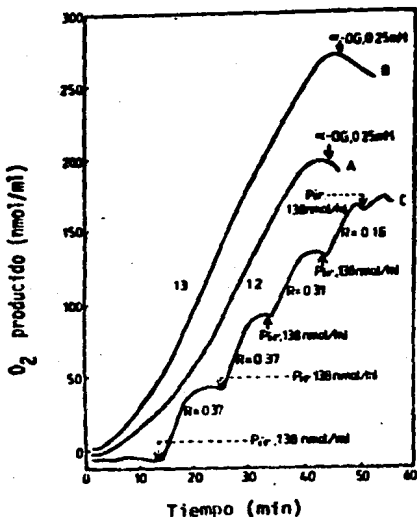


Figura 5.28. Curso del tiempo de liberación del O_2 por cloroplastos iluminados en presencia de 5 mM de glutamina, 0.5 mM de MSO y componente C. A, sin suplementos adicionales (condición 1); B, con 0.25 mM de 2-oxoglutarato (condición 1a); C, igual que para A pero carece inicialmente de piruvato (pir). Las otras adiciones se hicieron como se indica. Redibujado de Dawson y Anderson (1980).

catalizada por la sulforilasa. (Fig. 5.30) y éste a su vez, por medio de una sulfito reductasa dependiente de Fd, es convertido en sulfuro el cual es entonces incorporado en la cisteína.

En la luz, el factor reductor parece ser la Fd, sin embargo ésta puede ser sustituida por glutatión ó NADPH, sugiriendo que la Fd solo es requerida para la reducción fotosintética del $NADP^+$, como se muestra en el diagrama de la figura 5.31.

Desde el punto de vista cuantitativo, la función más importante de la reducción del sulfato es producir cisteína. ésta es producida por sulfhidrilación, con sulfuro, de la o-acetil-L-serina. Esta reacción es catalizada por la o-acetilserina sulfhidrilasa. En las plantas superiores esta enzima se encuentra

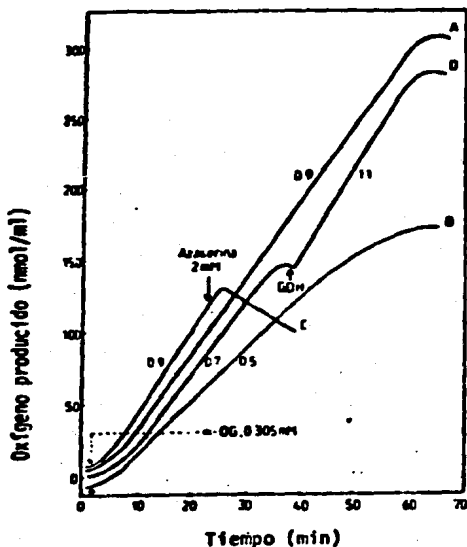


Figura 5.29. Algunas propiedades de la liberación de O_2 por cloroplastos iluminados en presencia de 1 mM de NH_3 y 0.305 mM de 2-oxoglutarato y componente C (condición 3). Los experimentos B y D inicialmente carecían de NH_3 y de GDH-NAD respectivamente. Las adiciones posteriores fueron hechas como se muestra. El porcentaje de cloroplastos aislados en A-D fue de 86%. Redibujado de Dawson y Anderson (1980).

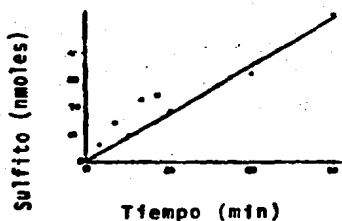


Figura 5.30. Cinética de la reducción del sulfato por extractos cloroplásticos. Redibujado de Schmidt y Trebat (1969).

localizada aparentemente en el citoplasma, sin embargo como ya se mencionó los cloroplastos aislados son capaces de reducir al sulfato y de sintetizar cisteína. Esta controversia ha sido resuelta recientemente por Faulkhauser et al. (1976) quienes de-

terminaron que en realidad existen dos isoenzimas, una en el cloroplasto y otra en el citoplasma.

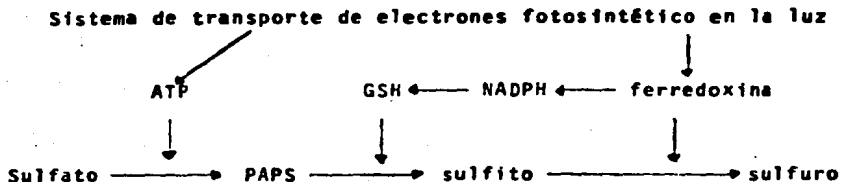


Figura 5.31. Diagrama que muestra la reducción del sulfato a sulfuro. Redibujado de Schmidt y Trebat (1969).

En *Chlamydomonas reinhardtii* la APS-cinasa es una enzima activada por la luz a través de la tiorredoxina f a través de un mecanismo similar al de las plantas superiores (Schwenn y Schriek, 1984).

Los cloroplastos de chícharo aislados son capaces también, en una reacción análoga a la de la reducción del sulfato, de reducir SeO_2^{2-} y de sintetizar selenocisteína. Esta reacción también es dependiente de luz y es inhibida por DCMU ($2 \mu\text{M}$) y por Na_2SO_3 (0.5 mM) 92 y 26% respectivamente (Ng y Anderson, 1979). Sin embargo ambos mecanismos son diferentes, ya que la luz es requerida a diferentes niveles de ambas reacciones.

El grupo de Anderson también ha demostrado de una manera muy elegante que el S^{2-} es incorporado rápidamente en la cisteína

(Fig. 5.32) (Ng y Anderson. 1979).

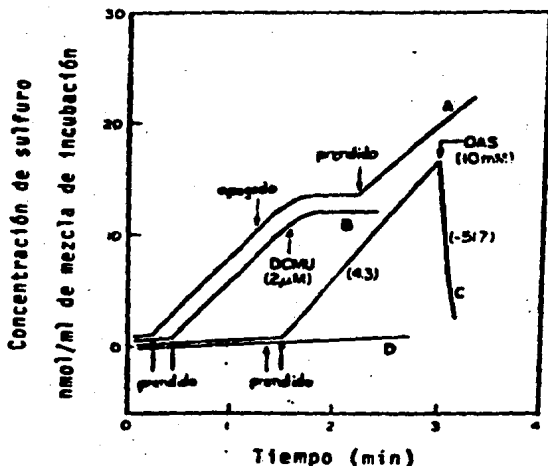


Figura 5.32. Efecto del OAS, DCMU y de la luz en la producción de S^{2-} dependiente de SO_3^{2-} por cloroplastos intactos de chícharo. Redibujado de Ng y Anderson (1979).

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Existen dos formas de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que es la primera enzima de la vía de las pentosas fosfato, una en el cloroplasto y otra en el citoplasma, y a diferencia de las enzimas hasta ahora analizadas, la luz no la activa, sino que inactiva a ambas isoenzimas. Este efecto puede ser inhibido por DCMU, sugiriendo muy claramente que el aparato fotosintético está involucrado en este fenómeno (Anderson y Mehrlich, 1977). Esta enzima también puede ser inactivada *in vitro* por DTT y tioredoxina y reactivada por H_2O_2 , lo que

sugiere que la activación en la oscuridad puede involucrar la oxidación de los grupos SH por el H_2O_2 , los cuales habían sido previamente reducidos en la luz por alguno de los mediadores del efecto lumínico (Brennan y Anderson, 1980)

Si bien por algún tiempo la función del H_2O_2 fue materia de controversia a cerca de su función en la activación de la G6PD, los experimentos de la figura 5.33 realizados por el grupo de Anderson han dejado claro que sí puede ser el activador de esta enzima *in vivo* en los cloroplastos (Brennan y Anderson, 1980). Además está bastante bien establecido que el H_2O_2 se produce en el cloroplasto (Elstner y Frommeyer, 1978). Un posible mecanismo de este efecto pudiera ser que el H_2O_2 convierta al glutatión de su forma reducida al estado oxidado y este glutatión oxidado, a su vez, oxide a la enzima. Este mecanismo implica que los niveles de glutatión oxidado/reducido cambiarán drásticamente en la luz/oscuridad, según el mecanismo propuesto por Wolosiuk y Buchanan (1977) (Fig. 5.34). Halliwell y Foyer (1978) han medido estos niveles en el cloroplasto y sus datos indican que dichos niveles no son función de la presencia o ausencia de luz lo que sugiere que la acción del H_2O_2 puede ser una oxidación directa de la enzima. También se ha propuesto que la enzima se asocie y disocie de la membrana del tilacoide por efecto de la luz, regulando de esta manera su actividad (Ben-Bassat y Anderson, 1981). En esta asociación/disociación de la membrana podría estar involucrada la tiorredoxina, siendo éste el compuesto que oxidara a la enzima, y no el H_2O_2 (Scheibe y Anderson, 1981).

En el caso de la enzima del citoplasma, que también es

inactivada por la luz. se ha propuesto que existe una proteína que media este efecto (Anderson y Nehrlich, 1977).

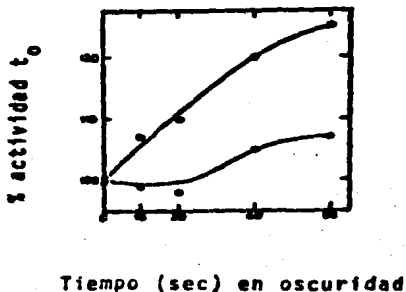


Figura 5.33. Curso en el tiempo de la activación en la oscuridad de la G6PD con (●) y sin (○) catalasa (7500 unidades) en cloroplastos de hoja de chicharo. Redibujado de Brennan y Anderson (1980).

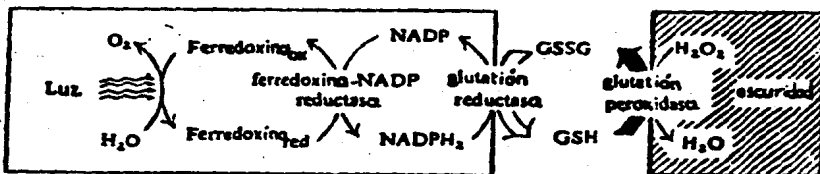


Figura 5.34. Mecanismo propuesto para el control de la relación de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en los cloroplastos. Redibujado de Wolosiuk y Buchanan (1977).

PROTEIN CINASA

Cloroplastos intactos aislados incorporan ³²P-ortofosfato en algunos polipéptidos en el rango de 7.000 a 70.000 daltones de

peso molecular (Bennet, 1977). Las 3 fosfoproteínas más abundantes están unidas a la membrana del tilacoide y comprenden un péptido de 9.000 daltones y dos más de alrededor de 26.000 daltones. Estos 2 péptidos forman parte del complejo proteico-colector de luz (Bennet, 1979). El marcado de las fosfoproteínas con ^{32}P -ortofosfato es dependiente de la luz en cloroplastos intactos (Fig. 5.35) (Bennett, 1977). Las proteínas cinasas utilizan ATP como el donador del fosfato en los experimentos *in vitro*. Un paso obvio dependiente de la luz en el marcaje de las fosfoproteínas en los cloroplastos a partir de ^{32}P -ortofosfato es la generación de ^{32}P -ATP en los organelos intactos. El hecho de que un desacoplante, el CCCP, inhiba el marcado de las fosfoproteínas (Fig. 5.35) (Bennet, 1977) sugiere que la fotofosforilación tiene una función importante en este proceso. Sin embargo, cuando la actividad de la proteína cinasa es ensayada en cloroplastos osmóticamente chocados o en tilacoides aislados, usando ^{32}P -ATP exógeno como donador del grupo fosforilo, la fosforilación de las proteínas es insensible al CCCP, pero aún es dependiente de la luz. Por otro lado el DCMU inhibe la activación de la proteína cinasa, sugiriendo que el transporte de electrones está involucrado en la activación de esta enzima. Una evidencia experimental que apoya esta hipótesis es la de que la Fd y el NADPH promueven la actividad de esta enzima en la oscuridad (Bennett, 1979a).

Todas las reacciones de fosforilación de las proteínas de los tilacoides son por igual dependientes de la luz. Esto indica o que las moléculas de proteína cinasa son fotoactivadas

independientemente de su sustrato, o que todos los sustratos son sometidos a cambios conformacionales, dependientes del transporte de electrones, que exponen los sitios donde deben ser fosforilados.

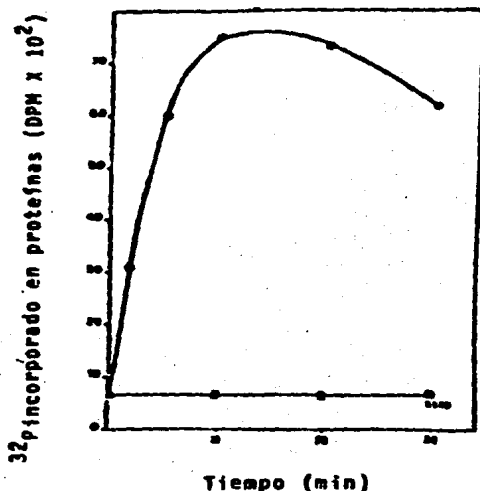


Figura 5.35. Cinética de incorporación de ^{32}P -ortofosfato en las proteínas de cloroplastos de *Euglena* en la luz (O), en la luz en presencia de CCCP (□) o en la oscuridad (●). Redibujado de Béliveau y Bellemare (1979)

La presencia de inhibidores del transporte de electrones y los desacoplantes, no solo inhiben la fotosfosforilación de las proteínas, sino que promueven su desfosforilación. Lo que indica que no solo las protein cinasas, sino que también las fosfoprotein fosfatases están reguladas por la luz (Bennett,

1979b).

SINTESIS DE ACIDOS GRASOS

Cloroplastos aislados son capaces de sintetizar Acidos grasos tanto en la oscuridad como en la luz en un proceso que es dependiente del pH (Fig. 5.36-A) y de la concentración de Mg^{2+} y es inhibida por la presencia de DTT (Fig. 5.36-B).

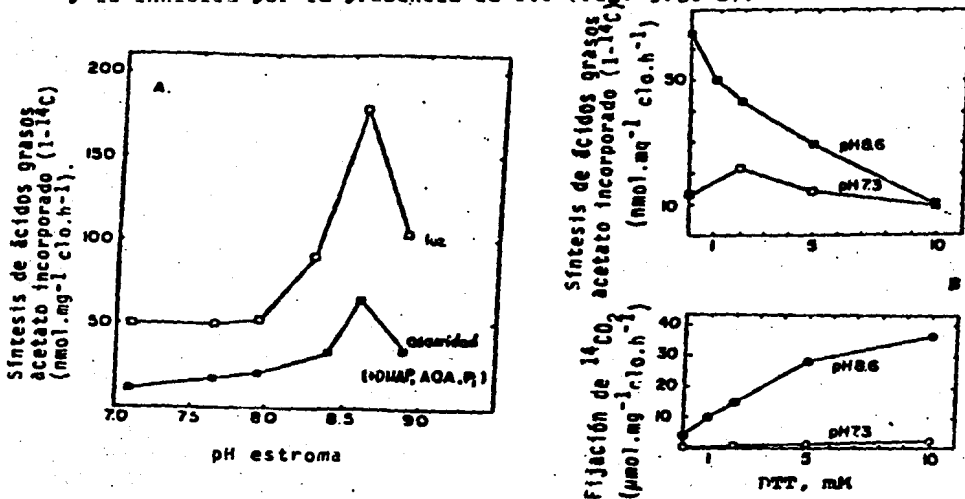


Figura 5.36. A) Síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetato por cloroplastos de espinaca como una función del pH en la luz (\square) y en la oscuridad (\blacksquare). B) Efecto del incremento en la concentración del DTT en la velocidad de síntesis de los ácidos grasos. Redibujado de Sauer y Heise (1983).

ATPasa

La ATPasa, que es la enzima que sintetiza ATP tanto en la mitocondria como en los cloroplastos, también es regulada por

luz, como lo demuestran los experimentos de Muchzermeier y Willms (1986). Estos autores han propuesto que la velocidad del transporte de electrones es quien regula la actividad del componente CF₁ de la ATPasa, a través del PS-I y de una interacción entre proteínas vecinas en las membranas de los tilacoides.

Tabla 5.1. Valores en la oscuridad y en la luz (30 min de iluminación) de la GFDasa en extractos de hoja de *Eisum sativum* silvestres y mutantes. Como medida se utilizó el consumo de NADPH en $\mu\text{mol/mg}$ proteína x min.

Tipo de planta	Oscuridad	Luz	Proporción luz/oscuridad
Planta verde I	0.050	0.243	4.00
II	0.072	0.243	3.38
III	0.074	0.248	3.33
Planta blanca I	0.062	0.070	1.10
II	0.079	0.064	0.81
III	0.079	0.071	0.90

Datos de Ziegler y Ziegler (1956).

Tabla 5.2. Efecto del DCMU y la salicilaldoxima (SAD) a diferentes concentraciones en el aumento de la actividad de la GFDasa en *Limnaea gibba* por medio de la luz (Ziegler y Ziegler, 1966).

Tratamiento	Actividad oscuridad/luz	Retardo del incremento en la luz (%)
Control	1/1.16	0
DCMU 10^{-6}	1/1.32	50
10^{-5}	1/1	100
10^{-4}	1/1	100
Control	1/1.17	0
SAD 10^{-5}	1/1.32	56
10^{-4}	1/1.20	72
5×10^{-4}	1/1	100

Tabla 5.3. Requerimiento para la activación por ferredoxina del componente alcalino de la FDPasa del cloroplasto. Buchanan et al. (1971).

Tratamiento	Pi liberado (μ moles)
Completo	4.0
Glutación reducido omitido	1.4
Ferredoxina omitida	0.1
Componente de la FDPasa alcalino omitido	0.1
MgCl ₂ omitido	0.1
Factor protéico omitido	0.0
Fructosa difosfato omitido	0.0
Completo, Fd no reducida (oscuridad)	0.1

Tabla 5.4. Efecto de diferentes parámetros durante el ensayo de la actividad de la NR *in vivo*. En cada una de estas 3 series de datos los medios de ensayo contra los cuales se probaron varios componentes fue amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH 7.5, KNO₃ 50 mM y 1X (v/v) 1-propanol. La actividad de la NR está expresada como por ciento del máximo más/menos la desviación estándar. El rango para los tratamientos individuales con 100X de la actividad máxima estuvo en el rango de 20 a 25 $\mu\text{mol NO}_2^-$ (g peso fresco, h⁻¹). Datos de Nicholas et al. (1976b).

pH	Actividad NR (%)	P1 (mM)	Actividad NR (%)	NO ₂ (mM)	Actividad NR (%)
5.5	61.3 + 0.5	0	71.7 + 0.6	0	65.2 + 1.6
6.0	78.1 + 1.5	1	80.8 + 1.6	10	93.2 + 2.2
6.5	82.6 + 3.4	10	88.9 + 1.8	25	100.0 + 2.8
7.0	99.3 + 1.4	100	100.0 + 0.5	50	98.6 + 1.9
7.5	100.0 + 2.2	250	97.5 + 1.6	100	91.1 + 1.3
8.0	95.2 + 2.4	500	83.2 + 4.0	200	63.6 + 4.2

Tabla 5.5. Efecto de la glucosa, NAD⁺ y NADH sobre la actividad de la NR *in vivo* en presencia de NO₃⁻ comparada con la actividad de la NR *in vitro*. Nicholas et al. (1976b).

Ensayos <i>in vivo</i>			Pretratamientos			
Adiciones			10 h 20°C osc		10 h 30°C osc	
glucosa	NAD	NADH	seguido de 4 h 30°C luz			
100	(0.5 mg/ml)		µmoles NO ₃ ⁻ (g PP, h) ⁻¹			
-	-	-	12.85	28.12	7.14	24.75
-	+	-	12.86	29.33	6.33	25.16
-	-	+	12.44	30.63	7.37	25.82
+	-	-	17.58	27.13	13.96	21.86
+	+	-	17.57	28.44	13.83	23.78
+	-	+	17.90	29.49	14.62	24.47
Ensayos <i>in vitro</i>			38.99	43.15	21.81	35.07
LSD (0.05)			1.77	1.80	2.92	2.13

Tabla 5.6. Efecto de diferentes concentraciones de metabolitos intermediarios sobre la actividad de la NR en presencia de NO_2^- in vivo. Nicholas et al. (1976b).

Nitrato (mM)	Glucosa	Piruvato $\mu\text{moles NO}_2^-$	Citrato (g PF/h)	Succinato	Malato
0	3.84	3.18	3.52	3.04	4.53
10	17.77	3.88	4.19	3.89	4.89
100	20.27	9.73	9.73	8.73	10.55
200	24.32	10.34	10.17	9.66	12.53
LSD (0.05)	1.94	0.87	0.92	0.47	0.99

Tabla 5.7. Localización y actividad de las enzimas de asimilación del nitrógeno en hojas de hierba rastrera. Moore y Black (1979).

Enzima	Hoja integra	Células del mesófilo	Células de la vaina	Células de los dos tejidos
µmoles producto/mg clo x h				
NR	5.1	8.3	ND ¹	40.3
NIR	25.7	39.4	ND	20.2
GS	44.2	33.6	45.6	38.8
GS	10.1	6.5	13.9	8.0
GDH-NADH	16.7	4.1	28.3	12.7
GDH-NADPH	6.3	1.1	11.1	7.1

¹ND = No detectada

Solución C. Sorbitol 0.33M, NaNO₂ 20 mM, Na₂EDTA 20 mM, ascorbato de sodio 2 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, K₂HPO₄, pH 7.6, HEPES 50 mM y Na₂P₂O₇, 10H₂O.

Tabla 5.8. Efecto de la luz, la oscuridad y el nitrógeno exógeno en la síntesis de glutamina por cloroplastos íntegros, aislados de chícharo. Mitchell y Stocking (1975).

Fuente de nitrógeno	Oscuridad (A)	Luz (B)	Luz/ estimu- lada	B-A para 100% de plástidos íntactos
	$\mu\text{moles gln formada mg clo}^{-1} \text{ h}^{-1}$			
Nada	0.23	1.84	1.61	2.69
Amonio 10^{-3} M	0.35	7.96	7.61	12.71
Nitrito 10^{-3} M	0.27	4.27	4.00	6.67

Tabla 5.9. Acoplamiento entre la síntesis de glutamina y la fotosforilación en cloroplastos íntegros aislados. Mitchell y Stocking (1975).

Tratamiento	Luz incandescente		Luz roja lejana	
	gln (mmol)	Inhibición (%)	gln (mmol)	Inhibición (%)
Control	39.6	---	42.8	---
SAD 2×10^{-4}	38.3	3.3	33.0	22.9
DCMU 2×10^{-7}	29.4	25.7	43.8	0.0
DCMU 1×10^{-5}	0.0	100.0	0.0	100.0

C A P I T U L O V I

REGULACION POR LA LUZ DE LA EXPRESION GENETICA

Las plantas han evolucionado para responder al medio ambiente de diferentes maneras y han incorporado señales en sus vías metabólicas que responden al medio ambiente. Frecuentemente se ha sugerido que la falta de movilidad ha producido un conjunto único de respuestas al medio ambiente del cual las plantas no pueden escapar. Una señal del medio ambiente muy importante, es la luz, la cual no solo se usa para la fotosíntesis, sino también como un modulador de complejos mecanismos reguladores y de desarrollo.

Las plantas tienen por lo menos tres fotorreceptores que median la respuesta a la luz: fotoclorigila, fitocromo y uno o más receptores azules los cuales no han sido completamente caracterizados (Briggs y Iino, 1983). Además, la luz ultravioleta está involucrada en la inducción de las enzimas de la biosíntesis de los fanilpropanoides, pero el fotorreceptor de esta respuesta no ha sido determinado. Hay evidencia de que hay dos fotorreceptores involucrados en la mediación de una respuesta simple y no se sabe que ninguno de los fotorreceptores actúen directamente (Tobin y Silverthorne, 1985).

Una de las respuestas de las plantas a la luz involucra cambios en la expresión de los genes a nivel de ARN. La regulación de la expresión genética por el fitocromo y el fotorreceptor sensible a la luz UV ha sido estudiada extensivamente a nivel molecular. Muchos de los genes cuya expresión cambia por efecto de la luz codifican para proteínas del cloroplasto. Se sabe que el fitocromo participa en la regulación del desarrollo del cloroplasto (Mohr, 1984; Lamb y Lawton, 1983).

El descubrimiento del fitocromo fue el resultado de su papel en el desarrollo de algunos procesos de las plantas, tales como la floración y la germinación. Tales observaciones sugirieron que la acción del fitocromo podría ser un switch importante en el control de la expresión genética. Los primeros reportes del efecto del fitocromo sobre el producto específico de un gene fueron presentados por Marcus (1960), quien demostró que la regulación de la GFDasa estaba mediada por fitocromo. Para 1977, Schopfer pudo enlistar 52 enzimas cuya actividad se reportaba que cambiaba por acción del fitocromo (Schopfer, 1977). Más recientemente Lamb y Lawton (1983) han incrementado esta lista a 61 enzimas reguladas por la luz.

Se ha sugerido que el fitocromo puede actuar activando genes (Hock y Mohr, 1964; Holgate y Goodwin, 1965; Mohr, 1966, 1972), si bien está claro que el fitocromo también puede afectar otros procesos en las células vegetales (Quail, 1983). Sin embargo, de cómo se encuentran relacionadas la respuesta rápida en ciertos procesos celulares y sus efectos en la expresión genética permanece sin contestar.

La acción del fitocromo incrementa tanto la cantidad total de ARN, como la fracción de ARNr en brotes de chícharo 24 h después de un tratamiento de luz roja (Jaffe, 1965). Experimentos más detallados han demostrado que el fitocromo puede incrementar la acumulación (Thien y Schopfer, 1975) y la síntesis (Thien y Schopfer, 1983) de ARNr en los cotiledones de plántulas de mostaza. También se ha observado un incremento en la transcripción de ARNr en *Lemna* (Silverthorne y Tobin, 1984) y en cebada (Mosinger et al., 1985) dentro de las dos horas siguientes a la iluminación con luz roja.

Existe una gran cantidad de reportes que muestran que el fitocromo media un incremento en los niveles de polisomas en las hojas (Yamamoto et al., 1975). Presumiblemente, tales incrementos en las relaciones de polisoma/monosoma refleja un incremento en la síntesis de ARNm, pero también puede deberse a una movilización del ARNm almacenado (Giles et al., 1977).

Algunos otros estudios han sugerido que el fitocromo puede afectar otros aspectos de la maquinaria de síntesis de proteínas. Por ejemplo, los ribosomas aislados de plántulas de maíz y frijol crecidas en la oscuridad fueron considerablemente menos activos en la incorporación de aminoácidos que los de plantas que fueron expuestas a la luz roja (Graham, 1971). También se ha observado un incremento en la capacidad de los ribosomas para incorporar fenilalanina en presencia de poli(U), lo que sugiere que los ribosomas pueden incrementar su actividad en la luz. Travis et al. (1974) han reportado que los ribosomas 80S de maíz son mucho más activos in vitro en un efecto mediado por fitocromo. En este

caso parece ser que el fitocromo incrementa los niveles de ARNt asociados con los ribosomas.

La luz también afecta la unión de los ribosomas del cloroplasto a las membranas de los tilacoides (Fish y Jagendorf, 1982). Parece ser que este efecto depende del flujo de electrones no cíclico más bien que del fitocromo o de algún otro pigmento.

Estudios pioneros han sugerido que la luz afecta la expresión de los genes en las plantas superiores. Experimentos con inhibidores tales como la actinomicina D sugieren que la luz puede actuar afectando la transcripción de genes específicos (Mohr, 1972). El primer reporte de que la luz afecta los niveles de ARNm traducible fue el de Tobin y Klein (1975) en Lemna gibba. Estos autores demostraron que cantidades iguales de ARNm-pol1(A) aislado de plantas crecidas en la luz y en la oscuridad al ser traducido *in vitro* produjo grupos de proteínas diferentes. Experimentos más recientes en la misma planta han mostrado que la luz afecta ARNm específicos, incluyendo los de la subunidad pequeña de la Rubisco y los de la proteína cosechadora de luz (Tobin, 1978; Broglie et al., 1984; Zhu et al., 1985).

Apel y Kloppstech (1978) determinaron que los niveles de ARNm de la proteína cosechadora de luz en cebada se incrementan en respuesta a la luz, si bien la subunidad pequeña de la Rubisco no se vió afectada. La luz también afecta la expresión de un gene del cloroplasto que codifica para una proteína de la membrana de los tilacoides de aproximadamente 32,000 daltones de peso molecular (Bedbrook et al., 1978).

Otra enzima cuyos niveles de ARNm se ven modificados por la luz es la PEPCasa de hojas de maíz (Sims y Hague, 1981). Sin embargo poco se conoce sobre el mecanismo por el cual se incrementan estos niveles, si bien se ha sugerido, al igual que para la subunidad pequeña de la Rubisco y las otras proteínas que aumentan por efecto de la luz, que el fitocromo está involucrado en la mediación de este efecto.

En resumen, está claro que la luz puede afectar la expresión de genes, tanto nucleares como del cloroplasto. Los efectos pueden variar entre especies; un gene regulado por la luz en una especie puede verse afectado de diferente forma o extensión en otra especie. La regulación puede ser positiva o negativa. Los fotorreceptores involucrados en la mediación de la respuesta no siempre han sido identificados.

CONCLUSIONES

La luz afecta el metabolismo de las plantas, tanto a nivel del metabolismo intermediario, como en la expresión de ciertos genes. A nivel del metabolismo intermediario aún se desconocen varios aspectos del mecanismo de regulación por la luz y falta por confirmar varias de las hipótesis propuestas sobre la función de los LEMs.

Por lo que respecta a la regulación por la luz de la expresión genética, la investigación en este campo está liendo en varias direcciones. Una de estas áreas es la caracterización de los genes y las secuencias que las flanquean las cuales podrían ser las responsables de la acción de la luz tal y como Estrella-Herrera et al., han demostrado recientemente (Herrera-Estrella et al., 1986). El uso del sistema de Agrobacterium tumefaciens para transferir ADN clonado en el genoma de las células vegetales será de gran utilidad en el futuro para elucidar la función de las secuencias que flanquean a los genes.

Otra importante área de investigación es entender los pasos intermedarios entre la percepción de la luz y la respuesta transcripcional. Más allá de los estudios de los fotorreceptores mismos es necesario delinear el proceso que estos fotorreceptores

pueden afectar de tal manera de entender los eventos que modifican la transcripción.

Una tercer área de investigación tiene la meta de entender como está coordinada la función y el desarrollo de los cloroplastos con otras funciones celulares y cual es la función que tiene la luz en la expresión de los genes del cloroplasto.

Los propósitos de estas metas de las investigaciones delineadas en los párrafos anteriores son tanto la aplicación práctica en el mejoramiento de los cultivos como el entendimiento de como la luz puede regular la expresión de los genes en las plantas.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson LE. *Plant Sci. Lett.*, 1: 331-334. (1973).
- . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59: 907-913. (1974).
- y M Avron. *Plant Physiol.*, 57: 209-213. (1976).
- , HM Chin y VK Gupta. *Plant Physiol.*, 64: 491-494. (1979).
- y JX Duggan. *Plant Physiol.*, 58: 135-139. (1976).
- , MJ Hansen y JE Anderson. *Plant Physiol. Suppl.*, 63: 2. (1979).
- , AH Mohamed, AR Ashton, R Scheibe, T Brennan y D Ben-Bassat, en: *Photosynthesis. IV. Regulation of Carbon Metabolism*, G Akoyunoglou, ed., Balaban Int. Sci. Services, Philadelphia. (1981), pp. 293-302.
- y SC Nehrlich. *FEBS Lett.*, 76: 64-66. (1977).
- , --- y ML Champigny. *Plant Physiol.*, 61: 601-605. (1978).
- , TCL Ng y KEY Park. *Plant Physiol.*, 53: 835-839. (1974).
- Anderson JW. en: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 8, Academic Press, N.Y., (1981), pp. 473-500.
- Anderson JW y J Done. *Plant Physiol.*, 60: 354. (1977).
- Apel K y K Kloppstech. *Eur. J. Biochem.*, 85: 581-588. (1978)
- Avron M y M Gibbs. *Plant Physiol. (Lancaster)*, 53: 136-139. (1974).
- Bahr JT y RG Jensen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 185: 39-43. (1978).
- Bedbrook JR, G. Link, DM Coen, L Bogorad y A. Rich. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 3060-3064. (1978).
- Beavers L y RH Hageman. *Rev. Plant Physiol.*, 20: 495-523. (1969).
- y ---. *Photophysiol.*, 7: 85-114. (1972).
- , LE Schrader, D Fleisher y RH Hageman. *Plant Physiol.*, 40: 691-693. (1965).

- Béliveau R y G Bellemare. Biochem. Biophys. Res. Commun., 88: 797-803. (1979).
- Ben-Bassat D y LE Anderson. Plant Physiol., 68: 279-283. (1981).
- Bennet J. Nature. 269: 344-346. (1977).
- , Eur. J. Biochem., 99: 133-137. (1979).
- , FEBS Lett., 103: 342-344. (1979).
- Bradbeer JW. New Phytol., 68: 233-245. (1969).
- , en: Biosynthesis and Its Control in Plants. BV Milborrow, ed., Academic Press, N.Y., (1973). pp. 279-302.
- Brennan T y LE Anderson. Plant Physiol., 66: 815-817. (1980).
- Briggs WR y R Iino. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B, 303: 347-359. (1983).
- Buchanan BB. Ann. Rev. Plant Physiol., 31: 341-374. (1980).
- , en: Photosynthesis. IV. Regulation of Carbon Metabolism. G Akoyunoglou, ed., Balaban Int. Sci. Services, Philadelphia. (1981). pp. 245-256.
- , PP Kalberer y DI Arnon. Biochem. Biophys. Res. Commun., 29: 74-79. (1967).
- , P Schürmann y PP Kalberer. J. Biol. Chem., 246: 5952-5959. (1971).
- , --- y RA Wolosiuk. Biochem. Biophys. Res. Commun., 69: 970-978. (1976).
- y RA Wolosiuk. Nature (London), 264: 669-670. (1976).
- , --- y P Schürmann. Trends Biochem. Sci., 4: 93-96. (1979).
- Championy ML y E Bismuth. Physiol. Plant., 36: 95-100. (1976).
- Chapman KSR y MD Hatch. Arch. Biochem. Biophys., 210: 82-89. (1981).
- Chin HM y LE Anderson. Abstracts. 174th Nat. Am. Chem. Soc. Meet. Biol., 155. (1977).
- Chueca A. JJ Lázaro y GJ López. Plant Physiol., 75: 539-541. (1981).
- Coombs J y AD Greenwood. Topics in Photosynthesis. Vol. I. 1-51. (1976).
- Dawson JC y JW Anderson. Phytochem., 19: 2255-2261. (1980).

- Day EA y MD Hatch. Arch. Biochem. Biophys., 211: 743-749. (1981).
- Dorne AJ, MA Block, J Joyard y R Douce. FEBS Lett., 145: 30-34. (1982).
- Douce R y J Joyard. Plant Organelles. (E Reid, ed.), 47-59. (1979).
- Edwards GE, SP Robinson, NJC Tyler y DA Walker. Arch. Biochem. Biophys., 90: 421-433. (1978).
- Eistner EF y D Frommeyer. FEBS Lett., 86: 143-146. (1978).
- Fankhauser H, CHR Brunold y KH Erisman. Experientia, 32: 1494-1497. (1976).
- Ferrari TE, OC Yoder y P Filner. Plant Physiol., 51: 423-431. (1973).
- Fisc LE y AT Jagendorf. Plant Physiol., 69: 814-825. (1982).
- Giles AB, D Grierson y H Smith. Planta, 136: 31-36. (1977).
- Gotow K, K Tanaka, N Kondo, K Kobayashi y K Syono. Plant Physiol., 79: 829-832. (1985).
- Graham D, MD Hatch, CR Slack y RM Smillie. Phytochem., 9: 521-532. (1970).
- , AM Grieve y RM Smillie. Phytochem., 10: 2905-2914. (1971).
- Gooden D y E Beck. Biochim. Biophys. Acta, 546: 426-435. (1979).
- Guerrero MG, JM Vega y M Losada. Ann. Rev. Plant Physiol., 32: 169-204. (1981).
- Haberlein I, G Schimpff-W and H Follman. Biochem. Biophys. Res. Commun., 127: 401-406. (1985).
- Habib MA y LE Anderson. Arch. Biochem. Biophys., 209: 606-612. (1981).
- Hague DR y TL Sims. Plant Physiol., 66: 505-509. (1980).
- Hall DO. Nature, New Biol., 235: 125-126. (1972).
- Hallberg M y C Larsson. Arch. Biochem. Biophys., 202: 121-130. (1981).
- Halliwel B. Chloroplast metabolism. Clarendon Press, Oxford (1984). pp. 1-28.
- y VS Butt. Biochem. J. 129: 1157-1158. (1972).
- y CH Foyer. Planta, 139: 9-17. (1978).

- Hamp R y H Ziegler, *Planta* 147: 485-494. (1980).
- Hatch MD, *Plant Cell Physiol. Special Issue*, 311-314. (1977).
- , *Curr. Top. Cell Regul.*, 14: 1-27. (1978).
- , *CR Slack y TA Bull. Phytochem.*, 8: 697-706. (1969).
- Heber U, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 393-421. (1974).
- , U Enser, E Weis, U Ziem y C Giersch, en: *Covalent and Non-covalent Modulation of Protein Function*, DE Atkinson, ed., Academic Press, N.Y., (1979), pp. 113-138.
- y MR Kirk, *Biochim. Biophys. Acta*, 376: 136-150. (1975).
- y GH Krause, en: *Photosynthesis and Photorespiration*, M.D. Hatch, C.B. Osmond y R.O. Slatyer, eds., Wiley, N.Y., pp. 218-225.
- y DA Walker, *Trends Biochem. Sci.*, 4: 252-256. (1979).
- Heldt HW, en: *The Intact Chloroplast*, J. Barber, ed., Elsevier, Amsterdam, (1976), pp. 215-234.
- y L Rapley, *FEBS Lett.*, 10: 143-148. (1970).
- Hiller RG y JK Raison, *Biochim. Biophys. Acta*, 599: 63-72. (1980).
- Hinkle PC y EM Richard, *Investigación y Ciencia*, 20: 58-75 (1978).
- Hook B y H Mohr, *Planta*, 61: 209-228. (1964).
- Holdgate DP y TW Goodwin, *Photochem. Photobiol.*, 4: 1-6. (1965).
- Holmgren A, BB Buchanan y RA Wolosiuk, *FEBS Lett.*, 82: 351-357. (1977).
- House CM y JW Anderson, *Phytochem.*, 19: 1925-1930. (1980).
- Huber SC, *Biochim. Biophys. Acta* 545: 131-140. (1979).
- Huchzermeyer B e I Willms, *Biochem. Soc. Trans.*, 14: 46-47. (1986).
- Murwitz J, A Weissbach, BI Horecker y PZ Smaynietis, *J. Biol. Chem.*, 218: 769-783. (1956).
- Ito O, T Tadakatsu y K Kumazawa, *Plant Cell Physiol.*, 19: 1109-1119. (1978).
- Jacquet JP, BB Buchanan, P Martin y J Vidal, *Plant Physiol.*, 68: 300-304. (1981).

- , J Vidal, P Gadal y P Schürmann, FEBS Lett., 96: 243-246. (1978).
- Jaffe MJ, *Physiol. Plant.*, 22: 1033-1037, (1969).
- Joyard J y R Douce, FEBS Lett. 102: 147-150, (1979).
- Kachru RB y LE Anderson, *Plant Physiol.*, 55: 199-202, (1975).
- Kagawa T y MD Hatch, *Arch. Biochem. Biophys.*, 184: 290-297. (1977).
- Karabourniotis G, Y Manetas y NA Gavalas, *Plant Physiol.*, 73: 735-739. (1983).
- Kelly GJ y M Gibbs, *Plant Physiol.*, 52: 111-118, (1973).
- y E Latzko, *Nature*, 256: 429-430, (1975).
- y ---, *Plant Physiol.*, 60: 290-294, (1977).
- y ---, *Plant Physiol.*, 60: 295-299, (1977).
- Klepper L, D Fleisher y RH Hageman, *Plant Physiol.*, 48: 580-590, (1971).
- Krause GH y U Heber, en: *The Intact Chloroplast*, J. Barber, ed., Elsevier, Amsterdam, (1976), pp. 171-214.
- Kyle DJ, LA Staehelin y CJ Arntzen, *Arch. Biochem. Biophys.* 222: 527-541, (1983).
- Leauch N, W Kaiser y W Urbach, *Plant Physiol.*, 63: 605-608, (1979).
- Lamb CJ y MA Lawton, *Encyclopedia of Plant Physiology*, ed. W. Shropshire, H. Mohr, 16: 213-257, (1983).
- Lara C, A de la Torre y BB Buchanan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93: 544-551, (1980).
- , --- y ---, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94: 1337-1344, (1980).
- Leegood RC y DA Walker, FEBS Lett., 116: 21-24, (1980).
- y ---, *Arch. Biochem. Biophys.*, 212: 644-650, (1981).
- y ---, en: *Photosynthesis, IV. Regulation of Carbon Metabolism*, G Akoyunoglou, ed., Balaban Int. Sci. Services, Philadelphia, (1981), pp. 317-324.
- y ---, *Plant Physiol.*, 71: 513-518, (1983).
- Lehninger AL, *Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers Inc., New

- York. (1975). pp. 535.
- Madhusudana Rao I y LE Anderson. *Plant Physiol.*, 71: 451-455. (1983).
- Manetas Y. *Photosynth. Res.*, 3: 321-333. (1982).
- Marcus A. *Plant Physiol.*, 35: 126-128. (1960).
- Mitchell CA y CR Stocking. *Plant Physiol.*, 55: 59-63. (1975).
- Mohr H. *Photochem. Photobiol.*, 5: 469-483. (1966).
- . *Endeavor*, 1: 107-114. (1977).
- . Chloroplast biogenesis. NR Baker y J Barber. eds. 305-347. (1984).
- Moore PD. *Nature*, 295: 617. (1982).
- . *Nature*, 308: 310. (1983).
- Moore R y CC Black Jr. *Plant Physiol.*, 62: 309-313. (1979).
- Mosinger E. A Batschauer. E Schafer y K Apel. *Eur. J. Biochem.*, 147: 137-142. (1985).
- Mousdale DM y JR Coggins. *FEBS Lett.* 205: 328-332. (1986).
- Moyse A. *Physiol. Végét.* 14: 533. (1976).
- Muller B. *Z. Naturforsch.* 27b: 925-932. (1972).
- . I Ziegler y H Ziegler. *Eur. J. Biochem.* 9: 101-106. (1969).
- Murakami S y H Strotman. *Arch. Biochem. Biophys.* 185: 30-38. (1978).
- Nakamoto H y GE Edwards. *Plant Physiol.*, 71: 562-573. (1983).
- y T Sugiyama. *Plant Physiol.*, 69: 749-753. (1982).
- Nakatani HY y J Barber. *Biochim. Biophys. Acta* 461: 510-512. (1977).
- Nelson N. H Nelson y E Racker. *Photochem. Photobiol.* 16: 481-489. (1972).
- Nayra CA y RH Hageman. *Plant Physiol.*, 58: 726-730. (1976).
- Nicholas JC, JE Harper y RH Hageman. *Plant Physiol.*, 58: 731-735. (1976a).
- . --- y ---. *Plant Physiol.*, 58: 736-739. (1976b).

- Ng BH y JW Anderson, *Phytochem.*, 18: 573-580, (1979).
- Nishizawa AN, RA Wolosiuk y BB Buchanan, *Planta*, 145: 7-12, (1979).
- Pontremoli S, J Luppis, WA Wood, S Traniello y BL Horecker, *J. Biol. Chem.*, 240: 3464, (1965).
- Pupillo P y G Piccari, *Eur. J. Biochem.*, 51: 475-482, (1975).
- Quail PH, *Encyclopedia of Plant Physiol.*, 178-212, (1983).
- Quinn PJ y WP Williams, *Biochim. Biophys. Acta* 736: 223-266, (1983).
- Racker E, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69: 300-310, (1957).
- y EAR Schroeder, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74: 326-344, (1958).
- Radmer R y O Ollinger, *FEBS Lett.* 110: 57-61, (1980).
- Ratnam CKM, *Plant Physiol.*, 62: 220-223, (1978).
- Sauer A y KP Heise, *Plant Physiol.*, 73: 11-15, (1983).
- Sawhney SK, MS Naik y DJD Nicholas, *Nature (London)*, 272: 647-648, (1978).
- Scheibe R y JP Jacquot, *Planta*, 157: 548-553, (1983).
- Schmidt A y A Trebst, *Biochim. Biophys. Acta*, 180: 529-535, (1969).
- Schofer P, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28: 223-252, (1977).
- Schürmann P y BB Buchanan, *Biochim. Biophys. Acta* 376: 189-192, (1975).
- y JP Jacquot, *Biochim. Biophys. Acta*, 569: 309-312, (1979).
- y RA Wolosiuk, *Biochem. Biophys. Acta*, 522: 130-138, (1978).
- , ---, VD Breazeale y BB Buchanan, *Nature (London)*, 263: 257-258, (1976).
- Schwenn JD y U Schriek, *FEBS Lett.*, 170: 76-80, (1984).
- Silverthorne J y EM Tobin, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 1112-1116, (1984).
- Sims TL y DR Hague, *J. Biol. Chem.*, 256: 8252-8255, (1981).
- Stryer L, *Bioquímica*, Ed. Raverté, España, (1979), pp. 461.

- Sugiyama T y MD Hatch. *Plant Cell Physiol.*, 22: 115-126. (1981).
- Thien W y P Schopfer. *Plant Physiol.*, 56: 660-664. (1975).
- y ---, *Plant Physiol.*, 69: 1156-1160. (1982).
- Ting IP y CB Osmond. *Plant Physiol.*, 51: 448-453. (1973).
- Tobin EM. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 4749-4753. (1978).
- y AO Klein. *Plant Physiol.*, 56: 88-92. (1975).
- y J Silverthorne. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 569-593. (1985).
- Travis RL. RC Huffaker y JL Key. *Plant Physiol.*, 46: 800-805. (1970).
- , JL Key y CW Ross. *Plant Physiol.*, 53: 28-31. (1974).
- , WR Jordan y RC Huffaker. *Physiol. Plant.*, 23: 678-685. (1970).
- Vidal J. MC Rio y P Gadal. *Plant Sci. Lett.*, 8: 243-249. (1977).
- Von Willert DJ, E Brinckmann, B Scheitler, DA Thomas y S Treichel. *Planta*, 147: 31-36. (1979).
- Walker DA. *Encycl. Plant Physiol. (N.S.)*, 3: 1-49. (1976).
- , *Meth. Enzymol.* 69C, 94-104. (1980).
- Weissbach A, BL Horecker y J Hurwitz. *J. Biol. Chem.*, 218: 795-810. (1956).
- Williams JP, EE Simpson y DJ Chapman. *Plant Physiol. (Lancaster)*, 63: 669-673. (1979).
- Winter K. *Plant Physiol.*, 65: 792-796. (1980).
- Wintermans JFGM, A VanBeeouw y G Bogemann. *Biochim. Biophys. Acta*, 663: 99-107. (1981).
- Wolosiuk RA y BE Buchanan. *Nature (London)*, 266: 565-567. (1977).
- y ---, *Plant Physiol.*, 61: 669-671. (1978).
- y ---, *Arch. Biochem. Biophys.*, 189: 97-101. (1978).
- , --- y NA Crawford. *FEBS Lett.*, 81: 253-258. (1977).
- , NA Crawford, BC Yee y BE Buchanan. *J. Biol. Chem.*, 254: 1627-1632. (1979).
- Yamamoto E, T Sugiyama y S Miyachi. *Plant Cell Physiol.*, 15: 987-

992. (1974).

Yamamoto N, M Hasegawa, S Sasaki y S Asakawa, Plant Physiol., 56: 734-737. (1975).

Zhu YS, SD Kung y L Bogorad, Plant Physiol., 79: 371-376. (1985).

Ziegler H e I Ziegler, Planta, 69: 111-123. (1966).

---, --- y HJ Schmidt-Clausen, Planta, 67: 344-356. (1965).

---, --- y ---, Planta, 81: 169-180. (1968).

Zielke HR y F Filner, J. Biol. Chem., 246: 1772-1779. (1971).