

292



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"FUNCIONAMIENTO DE LA BOMBA DE PROTONES  
DURANTE LA BIOGENESIS DEL CLOROPLASTO  
EN MAIZ"**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A

**ROCIO LORENA AGUILAR AVILA**

MEXICO, D. F.

1989

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE.

	Pág.
ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	3
I. ANTECEDENTES	
I.1. Estructura de los cloroplastos .....	4
I.2. Anatomía de las hojas de plantas C-3 y C-4 .....	7
I.3. Fotosíntesis en las plantas C-4 .....	13
I.4. Transporte de electrones en la fotosíntesis .....	19
I.4.1. Transporte de electrones acíclico .....	20
I.4.2. Transporte de electrones cíclico .....	22
I.5. Bombas de protones en la cadena redox del cloroplasto .....	23
I.6. Fotofosforilación .....	24
I.7. Acoplamiento del transporte de electrones a la síntesis de ATP .....	26
I.8. Biogénesis del cloroplasto .....	29
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS .....	35
III. MATERIALES Y METODOS.	
III.1. Material biológico	
III.1.1. Condiciones de siembra .....	38
III.1.2. Cosecha de las hojas de maíz .....	38

III.2. Aislamiento y resuspensión de los cloroplastos de mesófilo .....	39
III.3. Determinación de la concentración de clorofila en las suspensiones obtenidas de cloroplastos de mesófilo de las tres secciones de la hoja .....	40
III.4. Medición de la captación de protones .....	41
III.5. Medición de la síntesis de ATP .....	44
III.6. Medición de la hidrólisis de ATP .....	46
III.7. Técnicas de microscopía de cortes transversales de hojas de maíz y de suspensiones de cloroplastos de mesófilo de maíz.	
III.7.1. Microscopía de luz .....	48
III.7.2. Microscopía electrónica .....	51

LV. RESULTADOS.

IV.1. Obtención de cloroplastos de mesófilo .....	53
IV.2. Observaciones de cortes transversales de los tres estados de desarrollo de hojas de maíz por microscopía de luz y microscopía electrónica.	
IV.2.1. Microscopía de luz .....	54
IV.2.2. Microscopía electrónica .....	57
IV.3. Observaciones por microscopía electrónica de las suspensiones de cloroplastos aislados de hojas de maíz en tres estados de desarrollo .....	61

IV.4. Contenido de clorofila <u>a</u> y clorofila <u>b</u> y su relación en cloroplastos de mesófilo durante tres etapas de desarrollo de la hoja de maíz .....	66
IV.5. Actividad de la captación de protones .....	68
IV.6. Medición de la actividad sintética de la ATPasa .....	71
IV.7. Medición de la actividad hidrolítica de la ATPasa .....	74
V. DISCUSION .....	77
VI. CONCLUSIONES .....	80
VII. BIBLIOGRAFIA .....	82

## ABREVIATURAS

ADP, ATP	Adenosin Di y Trifosfato
CF <sub>1</sub> -CF <sub>0</sub>	Porciones extrínseca e intrínseca respectivamente del complejo ATPsintetasa.
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
PQ	Plastoquinona
PC	Plastocianina
P680.	Pigmento que absorbe luz a 680nm.
P700	Pigmento que absorbe luz a 700nm.
Fd	Ferredoxina
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido reducido.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
µM	Micromolar
MV	Metilviologeno
Pi	Fosfato inorgánico
mV	Millivoltio
RubisCO	Ribulosa-1-5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
RuDP	Ribulosa-1-5-difosfato
Cl <sub>a</sub>	Clorofila <u>a</u>
Cl <sub>b</sub>	Clorofila <u>b</u>
nm	Nanómetros
DABS	Acido diazoniobencensulfónico
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
Cl <sup>-</sup>	Cloro
FAD	Flavin Adenin Dinucleótido.
H <sup>+</sup>	Protones
Cit.	Citocromo
e <sup>-</sup>	electrones
BSA	Albumina de bovino desgrasada
PVP	Polivinil pirrolidona
µg	microgramos

neq	nanoequivalentes
nmoles	nanomoles
TCA	Acido Tricloroacético
Es	Epidermis superior
Ei	Epidermis inferior
CV	Células del tejido de la vaina vascular
CM	Células del tejido del mesófilo
cv	Cloroplasto de vaina
cm	Cloroplasto del mesófilo
e	estoma
pg	plastoglobulos
a	almidón
µm	micromoles
EGCD	Diciclohexil carbodimida
TPSrCl	Cloruro de trifenil estaño

## RESUMEN.

El presente trabajo forma parte de un proyecto general denominado "Biogénesis del Cloroplasto". En esta tesis se estudió el funcionamiento de la bomba de protones, entendiéndose como el intercambio de protones ( $H^+$ ) por medio de la cadena transportadora de electrones a través de la membrana, en cloroplastos de mesófilo aislados de hojas de maíz (Zea mays L.) var. Tuxpeño en tres estados de desarrollo de las mismas. La investigación se vio complementada por la medición de la actividad tanto sintética como hidrolítica de la ATP sintetasa. Así como por observaciones de estructura y ultraestructura de los cloroplastos.

En cuanto al funcionamiento de la bomba de protones, se encontró que a medida que el cloroplasto madura, se incrementa tanto la velocidad de captación de protones como la síntesis de ATP.

Por otro lado, los resultados de la velocidad de hidrólisis de ATP indican que a medida que el cloroplasto madura esta actividad se ve disminuida.

Tanto estos resultados como la observación del desarrollo estructural del organelo, realizada en el microscopio nos dan las bases para diseñar un modelo funcional del desarrollo del cloroplasto durante el crecimiento de las plantas en condiciones normales de luz-oscuridad.



## I. ANTECEDENTES.

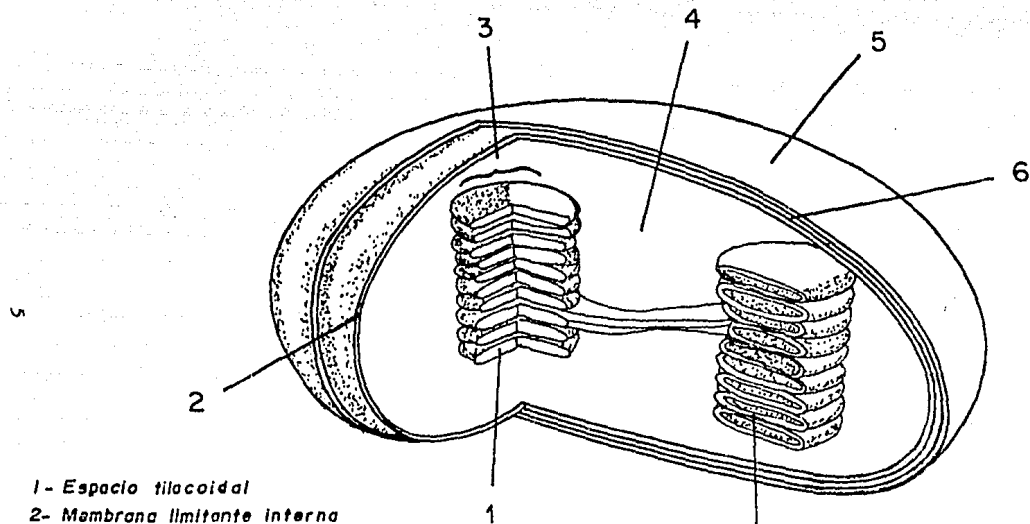
### I.1. Estructura de los cloroplastos.

Los cloroplastos son los plastidios más comunes y de gran importancia biológica. Son los organelos celulares donde se efectúa la fotosíntesis, por medio de la cual las plantas producen oxígeno y la mayor parte de la energía química que es utilizada por los organismos vivos. (Fig.1).

La forma de los cloroplastos varía en las diferentes especies. En las plantas superiores tiene forma ovoide, discoidal o esférica, su tamaño es de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de largo, 1.5  $\mu\text{m}$  de grueso y un diámetro aproximado de 4 a 6  $\mu\text{m}$ . Constan de una doble membrana que encierra una fase soluble, el estroma, y una membrana. El cloroplasto es un órgano flexible capaz de cambiar de volumen, forma y posición en respuesta a un estímulo como la luz. (Arntzen y Briantais, 1975).

En la envoltura, la membrana externa actúa como barrera de permeabilidad y la membrana interna presenta permeabilidad selectiva al transporte de metabolitos entre el citoplasma y el estroma del cloroplasto. (Laetsch, 1971).

Internamente el cloroplasto está formado por un sistema de sacos membranales discoidales de 50 a 60 nm de diámetro y de 70 a 100 nm de grueso, llamados tilacoides, los cuales pueden estar apilados formando el grana, o bien no estar apilados formando los tilacoides del estroma; a modo de un sistema de túbulos anastomosados que se unen a los tilacoides de los grana, los cuales están fijados de un modo firme al estroma. (Hall y Rao, 1979).



- 1- Espacio tilacoidal  
 2- Membrana limitante interna  
 3- Granum  
 4- Estroma  
 5- Membrana limitante externa  
 6- Espacio intermembranoso  
 7- Partición

FIG. No. 1 ESQUEMA DEL CLOROPLASTO

Es en la membrana de los tilacoides en donde se localizan los pigmentos fotosintéticos y el sistema transportador de electrones, razón por lo cual se describen algunas de las características biológicas de esta membrana.

Las ideas actuales básicas sobre la organización molecular de las proteínas y los lípidos en cualquier membrana biológica se dan en el modelo del Mosaico Fluido propuesto por Singer y Nicholson (1972).

Esta membrana tilacoidal está formada por una doble capa de fosfolípidos con las cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el interior y las cabezas polares orientadas hacia el exterior, normalmente los lípidos constituyen la fase fluida en que las proteínas flotan libremente y se mantienen en equilibrio dinámico. Estas proteínas pueden ser integrales o periféricas, de acuerdo con el grado de asociación con la membrana y los métodos utilizados para solubilizarlas. Las proteínas periféricas se separan mediante procedimientos suaves, son solubles en soluciones acuosas, y habitualmente no contienen lípidos, entre las principales encontramos el factor de acoplamiento de la fosforilación ( $CF_1$ ) y a la Ferredoxina  $NADP^+$  oxido-reductasa. Las proteínas integrales representan más del 70% del total, y para aislarlas se requieren tratamientos drásticos. Habitualmente son insolubles en soluciones acuosas, y la presencia de detergentes es necesaria para mantenerlas en una forma no agregada, entre las principales tenemos a el canal de protones de la ATPasa (llamado  $CF_0$ ); los complejos de proteínas y los pigmentos cosechadores de luz, varios acarreadores electrónicos (Citocromo f y Plastocianina) y los centros de reacción P680 y P700. (Robertis y Robertis, 1984).

En el estroma de los cloroplastos además de lo descrito, se encuentran granos de almidón, grasas, ribosomas, ácido desoxirribonucleico -

(ADN), las enzimas del Ciclo de Calvin así como a moléculas involucradas en el mecanismo de autorregulación y replicación del cloroplasto como el ácido ribonucleico (RNA) tanto mensajero como de transferencia. (Rosinski y Rosen, 1972).

## I.2. Anatomía de las hojas de plantas C-3 y C-4.

Los primeros experimentos sobre la eficacia de la fotosíntesis se realizaron en especies cultivadas en zonas templadas como el trigo, la remolacha y la espinaca, pero su extensión a especies tropicales y semitropicales como el sorgo, caña de azúcar y maíz demostró que no todos los vegetales se comportan de igual manera respecto a los factores limitantes de la fotosíntesis, ya que estos últimos para alcanzar su rendimiento máximo requieren pequeñas concentraciones de  $CO_2$  en comparación con las otras, existiendo pues, dos tipos de plantas, las plantas C-3 (espinaca) en las cuales el primer compuesto hidrocarbonado producido por las reacciones de oscuridad de la fotosíntesis es un compuesto de tres átomos de carbono (fosfoglicerato) y las plantas C-4 (maíz), en donde este compuesto tiene cuatro átomos de carbono (ácido oxaloacético). (Somerville y Somerville, ).

Aunado a esto, la anatomía foliar de una planta C-4 es radicalmente distinta a la de una planta C-3.

Morfológicamente en un corte transversal de una planta C-3 encontramos una diferenciación dorsiventral, en la que se observa un parénquima en empalizada con células prismáticas formando una o más filas apretadas entre sí y un parénquima esponjoso constituido por células redondeadas, con espacios intercelulares, ambos tipos de células conforman

el mesófilo, presentándose un sólo tipo de cloroplastos (Fig.2a).

La anatomía de las plantas C-4 se conoce desde 1934 y se denomina Anatomía Tipo Kranz, caracterizada por presentar dos distintos tipos - de células fotosintéticas parenquimáticas: las células del mesófilo y las de la vaina vascular, las cuales son diferentes en cuanto a sus actividades fotosintéticas y enzimáticas y en la organización de los tilacoides en sus cloroplastos. (Schuster, 1985).

En el caso del maíz (C-4), el sistema vascular se encuentra rodeado por una capa de células redondeadas denominadas células de la vaina vascular, las cuales a su vez están rodeadas por una segunda capa de células largas y estrechas, llamadas células del mesófilo, presentando ambas - diferentes tipos de cloroplastos. (Fig. 2b).

Estas dos coronas de células tienen además cada una, una función bien distinta. En las células del mesófilo los cloroplastos sintetizan el compuesto de cuatro átomos de carbono, no poseen ni Ribulosa-1-5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) ni Ciclo de Calvin. Por el contrario - los cloroplastos de las células de la vaina están dotados de RubisCO y de Ribulosa-1-5-difosfato (RuDP) y pueden funcionar como los de las plantas C-3 en lo referente a la fase oscura de la fotosíntesis.

En cuanto al Ciclo de fijación del  $CO_2$ , en las plantas C-3 este entra en el metabolismo celular combinándose en los cloroplastos con un compuesto de cinco átomos de carbono, la ribulosa-1-5-difosfato, para dar un compuesto intermedio de seis átomos de carbono. Esta reacción de carboxilación está catalizada por la ribulosa-1-5-difosfato carboxilasa. El compuesto C-6 se escinde inmediatamente en dos partes idénticas por - la misma enzima, dando dos moléculas de fosfoglicerato, el cual es reducido a triosa fosfato que se exporta fuera del cloroplasto, al citoplasma,

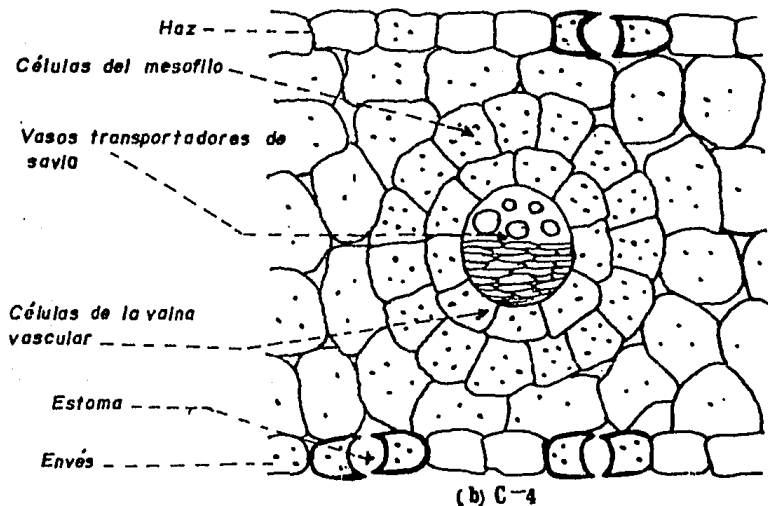
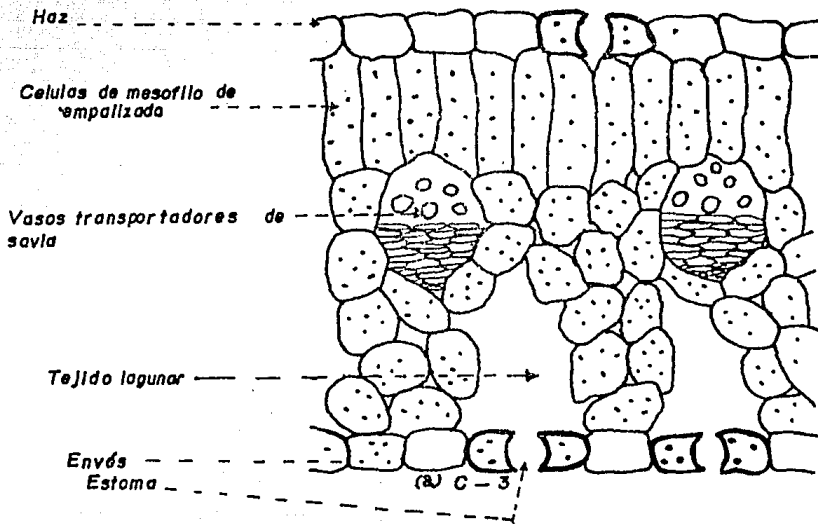


FIG.2 Corte transversal de hoja de una planta C-3 (a) y una C-4 (b).

donde es utilizado para el metabolismo celular y la síntesis de azúcares. En cuanto al aceptor del  $\text{CO}_2$ , RuDP, es continuamente regenerado para alimentar el ciclo de reacciones conocidas por Ciclo de Calvin a través del cual el  $\text{CO}_2$  es incorporado por las plantas. (Fig. 3 ).

En las plantas C-4, el  $\text{CO}_2$  atmosférico que difunde al interior de la hoja penetra en los cloroplastos del mesófilo. Ahí se combina con un compuesto de tres átomos de carbono, el fosfoenol piruvato, para formar un compuesto de cuatro átomos de carbono, el oxalacetato. Este ácido es transportado hacia las células de la vaina vascular, donde es descarboxilado; el compuesto C-3 resultante vuelve hacia las células del mesófilo, y el  $\text{CO}_2$  liberado en las células de la vaina vascular entra en el Ciclo de Calvin. (Fig. 4 ).

En este caso la función oxigenasa de la enzima RubisCO es prácticamente inoperante. La reacción importante de la ruta C-4 es la de la enzima carboxilante, la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPcase) que usa como sustrato fosfoenol piruvato y  $\text{CO}_2$ . Esta enzima tiene una alta afinidad por el  $\text{CO}_2$  y nula afinidad por el oxígeno, por lo que la catálisis no es inhibida por el oxígeno.

En cuanto a las diferencias morfológicas, dentro de la anatomía Kranz, los cloroplastos de la vaina vascular muestran un desarrollo pobre y variable de los grana, encontrándose algunos agranales, se sabe que esta pérdida del grana se da durante su desarrollo. Estos cloroplastos se presentan típicamente repletos de almidón, en cambio en los cloroplastos de mesófilo por lo general no se presentan granulos de almidón, tienen grana bien desarrollados los cuales aumentan tanto en número como en tamaño durante el desarrollo de la planta, además poseen una característica estruc

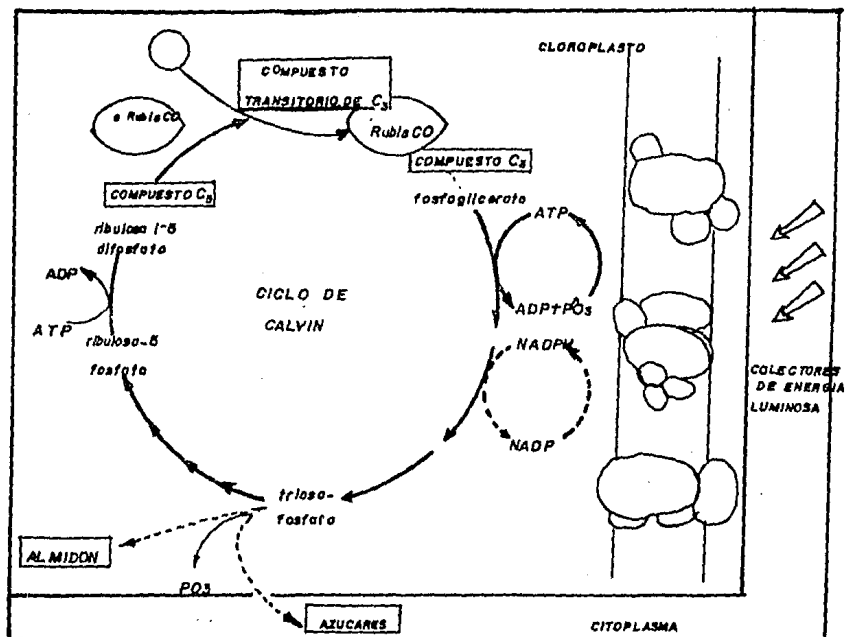
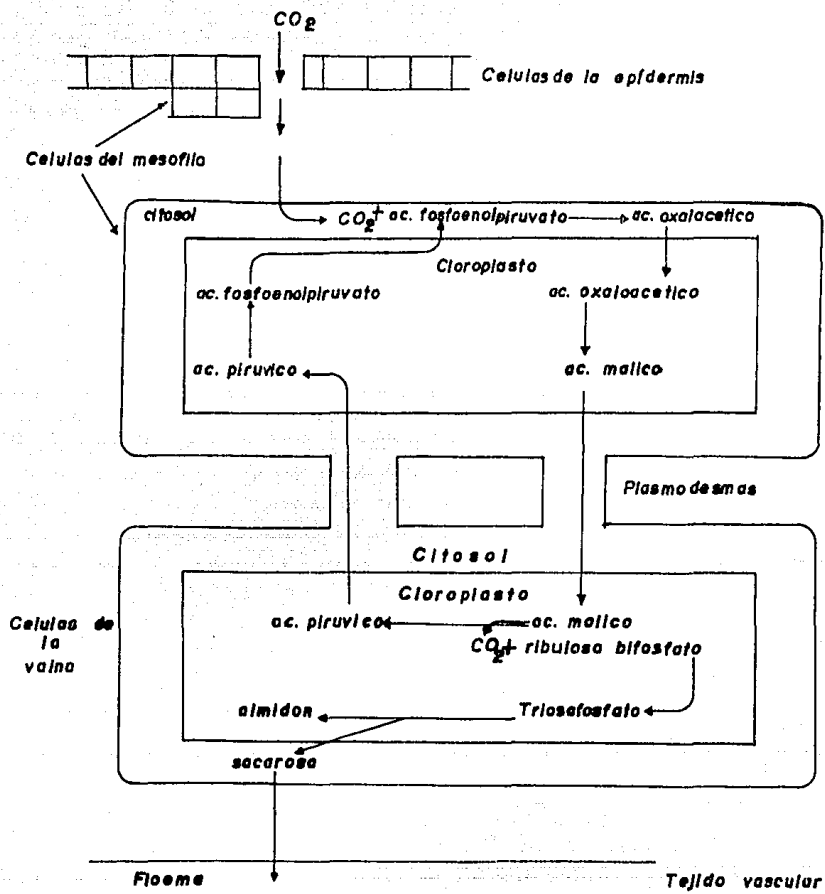


FIG. 3 CICLO DE FIJACION DE CO<sub>2</sub> EN PLANTAS C<sub>3</sub>.





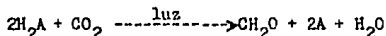
**FIG. 4**  
 Movimiento de metabolitos en las células del mesofilo y vaina en las hojas de plantas C-4

tural vesiculosa por debajo de la membrana externa que se denomina retículo periférico.

Existen evidencias contradictorias entre la pérdida o ausencia de grana en los cloroplastos de la vaina vascular y la actividad fotosintética que presentan durante el desarrollo de las plantas C-4, observándose que estos cloroplastos presentan baja actividad del FSII, comparado con la actividad del FSII de los cloroplastos de mesófilo.

### 1.3. Fotosíntesis en las plantas C-4.

La fotosíntesis se define como el proceso por el cual las plantas y ciertas bacterias convierten la energía proveniente de la luz solar en energía química (Govindjee y Govindjee, 1975). La ecuación general de la fotosíntesis es:



donde A es el sustrato que puede oxidarse.

A través de los años una gran variedad de investigadores han contribuido al estudio de la fotosíntesis, todos ellos con un objetivo fundamental, descubrir como se realiza la fotosíntesis.

Actualmente la fotosíntesis se divide en dos fases: una oscura y una luminosa. La fase oscura sucede en el estroma del cloroplasto y consiste en el denominado Ciclo de Calvin, en donde se efectúa la fijación de  $CO_2$  utilizando el poder asimilatorio del  $NADPH_2$  y ATP convirtiéndolo a carbohidratos.

La segunda fase, denominada luminosa o fotofosforilación, se localiza en la membrana del tilacoide, en esta fase se llevan a cabo las siguientes reacciones:

a) Absorción de energía luminosa por los pigmentos cosechadores de luz ---

(clorofilas a y b y carotenoides).

- b) Transferencia de energía a los centros de reacción en donde es empleada para las reacciones fotoquímicas.
- c) Fotólisis del agua con desprendimiento de oxígeno.
- d) Transporte de electrones ( $e^-$ ) desde el agua hasta el aceptor final  $NADP^+$  para producir  $NADPH_2$ ; con generación de un gradiente electroquímico protonmótrico que acumula protones en el interior del tilacoide.
- e) Síntesis de ATP mediante la utilización del gradiente electroquímico de protones a través de la ATP sintetasa.

Los pigmentos fotosintéticos que absorben la luz para iniciar la conversión de la energía solar a energía química se encuentran embebidos en la membrana de los tilacoides, encontrándose en formas diversas:

- a) Los primeros en importancia son las clorofilas a y b, son pigmentos formados por una porfirina, cuyos átomos de nitrógeno centrales se coordinan con un ión  $Mg^{2+}$ . A ésta se adiciona una larga cadena lateral de fitol durante la biosíntesis de la clorofila. Las diferentes clases de clorofilas poseen diferentes sustituyentes en el anillo porfirínico. La clorofila a posee un grupo metilo unido al anillo II, mientras que la clorofila b posee un grupo aldehído. (Fig. 5).

Los máximos de absorción de la clorofila a y b en éter y acetona son respectivamente, a 663 nm y 645 nm; y sus curvas de absorción se cruzan a 652 nm. (Fig. 6).

Sin embargo, investigaciones espectroscópicas detalladas de la célula muestran que in vivo hay más de una forma de clorofila a, las cuales pueden estar asociadas de diferentes maneras en los tilacoides y probablemente deben tener distintas funciones fotoquímicas.

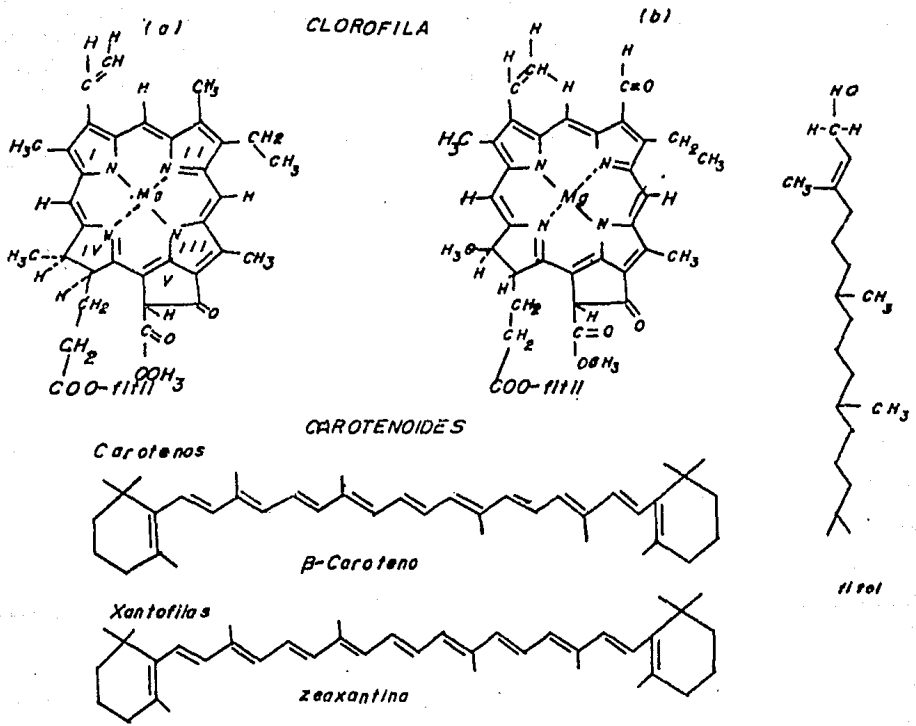


FIG. 5 ESTRUCTURA DE ALGUNOS PIGMENTOS FOTOSINTETICOS.

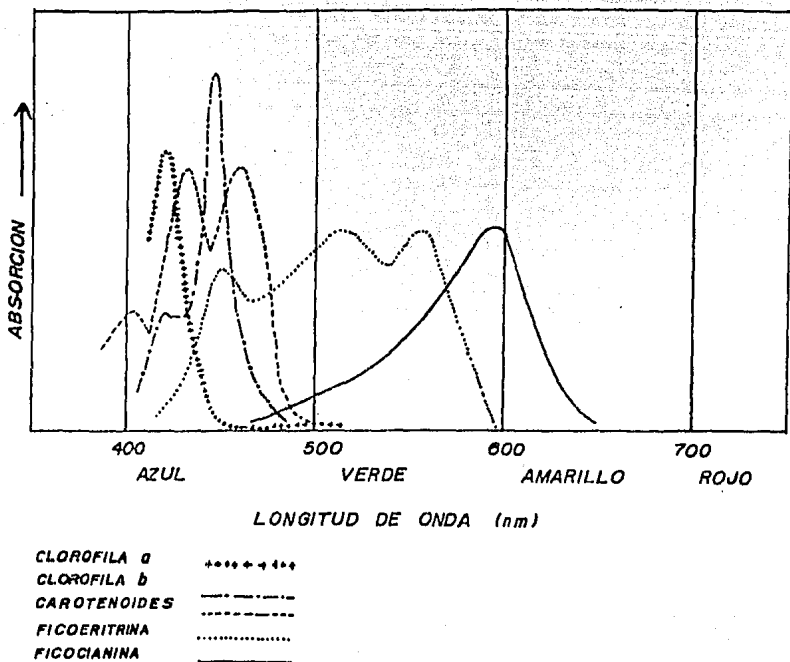


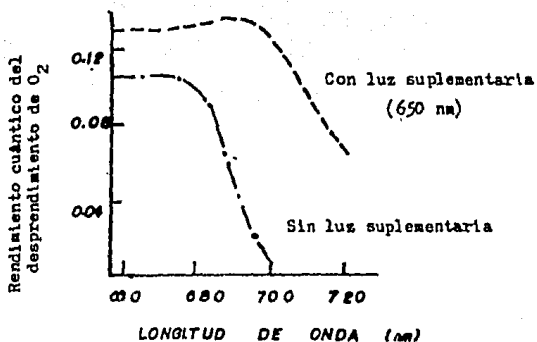
FIG. 6 ESPECTRO DE ABSORCION DE ALGUNOS PIGMENTOS

FOTOSINTETICOS.

b) Además de las clorofilas, las membranas tilacoidales contienen pigmentos secundarios o accesorios, los carotenoides, que también participan en la absorción de luz. Estos consisten en largas cadenas de átomos de carbono unidos por enlaces dobles y conjugados, formando un anillo de seis átomos de carbono en cada extremo; estos se dividen en dos clases: los carotenos que son hidrocarburos que se reportan en dos formas y los carotenoles que son alcoholes y cetonas, tales como luteína y zeaxantina. Estos pigmentos poseen un espectro de absorción en la región de 400-500nm. Se cree que los carotenoides pueden proteger a las moléculas de clorofila de una excesiva fotooxidación por exceso de luz. (Hall y Rao, 1979). (Fig. 5 y 6).

Todos estos compuestos se hallan dispuestos en conjuntos funcionales o agrupaciones llamados fotosistemas. Distintas pruebas experimentales indican que la eficiencia fotosintética es una función de la longitud de onda de la luz incidente. La representación gráfica que muestra tal eficiencia (medida como desprendimiento de oxígeno o fijación de  $CO_2$ ) debida a la luz en función de la longitud de onda se conoce como espectro de acción de la fotosíntesis. En las reacciones fotoquímicas que implican un único pigmento, este espectro tiene la misma forma general que el espectro de absorción del pigmento.

Sin embargo Emerson y col. (1943) al estudiar la eficiencia cuántica de la producción de oxígeno (o sea el número de moléculas de oxígeno producidas por fotón absorbido) encontró que disminuía al iluminar las células con una longitud de onda mayor a 685nm a lo cual se le llamó caída del rojo. No obstante si las células se suplementaban con una longitud de onda menor (650-670nm) la eficiencia cuántica aumentaba. Estos resultados sugirieron la existencia de dos reacciones luminosas, cada una con su



**FIG 7** Eficiencia de la fotosíntesis (rendimiento cuántico) con luz de diferentes longitudes de onda. Agregando una luz suplementaria se aumenta el rendimiento cuántico a longitudes de onda superiores a los 680 nm, efecto de mejoramiento de Emerson.

longitud de onda característica; el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII), por medio de los cuales se realiza la fase luminosa de la fotosíntesis; estos fotosistemas actúan de manera secuencial e interrelacionada. (Hill y Benlall, 1960). (Fig. 7).

Billey y col. (1972) realizaron ensayos con Ácido diazonobenzen sulfónico (DABS) y demostraron que el FSI, se encuentra hacia la parte externa de la membrana del tilacoide y el FSII hacia la parte interna; esto ha venido a reforzar el modelo propuesto por Junge y Witt (1978) quienes concluyeron que el transporte de electrones en la membrana de los tilacoides está en forma de zig-zag.

El FSI no está asociado con la producción de oxígeno, su centro de reacción es la  $Cl_{aI}$  o P700 que absorbe luz de longitud de onda larga y es débilmente fluorescente. El FSII es el responsable de la producción de oxígeno, su centro de reacción es la  $Cl_{aII}$  o P680 que absorbe luz de longitud de onda corta y es fluorescente. Aquí también se encuentran la clorofila b así como carotenoides.

#### 1.4. Transporte de electrones en la fotosíntesis.

La producción de  $NADPH_2$ , ATP y  $O_2$  en los cloroplastos implica la transferencia de electrones a través de una cadena transportadora de los mismos. Esta transferencia electrónica requiere que cada uno de los transportadores sea reducido y oxidado para que la energía del electrón pueda pasar a lo largo de la cadena. Esto puede tener lugar vía dos sistemas: cíclico y acíclico.

En el flujo de electrones acíclico, el ATP se genera en un sistema de transferencia electrónica "abierto" junto con desprendimiento de



$O_2$  a partir de  $H_2O$  y formación de  $NADPH_2$  a partir de  $NADP$ . En el flujo de electrones cíclico, el flujo de electrones es un sistema "cerrado" (alrededor del FSI) y el ATP es el único producto formado. Estos dos sistemas se explican a continuación. (Fig. 8).

#### 1.4.1. Transporte de electrones acíclico.

El esquema del transporte de electrones en la fotosíntesis se basa en el propuesto por Hill y Bendall (1960).

El proceso empieza con la absorción de un fotón por el conjunto de pigmentos antena o colectores del FSII. La energía de excitación es transferida a una molécula de clorofila en el centro de reacción de una unidad fotosintética, la molécula designada es P680, la cual transfiere un electrón al aceptor primario de electrones designado Q (Kok, 1960 y Dwpwns, 1963), el cual es un tipo de plastoquinona con características de reductor débil y un donador de electrones primario desconocido designado Z. El  $Mn^{2+}$  y el  $Cl^-$  son esenciales para el funcionamiento de Z.

Desde Q el electrón pasa a través de una serie de moléculas a-carreadoras, donde el siguiente aceptor de electrones es la plastoquinona (PQ), una quinona liposoluble con una cadena lateral larga que se parece a la ubiquinona de la cadena respiratoria mitocondrial.

De aquí el electrón se transporta al citocromo f (Cit.f); del cual su posición fue la primera en determinarse, mediante el uso específico de mutantes del Cit.f. En este punto se ha descrito un sitio de acoplamiento entre PQ y Cit.f, donde se crea la energía libre necesaria para la formación de ATP.

El siguiente componente de la cadena es la Plastocianina (PC),

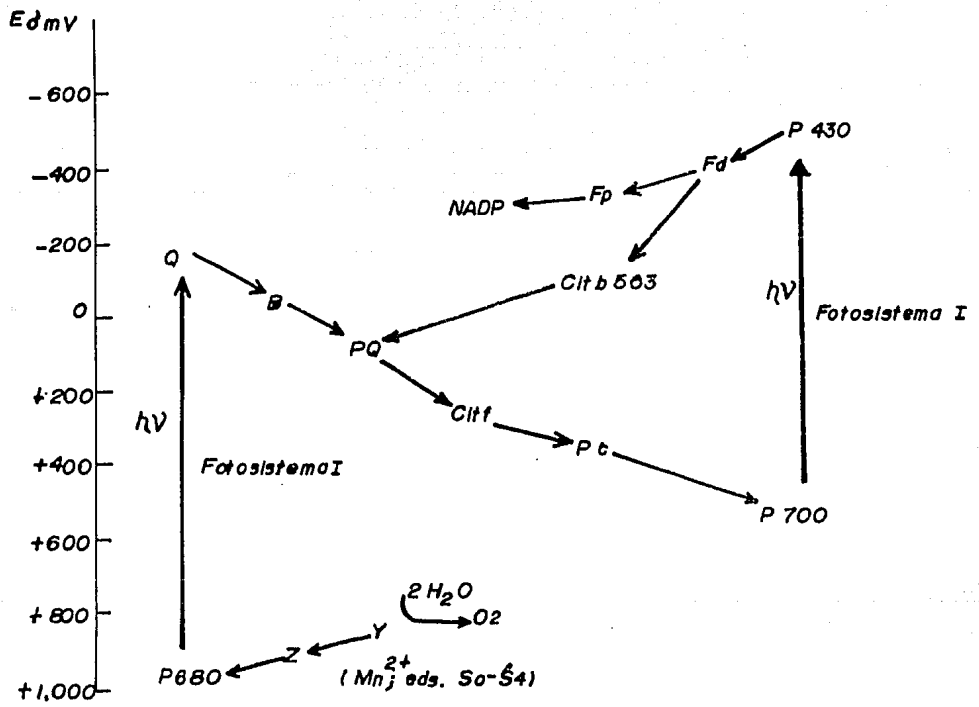


FIG. 8 Transporte de electrones fotosintético en plantas superiores.

es una protefna azul que contiene cobre, su posición esta determinada - por estudios realizados semejantes a los hechos con Cit.f. El átomo de co- bre de esta protefna es el que transporta los electrones en realidad, ya que es capaz de experimentar ciclos  $Cu(I)$ - $Cu(II)$ .

De aquí el electrón es donado al sistema de pigmentos del FSI, designado como P700; el cual es excitado y iona el electrón al aceptor - X o P430, que se cree es una protefna ferro-sulfurada.

La sustancia reductora de la ferredoxina (SFR), es el primer a- ceptor de electrones del FSI.

En este orden, el electrón pasa a una sulfo-ferro-protefna lla- mada Ferredoxina (Fd). En el siguiente paso interviene una enzima denomi- nada Ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxido reductasa (Fd-NADP<sup>+</sup> Red), una flavoprotefna que contiene Flavin Adenin Dinucleótido (FAD) y que reduce el NADP<sup>+</sup> dan- do NADPH<sub>2</sub>, el cual es un producto primario en esta reacción.

Se ha sugerido que dos moléculas de ATP se forman simultánea- mente a partir de dos moléculas de ADP y dos moléculas de fosfato inórga- nico (Pi) de forma que la energía se conserva en forma de este compuesto de alta energía.

#### I.4.2. Flujo de electrones cíclico.

En este proceso que requiere luz y cloroplastos el único produc- to neto es el ATP, ya que para producir ATP únicamente se necesita un flu- jo de electrones cíclico que implique sólo al FSI. Esta reacción fue des- cubierta en 1954 por Arnon, Allen y Whatley utilizando cloroplastos aisla- dos de espinaca. Cuando la luz excita al FSI se expulsa un electrón de la clorofila a en estado excitado y éste es cedido a la Fd que se reduce.

Por último la Fd reducida, cede el electrón al Citocromo b (Cit. b) y luego a través de la cadena de transporte electrónico vuelve a la -- clorofila a en el FSII, generándose un gradiente electroquímico para la formación de ATP.

### I.5. Bombas de protones en la cadena redox del cloroplasto.

Bomba en el sistema lítico del agua.

Algunas partes de la cadena redox del lado del  $O_2$  del FSII parece que están accesibles a reactivos a ambos lados de la membrana. El manganeso se descarga en la fase interna, pero en los cloroplastos tratados -- el manganeso adicionado es donador al FSII como el ferricianuro. Ambos iones no pueden atravesar la membrana.

El Cit. b<sub>559</sub> que es donador del FSII a bajas temperaturas, se oxida con ferricianuro y tanto el citocromo b como las reacciones líticas del agua se modifican con tripsina y otros reactivos que no pueden cruzar la membrana. El aparato productor de oxígeno es grande y atraviesa la membrana y libera protones hacia el interior del tilacoide. La oxidación del agua y transferencia de electrones al FSII libera 4 protones por  $O_2$  producido (Fowler y Kok, 1974).

La participación de los protones en el lado aceptor del FSII.

El flujo de electrones de Q a la poza de Plastoquinonas ocurre mediante un mecanismo de dos etapas. La reducción de Q a dihidroxiquinona involucra la toma de 2 equivalentes de protones. Witt (1971), (Fowler y -- Kok, 1974).

Los protones se toman estequiométricamente con electrones en -- una relación 1:1. Además la reducción de PQ a dihidroxiquinona involucra

des protones por molécula. Hay discrepancias entre la velocidad a la que se reduce la  $P_2$  y la velocidad a la que el protón abandona la fase acuosa externa, sugiriendo que los protones involucrados en la reducción no vienen de la fase de inmediato. (Hauska, 1975).

#### 1.6. Fotofosforilación.

La fosforilación ocurre en el  $CF_1$ - $CF_0$  o ATP sintetasa, localizada en la cara externa de la vesícula del tilacoide, la cual se compone de dos factores funcionales: una que es una estructura extrínseca oligomérica llamada  $CF_1$  que forma un complejo esférico de cerca de 9.0-11.5 nm de diámetro y el segundo componente, que es un complejo intrínseco en la membrana llamado  $CF_0$ , el cual funciona como un canal de protones, al mismo tiempo que el  $CF_1$  fosforila al ADP.  $CF_1$  es el sector catalítico de la enzima y se compone de 5 polipéptidos los cuales se designan como tres subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$ , y una  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contienen los sitios de enlace y catalíticos para el ADP y el ATP. La subunidad  $\delta$  es la encargada de unir la  $CF_1$  a la partícula  $CF_0$ , la subunidad  $\zeta$  controla el flujo de protones dentro del complejo y la subunidad  $\epsilon$  inhibe la actividad catalítica del complejo en la oscuridad para bloquear la hidrólisis de ATP. (Fig. 9). (Nelson, 1980).

Por otro lado  $CF_0$  se compone de tres polipéptidos los cuales se han designado como subunidades I, II y III. (Fig. 9). (Nelson, 1980).

Una vez generada la energía producida durante el transporte de electrones el complejo  $CF_0$ - $CF_1$  o ATP sintetasa, la aprovecha para la síntesis del ATP, disipando el gradiente protonométrico. Los valores de  $H^+/2e^-$  encontrados en los cloroplastos oscilan entre 1.1-1.9, lo cual significa que

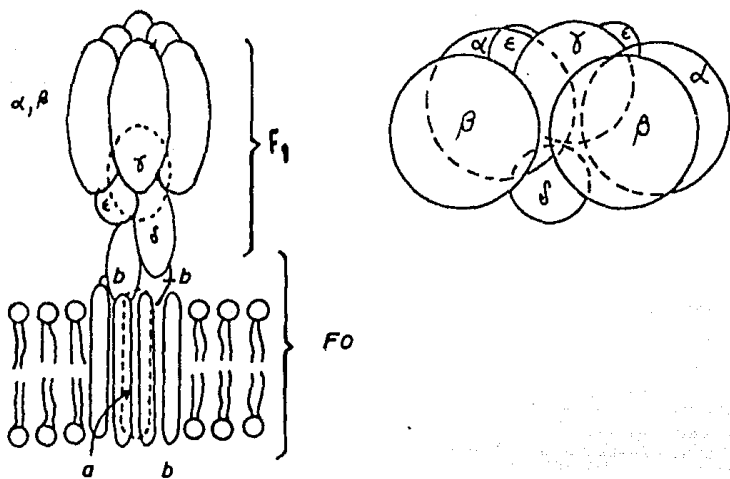


FIG. 9 MODELO CONCEPTUAL PARA LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO  
 ATPasa PROTON.

por cada dos electrones que son transportados por la cadena se fosforilan de 1.1 a 1.9 ATP.

#### I.7. Acoplamiento del Transporte de Electrones a la Síntesis de ATP.

La síntesis de ATP está acoplada al transporte de electrones y viceversa. En 1958, Arnon, Whatley y Allen demostraron que era un requisito que la formación de ATP y la reducción de  $\text{NADP}^+$  estuvieran acopladas y -- también demostraron que la velocidad del flujo electrónico hacia  $\text{NADP}^+$  dependía de la presencia de ADP y  $\text{P}_i$  (requerido para la formación de ATP); esto puede ser explicado por medio de la hipótesis Quimiosmótica propuesta por Mitchell (1961). El sugiere que el flujo de electrones a lo largo del sistema de moléculas transportadoras de hidrogeniones cargados positivamente en la membrana del tilacoide, crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana.

El gradiente consta de dos componentes: una diferencia de concentración de iones hidrógeno o  $\Delta\text{pH}$  y una diferencia de potencial electroquímico. El gradiente electroquímico y el gradiente de protones se deben a la acumulación de iones hidrógeno en los tilacoides del cloroplasto, cuando se transportan los protones de afuera hacia adentro por medio de las plastoquinonas y la fotólisis del agua, depositándose en el espacio intratilacoidal.

La síntesis de ATP se lleva a cabo por el flujo de protones a través de  $\text{CF}_1\text{-CF}_0$  en sentido inverso, mediando por una bomba de protones a favor de un gradiente en presencia de ADP y  $\text{P}_i$  que son empleados por el factor de acoplamiento uno ( $\text{CF}_1$ ). (Mitchell, 1961).

En esta hipótesis no se postula la presencia de ninguna máquina

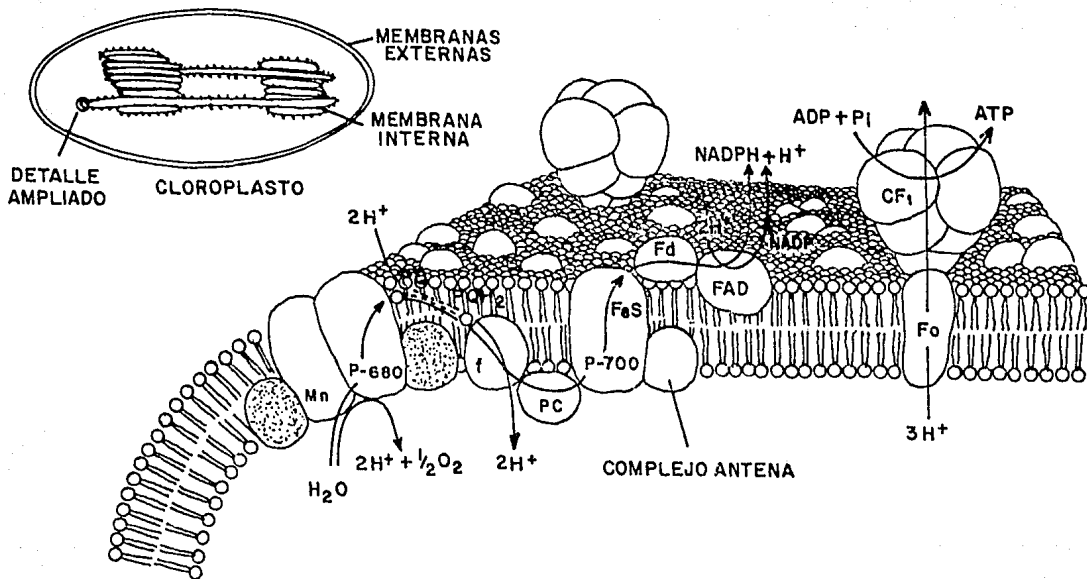


FIG.10 FLUJO DE ELECTRONES ACOPLADO A LA SINTESIS DE ATP



ria molecular en la que el flujo de energía procedente de la luz se acopla a la síntesis de ATP. En su lugar el papel crucial lo desempeña una membrana que separa una región de la otra, que sirve como barrera para la formación de los gradientes mencionados. La membrana proporciona más que protección, confinamiento y un medio interno controlado, ya que la disposición asimétrica de las moléculas que transportan electrones a través de la membrana, permite el establecimiento del gradiente de protones.

Una demostración convincente del papel desempeñado por el gradiente de protones en la fotofosforilación la realizaron Jagendorf y Uribe (1966), al demostrar que la creación de un gradiente artificial de protones puede dar lugar a la síntesis de ATP.

El modelo quimiosmótico define una relación entre las estequiometrias básicas:  $H^+/ATP$ ,  $H^+/e^-$  y  $ATP/2e^-$ , con el conocimiento de dos de ellas se puede conocer la tercera. Para estas tres relaciones se han obtenido valores diversos.

La relación  $ATP/2e^-$  ha sido estimada en cloroplastos por Porritt y McCarty (1974) calculando la velocidad del transporte de electrones basal ( $T_{eb}$ ) y la concentración interna de  $H^+$  durante la fosforilación, logrando encontrar una estequiometría de 133. La salida fosforilante de  $H^+$  reduce el tamaño de la poza de  $H^+$  y consecuentemente se aumenta la velocidad del transporte de electrones y se reduce la salida basal de  $H^+$ .

Por otro lado Izawa y Good (1968) encontraron una relación de  $2ATP/e^-$ .

La mayor parte de los reportes respecto a la estequiometría  $H^+/e^-$  apoyan la idea de que se transfieren dos protones por cada par de electrones a través de la membrana teniendo en los cloroplastos una proporción de  $H^+/2e^-$  de 4, dando que hay dos lugares de acoplamiento.

En este caso la determinación de la relación  $H^+/ATP$  puede hacerse indirectamente de las relaciones anteriores, teniendo que:

$$H^+ / ATP = H^+ / e^- / ATP/2e^- = 2 \times \frac{2}{1.33} = 3$$

requiriéndose por tanto tres protones por cada ATP sintetizado por el  $CF_1-CF_0$ . (Portis y McCarty, 1974).

A pesar de todo esto, no ha habido un consenso en los resultados de estas relaciones.

### I.8. Biogénesis del Cloroplasto.

Durante la germinación de las semillas se desarrolla el tejido foliar y dentro de él se desarrollan los organelos que serán responsables de la actividad fotosintética de la planta. Este desarrollo se conoce como biogénesis del cloroplasto.

Durante los últimos 20 años se ha estudiado con mucho interés el desarrollo de los cloroplastos de las hojas de plantas superiores. Este desarrollo puede ser estudiado en tres modelos diferentes: 1) Estudiando el desarrollo de etioplastos a plastidios inducido por luz en organelos aislados; 2) Estudiando el desarrollo de etioplastos a plastidios inducido por luz en plantas intactas y 3) Siguiendo el desarrollo normal de los cloroplastos durante la ontogenia de la hoja bajo un régimen normal de luz-oscuridad.

Siendo esta última forma la más apropiada para realizar los cambios funcionales y estructurales, ya que es aquí donde se presentan las condiciones "in vivo". Sin embargo la mayoría de los conocimientos acerca del desarrollo de los cloroplastos se han obtenido a partir del estudio

de etioplastos a cloroplastos de plantas etioladas expuestas a la luz -- después de un periodo de crecimiento en la oscuridad (Baker y Barber, 1984).

Pero bajo tales condiciones el desarrollo parcial de las hojas no tiene sincronía con aquellos procesos que requieren luz por lo que el empleo de etioplastos no es muy recomendado.

Se sabe que el desarrollo de los cloroplastos durante el crecimiento sigue un proceso en etapas. La secuencia de estas etapas puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, la aparición de los componentes y de las actividades fotosintéticas es mucho más tardía que en las plantas etioladas. Esto se debe a que en dichas plantas etioladas el crecimiento de la hoja se lleva a cabo en la oscuridad, y la mayoría de los componentes que participan en el transporte de electrones y enzimas fotosintéticas son formadas a altos niveles durante el crecimiento en la oscuridad. Se ha observado que los etioplastos contienen Cit. f, Cit. b<sub>6</sub> y Cit. b<sub>559</sub>; la producción de PQ puede ser estimulada por la luz aunque cantidades substanciales pueden estar presentes en etioplastos al igual que la PC, Pn-NADP<sup>+</sup>-Rd. La luz es utilizada prácticamente sólo para inducir la formación de pigmentos, conectar los dos fotosistemas y activar algunos procesos enzimáticos, lo cual se lleva a cabo en las primeras horas de iluminación. (Kirk, et al, 1978).

En el caso de monocotiledóneas como el maíz, se ha observado que existe un desarrollo lineal y progresivo entre las células de la base a la punta de la hoja, estos cambios en estructura del tejido fotosintético se ven reflejados en cambios en la actividad fotosintética de los cloroplastos. Varias especies que presentan este mismo desarrollo han sido estudiadas encontrándose un patrón regular de cambios tanto en la forma de los plastidios como en su desarrollo dimensional de la membrana del

tilacoides. (Leech, et al, 1973).

Se considera que los cloroplastos se desarrollan a partir de plastidios preexistentes denominados proplastidios los cuales se encuentran en las células del meristemo basal, estos poseen una doble membrana que puede ser un poco irregular en su contorno tiene un diámetro de 1  $\mu$ m o menos, ribosomas 70s, fibrillas de ADN, granos de almidón y plastoglobulos.

Por medio de la microscopía electrónica se ha establecido la presencia de los primeros cinco estados de desarrollo de plastidios de cebada de la primera hoja de siete días de edad crecidas bajo condiciones normales de luz-oscuridad, a partir del meristemo intercalar, teniendo lo siguiente: de 0.05-0.15 cm. se encuentran los proplastos asociados a mitocondrias; de 0.15-0.75cm. están los amiloplastos que son plastos incoloros conteniendo grandes granulos de almidón y primitivos cuerpos prolamelares; de 0.75-1.25cm. plastidios ameboides con sistema lamelar en caso; de 1.25-1.75cm. se encuentran plastidios inmaduros que presentan plastoglobulos, cuerpos protilacoidales con incipiente grana y de 1.75cm. hacia arriba encontramos cloroplastos maduros.

En el caso de etioplastos al ser iluminados hay una considerable proliferación membranal en forma de cuerpos prolamelares, los cuales consisten de una red de tubulos regular, los cuales contienen lípidos y algunas proteínas que serán utilizadas para la biogénesis de los tilacoides en respuesta a la iluminación. (Baker y Barber, 1984).

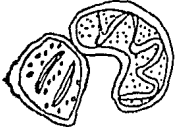

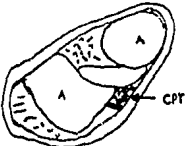

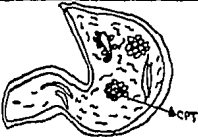
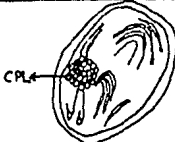




En maíz se ha observado que los etioplastos presentes son dimórficos, los de la vaina vascular contienen varios cuerpos prolamelares y los protilacoides se arreglan en capas paralelas. En contraste los de mesófilo contienen gran cantidad de cuerpos prolamelares largos y multi

centrados y los protilacoides se arreglan de manera muy irregular. Si estos son transferidos a iluminación continúa el cuerpo prolamelar pierde su apariencia regular y cristalina formando una agrupación de túbulo, seguido de un rápido aumento en su volumen para que después de una fase de retardo se desarrolle el grana y los tilacoides para formar los cloroplastos maduros. Se forman primero laminillas aplanadas con un arreglo regular de túbulo interconectados; posteriormente estas laminillas son separadas tanto el estroma o bien quedan compactas en pilas formando el grana. Esto ocurre tanto en etioplastos como en cloroplastos de plantas crecidas en condiciones normales de luz-oscuridad.

Los componentes del cuerpo prolamelar son usados en la producción de los tilacoides. Se ha visto que los etioplastos de mesófilo contienen suficiente material en el cuerpo prolamelar para incrementar el área tilacoidal hasta cuatro veces en las primeras 15 horas de iluminación, -- mientras que los etioplastos de vaina contienen material suficiente para incrementar el área tilacoidal en un 150%. En los cloroplastos de vaina -- la formación tilacoidal "de novo" se completa prácticamente entre las 12-24 horas después del comienzo de la iluminación y los tilacoides del mesófilo son sintetizados hasta 72 horas después de comenzar la iluminación. (Baker y Barber, 1984).

La formación del cuerpo prolamelar es paralela a la acumulación de la protoclorofila. En etioplastos cuando son iluminados, la fitolación de la clorofila se presenta para dar lugar a la fotoreducción de la protoclorofila a clorofila, y si la iluminación es suficientemente intensa la -- reducción de la protoclorofila es muy rápida. Además, se ha observado que la clorofila b no es detectable hasta un tiempo después de que la clorofila a es detectada. Extensivas investigaciones, en particular de Shlyk y -

FIG. 11 Desarrollo comparativo entre un cloroplasto (luz) y un etioplasto (oscuridad).

CLOROPLASTO (LUZ)		ETIOPLASTO (OSCURIDAD)	
	Proplasto con una estrecha "aprestón" con una mitocondria.		Proplasto
	Amloplastid con granos de almidón (A) y un cuerpo protilacoidal primitivo.		Etioplastos aislados de plantas de avena de 10 días de edad CPL-Cuerpo prolamelar
	Plástido ameboides. Se aprecian algunas perforaciones en el sistema lamelar.		Etioplastos aislados después de 5 min. de iluminación. El CPL se desorganiza y las lamelas del estroma se hacen más largas.
	Plástido inmaduro con glóbulos osmofílicos atrapados dentro de un CPT acorfo.		Etiocloroplasto "in situ" después de 15 min. de iluminación, se observan perfectamente las lamelas.
	Cloroplasto maduro con un grano de almidón (A) normal, un CPT pequeño y ribosomas (r) asociados con los tilacoides.		Plastido después de 24 hrs. luz, presenta un estromatocentro (E) y plastoglobulos.

col.(1971) han establecido que la clorofila a es el precursor de la clorofila b.

Un factor que puede afectar el desarrollo de la ultraestructura de los cloroplastos es la intensidad luminosa, ya que bajo fuerte iluminación se incrementa el número de cloroplastos por unidad de área. El grana aunque es más pequeño es más numeroso y hay una mayor cantidad de estroma con alta cantidad de enzimas del Ciclo de Calvin, se incrementa la cantidad de clorofila y la actividad de los fotosistemas, en comparación con los etioplastos irradiados con baja intensidad luminosa. (Baker y Barber, 1984).

Un hecho importante durante el desarrollo de los cloroplastos es la dependencia de la fotofosforilación con el pH y la temperatura del medio de incubación, lo cual puede ser diferente para los cloroplastos de las distintas regiones de la hoja, ya que en algunos casos se ha observado que la máxima actividad fotosintética de los cloroplastos de la parte superior de la hoja se han obtenido a pH y temperaturas mayores que para el caso de cloroplastos provenientes de la parte basal de la hoja.

## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Debido a que la mayoría de los estudios sobre la biogénesis del cloroplasto se han efectuado toman o como modelo el desarrollo de etioplastos de plantas etioladas expuestas a la luz después de un periodo de crecimiento en la oscuridad, no ha sido posible conocer si este proceso de biogénesis ocurre de manera similar en cloroplastos de plantas crecidas bajo condiciones normales de luz-oscuridad, razón por la cual se decidió estudiar la biogénesis del cloroplasto en plantas crecidas bajo tales condiciones.

Aprovechando el hecho de que los cereales presentan un desarrollo progresivo y gradual de sus células desde la base a la punta de la hoja a partir del meristemo basal, se eligió el empleo del maíz para la realización del presente trabajo, por considerarlo un buen modelo para la caracterización de la biogénesis del cloroplasto. Este tipo de plantas C-4 presenta dos tipos distintos de cloroplastos, los de mesófilo y los de vaina vascular. En este caso se estudiaron los cloroplastos de mesófilo, ya que éstos contienen tilacoides con la presencia de sus dos fotosistemas funcionales, llevando a cabo el proceso fotosintético en la fase luminosa de la misma manera que los cloroplastos de plantas con metabolismo C-3; a diferencia de los cloroplastos de vaina vascular los cuales carecen o presentan una muy baja actividad relacionada con el FSII.

En vista de todas estas consideraciones se decidió utilizar como modelo de estudio a los cloroplastos del mesófilo de maíz.



Considerando por otro lado que se conoce el desarrollo de los fotosistemas durante la biogénesis en otros modelos de estudio (ej. planta etiolada) decidimos estudiar el desarrollo funcional de la bomba de protones, entendiéndose como el intercambio de protones a través de la membrana por medio del transporte de electrones, para la generación de un gradiente que favorezca la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones, por lo que también se realizaron mediciones de la actividad del complejo  $CF_1-CF_0$  o ATP sintetasa tanto en la hidrólisis como en la síntesis de ATP durante el desarrollo de este organelo y en relación con la actividad de la bomba de protones.

#### HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si existe una correlación anatómico-fisiológica progresiva durante la maduración de los cloroplastos de mesófilo de maíz (Zea mays L.) var. Tuxpeño, entonces la actividad de la bomba de protones será diferente durante los tres estados de desarrollo de los cloroplastos aquí estudiados. (base, medio y punta de la hoja).

Con base en lo anterior se plantea el siguiente:

#### OBJETIVO GENERAL

-Conocer el funcionamiento de la bomba de protones en cloroplastos de mesófilo de maíz (Zea mays L.) var. Tuxpeño, durante los tres estados de desarrollo.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Medir la actividad de la bomba de protones y compararla en los tres estados de desarrollo.
- Medir la actividad hidrolítica de la ATP sintetasa por medio de activación con luz y compararla en los tres estados de desarrollo.

- Medir la actividad sintética de la ATP sintetasa y compararla en los tres estados de desarrollo.
- Realizar estudios estructurales anatómicos de la hoja y la presencia de la Anatomía Kranz en los tres estados de desarrollo.
- Realizar estudios de ultraestructura y diferenciación del cloroplasto.

### III. MATERIALES Y METODOS.

#### III.1. Material biológico.

##### III.1.1. Condiciones de siembra.

Para este trabajo se emplearon semillas de maíz (Zea mays L.) variedad Tuxpeño donadas por el Dr. Gregory Edmeados del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Las semillas se sembraron en cajas de plástico (35x23x8.5 cm.) conteniendo suelo preparado previamente con tierra de hojas y tierra negra mezcladas 1:1 con una altura de 4cm. sobre la cual se colocaron aproximadamente 40 semillas por caja y se cubrieron con una capa de 1cm. de tierra.

Las plantas fueron crecidas en un invernadero con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una temperatura de  $20 \pm 5$  °C en el día y  $10 \pm 5$  °C durante la noche y se irrigaron las cajas diariamente con agua corriente.

##### III.1.2. Cosecha de las hojas de maíz.

Se cosecharon las hojas de entre 15 y 20 días de edad. En las hojas se determinaron tres estados fisiológicos. El primero correspondió a los dos primeros centímetros de la hoja a partir de la base de la misma, el segundo correspondió a los siguientes dos centímetros y el tercero correspondió a los dos últimos centímetros pertenecientes a la punta de la hoja, denominándose a cada sección base, medio y punta respectivamente.

## II.2. Aislamiento y Resuspensión de los cloroplastos de mesófilo.

A partir de las hojas se aislaron cloroplastos de mesófilo de acuerdo al siguiente método: 20 gr. de hojas de maíz en buen estado se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada; después con la ayuda de unas tijeras se cortaron las tres secciones de la hoja, correspondientes a la base, medio y punta de 2cm. aproximadamente cada una.

Estas secciones se colocaron (por separado) en un vaso de licuadora previamente enfriado a 4°C, a donde se habían agregado 50 ml. de medio de aislamiento que contenía: sacarosa 0.5 M,  $MgCl_2$  5 mM, KCl 10 mM, amortiguador tricina-KOH 20 mM, pH 7.8, albúmina de bovino desgrasada (BSA) 0.2% y polivinil pirrolidona (PVP) 0.1%.

En el presente trabajo se probaron tres medios de aislamiento para obtener cloroplastos de mesófilo Tipo II hasta obtener el adecuado que diera cloroplastos activos y acoplados por tiempo suficiente (4-5 horas) para la realización de las pruebas experimentales. Los tres medios -- probados se presentan a continuación denominándose A, B y C respectivamente.

MEDIOS	A	B	C
REACTIVOS	CONCENTRACIONES (M)		
Sorbitol o Manitol	0.33		
Sacarosa		0.5	
Tris-HCl pH 7.8	0.05		
Tricina-KOH pH 7.8		0.02	0.03
$MgCl_2$	0.005	0.005	0.005
KCl		0.010	
NaCl			0.3
EDTA (Na)			0.0005

MEDIOS	A	B	C
REACTIVOS	CONCENTRACIONES (M).		
BSA	0.1 %	0.2 %	
PVP		0.1 %	
-Mercaptoetanol	0.01 mM		

Cada sección se homogeneizó en una licuadora Osterizer Custom Mod.L-21 por 5 segundos a máxima velocidad. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa colocadas en un embudo de filtración rápida, el filtrado resultante se centrifugó a 1500 x g durante 3 minutos en una centrifuga Beckman Mod.J2-21 a 4°C.

El sobrenadante se desechó y la pastilla que contenía los cloroplastos se resuspendió con un pincel en un volumen de 0.4ml. con un medio de resuspensión que contenía sacarosa 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl<sub>2</sub> 10 mM, - amortiguador tricina-KOH 10 mM pH 7.8, BSA 0.1% ; las muestras se mantuvieron durante 4-5 horas en tubos de centrifuga a 4°C. y en la oscuridad. Todos los pasos de aislamiento se efectuaron a 4°C aproximadamente.

### III.3. Determinación de la concentración de clorofila en las suspensiones obtenidas de cloroplastos del mesófilo de las tres secciones de la hoja.

Debido a que el cloroplasto presenta dos tipos distintos de clorofila cuando se aísla, la clorofila a y la clorofila b, el cálculo de la cantidad de clorofila presente será reflejada por la suma de ambas fracciones.

En base a esto, para determinar la concentración de clorofila se empleó el método espectrofotométrico propuesto por Arnon (1949) que -

consiste en lo siguiente:

Se utilizaron 7 tubos de centrifuga clinica, que contenian 5ml. de solución de acetona al 80% (a temperatura ambiente) a los que se les adicionaron - 50 µl de suspensión de cloroplastos; (a dos de ellos de base, a otros dos de medio y otros dos de punta), se taparon con parafilm y se agitaron vigorosamente en un Vortex-Genie Mod.K-550-G y fueron incubados en la oscuridad durante 8 min.; con el fin de que la clorofila fuera extraída sin ser dañada por la luz durante este lapso. El séptimo tubo se mantuvo como blanco, para calibrar el espectrofotómetro.

Transcurrido el tiempo anterior se centrifugó por 5 minutos en una centrifuga clinica Mod.CL No.197-A a 500 x g para precipitar los residuos de los cloroplastos y se decantó a otros tubos de ensaye para evitar la resuspensión de los mismos.

Cada solución resultante se leyó en un espectrofotómetro PYE-unicam Mod.SP6-550 contra solución de acetona al 80% como blanco a una longitud de onda de 663 y 645 nm. La cantidad de clorofila se determinó por el método de Arnon empleando los coeficientes de extinción molar específicos propuestos por McKinney (1941) para extractos de acetona al 80% lo cual se indica a continuación:

$$\text{Clorofila a (mg/ml)} = (12.7)(A_{663}) - (2.69)(A_{645})$$

$$\text{Clorofila b (mg/ml)} = (22.9)(A_{645}) - (4.68)(A_{663})$$

$$\text{Clorofila Total (mg/ml)} = (20.29)(A_{645}) + (8.05)(A_{663})$$

A=Absorbancia

#### III.4. Medición de la captación de protones (Bomba de H<sup>+</sup>) .

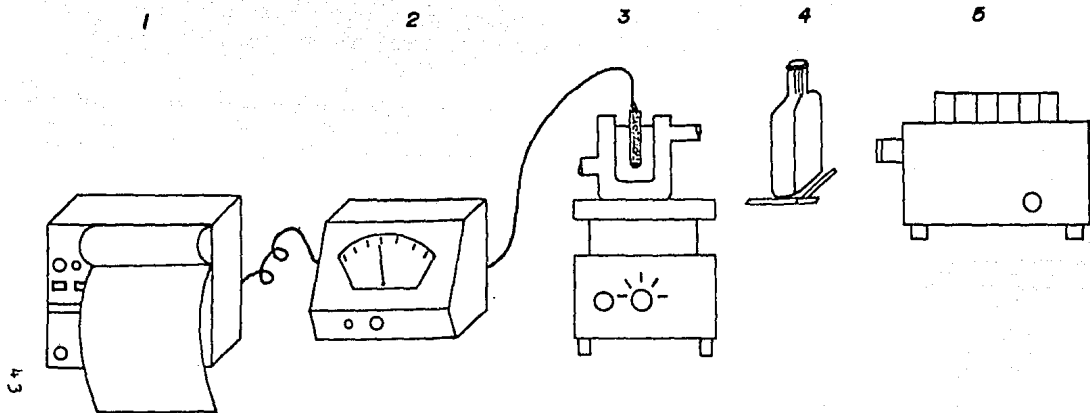
La entrada de protones(H<sup>+</sup>) se evaluó registrando los cambios de pH fotoinducidos en la mezcla de reacción conteniendo cloroplastos

(Newman y Jagendorf, 1964).

El transporte de iones y de  $H^+$  se asocia al flujo de electrones y a la conservación de la energía en los cloroplastos. Este flujo de electrones inducido por la luz resulta en un incremento interno del pH debido tal vez a la captación de  $H^+$  en el interior de la membrana tilacoidal. Para medir la bomba de  $H^+$  es conveniente ajustar el pH del medio externo a 6.0, dependiendo de la capacidad amortiguadora de la mezcla de reacción, el cambio en la elevación del pH puede observarse en mezclas de reacción que contengan sólo cloroplastos y verse incrementado notablemente en presencia de aceptores de electrones como el metilviológeno (MV) el cual actúa a nivel de FSI, este cambio de pH inducido por la luz puede ser tan grande como 0.4 unidades de pH, es decir de un pH inicial de 6.0 a 6.4 en la luz. (Newman y Jagendorf, 1964).

El equipo requerido para la medición de la bomba de  $H^+$  consistió de un electrodo de vidrio marca Orion de respuesta rápida en contacto con 3ml. de medio de reacción que contenía KCl 100 mM,  $MgCl_2$  5mM y amortiguador tricina-KOH 1mM pH 7.6, MV 5mM empleado como aceptor artificial de electrones y cloroplastos hasta una concentración final de clorofila de 25µg/ml. Antes de encender la luz en cada ensayo se ajustó el pH a 6.0. El electrodo mencionado estaba conectado a un potenciómetro Corning Modelo 12 de escala expandida de Scientific Instruments, el que a su vez estaba conectado a un registrador Beckman "10" a 10 mV.

El dispositivo usado consta de un proyector con lámpara de luz blanca la cual incide sobre un lente de Izawa que está constituido por solución de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) al 20% contenido en un frasco plano de vidrio; el cual elimina el calor y hace las funciones de filtro, además de concentrar la luz en la cámara de reacción que se encuentra sobre una



- 1- Graficador  
 2- Potenciómetro  
 3- Agitador (Electrodo dentro del medio de reacción + cloroplastos)  
 4- Lente de Izawa.  
 5- Proyector

FIG. 12. Dispositivo empleado para la medición de la actividad de la bomba de protones y la síntesis de ATP.



base de agitación magnética Spin con plato térmico Mod.4803 que mantiene homogénea la suspensión de cloroplastos y ayuda a lograr una iluminación constante sobre los cloroplastos contenidos en la cámara de reacción. (Fig.12).

-Cálculo de la bomba de protones.

La velocidad y el cambio de pH, se puede estimar debido a la deflexión del pH, ocasionado por la adición de una cantidad de ácido -- estándar, en nuestro caso para conocer los neq de  $H^+$  captados en cada uno de los ensayos. Se hizo una proporción entre el cambio que se obtiene en la escala del graficador con 0.5  $\mu$ l. de HCl 0.01 N que equivale a 1.6666 neq  $H^+$ /ml. y el cambio en esta escala causado por la bomba cuando se enciende la luz.

Para realizar este cálculo se consideran los siguientes datos: volumen total empleado 3ml., velocidad de la carta del graficador que es una pulgada por minuto, cantidad de clorofila agregada que es de 25 $\mu$ g/ml. y la calibración con HCl 0.01 N. Los resultados se expresan en neq  $H^+$  x  $10^{-1}$  mg. clx hr. $^{-1}$ .

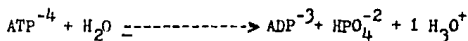
### III.5. Medición de la síntesis de ATP.

En el estudio de las reacciones de fotofosforilación de cloroplastos ó cromatóforos bacterianos es necesario medir la cantidad de ATP sintetizado. Generalmente se ha utilizado la especificidad química de algunas reacciones enzimáticas por el ATP para reaccionar con sustratos como por ejemplo glucosa o 3-fosfoglicerato para obtener compuestos como la glucosa 6 fosfato y el 1,3 difosfoglicerato. Estos productos cuando reaccionan respectivamente con  $NADP^+$  o  $NADH + H^+$  van a dar lugar a un cambio en absorbancia a 340nm. Dicho cambio se utiliza para medir indirectamente

tamente la cantidad de ATP sintetizado. Otro método que se ha usado es el sistema luciferina-luciferasa, donde se relacionan directamente los cuantos de luz emitidos por dicho sistema con la concentración de ATP en la muestra.

Nishimura y Chance (1962) han desarrollado un método de medición del ATP que presenta algunas ventajas sobre los métodos citados. Este método no necesita que sustancias químicas como enzimas, ajenas a la fotofosforilación estén presentes en el medio de reacción. Se debe tener presente sin embargo al utilizarlo que el medio de reacción debe contener sustancias de capacidad amortiguadora mínima y que su aplicabilidad depende del pH, concentración de metales como el  $Mg^{2+}$  presente en la muestra y concentración de sales como el cloruro de sodio y potasio.

La síntesis de ATP se midió por medio del cambio de pH fotoinducido en la mezcla de reacción conteniendo cloroplastos a pH 8, Alberty (1951, 1968) ha calculado el número de equivalentes producidos en esta reacción de fosforilación como función del pH. La carga neta del ADP a pH mayor de 8 es de -3, mientras que la de el ATP es de -4 y la del fosfato es de -2 por lo que:



para pH 8 el número de equivalentes de  $H_3O^{+}$  producido por cada equivalente de ATP hidrolizado es de 1, y para pH 7.0 es de 0.7 por lo que existe un compromiso en la reacción del pH más adecuado para medir la fosforilación. Entonces aunque el pH óptimo de la reacción sea próximo a 7, la equivalencia entre protones y ATP sintetizado es mayor a pH 8.0 por lo que se realiza la medición a pH 8.0. (Nishimura y Chance, 1962).

En la fotofosforilación se consume una mol de protones por ca

da mol de ATP sintetizado. Estos protones no están directamente relacionados con los protones de la bomba o los protones que se transportan por el  $CF_0$  durante la síntesis. (Nishimura y Chance, 1962).

El dispositivo empleado fue el mismo que para la bomba de protones. La mezcla de reacción también fue la misma que la utilizada anteriormente pero a pH 8.0. Además se adicionó Adenosin Difosfato (ADP) 1mM y fosfato inorgánico ( $KH_2PO_4$ ) 3mM. Se agregaron cloroplastos equivalentes a 50  $\mu\text{g/ml}$  de clorofila. Una vez completo todo se iluminó la muestra y se midió el cambio de pH en el tiempo seguido por medio del graficador; después la luz fue apagada y la muestra se calibró de la misma manera que para la bomba de protones.

#### -Cálculo de la síntesis de ATP.

Para obtener la velocidad de la síntesis de ATP a partir del trazo obtenido en el graficador se consideran los siguientes datos: volumen total empleado 3ml., velocidad de la carta que es una pulgada por minuto, cantidad de clorofila agregada 50  $\mu\text{g/ml}$  y la calibración con 0.5  $\mu\text{l}$  de HCl 0.01 N que equivale a 1.6666 neq  $H^+$ /ml. Con estos valores obtenemos un número que llamamos factor el cual será multiplicado por la distancia recorrida en cada trazo y así obtener la velocidad de la síntesis de ATP expresado como nmoles de ATP  $\times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .

#### III. 6. Medición de la hidrólisis de ATP.

Para la medición de la hidrólisis de ATP se aislaron cloroplastos de mesófilo Tipo I, del mismo modo que en la sección II.2., excepto que en este caso el medio de aislamiento fue el siguiente: sorbitol 0.35 M, ácido ascórbico 5 mM, ácido 2-(N-Morfolino)etano sulfónico (MES) -----

20 mM pH 6.5, en este caso se realizó un lavado de los cloroplastos y posteriormente se resuspendieron en 0.4 ml. de un medio que contenía: sorbitol 0.35 M,  $MgCl_2$  1 mM,  $MnCl_2$  1 mM, N-2-hidroxi-etil piperazina-N'-2-ácido etanosulfónico (HEPES) 50 mM pH 7.6. Estas suspensiones de cloroplastos se guardaron en tubos de ensaye en el refrigerador, cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz durante una hora aproximadamente.

Se determinó la cantidad de clorofila como se indicó anteriormente.

#### Activación de $CF_1$ - $CF_0$ .

La activación de  $CF_1$ - $CF_0$  se hizo con luz para causar un cambio conformacional en  $CF_1$ .

Se tomaron 17  $\mu$ l de un medio que contenía: sorbitol 1.2 M y amortiguador tricina-KOH 100 mM pH 8.0 al que se le adicionó 44  $\mu$ l de un medio que contenía:  $MgCl_2$  5 mM y amortiguador tricina-KOH 15 mM pH 8.0--- más 40  $\mu$ l de cloroplastos equivalentes a 12.1  $\mu$ g/ml de base; 16.2  $\mu$ g/ml de medio y 14.7  $\mu$ g cl/ml de punta; todo esto se mantuvo en agitación en la oscuridad por un minuto, transcurrido este tiempo la muestra se puso en la luz (la fuente de luz fue un proyector de luz blanca 1500w/m<sup>2</sup>) a una distancia de 10cm. y en agitación constante por 1.5 min. Posteriormente se agregaron 0.9 ml. de medio de reacción de la ATPasa el cual contenía:  $MgCl_2$  2 mM,  $NH_4Cl$  1.1 mM, ATP 2.2 mM y amortiguador tricina-KOH 15 mM pH 8.0.

Después se apagó la luz y se mantuvo en la oscuridad y agitación constante por medio minuto para posteriormente detener la reacción con 0.5 ml. de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % w/v y se centrifugó la preparación a 1500 x g por 5 minutos. El fosfato presente se determinó por el siguiente método.

## Determinación de Fosfatos.

La determinación de fosfatos se hizo de acuerdo al método de Fiske-Subbarow.

La curva estándar para la determinación de fosfatos se hizo en 0.8 ml. de solución que contenía de 0 a 0.15  $\mu$ moles de fosfato. (Tabla 1 y Gráfica 1). La muestra se llevó a un volumen final de 3,2 ml. con agua destilada. Las muestras problema también se llevaron a este volumen.

Posteriormente se adicionaron 0.5 ml. de hexamolibdato de amonio al 6,6 % en agua más ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 7.5 N en una proporción 1:1 y se agitaron vigorosamente en un Vortex-Genie Mod. K-550-G y se agregaron 0.4 ml. de reactivo de color que contenía 5 gr. de sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) disueltos en 50 ml. de agua a los que se les agregó 1 ml. de  $H_2SO_4$  7.5 N, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se determinó su absorbancia a 660 nm. en un espectrofotómetro y se gráfico la curva patrón, obteniéndose además la actividad de la ATPasa de las muestras problema, expresadas como  $\mu$ moles Pi x  $mg^{-1}cl \times hr^{-1}$ .

### III.7. Técnicas de microscopía de cortes transversales de hojas de maíz y de suspensiones de cloroplastos de mesófilo de maíz.

#### III.7.1. Microscopía de luz.

Se hizo en base a Parra G, (1985) de la siguiente manera:

Se hicieron cortes transversales de aproximadamente 1 mm, de cada estado de desarrollo de la hoja de maíz, con ayuda de un bisturí. Estos cortes se fijaron en glutaraldehído al 3 % en solución amortiguadora

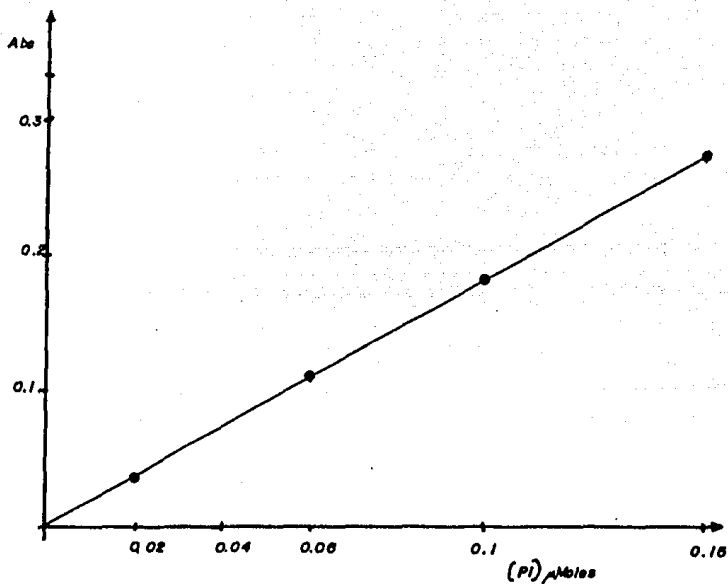
TABLA N. 1

Curva estándar para la determinación de fosfatos.

Concentración de fosfatos micronado ( $\mu$ moles)	Absorbancia 660 nm.
0.02	0.030
0.06	0.108
0.100	0.179
0.150	0.275

Tabla 1. Curva estándar para la determinación de fosfatos.

Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos.



*Grafica No. 1 Curva estándar para la determinación de fosfatos.*

de fosfatos 0.1 M pH 7,2 durante 2 horas. Se lavaron con medio que contenía sacarosa 0.25 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 a 7.4, realizando cambios cada 15 minutos y dejando el tejido sumergido en el medio durante toda la noche a 4°C. Se fijó con tetroxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 2 % en amortiguador de fosfatos pH 7.2 en la campana de extracción durante 2 horas.

Las muestras fijadas se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol del 30 al 100 % (v/v) que iban en aumento de su concentración de 10 en 10 % realizando cambios cada 10 minutos y luego con óxido de propileno al 100% durante 15 minutos (cada una).

Las muestras deshidratadas se incluyeron en OP:Epon (1:1) en desecador durante 24 horas, al cabo de este tiempo la muestra se colocó en cápsulas con Epon al 100 % para dejar polimerizar en la estufa a 60°C por 48 horas. Obtenidas las muestras, se realizaron cortes semifinos con un microtomo Reichert UMO3, estos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron en un microscopio de luz Juez Leitz. También se hicieron cortes finos para microscopía electrónica.

### III.7.2. Microscopía electrónica.

Se hizo en base a Parra (1985) de la siguiente manera: Muestras pequeñas de suspensiones de cloroplastos provenientes de los tres estadios de desarrollo de hojas de maíz se fijaron en glutaraldehído al 2% en un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 durante 2 horas a 4°C. Estas preparaciones se lavaron 4 veces (15 minutos cada lavado) en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 conteniendo sacarosa 0.25 M. Enseguida se postfijaron (doble fijación) en solución de  $OsO_4$  al 2 % en el mismo amortiguador a pH 7.4 durante 2 horas a 4°C.



Posteriormente se lavaron 4 veces (15 minutos cada lavado) en medio de sacarosa en fosfatos y se deshidrataron en series graduales con tinuas de etanol del 30 al 100 % realizando cambios cada 10 minutos y -- luego con óxido de propileno;etanol (1:1) y óxido de propileno al 100%. Las muestras deshidratadas se infiltraron con OP:Epon (171) en desecador durante 24 horas, al cabo de este tiempo las muestras se colocaron en cápsulas con Epon al 100 % para su inclusión, las cuales se colocaron en la estufa a 60°C por 48 horas para la polimerización total de la resina.

Ya listas las muestras, se realizaron cortes finos en un ultra microtomo Reichert UM03, los cuales se colocaron en rejillas de cobre, se tificaron con acetato de uranio al 2 % en agua destilada y pH 4-5 por 30 minutos a temperatura ambiente y con citrato de plomo al 2 % por 10 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico marca JEOL/100 B operando a 50 KV y ajustado a 50  $\mu$ m el condensador.

#### IV. RESULTADOS.

En el presente trabajo se estudió el funcionamiento de la bomba de  $H^+$  durante la biogénesis del cloroplasto de mesófilo de hojas de maíz - (Zea mays L.) var. Tuxpeño, crecido bajo condiciones normales de luz-oscuridad. Para lo cual se determinó la funcionalidad de los cloroplastos por medio de las mediciones de las siguientes actividades fotoquímicas: la actividad de la bomba de  $H^+$ , la actividad tanto sintética como hidrolítica de la ATP sintetasa así como la determinación de la relación de la clorofila a/clorofila b. Se observó además la estructura anatómica de la hoja y la presencia de la anatomía Kranz (por microscopía de luz y microscopía electrónica) así como la ultraestructura de los cloroplastos. A continuación se presentan los resultados de estas determinaciones y observaciones.

##### IV.1. Obtención de cloroplastos de mesófilo.

Para la obtención de cloroplastos de mesófilo tipo II, acoplados y activos por un tiempo suficiente (4-5 hrs) para poder realizar las pruebas experimentales se pobraron tres medios de aislamiento (ver Materiales y Métodos), siendo el medio "B" el adecuado para obtener cloroplastos de mesófilo con las características antes mencionadas. El grado de acoplamiento de los cloroplastos se siguió midiendo la actividad de la bomba de protones. Teniéndose que con el medio "A" y "C" no se registró actividad alguna de la bomba de protones, mientras que con el medio "B" se obtuvo una actividad de la bomba de  $H^+$  satisfactoria.

IV.2.Observación de cortes transversales de los tres estados de desarrollo de hojas de maíz por microscopía de luz y al microscopio electrónico.

IV.2.1.Microscopía de luz.

Las observaciones morfológicas por microscopía de luz de cortes transversales de los tres estados de desarrollo de hojas de maíz se muestran en las micrografías de la figura Ia, Ib y Ic.

El primer estado de desarrollo pertenece al denominado base que corresponde a los dos primeros centímetros de la hoja. Un corte transversal de este estado se muestra en la micrografía de la figura Ia, en donde podemos observar en primer término la capa de células de la epidermis superior (Es) y la de la epidermis inferior (Ei) a ambos lados del corte respectivamente, así como un estoma (e) con sus células guardia.

Los componentes estructurales de la hoja como xilema y floema y el tejido de la vaina vascular (CV) se encuentran poco desarrollados, pero ya es posible diferenciar las células de la vaina vascular (CV) que son más redondeadas que las del mesófilo (CM) las cuales son más alargadas. Ambos tipos celulares muestran la presencia de cloroplastos, siendo más alargados los de la vaina vascular (cv) y ambos con forma ovoide.

En un corte transversal de hoja de maíz pertenecientes a el segundo estado denominado medio encontramos las estructuras más desarrolladas comparativamente con los cortes de base. A "grosso modo" se puede ver que es posible diferenciar la epidermis superior e inferior (Es y Ei) a ambos lados del corte, así como el tejido de la vaina vascular (CV) y el tejido del mesófilo (CM). Esto indica que en este estado es ya más distinguible la anatomía tipo Kranz. Ambos tipos de células presentan cloroplastos, los del mesófilo tienen forma ovoide y han aumentado en número aunque

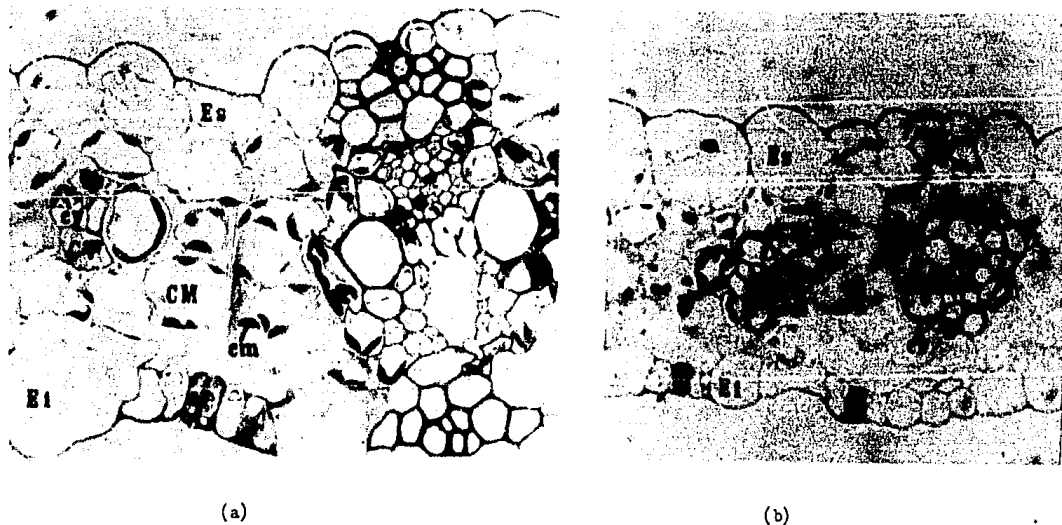


Fig.I. Cortes transversales de una hoja de maíz (*Zea mays* L.) var. Tuxpeño, correspondientes a dos estados de desarrollo. (a) base y (b) medio. Es:Epidermis superior;Ei:Epidermis inferior;CM:células del mesófilo; CV:células de la vaina; cm:cloroplasto de mesófilo;cv:cloroplasto de la vaina;e:estoma.

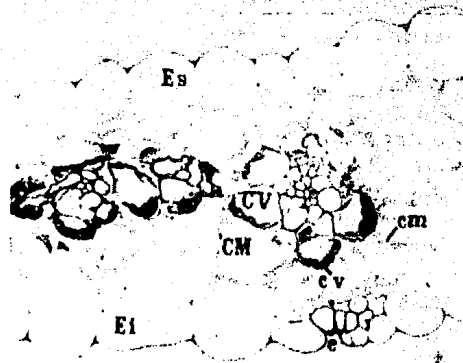


Fig.1c.Corte transversal de una hoja de maíz (*Zea mays* L.) var. Tuxpeño, correspondiente al tercer estado de desarrollo (punta). Es:Epidermis superior;E1:Epidermis inferior;CM:células del mesófilo;CV:células de la vaina;cv;cloroplastos de la vaina;cm;cloroplastos del mesófilo;e:estoma.

no tienen un tamaño muy homogéneo; en cuanto a los de la vaina vascular son alargados. (Fig. 1b).

En este estado las células del mesófilo tienen forma poliédrica mientras que las células de la vaina vascular tienen forma circular.

En el corte transversal del tercer estado llamado punta se señalan las células de la epidermis superior e inferior (Es y Ei) a ambos lados del corte. Las células del tejido de vaina vascular y del tejido del mesófilo (CV y CM) están ya mejor definidos, además de observarse los demás componentes estructurales de la hoja, lo que significa que la anatomía Kranz está ya perfectamente definida. (Fig. 1.c).

Las células del tejido del mesófilo (CM) presentan tamaños variables con formas poliédricas, mientras que las de la vaina vascular son redondas.

En este estado los cloroplastos de la vaina vascular son mayores en número comparados con los de las células del mesófilo. Los cloroplastos de la vaina (cv) siguen siendo de forma alargada y grandes en tanto que los del mesófilo (cm) son más pequeños y de forma ovoide.

#### IV.2.2. Microscopía electrónica.

Para observar diferencias morfológicas más finas se empleó el microscopio electrónico en los cortes transversales de los tres estados de desarrollo de la hoja de maíz.

En cortes finos pertenecientes al primer estado de desarrollo denominado base (Fig. II a), se observan cloroplastos tanto de mesófilo (cm) como de vaina (cv). Aquí no es posible definir ambos tipos celulares. La estructura de los cloroplastos ya es definida pero se encuentra poco desarrollada y se observan tilacoide no apilados en ambos tipos de clo\_

roplastos así como gránulos densos osmiófilos, los cuales probablemente sean plastoglóbulos (pg). Estos plastoglóbulos fueron reportados por Lichenthaler (1968). En los cloroplastos de vaina se observan además gránulos de almidón (a). El tamaño y la forma de ambos tipos de cloroplastos es diferente, los de mesófilo son más pequeños y de forma ovoide y los de vaina son más grandes y alargados.

Es importante hacer notar que en ambos tipos celulares se presentan mitocondrias, las cuales se localizan muy próximas a los cloroplastos. Esto coincide con lo reportado por Wellburn (1984) quien indica que los cloroplastos en sus primeros estados de desarrollo requieren energía, necesaria para continuar su formación, tal energía es proporcionada por las mitocondrias.

En los cortes finos del segundo estado (medio) la estructura de los cloroplastos se encuentra bien definida y un poco más desarrollada que en el estado anterior, observándose grandes cantidades de plastoglóbulos. (Fig. II b.).

Los cloroplastos de mesófilo siguen siendo más pequeños que los de la vaina presentando aún su forma ovoide y alargada respectivamente. En los cloroplastos de vaina el número de gránulos de almidón ha aumentado. Notamos que los cloroplastos de mesófilo presentan un sistema laminar más desarrollado con la presencia de tilacoides apilados formando grana, mientras que los de vaina son agranales.

Al hacer un corte fino transversal de la hoja perteneciente al tercer estado de desarrollo (punta) (Fig. II c), se observa que los cloroplastos de mesófilo presentan un sistema laminar más desarrollado formando grana, así como la presencia de plastoglóbulos (pg). Los cloroplastos se ven distribuidos alrededor de la membrana plasmática.



(a)



(b)

Fig.II.Micrografías electrónicas de cortes transversales de hojas de maíz (*Zea mays* L.) var.Tuxpeño, correspondientes a dos estados de desarrollo (a) base (b) medio. cv:cloroplasto de vaina;cm:cloroplasto de mesófilo;a:almidón;pg:plastoglobulos;m:mitocondrias.





Fig.IIc.Micrografia electrónica de un corte transversal de una hoja de maíz (Zea mays L.) var.Tuxpeño , perteneciente al tercer estado de desarrollo (punta). cv:cloroplasto de vaina; cm:cloroplasto de mesó\_filo; pg:plastoglobulo; .

En el caso de los cloroplastos de vaina (cv), se ve que son ricos en sistema lamelar pero no forman grana (g), estos cloroplastos se arreglan alrededor de la membrana plasmática orientándose hacia el centro de la célula; se observa también la presencia de plastoglobulos.

Comparando nuestros resultados con otros anteriores, encontramos que Ferchorowick y Gibbs (1980) en cortes transversales de hojas de maíz de 12-16 días de edad, observaron que la parte basal de la hoja se encontraba enrollada y presentando una anatomía Kranz rudimentaria no pudiendo ser distinguibles los cloroplastos de la vaina y los del mesófilo, aún a gran aumento, (34,000 X).

Por otro lado Miranda et al (1981) realizaron estudios anatómicos de hojas de maíz de siete días y encontraron que desde la base de la hoja ya se encontraba presente la anatomía Kranz; las células de la vaina eran más pequeñas que las del mesófilo, y el arreglo centrifugo de los cloroplastos de la vaina se presentó a partir de los 3cm. desde la base de la hoja. Los elementos vasculares aparecieron totalmente desarrollados desde 0-5cm. de la hoja, lo cual coincide con lo reportado por nosotros.

#### IV.3. Observaciones por microscopía electrónica de las suspensiones de cloroplastos de los tres estados de desarrollo, aislados de hojas de maíz.

Para el presente trabajo se tomaron micrografías de las diferentes muestras de suspensiones de cloroplastos aislados de los tres estados de desarrollo.

En la micrografía III a, correspondiente al primer estado de desarrollo (bazo) se observa la carencia de doble membrana externa. La estruc

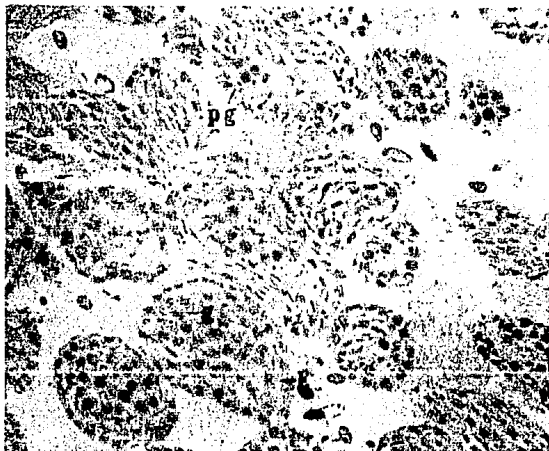
tura del cloroplasto se encuentra definida y la organización lamelar con formación de poco grana, encontrándose un número promedio de  $4.72 \pm 1.45$  tilacoides por grana (tomando como muestra 25 grana).

En la micrografía correspondiente al segundo estado (medio) -- (fig. III b) también se observa la carencia de doble membrana. Se observan algunos plastoglobulos así como un sistema lamelar con una mayor organización y formación de grana (g), el número de tilacoides promedio por -- granum fué de  $8.6 \pm 1.5$  (tomando como muestra 15 grana).

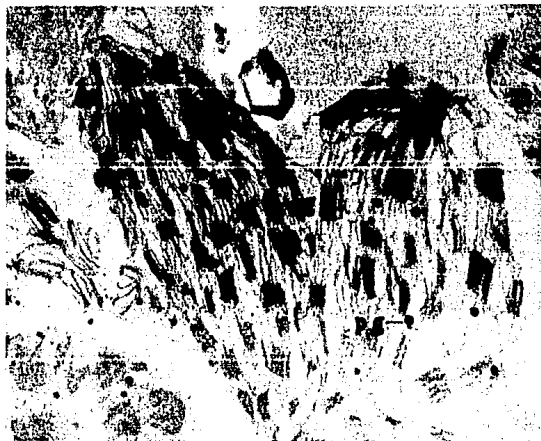
Al observar la micrografía (III c) del tercer estado (punta), se observa nuevamente la carencia de la doble membrana. Se observan plastoglobulos. El sistema lamelar se encuentra mejor organizado observándose un incremento en el número de tilacoides por granum, llegando a encontrarse un número promedio de  $15.7 \pm 3.8$  (tomando como muestra 21 grana). En este estado la estructura del cloroplasto se encuentra bien diferenciada.

En algunos casos se ha encontrado que los cambios en la intensidad de luz tienen efectos sobre la estructura del cloroplasto. Al examinar la ultraestructura del cloroplasto de plantas crecidas bajo varias intensidades de luz se mostró que plantas crecidas con luz de baja intensidad tienen gran desarrollo de grana, comparado con las crecidas a altas intensidades de luz. Estos cambios estaban correlacionados con una menor relación de  $Cl_a/Cl_b$  en cloroplastos con grana. (es decir alto contenido de clorofila b). Los resultados aquí presentados muestran que en el último estado de desarrollo la ultraestructura de los cloroplastos del mesófilo es más rica en grana y con una relación de  $Cl_a/Cl_b$  mayor en comparación con los otros dos estados, sugiriendo que a mayor contenido de  $Cl_b$  existe mayor apilamiento de tilacoides por granum.

Por el contrario, Parra (1985) encontró que en cloroplastos con



(a)



(b)

Fig.III.Micrografia electrónica que muestra cloroplastos aislados de mesófilo de hojas de maíz .  
 (*Zea mays* L.)var. Tuxpeño correspondientes a dos estados de desarrollo de la hoja (a)base y (b)  
 medio. E:estroma; g:granum ; pg:plastoglobulos.



Fig.IIIc.Micrografía electrónica que muestra cloroplastos de mesófilo aislados de hojas de maíz (Zea mays L.)var.Tuxpeño correspondiente al tercer estado de desarrollo de la hoja (punta). E:estroma; g:granum;t:tilacoides ; pg:plastoglóbulos.

mayor cantidad de grana la relación de  $\text{Cl}_a/\text{Cl}_b$  era similar a al encontrada en cloroplastos agranales, esto puede deberse a la diferencia en las variedades utilizadas en cada trabajo.

Lesse y Thomson (1971) realizando estudios morfológicos de los plastidios de diferentes regiones de desarrollo de hojas de maíz de siete días de edad crecidas en la luz, observaron que en las preparaciones correspondientes a los primeros 4cm. de la hoja contenían algunos plastidios de los denominados proplastidios intactos y contaminación por componentes celulares, particularmente ribosomas y membranas celulares. Los plastidios de los primeros 2cm. (a partir de la inserción de la hoja) -- eran grandes y presentaban de 2-3 tilacoides por granum. Los plastidios de los siguientes 2cm. eran de  $1-1\frac{1}{2}$  veces más grandes que los de la sección anterior, y con 2-6 tilacoides por granum. En los siguientes 2cm. los cloroplastos de mesófilo presentaban numeroso grana y los de la vaina -- presentaban de 2-3 tilacoides por granum. Los cloroplastos correspondientes a los últimos 5cm. de la hoja mostraban dos tipos distintos de cloroplastos, los de la vaina eran elongados e intactos y los del mesófilo eran más redondeados y se presentaban usualmente rotos.

Por otro lado Leech y col. (1971) estudiaron la estructura de los plastidios y la composición de lípidos y ácidos grasos en 5 regiones sucesivas de hojas de maíz crecidas en las mismas condiciones anteriores en donde las secciones fueron de 2cm. cada una encontrándose desde la sección A a la E. Observaron que las células de la sección A tenían vacuolas pequeñas y plastidios de entre  $1.5-2.0 \mu\text{m}$  de longitud y entre  $0.5-0.75 \mu\text{m}$  de ancho, algunos con cuerpos prolamelares pequeños y poco grana, con 1-2 tilacoides. En la sección B las células eran más largas y abundantes y altamente vacuoladas, los cloroplastos incrementaron hasta 2 veces

su longitud y su ancho en comparación con los anteriores. En la mayoría de los plastidios se observan cuerpos prolamelares, aunque más pequeños. Presentándose de 4-6 tilacoides por granum. En la sección C, ya era posible diferenciar los cloroplastos de mesófilo de los de vaina, ambos tipos de plastidios eran similares en tamaño y forma. En la sección D y E todos los plastidios eran más grandes que en la sección anterior; pero los de la vaina eran más elongados y largos, con sólo reminiscencias de grana. En los del mesófilo el grana se encontraba muy bien desarrollado, con -- hasta 12-15. tilacoides por granum, observándose que los plastidios aquí contenidos estaban en estados sucesivos de desarrollo.

Todo lo anterior es también comparable con lo reportado por Leech, et al (1973), Leese y Leech, (1976), Baker y Leech (1977) y Perchoro-wick y Gibbs (1980) para cloroplastos de hojas de maíz de 7 días de edad crecidas bajo las mismas condiciones anteriores.

#### IV.4. Contenido de clorofila a y clorofila b y su relación en los cloroplastos de mesófilo durante tres etapas de desarrollo de la hoja de maíz.

En la tabla 2 observamos los valores correspondientes a estas mediciones, los cuales son comparables con otros obtenidos por otros autores.

Se observa que la cantidad de clorofila a es mayor en relación con la cantidad de clorofila b en las tres etapas de desarrollo. Estos datos son comparables con los obtenidos por Mayfield y Taylor (1984), en hojas de maíz de 10-14 días de edad bajo fotoperíodo de 16 hrs. de luz y 8 hrs. oscuridad, observándose que tanto la Cl<sub>a</sub> como la Cl<sub>b</sub> se encuentran presentes desde las secciones más jóvenes de la hoja; aunque la cantidad

TABLA N. 2.

Relación del contenido de clorofila a /clorofila b de los cloroplastos de mesófilo de hojas de maíz de tres estados de desarrollo.

	Estado de desarrollo		
	Base	Medio	Punta.
Datos obtenidos.	2.88 ± 0.43	3.279 ± 0.25	3.40 ± 0.31
Perchorowicz y Gibbs (1980).	2.5 ± 0.7	3.1 ± 0.5	3.2 ± 0.5
Mayfield y Taylor (1984).	2.5		3.8



de ambas se incrementó grandemente en las secciones más maduras de la --  
hoja.

#### IV.5. Actividad de la captación de protones (Bomba de $H^+$ )

Los datos de esta actividad corresponden al promedio de 5 deter-  
minaciones en cada caso.

Como se observa en la tabla 3 los cloroplastos de mesófilo ais-  
lados del tejido basal de la hoja presentaron una velocidad de bomba de  
 $H^+$  promedio de  $2544.028 \text{ neq } H^+ \times \text{mg}^{-1} \text{cl.} \times \text{hr.}^{-1}$ ; para el tejido de media  
hoja se observó un incremento de esta actividad alcanzando un valor de --  
 $7865.87 \text{ neq. } H^+ \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr.}^{-1}$  que es casi tres veces mayor, comparado -  
con la actividad del tejido de la base; mientras que para el tejido corres-  
pondiente a la punta de la hoja, la actividad alcanzó un valor de -----  
 $16,784.73 \text{ neq } H^+ \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr.}^{-1}$ , el cual es 6.5 veces más grande en con-  
paración con la actividad de los cloroplastos de la base y 2 veces mayor  
con respecto a la actividad de los cloroplastos de media hoja.

Estos datos indican que durante el desarrollo de los cloroplas-  
tos de mesófilo a lo largo de la hoja de maíz se da un incremento en la  
actividad de la bomba de protones, desde la base hacia la punta de la ho-  
ja.

En la gráfica 2, observamos los gráficos de la captación de --  
protones correspondientes a los tres estados de desarrollo.

TABLA N. 3.

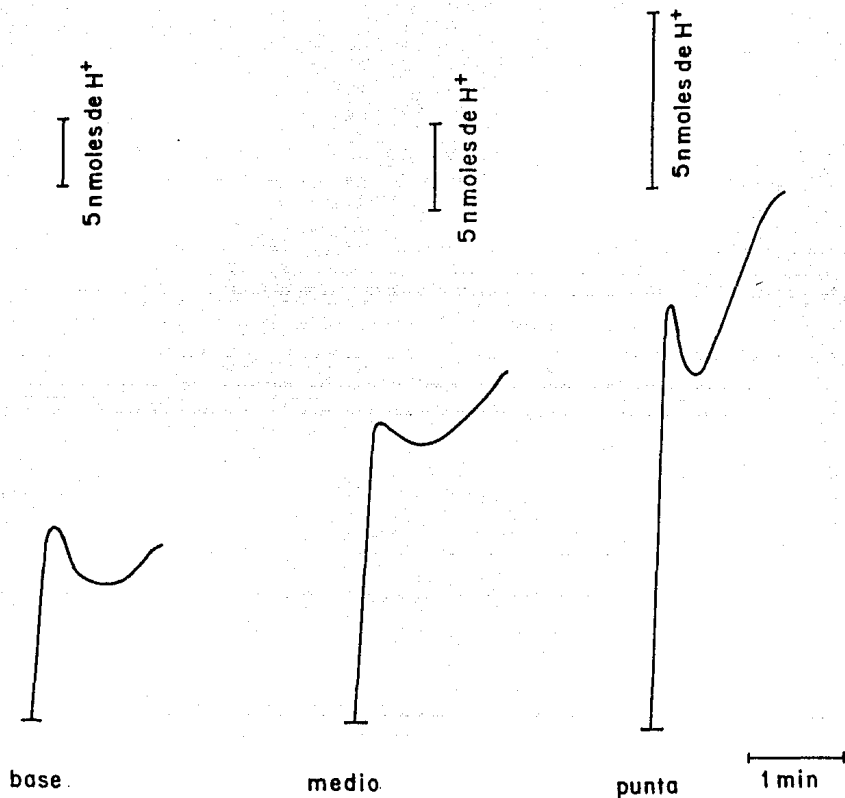
Velocidad de la captación de protones ( $H^+$ ) en cloroplastos de mesófilo - de maíz en tres estados de desarrollo.

FUNTA	MEDIO $\text{neq } H^+ \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .	BASE
17,285.677	9645.2987	2534.0367
19,841.2685	6714.7282	2916.3092
19,566.3121	8778.6536	2356.6779
12,992.2918	7933.8847	1926.3098
14,253.1372	8006.1853	2986.8105
	6122.4796	
$\bar{x} = 16,784.7374$	7865.8768	2544.0288

Tabla 3. Velocidad de la captación de protones ( $H^+$ ).

Medio de reacción: KCl 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM, amortiguador tricina-KOH 1 mM  
 pH 7.6, MV 0.5 mM, pH 6.0. Volumen final 3ml. Cloroplastos equivalentes a  
 25  $\mu\text{g/ml}$ . Iluminación de luz visible. Adiciones para la titulación: 1  $\mu\text{l}$   
 de HCl 0.01 N o 5  $\mu\text{l}$  de HCl 0.01 N. Los resultados se expresan en  $\text{neq } H^+$   
 $\text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .

α



Gráfica No. 2 Gráficos de la medición de la bomba de protones en cloroplastos de mesofilo de base, medio y punta de hojas de maíz tuxteño. Condiciones de medición iguales a la tabla.3

#### IV.6. Medición de la actividad sintética de la ATP sintetasa.

Se midió la velocidad de síntesis de ATP en tres estados de desarrollo del cloroplasto de mesófilo de hojas de maíz, por activación con luz. Los datos de estas determinaciones corresponden al promedio de 5 mediciones.

Se observó que los cloroplastos aislados de hojas de maíz a partir del tejido basal no presentaron actividad de síntesis de ATP (Tabla 4). En cuanto al tejido de media hoja estos presentaron una actividad de  $78.60 \mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$  en promedio y para el tejido de punta la actividad se incrementó hasta un valor de  $184.20 \mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$  en promedio.

Notamos que al igual que con la actividad de la bomba de  $\text{H}^+$ , la velocidad de la síntesis de ATP mostró un incremento desde la base a la punta de la hoja.

En la gráfica 3, observamos los trazos obtenidos de la velocidad de síntesis de ATP correspondiente a los tres estados de desarrollo.

Nuestros resultados pueden ser comparables con los reportados por Mayfield y Taylor (1984) quienes encontraron que ciertas proteínas pertenecientes al complejo cosechador de luz e involucradas en la síntesis de ATP medidas inmunológicamente estaban ya presentes en el tejido basal de la hoja en desarrollo. Estos autores sugieren que la fosforilación puede tener lugar en esta parte más inmadura de la hoja e ir aumentando progresivamente hacia la parte más madura, lo que estaría contribuyendo a incrementar la velocidad de síntesis de ATP. En nuestro trabajo no se observó actividad fosforilante en los 2 primeros centímetros de la hoja, lo cual puede deberse por un lado a que la actividad aquí presente haya sido tan baja que fué imposible detectarla con el dispositivo emplea

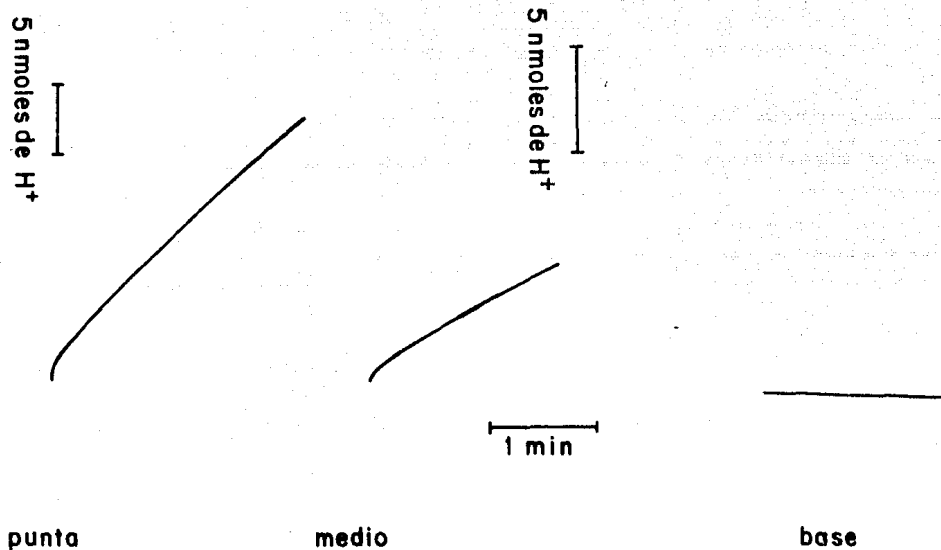
TABLA N. 4

Velocidad de la síntesis de ATP en cloroplastos de mesófilo de maíz.

FUNTA	MEDIO $\mu\text{moles ATP} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .	BASE
194.269	113.344	--
229.617	64.962	--
205.353	102.340	--
142.548	52.849	--
149.213	59.538	--
$\bar{x}$ = 184.200	78.607	

Tabla 4. Velocidad de la síntesis de ATP.

Medio de reacción: KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5mM, amortiguador tricina-KOH 1 mM, pH 7.6, MV 0.5 mM, ADP 1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM, pH 8.0. Volumen final 3ml. Cloroplastos equivalentes a 50  $\mu\text{g/ml}$  de clorofila. Iluminación con luz visible. Adiciones para la titulación: 5  $\mu\text{l}$  de HCl 0.01 N. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles ATP} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .



*Grafica No. 3 Gráficos potenciométricos de los cambios de pH en el medio durante la síntesis de ATP en cloroplastos de mesófilo de base, medio y punta de maíz tuxpeño. Ver condiciones experimentales en Materiales y Métodos.*

do para la medición de tal actividad. O bien pudiera ser que los cloroplastos aislados a partir del tejido basal estuvieran desacoplados. Esto se comprobó en el laboratorio al medir las actividades del transporte de electrones, de estas preparaciones (Reyes, tesis 1989)\* observándose que para el estado de base el transporte de electrones basal fue igual al transporte de electrones fosforilante (al agregar ADP Y Pi) y al transporte de electrones desacoplado (con cloruro de amonio) lo cual nos indica que realmente existe un desacoplamiento en los cloroplastos.

Nuestros resultados también son comparables a los obtenidos por Reyes \* quien encontró en cloroplastos de mesófilo de maíz en las mismas -- condiciones que los aquí estudiados, que la producción de ATP era ausente - en cloroplastos del tejido basal, mientras que para los cloroplastos de la sección media y de la punta se obtuvieron los siguientes valores respectivamente: 71.28  $\mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{h}^{-1}$  y 209.16  $\mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{h}^{-1}$ , lo cual es muy similar a lo reportado en el presente trabajo.

Todos estos resultados sin embargo son bajos comparados con las actividades de síntesis de ATP observadas en cloroplastos aislados de hojas completas de espinaca, en donde se han encontrado actividades de 400  $\mu\text{moles de ATP} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{h}^{-1}$ . (Mitchell y Mill, 1984).

#### IV.7. Medición de la actividad hidrolítica de la ATP sintetasa..

En la tabla 5 se observa que la velocidad de hidrólisis de ATP en el estado de base es mucho mayor comparada con la de los estados de medio y punta. Para el estado de base la velocidad alcanzada fue de 412.53  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{h}^{-1}$ , en el estado de medio la velocidad disminuyó a 288.11  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{h}^{-1}$  y para el último estado denominado - punta la velocidad obtenida fue de 295.46  $\mu\text{moles de Pi} \times \dots$

\*Comunicación personal.

TABLA N. 5

Medición de la actividad hidrolítica de la ATP sintetasa de cloroplastos de mesófilo de maíz en tres estados de desarrollo.

Estado de desarrollo.	Actividad en $\mu\text{moles Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$	% Actividad.
Punta	295.46	71.62
Medio	280.11	67.00
Basé..	412.53	100.00

Tabla 5. Medición de la actividad hidrolítica de la ATP sintetasa.

Medio de activación de ATPasa:  $\text{MgCl}_2$  2mM, ATP 2.2 mM y amortiguador tricina-KOH 15 mM pH 8.0.

Medio de incubación y cloroplastos equivalentes a 12.1, 16.2 y 14.7  $\mu\text{g cl}$  x ml. de base, medio y punta. Iluminación de luz visible. Se detuvo la reacción con TCA al 30%. Determinación de fosfatos por el método de Fiske-Subbarow. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ .



$\mu\text{g}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ , éstos dos últimos resultados son muy similares ya que la diferencia entre uno y otro es despreciable.

Algunos datos sobre esta actividad han sido reportados para espinaca, en donde se han encontrado los siguientes valores: 48  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$  (Hangarter, et al, 1981); 177  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$  (Ravizzni, et al, 1980).

Otro mecanismo de activación de la ATPasa es por medio de alcoholes, como el metano (Anthony y Jagendorf, 1983, 1986), el cual parece estimular preferentemente la  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa lo cual se utilizó en el presente trabajo, con este método es posible observar actividades más altas en cloroplastos de espinaca (hasta un 50% más de actividad) en comparación con las observadas por activación con luz.

Reyes (1989)\* realizó activación de ATPasa con metanol en cloroplastos de mesófilo de maíz bajo las mismas condiciones que los del presente trabajo, encontrándose una discrepancia en cuanto a lo reportado en la literatura, ya que se observó que para cloroplastos de maíz, la activación con luz presentó mayor actividad que la activación por metanol obteniéndose los siguientes resultados: 37  $\mu\text{moles Pi} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ ; 17.6  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$  y 24.5  $\mu\text{moles de Pi} \times \text{mg}^{-1}\text{cl} \times \text{hr}^{-1}$ , para el tejido de base, medio y punta respectivamente. Cabe hacer notar que el patrón de comportamiento es similar con ambos tipos de activación encontrándose una mayor actividad para el estado de base, seguido del estado de punta y por último el estado de media hoja, siendo la diferencia entre éstos dos últimos despreciable.

\* comunicación personal.

## V. DISCUSION.

Como se ve durante la biogénesis del cloroplasto de mesófilo - de raíz, es posible observar diferencias en cuanto a sus actividades fotoquímicas así como en su estructura y ultraestructura durante los diferentes estados de desarrollo aquí estudiados.

Al principio del desarrollo se observa que la actividad de la bomba de protones es muy baja, esto debido tal vez a que los cloroplastos en este estado de desarrollo se encontraban en una etapa muy joven de desarrollo por lo que sus tilacoides pudiesen no contener todos los fosfolípidos de la membrana ocasionando el que los tilacoides no tuviesen la estructura de un saco totalmente impermeable favoreciendo así un escape de protones a través de membrana a su constante dieléctrica baja.

Por otro lado, podemos pensar que en este estado de desarrollo aún estando presente todo el complejo  $CF_1-CF_0$ , éste no tuviera el arreglo conformacional necesario para evitar fugas de protones a través del  $CF_0$  y por lo tanto evitar el almacenamiento neto de protones y como consecuencia afectar el funcionamiento de la bomba de protones aún existiendo un transporte de electrones como lo muestran los resultados.

Un enfoque que permitiría observar lo anterior, sería el aplicar experimentalmente bloqueadores del  $CF_0$  como es el caso del Diciclohexil carbodimida (DCCD) o el Cloruro de trifenil estaño ( $TFSnCl$ ) y medir su efecto sobre la fotofosforilación tanto cíclica como acíclica. Si observáramos que existe fotofosforilación cíclica en los cloroplastos de base a concentraciones bajas del bloqueador esto nos indicaría que en esta fase de desarrollo algunos  $CF_1$  ya se encuentran unidos a  $CF_0$ , pero que

algunos  $CF_0$  estarían libres a la difusión de protones.

En este caso, debido a que la actividad de la bomba de protones es muy baja, ésta no genera un potencial electroquímico suficiente para - que se de síntesis de ATP, aunque este gradiente si es suficiente para ac tivar el sitio activo de la ATPasa ( $CF_1$ ) para que haya hidrólisis de ATP. Lo cual indirectamente nos indica un cambio de potencial de membrana, lo - que viene a ser congruente con la baja actividad de la bomba de protones en este estado de desarrollo.

En estados posteriores de desarrollo (medio y punta) la acti vidad de la bomba de protones aumenta progresivamente generándose un gra\_\_ diente electroquímico suficiente para que haya fotofosforilación. Esto de bido tal vez, a que en estos estados desarrollo se encuentran aunque no -- todas si por lo menos, las enzimas mínimas necesarias de la ATPasa para -- que se lleve a cabo la síntesis de ATP.

Es posible que en el estado basal no se encuentren todas las - subunidades que conforman la ATPasa, sino sólo las mínimas necesarias para que dicha enzima presente actividad hidrolítica como sucede en cloroplas\_ tos y mitocondrias reconstituidas. Esta hipótesis es congruente con la pre sencia de actividad hidrolítica de la ATPasa y la ausencia de fotofosfo\_ rilación en los cloroplastos en este nivel de desarrollo.

A este respecto sería interesante realizar estudios con ciertos compuestos que sean específicos en su unión a determinadas subunidades - del complejo  $CF_1-CF_0$  y observar así como es que tales subunidades se van conformando a través del desarrollo del cloroplasto. En este caso los an\_ ticuerpos contra las subunidades aisladas serían de gran utilidad.

Pueden existir ciertos mecanismos de regulación presentes en - el cloroplasto que favorezcan la síntesis de ATP desfavoreciendo la acti

vidad hidrolítica del ATP en los estados posteriores de desarrollo (medio y punta) del cloroplasto de la hoja de maíz.

Otro aspecto importante a estudiar sería la caracterización del desarrollo de la actividad enzimática del estroma de cloroplastos intactos de mesófilo para poder integrar la información con la aquí presente y tener así un panorama más completo de la biogénesis del cloroplasto.

Debemos mencionar además que todo esto a su vez está relacionado en cierto grado con los cambios ultraestructurales de los cloroplastos, específicamente con el número de tilacoides por gránulo durante el desarrollo de la hoja de maíz, ya que existe por tanto una mayor área de captación de luz dando una mayor eficiencia fotosintética. Además de que indicaría que durante el desarrollo de los cloroplastos de mesófilo de maíz se da un incremento en el número de cadenas transportadoras de electrones o bien un mejor ensamblaje de las ya existentes..

Por último debemos mencionar que debido a que los cloroplastos del mesófilo se desprenden fácilmente del tejido foliar y a que las células de la vaina vascular tienen una pared celular muy resistente no es muy fácil la obtención de cloroplastos de vaina, por lo que sería interesante desarrollar técnicas adecuadas para preparar cloroplasto tanto Tipo I y II de vaina vascular y caracterizar su desarrollo bioquímicamente para entender de forma integrada el desarrollo de ambos tipos de cloroplastos y observar como es que se acoplan para llevar a cabo el proceso fotosintético. En nuestro caso los resultados no se verían afectados por la presencia de cloroplastos de vaina, ya que con el método de aislamiento empleado se ha reportado una contaminación por cloroplastos de vaina en preparaciones de cloroplastos de mesófilo hasta del 10%. (Walbot & A. Holsington, 1982)

## VI. CONCLUSIONES.

Al hacer el estudio de las actividades fotoquímicas de los cloroplastos del mesófilo, así como observaciones de estructura y ultraestructura correspondientes a distintas etapas de desarrollo de la hoja de maíz se encontró lo siguiente:

-Los cloroplastos del mesófilo de maíz son un buen modelo para el estudio de la biogénesis del cloroplasto, ya que a medida que se desarrolla la hoja es posible observar cambios en cuanto a sus actividades fotoquímicas así como en su estructura y ultraestructura.

-Los procesos que se llevan a cabo durante la biogénesis del cloroplasto en condiciones normales de luz-oscuridad tienen aspectos en común con lo observado durante el desarrollo de etioplastos a cloroplastos en cereales, siendo ambos tipos de estudios complementarios.

-La actividad de la bomba de protones, se ve incrementada durante el desarrollo de los cloroplastos, indicando que existe un mejor y mayor acoplamiento de la membrana, en relación con las demás actividades fotoquímicas.

-La actividad sintética de la ATP sintetasa, se ve incrementada a medida que se desarrolla el cloroplasto. Aunque para el estado correspondiente a la base de la hoja no se encontró actividad alguna.

-La actividad hidrolítica de la ATP sintetasa, se ve disminuida a medida que el cloroplasto madura, debido tal vez a la existencia de un mecanismo regulatorio propio del cloroplasto, que desfavorezca este proceso a través del desarrollo de la hoja de maíz.

-Se observan ciertos cambios estructurales y ultraestructurales de los --  
cloroplastos así como la anatomía foliar de la hoja, los cuales están en  
relación directa con los cambios en las diferentes actividades fotoquí-  
micas durante la biogénesis del cloroplasto.

-Aún queda mucho por hacer por lo que es importante realizar más estudios  
sobre el tema para obtener un conocimiento más amplio acerca de la bio-  
génesis del cloroplasto.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Alberty, R., Smith, R. & Back, R., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193:425.
- Alberty, R., (1968), *J. Biol. Chem.*, 243:1337.
- Anthon, E.G. & Jagendorf, T.A., (1983), *Biochim. Biophys. Acta.*, 723:358.
- Anthon, E.G. & Jagendorf, T.A., (1986), *Biochim. Biophys. Acta.*, 848:92.
- Arnon, I.D., (1949), *Plant Physiol.*, 24:1.
- Arnon, D., Whatley, F.R. & Allen, M.B., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, 76:6324.
- Arntzen, C.J. & Briantais, J.M., (1975), in *Bioenergetics of photosynthesis*, (Govindjee ed), Academic Press, New York, p.p.51.
- Baker, R.N. & Barber, J., (eds), 1984, *Chloroplast biogenesis. Topics in photosynthesis*. Vol. 5, Elsevier Amsterdam, p.p.201.
- Baker, R.N. & Leech, M.R., (1977), *Plant Physiol.*, 60:640.
- Bazzaz, B.M. & Govindjee, R., (1973), *Plant Physiol.*, 52:257.
- Buttler, W., (1971), *Plant Physiol.*, 48:621.
- Carmeli, C., Lifshitz, Y. & Gephstein, A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta.* 376:249.
- Dilley, R.A., Peters, A. & Shaw, E.R., (1972), *J. Membrane Biol.*, 8:163.
- Fowler, C. & Kok, B., (1974), *Biochim. Biophys. Acta.*, 357:299.
- Govindjee & Govindjee, R., (1975), in *Bioenergetics of photosynthesis* (Govindjee eds), Academic Press, New York, p.p.1-50.
- Hall, D.O. y Rao, K.K., 1979, *Fotosintesis*. 2<sup>a</sup> ed. Omega, Barcelona, p.80.
- Hill, F.R.S. & Bendall, F., (1960), *Nature*, 186:135.
- Izawa, S. & Good, N., (1968), *Biochim. Biophys. Acta.*, 162:380.
- Jagendorf, T.A. & Uribe, E., (1966), *Brokhamen Symp. Biol.*, 19:219.
- Jagendorf, T.A. & Uribe, E., (1966), *Proc. National Ac. Sc.*, 55:318.
- Kirk, T.O. & Tilney-Bassett, R.A.E., 1978. "The plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance., p.p.720.

- Laetsch, W.M., 1971, "Chloroplast structural relationships in leaves of C-4 plants". in: Photosynthesis and photorespiration. Hatch, M.D., Osmond, C.B. & Slayter, R.O. (eds.), John Wiley and Sons Inc. p.323.
- Leech, M.R., Rumsby, G.M., Thomson, W., Crosby & Wood, P., (1971), "Lipid changes during plastids differentiation in developing maize leaves". in Proceedings of 2nd. International Congress on photosynthesis Research. Stresa, Italy.
- Leech, M.R., (1977). "Etioplast structure and its relevance to chloroplast development" in Biochemical Society Transactions, ., 566th, Meeting Cambridge, Vol. 5.
- Leech, M.R. & Chapman, J.D. (1979), Plant Physiol., 63: 567.
- Leese, M.B., Leech, M.R. & Thomson, W.W., (1971), "Isolation of plastids from different regions of developing maize leaves" in Reprinted from 2nd. International Congress on Photosynthesis. Stresa, Italy.
- Leese, M.B. & Leech, M.R., (1976), Plant Physiol., 57: 789.
- Lichtenthaler, K.H., (1968), Endeavour, 27: 144.
- Hauska, G. & Trbat, S., (1975). "Proton translocation in chloroplast" in Bioenergetics of photosynthesis. (Govindjee ed) p.151.
- MacKinney, G., (1941) J. Biol. Chem., 140: 315.
- Mayfield, P.S. & Taylor, C.W., (1984), Planta, 161: 481.
- McCarty, F.R. & Jagendorf, A.T., (1965), Plant Physiol., 40: 725.
- Miranda, V., Baker, R.N. & Long, P.S., (1981), New Phytol., 88: 595.
- Mitchell, P., (1961), Nature, 191: 144.
- Mitchell, P., & Mills, J.D., (1982), FEBS Lett., 144: 63.
- Mitchell, P., & Mills, J.D., (1984), Biochim. Biophys. Acta., 764: 93.
- Newman, J. & Jagendorf, T.A., (1964), Arch. Biochem. Biophys., 167: 109.
- Newman, J. & Jagendorf, T.A., (1964), Biochem. Biophys. Res. Commun., 16: 562.



- Nishimura, M. & Chance, (1952) *Biochim. Biophys. Acta.*, 57:96.
- Parra, G.M., 1985. Estudio de las características estructurales y funcionales de cloroplastos dimórficos de una planta agrícola el maíz (Zea mays L.) Tesis de maestría, ac. Química UNAM, México.
- Perchorowicz, J. & Gibbs, M., (1980), *Plant Physiol.*, 55:802.
- Plesnicar, M. & Bendall, D.S., (1973), *Biochem. J.*, 136:803.
- Portis, A. & McCarty, R.E., (1974), *J. Biol. Chem.*, 24:6250.
- Portis, A. & McCarty, R.E., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251:1610.
- Ravizzini, R.A., Andreo, C.S. & Vallejos, R.H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta.* 591:135.
- De Robertis, D.E. y De Robertis, F.M.E., 1984. *Biología celular y molecular.* El Ateneo. México. p.p.284.
- Rosinski, J. & Rosen, G.W., 1972, *Quart. Rev. Biol.*, 47:160.
- Ruffer-Turner, E.M., Bradbeer, W.J. & Stocking, R.C., (1984), *Israel Journal of Botany*, 33:133.
- Sestak, Z., (1977), *Photosynthetica*, 11:449.
- Singer, S.J. & Nicholson, G.L., (1972), *Science*, 175:720.
- Slater, E. & Myers, D.K., (1957), *Biochem. J.*, 67:558.
- Somerville, R.C. y Somerville, C.S., *Mundo Científico*, 37,(4):612
- Strayer, L., 1976. *Bioquímica. Reverté. Cap. 19.*
- Wellburn, R.A., (1984), *Planta*, 135:191.
- Nelson, N., Nelson, H., & Gottfried, S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:1361.
- Zabrocki D.R., Freeman, P., Duyson, T. & Murray, A., (1980), *Plant Physiol.*, 65:880.
- Walbot, V., Hoisington, A.D., 1982. "Isolation of mesophyll and bundle sheath chloroplast from maize". *Methods in chloroplast molecular biology.* Elsevier Biomedical. p.211.