

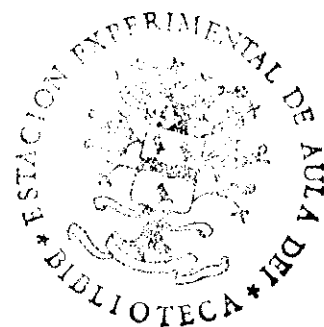
000424-852
CB-429367600000

TD 1987-2

7105

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, FACULTAD DE CIENCIAS

SECCION QUIMICAS



DINAMICA DE LA FORMACION DE LOS
PIGMENTOS FOTOSINTETICOS
EN EL DESARROLLO CLOROPLASTICO
INDUCIDO POR HIERRO

Memoria presentada por:
JESUS VAL FALCON
para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas
Zaragoza, Julio de 1987

Trabajo financiado por la Caja de Ahorros de Zaragoza Aragón y Rioja

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a:

Prof. Carlos Gómez Moreno. Catedrático del Departamento de Bioquímica y Ponente de esta Tesis.

Dr. Emilio Monge Pacheco y Luis Heras Cobo, por su labor de dirección.

Dr. Luis Montañes García, Jefe de la U.E.I. de Fertilidad de Suelos y Nutrición vegetal, por permitirme disponer de los medios de la Unidad.

Ma Angeles Gracia por su asistencia técnica.

A los compañeros de la Estación Experimental de Aula Dei y en especial a los de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal por su constante apoyo.

Caja de Ahorros de Zaragoza Aragón y Rioja, por la beca de Investigación que ha hecho posible la realización de este trabajo.

A todos los que han hecho posible la realización de esta Tesis.

INTRODUCCION

I 1.	El origen de la vida.....	1
I 2.	Eucariotas y procariotas.....	6
I 3.	Fotosíntesis.....	8
I 3a.	Los plastídios.....	13
I 4.	Pigmentos fotosintéticos.....	18
I 4a.	Clorofilas.....	19
I 4b.	Carotenoides.....	24
I 4b ₁ .	Regulación de la síntesis de carotenoides en los te- jidos verdes.....	28
I 4c.	Papel de los pigmentos fotosintéticos...	30
I 4d.	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos totales.....	33
I 5.	Morfología de las membranas del cloroplasto.....	35
I 5a.	Envoltura externa.....	36
I 5b.	Tilacoides.....	38
I 6.	Descripción del aparato fotosintético.....	41
I 6a.	Complejo del fotosistema I.....	41
I 6b.	Complejos del fotosistema II.....	43

I 6b ₁ . Complejo captador de luz LHC II.....	44
I 6c. Organización de los componentes de la membrana.....	46
I 7. Pigmentos y microelementos.....	47
I 8. Pigmentos y hierro.....	51

HIPOTESIS DE TRABAJO.....	57
---------------------------	----

METODOS

M I. Material vegetal.....	59
M I ₁ . Cultivo en hidropónico.....	60
M I ₂ . Condiciones de trabajo.....	61
M I ₃ . Solución nutritiva.....	62
M II. Aislamiento de cloroplastos.....	66
M III. Determinación de pigmentos por HPLC.....	71
M IV. Cuantificación de pigmentos totales.....	76
M V. Separación de complejos pigmento-proteína...	79

RESULTADOS

R-I. Extracción de pigmentos.....	86
R-II. Cromatografía líquida de alta resolución.....	93
R-III. Identificación de pigmentos fotosintéticos...	96
R-IV. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos..	100
R-V. Influencia de los solvente orgánicos en el rendimiento de extracción de pigmentos fotosintéticos.....	103
R-VI. Pigmentos y deficiencia de hierro.....	108
R-VII. Desarrollo cloroplástico.....	114
R-VIII. Composición pigmentaria de los complejos pigmento-proteína.....	123
R-IX. Selección del material foliar para el estudio del desarrollo cloroplástico.....	127
R-X. Influencia del aporte de hierro en la evolución de pigmentos y estructuras fotosintéticas.....	131

R-XI. Incidencia de la luz en el desarrollo cloroplastico inducido por hierro.....	170
DISCUSION.....	189
CONCLUSIONES.....	241
BIBLIOGRAFIA.....	244

INTRODUCCION

I 1. EL ORIGEN DE LA VIDA

Desde que Alejandro Ivanovich Oparin, en 1936 publicó *El Origen de la Vida*, pasando por los trabajos de Calvin, Urey, Miller, Abelson, Groth y Weyssenhoff y más recientemente Juan Oró, Ponnampertuma con Mariner y Carl Sagan, parece demostrarse que en los comienzos de la historia de la Tierra, el proceso de la Fotosíntesis modificó profundamente el carácter de su atmósfera y suministró las condiciones esenciales para el desarrollo y evolución de la vida. Los materiales orgánicos más antiguos que se conocen se han hallado en los depósitos de esquisto de Fig Tree (Sudáfrica), que contienen formas de hidrocarburos, algunos de naturaleza isoprenoide, porfirinas, purinas y pirimidinas. Las técnicas de datación isotópica indican

que dichos esquistos tienen, al menos, 3100 millones de años. Recientemente, se ha descubierto que algunas formaciones rocosas antiguas contienen vestigios reconocibles de organismos vivos, comprendiendo formas fotosintéticas. Así, por ejemplo, ciertas variedades de cuarzo encontradas en el sur de Ontario contienen fósiles microscópicos de formas coloniales de algas verde-azuladas. Se estima que estos depósitos tienen al menos 1500 millones de años, por ello, si esta estimación es exacta, la fotosíntesis en nuestro planeta opera, al menos, desde entonces.

Es posible que los primeros precursores de los seres vivos, los llamados protobiontes, se encontraran en un planeta con una atmósfera carente de oxígeno o de dióxido de carbono, o incluso de ambos. Unicamente la evolución de organismos capaces de generar ambos gases puede haber creado el ambiente adecuado para que se desarrolle la vida en todas sus formas. En este sentido Schopf, en 1974, propuso el siguiente esquema de evolución de la vida en 5 pasos:

1. Inicialmente aparecieron sistemas exentos de moléculas de porfirina. Los organismos más primitivos fueron anaerobios heterótrofos, que dependían completamente de la fermentación de compuestos orgánicos no biológicos sintetizados en ambientes carentes de oxígeno. Estos utilizaban

los compuestos orgánicos del océano como sillares de construcción y fuente de combustible.

2. Con el crecimiento y proliferación de estas células, que provocaron el progresivo agotamiento de los materiales orgánicos relativamente sencillos, que se daban en el medio acuoso, aparecieron organismos que contenían porfirinas de hierro con funciones similares a los actuales citocromos. Estos organismos eran capaces de producir reacciones anaeróbicas, con el sulfato, dióxido de carbono, nitrato u otros compuestos orgánicos. Estos organismos no solamente fueron capaces de utilizar nutrientes, no disponibles por vía fermentación, sino que obtenían mayor producción de energía a partir de estos nutrientes.
3. El siguiente paso en la evolución consistió en la aparición de los enzimas que ampliaban la ruta biosintética establecida previamente en el sentido de la aparición de metal-porfirinas, dando porfirinas acomplexadas con el magnesio además del hierro. Esto dió lugar a la formación de clorofilas y a la aparición de organismos anaeróbicos fotoheterótrofos, capaces de utilizar la luz solar en fuente de energía, si bien todavía eran necesarios los nutrientes orgánicos. Liberados de la necesidad de degradar grandes cantidades de materia orgánica para obtener

energía, esos organismos fotosintéticos eran capaces de invadir habitats que contenían mucho menos material orgánico para abastecer las necesidades celulares. Tales habitat, apenas contenían materia orgánica, por lo que era imposible la existencia de los organismos que dependían exclusivamente de ella.

4. Tras la situación descrita en el punto 3, solamente pudieron sobrevivir aquellas células que fueron capaces de utilizar compuestos orgánicos sencillos, especialmente el CO_2 . Los fotoasimiladores surgieron como fotoautótrofos anaeróbicos, capaces de utilizar la energía solar para formar sus propios materiales orgánicos; cuando aparecieron las rutas que fijaban el dióxido de carbono, similares a las de los autótrofos. Así, las primeras células fotosintéticas surgieron, probablemente, hace 3000 millones de años, aunque al principio no fuesen capaces de desprender oxígeno.
5. Con el desarrollo de las ficobilinas y el establecimiento de la unión entre el fotosistema I con el fotosistema II de la fotosíntesis, los iones hidroxilo producidos a partir del agua pudieron utilizarse como donores de electrones, dando lugar a la introducción de oxígeno libre en el ambiente.

Los primeros heterótrofos aeróbicos consumidores de oxígeno surgieron cuando el nivel atmosférico de este elemento alcanzó una concentración crítica como resultado de la fotosíntesis. Por lo tanto, fué necesario que transcurrieran 1000 millones de años despues de la aparición del O_2 en la atmósfera para que se desarrollasen los vertebrados aeróbicos y las plantas vasculares.

Como resultado de esta evolución se incrementó la concentración de oxígeno en la atmósfera, transformándose parte de éste en ozono, que actuá como pantalla frente a la radiación ultravioleta. Como consecuencia de este apantallamiento los organismos vivos pudieron trasladarse de las aguas profundas a otras más superficiales y algunos de ellos pasaron a la tierra.

En la actualidad existen organismos que se integrarían en los pasos de la evolución descritos por Schopf. Como ejemplo de la primera etapa podrían citarse los micoplasmas y la segunda prodría estar representada por las bacterias anaeróbicas, siendo las algas verdeazuladas el ejemplo del paso 5.

I 2. EUCARIOTAS Y PROCARIOTAS

Todos los ejemplos citados hasta el momento pertenecen al grupo de células *procariotas*. Sin embargo, todas las plantas que existen hoy en día, con excepción de las bacterias y las algas verdeazuladas, son organismos complejos con células *eucariotas*. Las *procariotas* no son realmente multicelulares, así los tejidos vegetales no aparecieron hasta el desarrollo de las células *eucariotas*. Las diferencias entre células *eucariotas* y *procariotas* se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1

PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS*

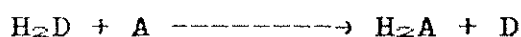
PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
La mayor parte son células pequeñas (1-10 μm). Todas son microbios; las de morfología más compleja solo llegan a agrupaciones filamentosas o micelios de cuerpo blando (p.e. <i>actinomicetos</i> , <i>mixobacterias</i> , <i>algas verdeazules</i>)	La mayor parte son células grandes (10-100 μm). Algunas son microbios. Los últimos estadios evolutivos son los vertebrados y las plantas superiores.
Son nucleoides sin membrana asociada.	El núcleo está encerrado por una membrana
División celular directa, generalmente por "fisión binaria". La cromatina contiene DNA, pero no proteína; no se tiñen con la técnica de Feulgen. No existen microtubos ni centriolos.	División celular por varias formas de mitosis. Muchos cromosomas contienen DNA, RNA, y proteínas; se tiñen por la técnica de Feulgen. La mayoría tienen centriolos y microtubos.
No existen por lo general sistemas sexuales y si se dan la transferencia genética es unidireccional, del donador al hijo.	Poseen sistemas sexuales, con igual participación de ambos progenitores en la fertilización.
Los organismos multicelulares nunca se desarrollan a partir de cigotos haploides. No existe diferenciación tisular.	La meiosis produce formas haploides, los cigotos se desarrollan a partir de diploides. Los organismos multicelulares muestran un extenso desarrollo de los tejidos.
Este grupo incluye todas las formas anaeróbicas y algunas aeróbicas.	Todas las formas son aeróbicas, excepto algunas modificaciones secundarias.
Grandes variaciones en los patrones metabólicos. No tienen mitocondrias, las enzimas para la oxidación de moléculas orgánicas están ligadas a las membranas celulares	Los mismos patrones metabólicos de oxidación (es decir, ciclo de Krebs, citocromos, etc). Poseen mitocondrias.
Si existe fotosíntesis, las enzimas están ligadas a las membranas celulares. Esta fotosíntesis puede ser anaerobia o aerobia liberando O_2 o depositando azufre.	Si existe fotosíntesis, las enzimas están ligadas a los cloroplastos, liberando O_2 .
No existen movimientos intracelulares.	Movimientos intracelulares: fagocitosis, pinocitosis, corrientes,...

* Hufford (1979)

I 3. LA FOTOSINTESIS

Toda la vida en nuestro planeta depende de la luz solar, es decir, de la fotosíntesis que realizan las plantas, organismos fotosintéticos capaces de captar la luz solar. Podemos definir la fotosíntesis como el empleo de la energía solar por las células de las plantas para efectuar la biosíntesis de los componentes celulares, en un proceso fundamental para todos los organismos vivos. Este es el proceso a gran escala que convierte compuestos inorgánicos simples y estables en la combinación rica en energía de materia orgánica y oxígeno. El proceso fotosintético consta aparentemente de tres fases fundamentales: a) la separación de átomos de hidrógeno de un donador electrónico; b) la transferencia de átomos de hidrógeno desde un compuesto intermedio de la primera fase a la tercera; y c) la utilización de los átomos de hidrógeno para reducir un aceptor electrónico (Rabinowitch y Govindjee, 1971).

luz



La energía solar constituye no solamente la fuente energética inmediata para las plantas verdes y otros autótrofos fotosintéticos, sino también, en último término, la fuente energética para casi todos los organismos heterótrofos, a través de la actuación de las cadenas alimenticias de la biosfera. Además, la energía solar capturada por el proceso de la fotosíntesis es la fuente de cerca del 90 % de toda la energía empleada por el hombre para satisfacer las demandas de calor, luz y potencia, ya que el carbón, el petróleo y el gas natural que son los combustibles utilizados para la mayor parte de las maquinarias fabricadas por el hombre, son los productos de descomposición del material biológico generado hace millones de años por los organismos fotosintéticos.

La luz (radiación visible para el ojo humano) comprende solo una estrecha banda en el espectro de la energía radiante. La porción visible de este espectro está comprendida entre 380 y 760 nm. El hecho más destacable es que dentro de esta zona, se encuentran también la visión del resto de animales, el fototropismo y lo más importante, la Fotosíntesis

Las plantas y animales que no pueden fotosintetizar viven a expensas de las plantas fotosintéticas. La mayor parte de los organismos, para poder vivir, tienen que consumir energía por medio de procesos degradatorios esencialmente oxidantes y catabólicos. Estos procesos exigen un ambiente oxidante

y conducen a la conversión de todos los compuestos de carbono a su forma más oxidada, por ejemplo, el dióxido de carbono. La fotosíntesis, en plantas superiores, restablece el equilibrio, consumiendo CO_2 y produce compuestos orgánicos más reducidos a la vez que genera oxígeno.

Además de las plantas superiores, existen otros organismos capaces de utilizar la energía luminosa en sus procesos metabólicos, incluyendo procariotas y eucariotas, como son las bacterias fotosintéticas y las algas. Las bacterias son los organismos vivos más pequeños de los conocidos, su diámetro varía entre 0.1-2 μm , aunque algunas pueden llegar a medir 500 μm . Las bacterias fotosintéticas o fotoautótrofas utilizan la luz como energía y, bajo condiciones anaeróbicas, producen azúcares. Dos tipos de bacterias sulfurosas (verde y roja) pertenecientes a las *Pseudomonales*, son fotolitótrofas. Para ellas la fuente de hidrógeno no es el agua y no se desprende oxígeno en este proceso. La bacteria sulfurosa roja posee una variedad de clorofila llamada bacterioclorofila, de color verde enmascarado por el rojo de los carotenoides. La bacteria sulfurosa verde posee otro tipo de clorofila que no está enmascarada. Ambos tipos bacterianos están adaptados para vivir en aguas sulfurosas, termales, donde el H_2 es la fuente de hidrógeno. Otro tipo de bacterias de la familia de las *Pseudomonales*, utilizan la energía luminosa para escindir el hidrógeno de la materia orgánica, por lo que se las llama foto-organófilas.

Este tipo de bacterias rojas no sulfurosas posee bacterioclorofila enmascarada por los carotenoides.

Las bacterias procariotas fotosintéticas desempeñan un importante papel en la biosfera y son un buen material experimental para investigar los procesos fotosintéticos. Estos organismos pueden clasificarse en tres grupos: las bacterias verdes, como el *Chlorobium*, las bacterias sulfurosas púrpuras, como *Chromatium*, y las bacterias púrpuras no sulfurosas, como el *Rhodospirillum* y *Rhodopsuedomonas*. Tanto las bacterias verdes como las sulfurosas púrpuras, son autótrofos y utilizan compuestos de azufre inorgánico (H_2S) como donadores de electrones para la reducción fotosintética del CO_2 , pero las bacterias púrpuras no sulfurosas son fotoheterótrofos y utilizan el succinato o el maleato en lugar del H_2S . Las reacciones bacterianas fotoquímicas necesitan la existencia de algunos pigmentos fotosintéticos como los carotenoides, bacterioclorofila y en el *Chlorobium* la clorofila (Kumar y Singh, 1979)

Los eucariotas fotosintéticos comprenden, no solamente las plantas verdes superiores, sino también formas inferiores, tales como las algas pluricelulares y unicelulares verdes, pardas y rojas, así como las euglenoides, los dinoflagelados y las diatomáceas. Gran parte de la investigación en fotosíntesis está basada en el estudio de algas microscópicas como *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Anacystis*, y *Porphyridium*.

Estas formas vegetales son fáciles de cultivar y pueden reproducirse las condiciones de crecimiento. Sus ciclos vitales relativamente cortos, junto con sus rápidas tasas de crecimiento, unido a la forma de cultivo sincronizado, que permite obtener una población de células con igual grado de desarrollo y estado fisiológico, hacen de estos organismos un excelente material para propósitos experimentales.

Debido a su morfología, color y aparato fotosintético las verdeazules, pertenecientes a las *Cianofíceæ*, se han incluido en el grupo de las algas, a pesar de ser procariotas con gran parecido a las bacterias. Las algas verde azuladas pueden ser unicelulares o coloniales, mientras que otras son filamentosas. Sin embargo, se diferencian de las bacterias por la presencia de fotosistema II, en su aparato fotosintético. Poseen xantofilas, clorofila *a* y β -caroteno, además de ficoeritina (pigmento rojo) y ficoocianina (pigmento azul). Una característica importante de ciertas verdeazules es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico para convertir el N_2 en NO_2^- . Como organismos fotosintéticos son capaces de obtener el hidrógeno del agua, aunque en la oscuridad pueden llegar a ser heterótrofos.

Los protistas son organismos fotosintéticos que generalmente se incluyen en el grupo de las plantas. Las carofitas, crisofitas, xantofitas, diatomeas, algas pardas, algas verdes, dinoflagelados, euglenoides y

hongos flagelados, son los principales exponentes de los protistas. La composición en pigmentos varía para cada especie. Así, en las algas verdes predomina la clorofila *a*, aunque también están presentes la clorofila *b*; α , β y ϵ -caroteno y cinco o seis xantofilas. Las crisofitas tienen uno o dos cloroplastos pardo-dorados que contienen clorofilas *a* y *c*, β -caroteno y algunas xantofilas. Las xantofitas contienen mayoritariamente xantofilas, lo que les da el nombre de algas verde-amarillentas, y también clorofilas *a*, *c* y *e*, y β -caroteno. Las diatomeas poseen clorofila *a* y *c*, β -caroteno y ciertas xantofilas entre las que se encuentra la fucoxantina, responsable del color pardo.

I 3a. LOS PLASTIDIOS

Los plastos son unos orgánulos característicos del citoplasma de las células vegetales. Juegan un importante papel en el metabolismo vegetal, ya que en ellos se realiza la fotosíntesis. Los plastos tienen gran variedad de formas, tamaños y estructuras; y el conjunto de ellos forma el plastidioma. Según la naturaleza de las sustancias que contiene, se distinguen varias clases de plastos: los cloroplastos, ricos en clorofila, realizan la Fotosíntesis; los amiloplastos, que almacenan almidón, como en el caso de

la patata, de forma que pueden llegar a destruir su estructura interna desgarrando la membrana; cromoplastos, ricos en carotenoides, son los que dan la coloración especial de las flores y frutos; proteoplastos, ricos en proteínas; los oleoplastos, que almacenan materias grasas. Otro importante grupo de plastos lo constituyen los etioloplastos que se forman en las plantas sometidas a oscuridad, si bien cuando reciben luz modifican su estructura, evolucionando hasta formar cloroplastos.

Si se rompen las células y se aíslan fracciones purificadas de cloroplastos, éstos, con un sustrato y cofactores solubles adecuados, son capaces de efectuar la secuencia completa de la Fotosíntesis. En las plantas verdes, organismos verdes unicelulares tales como las algas (por ejemplo *Chlorella* y *Scenedesmus*) y *Euglena*, los plastidios que contienen clorofila se denominan cloroplastos. El número, forma y tamaño de estos cloroplastos varía ampliamente según los organismos entre 1 y 10 μm de diámetro.

Cuando se examinan los plástidos al microscopio se revela una gran riqueza de detalles. Los rasgos más característicos son los tilacoides constituidos por los grana, apilamientos de estructuras laminares bien definidas; y por unas laminillas que unen los grana llamadas lamellae, la parte soluble o estroma y la doble membrana externa que envuelve el cloroplasto (Figura 1) (Coombs y Greenwood, 1976). En la actualidad

se prefiere la denominación de *apiladas* y *no apresadas*, lo que permite establecer las diferencia entre las regiones con interacción membrana/membrana y aquellas que están en contacto con el estroma, bien sean granales o lamelares.

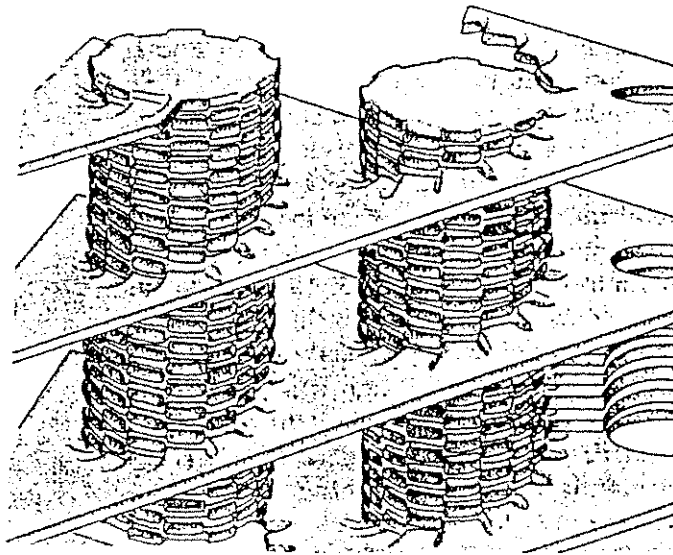


Fig. 1 Representación artística del interior del cloroplasto, donde pueden apreciarse las partes apresadas (*grana*), y las no apresadas en contacto con el estroma (*lamellae*), según Paolillo (1970).

En las membranas del tilacoide también existe diferencia entre las superficies internas y externas. La interacción entre este tipo de estructuras está clara y los modelos propuestos no son satisfactorios a causa de su rigidez. De hecho, las membranas tilacoidales aisladas pueden cambiar fácilmente de su estado granal a otro no apilado mediante la disminución de la fuerza iónica del medio de suspensión (Barber y Chow, 1979). También se pueden reestructurar los grana, que se encuentran en las partes apresadas, mediante la adición de determinados cationes. La efectividad de varios cationes no ligados a las membranas y que también inducen el apresamiento, depende en gran parte de su valencia (Barber, Mills y Love, 1977; Barber, 1980a). El apilamiento de las membranas tilacoidales también puede modificarse adicionando especies catiónicas unidas a la superficie tilacoidal, pero este proceso implica la neutralización electrostática de las cargas expuestas y produce fenómenos en los grana que difieren de los que suceden *in vivo* (Barber, 1980a). Estas observaciones, acopladas con el conocimiento del grado de apilamiento *in vivo* varía con las condiciones de crecimiento (Anderson, 1982a) y también puede modificarse significativamente durante cortos periodos de tiempo como respuesta a estímulos externos (Punnett, 1970; Bennoun y Jupin, 1974). Por otra parte es preciso constatar que la organización de las membranas externas no está firmemente establecida.

Los estudios de "freeze-fracture" han revelado la naturaleza dinámica de los tilacoides a nivel subestructural. Recientemente se ha puesto de manifiesto que las partículas protéicas intermembranales tienen libertad de movimiento en respuesta a los cambios en las condiciones iónicas (Wang y Packer, 1973; Ojakian y Satir, 1974; Staehelin, 1976) y más recientemente a la fosforilación de proteínas (Kyle, Staehelin y Arntzen, 1983).



Fig. 2. Micrografía electrónica del interior del tilacoide. En la parte superior, aparecen los grana y las láminas, según Hafford (1978).

I 4 . PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

La mayor parte de los pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides de la célula vegetal, están localizados en los tilacoides. Clorofila es el nombre aceptado de los pigmentos verdes en los organismos capaces de fotosintetizar. Fué utilizado en primer lugar por Pelletier y Caventou (1818) para describir el pigmento responsable del color verde de las hojas, pero pasó algún tiempo hasta que Stokes (1864) demostró que era una mezcla de dos pigmentos verdes y varios pigmentos amarillos; los pigmentos verdes fueron aislados más tarde por Sorby (1873). La cromatografía (del griego *escritura coloreada*) fué empleada por primera vez por Tswett (1906) para separar las dos clorofilas y los carotenoides por cromatografía de columna en azúcar, según su adsorción, desarrollo y elución. Estas clorofilas fueron denominadas como α y β , pero posteriormente pasaron a ser clorofilas *a* y *b*.

En plantas superiores y en todas las algas, excepto en las verdezuladas, las clorofilas y carotenoides se localizan en los cloroplastos. La función de las clorofilas es absorber energía luminosa y convertirla en energía química. Todo este proceso implica la producción de electrones que reducen el CO_2 para dar carbohidratos, y de esta forma la energía



atrapada por las plantas se libera en procesos de oxidación.

I 4a. CLOROFILAS

Las clorofilas son los aceptores de luz primarios en las plantas y están presentes invariablemente en cada organismo que realiza la fotosíntesis con absorción de dióxido de carbono y la evolución a oxígeno molecular. En las plantas, la clorofila se dispone en agrupaciones de unos pocos centenares de moléculas y su principal función es actuar como antena para captar la luz, mientras que en una pequeña proporción actúa como centro de reacción.

El primer precursor de la clorofila identificado inequívocamente es el ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), compuesto de 5 carbonos que se produce por la condensación de succinil-CoA y glicina, en animales y bacterias. Las plantas y las algas forman δ -ALA por otra ruta, utilizando el esqueleto carbonado intacto del ácido glutámico. Todos los átomos de carbono y nitrógeno del núcleo porfirínico de la clorofila se derivan de este δ -ALA.

La ruta biosintética desde el δ -ALA hasta la clorofila está ilustrada en la Figura 2. El ensamblaje del esqueleto tetrapirrólico se produce por la condensación de dos moléculas de ALA para formar

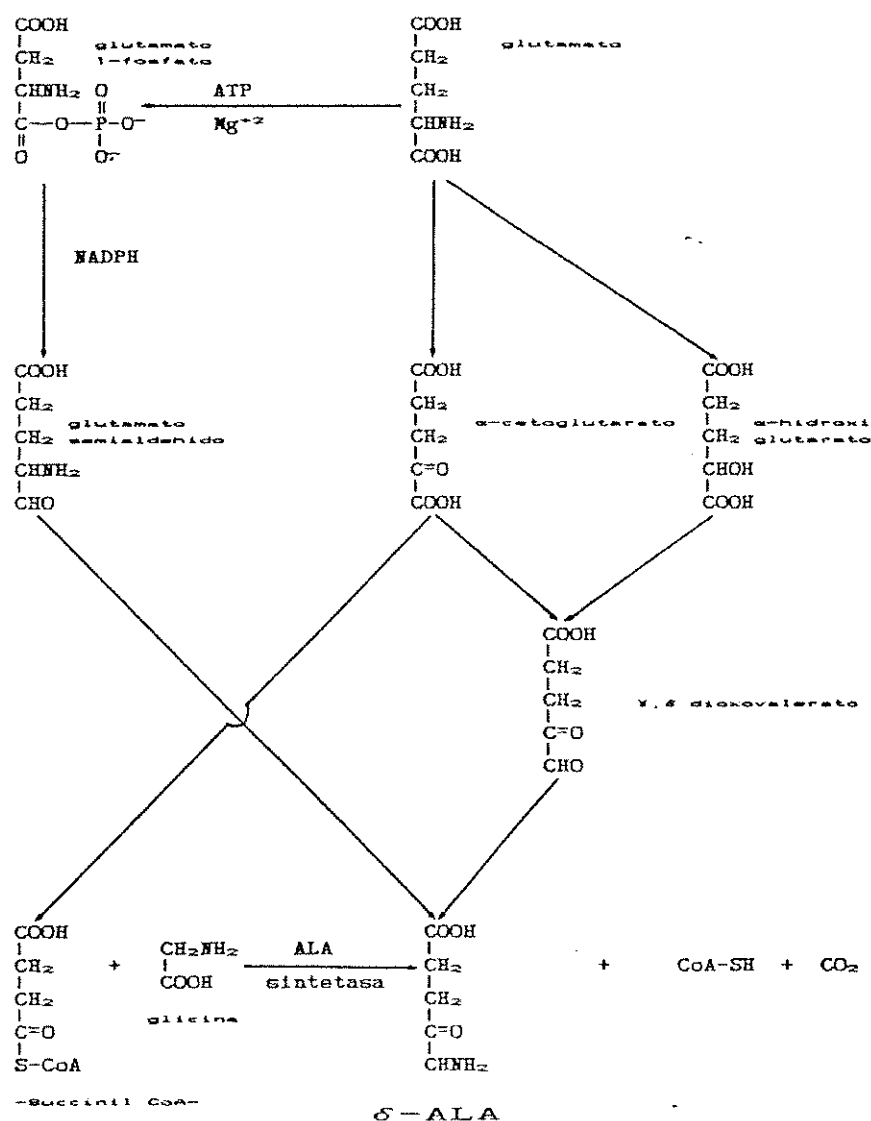


Fig. 3 Esquema resumido de la biosíntesis del ácido δ -aminolevulínico.

unidades de Pórfobilinógeno (PBG), que son los primeros intermediarios pirrólicos de esta ruta. Más adelante, se enlazan secuencialmente, cabeza con cola, cuatro unidades de PBG, para dar un tetrapirrol inestable. Esta molécula lineal está en condiciones de formar el ciclo tetrapirrólico Uroporfirinógeno III. Este isómero tiene un anillo D invertido, de forma que la secuencia de sustituyentes en posición β es la inversa con respecto a los otros anillos. La conversión a

Coproporfirinógeno III está ligada a la descarboxilación de cuatro moléculas de ácido acético, liberando grupos metilo, y entonces se descarboxilan oxidándose dos de los cuatro ácidos propiónicos (en los anillos A y B), para dar grupos vinilo, formando la Protoporfirina IX, que tiene sustituyentes vinilo en estas posiciones. La escisión de seis electrones del macrociclo porfirinógeno confiere al Proto características aromáticas. El Proto es el último precursor común de los hemos, bilinas y clorofilas.

A partir del último paso, la ruta de la clorofila comienza con la inserción del Mg en el núcleo Proto. Esto está seguido por la metilación del grupo ácido propiónico en el anillo C. A continuación, y en orden todavía no bien determinado, el grupo vinilo del anillo B se reduce a etilo, y nuevamente el ácido propiónico metilado, se oxida a carbonilo en la posición 8 y se une a su carbono en α para dar el carbono γ -meso de la porfirina, formando la protoclorofilida, que contiene un quinto anillo isocíclico que está presente en todas las clorofilas. La conversión de protoclorofilida a clorofilida requiere generalmente luz en las angiospermas, si bien algunos tejidos de plantas superiores son capaces de realizar la reducción de la protoclorofilida en ausencia de luz.

El paso final en la formación de clorofila a consiste en la adición de la larga cadena de fitilpolisopreno. Este proceso se inicia mediante la

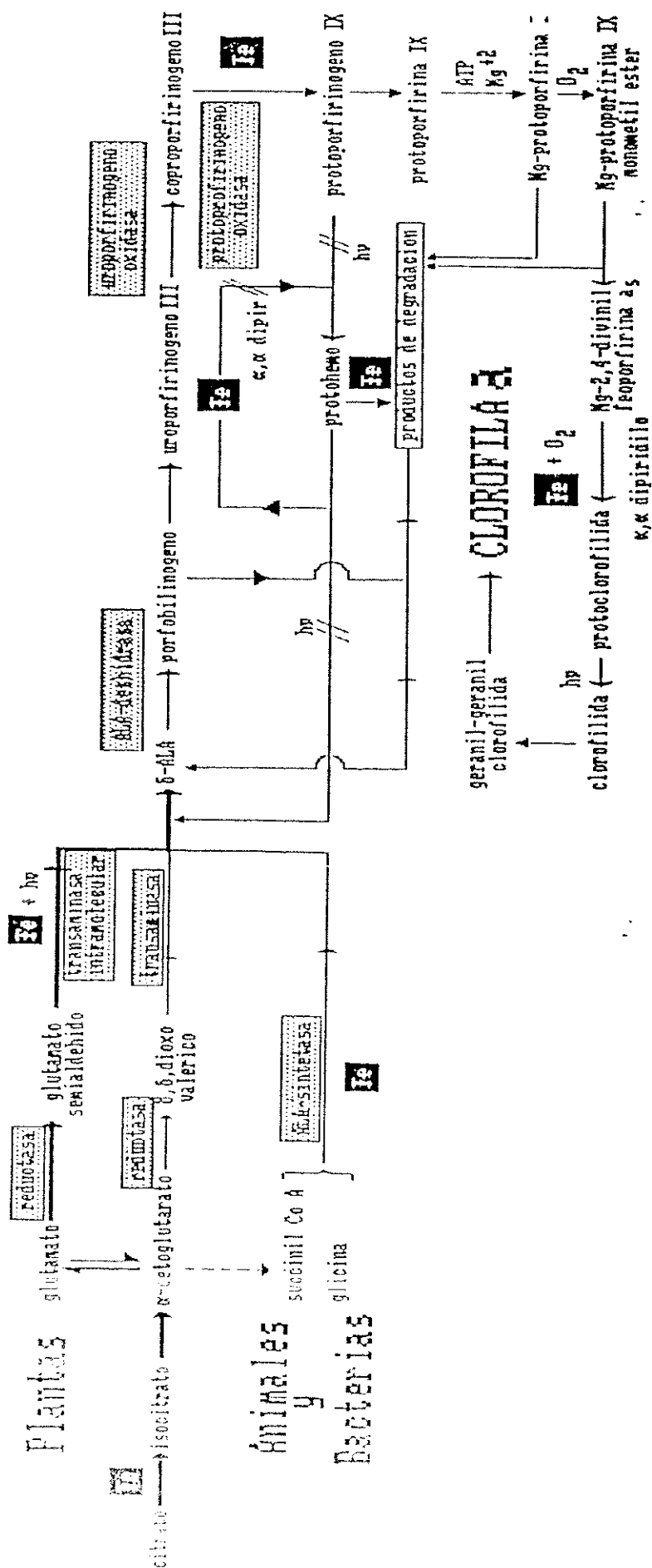


Fig. 6 Esquema de la biosíntesis de clorofilas

I 4b. CAROTENOIDES

Los carotenoides siempre han atraído la atención de los naturalistas debido a que son los responsables de gran parte de los amarillos y rojos brillantes que se dan en las flores y frutos, en pájaros, insectos y otros muchos animales (Weedon, 1971). Esta coloración se debe al gran número de dobles enlaces conjugados de la estructura terpénica.

Desde hace pocos años se vienen estudiando gran número de alimentos y constituyentes de estos por sus efectos inhibidores de la carcinogénesis. Un buen número de estos estudios han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de ciertas frutas y vegetales y el riesgo de cancer (Peto et al., 1981). Estas investigaciones asumen que el factor activo de una dieta rica en vegetales y frutas es el β -caroteno en función de su potencial como fuente de vitamina A. Sin embargo, muchos de estos vegetales y frutas son relativamente pobres en β -caroteno y relativamente ricos en el resto de carotenoides (xantofilas) que tienen poca o nula actividad de vitamina A. Recientemente se ha encontrado que el incremento de carotenoides en la dieta, ejerce un efecto protector contra el cancer en la población de la tercera edad. También se ha comprobado el efecto protector de ciertos alimentos que contienen otros carotenoides aparte del

β -caroteno. Generalmente las tablas de composición de los alimentos adolecen de falta de información acerca del contenido en carotenoides, por lo tanto el desarrollo de un método analítico rápido y fiable será un instrumento valioso en un gran número de campos de investigación.

Los carotenoides provienen de reacciones de copulación "cola a cola" de análogos al pirofosfato de farnesilo con 20 átomos de carbono. El primer producto de reacción detectable, el hidrocarburo C_{40} llamado fitoeno, se modifica posteriormente por acción de los enzimas del organismo (deshidrogenación y a veces ciclación y oxidación) dando gran variedad de carotenoides C_{40} . Las estructuras de los carotenoides más comunes, β -caroteno y el licopeno, cada uno de los cuales contiene 11 dobles enlaces conjugados son las siguientes:

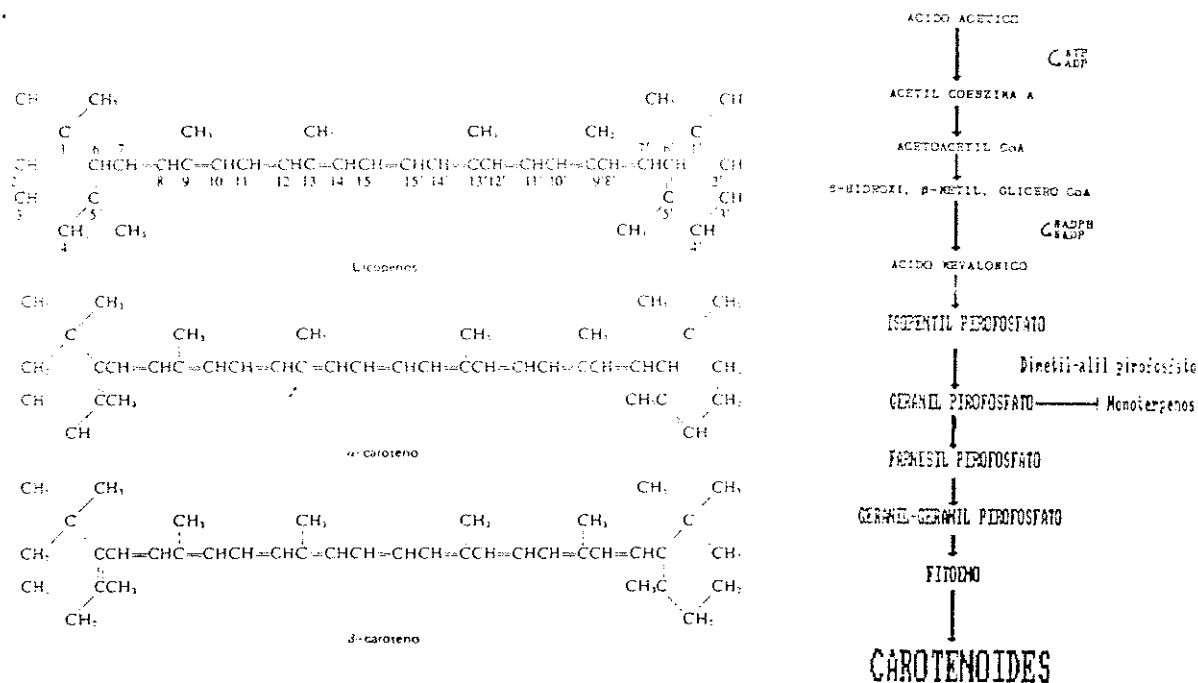


Fig. 6 Formulas estructurales de algunos carotenoides y esquema de biosíntesis.

Junto con las (bacterio)clorofilas, los carotenoides son los pigmentos mayoritarios de las membranas fotosintéticas. En el cuadro 2 se sumarizan los carotenoides más importantes, en plantas superiores, y asimismo, se citan su nombres semisistemáticos. Las clorofilas y carotenoides son lipofílicos y se localizan en las regiones hidrófobas de las membranas protéicas o en las matrices lipídicas de los tilacoides.

Cuadro 2

CAROTENOIDES MAS IMPORTANTES EN PLANTAS SUPERIORES

Nombre vulgar	Nombre semisistemático
Carotenos	
α -caroteno	β,ϵ -caroteno
β -caroteno	β,β -caroteno
Xantofilas	
Neoxantina	5',6'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,5,3'-triol
Violaxantina	5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,3'-diol
Luteína	β,ϵ -caroteno-3,3'-diol

La posibilidad de sintetizar carotenoides *de novo* parece que puede producirse en cualquier estadio evolutivo. Algunas bacterias y hongos, las algas y las plantas superiores han preservado esta capacidad. La producción normal de carotenoides sintetizados por estos organismos se ha estimado en cerca de cien mil millones de Kg (Siefermann-Harms, 1985). La mayor parte de los carotenoides sintetizados por estos organismos son difícilmente detectables *in situ*, ya que su presencia está enmascarada por otros pigmentos, especialmente por las clorofilas. La fucoxantina es el

más abundante de los carotenoides (Weedon, 1971), y se encuentra formando parte de las membranas de las algas pardas. Por otra parte los tres carotenoides más importantes de las hojas verdes son: luteína, violaxantina y β -caroteno, que se localizan en el correspondiente sistema de membranas de las plantas superiores.

I 4b. REGULACION DE LA SINTESIS DE CAROTENOIDES EN LOS TEJIDOS VERDES

En los tejidos fotosintéticos los carotenoides se sintetizan y localizan exclusivamente en los cloroplastos. Las plántulas etioladas producen pequeñas cantidades de carotenoides, principalmente xantofilas, pero en respuesta a la luz, se sintetizan simultáneamente a la funcionalidad de los cloroplastos, produciendo gran cantidad de β -caroteno (Goodwin, 1958). Sin embargo, los cloroplastos tienen un considerable grado de autonomía, no existiendo evidencia de que realicen los pasos de glicólisis que conducen al piruvato y eventualmente el precursor primario de los carotenoides: acetil-CoA. Se ha obtenido confirmación de la existencia de una ruta de formación de piruvato a partir de glicolato (Britton, 1976), pero no existe evidencia de que los cloroplastos

puedan convertir el piruvato en acetil CoA o el acetil CoA en ácido mevalónico (MVA).

Se ha sugerido una compartimentación de la biosíntesis como un mecanismo por el cual se regule la formación de diferentes clases de compuestos terpénicos. Si se colocan cortes de plántulas etioladas en ácido mevalónico marcado con ^{14}C y se dejan enverdecer, se detecta una pequeña radioactividad en los terpenoides cloroplásticos, es decir en los carotenoides y las cadenas de las clorofilas, plastoquinonas, tocoferoles y filloquinona, si bien los terpenoides extracloroplásticos, como el escualano, esteroides y la cadena lateral de la ubiquinona están fuertemente marcadas (Britton, 1976). Por otra parte, si se permite el enverdecimiento de estas plántulas en presencia de $^{14}\text{CO}_2$, la situación es reversible, los terpenoides del cloroplasto están fuertemente marcados. Así, la regulación de la síntesis de terpenoides en plántulas en desarrollo puede estar compartimentada en dos lugares separados de la síntesis de terpenoides desde el MVA en adelante; uno fuera del cloroplasto y otro en su interior. Las reacciones básicas de la biosíntesis de terpenoides (p.e. la formación de prenil pirofosfatos) puede producirse en ambos lugares, pero las reacciones específicas involucradas en la biosíntesis de un grupo particular de terpenoides solo puede darse en un lugar, en el caso de los carotenoides, dentro del cloroplasto.

I 4C. PAPEL DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

La clorofila *a* es el pigmento principal, el más abundante y el único que se encuentra constantemente en toda la escala vegetal. El resto son pigmentos accesorios. Unicamente las bacterias fotosintéticas consituyen una excepción a la regla de omnipresencia de de la clorofila *a*. En éstas existen otras formas de clorofila, las bacterioclorofilas, que apenas difieren químicamente de la clorofila *a* y que juegan el mismo papel fisiológico.

En las plantas superiores y en las algas, excepto en las verdeazuladas la clorofila se localiza en los cloroplastos, mientras que en las verdeazuladas y en las bacterias las clorofilas se disponen en las lamelas intracelulares. Su principal función es absorber la energía luminosa para convertirla en energía química. El proceso global implica la producción de electrones capaces de reducir el dióxido de carbono, que junto con el H^+ dan lugar a los hidratos de carbono, y de esta forma la energía atrapada se libera en los procesos oxidantes de las plantas, y en último lugar en los animales, que producen la energía química y mecánica necesaria para el desarrollo de la vida.

La abundancia de carotenoides en las membranas fotosintéticas (aproximadamente un 3 % p/p), sugiere que juegan un cierto papel en estas reacciones o bien estabilizando el aparato fotosintético. No existe ninguna evidencia de que los carotenoides intervengan en la transferencia de electrones. Sin embargo, la eficacia para transferir la energía absorbida desde estos compuestos a los centros de reacción fotosintéticos es relativamente baja. Por esta razón parece que el principal papel de los carotenoides no sea la captación de luz sino la protección del aparato fotosintético contra los efectos destructores de la luz y O_2 (Krisnky, 1971).

Los cloroplastos de las plantas superiores tienen el potencial de generar formas de oxígeno perjudiciales para la planta. La interacción entre la clorofila (3Chl) y el oxígeno (3O_2) en estados triplete da lugar a la generación de radicales oxígeno en estado siglete (1O_2) (Foote y Denny, 1968). El oxígeno puede aceptar electrones de los transportadores de electrones del fotosistema I, siendo reducido a superóxido (O_2^-). La dismutación del O_2^- debido a la acción de la superóxido dismutasa (SOD) genera H_2O_2 , mientras que la reacción entre O_2^- y el H_2O_2 genera radicales $OH\cdot$ muy reactivos (Halliwell, 1981). La generación de radicales oxígeno en los cloroplastos puede dañar el aparato fotosintético. La concentración de H_2O_2 inhibe la fotosíntesis por inactivación de las enzimas fructosa y sedoheptulosa bifosfatasa del ciclo de Calvin (Charles

y Halliwell, 1981). Tanto el 1O_2 como el OH pueden iniciar la peroxidación de los ácidos grasos de la membrana, así como la oxidación de algunas proteínas, aminoácidos y otros componentes celulares (Halliwell, 1981). El deterioro está normalmente restringido por un rango de mecanismos de protección que reducen la toxicidad de las especies dañinas. La generación de 1O_2 está controlada por los carotenoides que producen el *quenching* o desexcitación de la 3Chl y 1O_2 (Foote y Deny, 1968).

Todavía no está bien aclarada la función del ciclo violaxantina/zeaxantina dentro de los tejidos fotosintéticos, aunque algunos autores (Krinsky, 1966; Krinsky, 1968) proponen que juega un importante papel en la protección de los cloroplastos frente a las fotooxidaciones, en la evolución fotosintética del oxígeno (Sapozhnikov, 1969) y también es posible que los carotenoides en las membranas estabilicen la conformación protéica (Krinsky, 1971). Tal papel puede ser particularmente importante en un sistema de membranas que continuamente está sintetizando todos los galactolípidos de los tilacoides (Jeffrey, Douce y Benson, 1974).

I 4d. CUANTIFICACION DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS TOTALES

La determinación de clorofilas y carotenoides es, frecuentemente, un dato necesario en análisis foliares. La cuantificación de estos pigmentos, en la mayoría de los casos, se suelen realizar aplicando unas ecuaciones matemáticas basadas en coeficientes de extinción y en medidas de absorbancia sobre el extracto de hojas, a longitudes de onda específicas.

En 1949, Arnon publica las fórmulas para el cálculo de pigmentos totales en acetona del 80 %. Desde entonces, numerosos autores han proseguido en la misma línea de investigación con más o menos éxito. La aplicación de estas fórmulas presupone que, en el caso de muestras complejas de pigmentos, hay que buscar regiones del espectro de absorción que sean características del pigmento que se desea calcular. De las fórmulas que se citan, las clorofilas se determinan en la región del rojo y los carotenoides en la región del azul del espectro visible de radiación.

Wintermans y De Mots (1965) estudian los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* en etanol del 96 % por su capacidad para disolver los lípidos cloroplásticos; sin embargo, tanto en este caso como en los intentos mas recientes (Inskeep y Bloem, 1985; Moran y Porath, 1980 y Moran, 1982), se puede cuestionar

la pureza de las preparaciones, factor limitante debido al método matemático utilizado para calcular las ecuaciones a partir de pigmentos puros.

La bibliografía sobre el tema propone distintas ecuaciones para la determinación de clorofilas en distintos solventes (Davies, 1976), sin embargo, son muy escasas las fórmulas que se citan para la determinación de carotenoides, y las únicas encontradas que utilizan este solvente, tanto para las clorofilas, como para los carotenoides, son las de Lichtenthaler y Wellburn (1983).

I 5. MORFOLOGIA DE LAS MEMBRANAS DEL CLOROPLASTO

Las membranas cloroplásticas son las más abundantes en la superficie de nuestro planeta, si se comparan con otros tipos de membranas biológicas, y tienen un comportamiento que refleja su papel funcional como sistema transformador de energía.

La morfología del cloroplasto está constituida por tres partes fundamentales con distinta funcionalidad: envoltura, estroma y membranas tilacoidales (Figura 4).

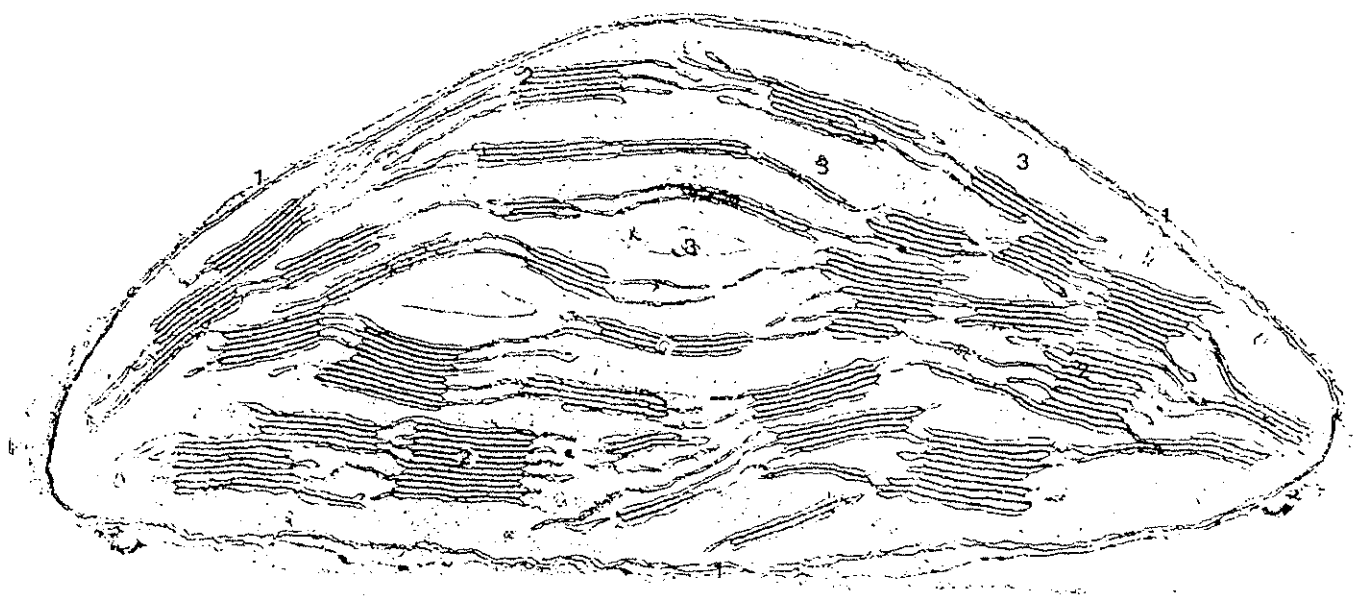


Fig. 7 Microfotografía electrónica de un cloroplasto, en la que se aprecian: la doble membrana externa (1), los grana (2), y las lamellae (3) [Salisbury y Ross, 1976]

I 5a. ENVOLTURA EXTERNA

La envoltura consta de dos membranas, la interior y la exterior. En esta envoltura se sintetizan galactolípidos, carotenoides y prenilquinonas. Por otra parte, las membranas de la envoltura forman una barrera que impide el paso de ciertas moléculas dentro del cloroplasto. La membrana interna regula el flujo de metabolitos entre el citosol y el cloroplasto y la externa probablemente induzca la toma de los polipéptidos sintetizados en el citoplasma. Estudios de microscopía electrónica apuntan a que la membrana interna da lugar a los tilacoides mediante un proceso de invaginación durante el desarrollo del cloroplasto (Joyard et al., 1983).

La envoltura del cloroplasto es un sistema de membranas amarillo con una composición fija de carotenoides. Las envolturas aisladas a partir de cloroplastos de hojas de espinaca sometidas a la oscuridad tienen un contenido en violaxantina superior en 3.5 veces al de luteína+zeaxantina, mientras que las iluminadas muestran una relación de solo 0.75, por lo tanto es lógico suponer que la luz cataliza el ciclo violaxantina/zeaxantina dentro del cloroplasto (Jeffrey, Douce y Benson, 1974).

La composición en carotenoides de fracciones de cloroplastos enriquecidas en envoltura externa e

interna muestran que el contenido en violaxantina es el 50 % del total de carotenoides, sin embargo la composición del resto de carotenoides es diferente en cada membrana. Así la envoltura externa contiene mayor proporción de neoxantina que la interna. Por otra parte la membrana externa tiene tres veces más carotenoides que la interna.

Cuadro 3

Composición pigmentaria de la membrana
externa del cloroplasto*

Pigmento	concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)
β -caroteno	0.6
Violaxantina	2.6
Luteína	1.8
Neoxantina	0.3
Clorofilas	0.0

* Según Lichtenthaler, Prenzel y Joyard (1981)

I 5b. TILACOIDES

En los cloroplastos completamente desarrollados con el sistema de membranas completo, más del 90 % de los carotenoides se encuentran en los tilacoides (Lichtenthaler, Prenzel y Khun, 1982). Estos autores realizan un estudio de la composición pigmentaria de varios complejos clorofila-pigmento-proteína separados por SDS-PAGE y encuentran que la relación clorofila *a*/clorofila *b* en los captadores de luz es de 1 a 1.3. El CP1 (centro de reacción del fotosistema I), en tilacoides de espinaca solubilizados con Triton X-100, se caracteriza por una relación de clorofilas *a/b* de 5.9-7.8, siendo el β -caroteno el principal carotenoide. Los análisis del centro de reacción del fotosistema II, también de espinaca y aislado por centrifugación diferencial tras la solubilización con digitonina muestran que, por cada 100 moléculas de clorofila *a* contiene 4 de clorofila *b*, 12.5 de β -caroteno y 2.5 de luteína (Siefermann-Harms, 1985).

Cuadro 4

Composición pigmentaria de los tilacoides*

Pigmento	concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)
β -caroteno	6.6
Violaxantina	3.1
Luteína	7.8
Neoxantina	1.3
Clorofilas	19.5

* Según Lichtenthaler, Prenzel y Joyard (1981)

La membrana tilacoidal está asociada con las proteínas intrínsecas y extrínsecas. Parece que existen principalmente cinco complejos multipéptidos macroscópicos implicados en la captura de luz y en el transporte electrónico y en los procesos de fosforilación: el fotosistema I (PS I), el fotosistema II (PS II), el complejo *a/b* captador de luz (LHC), el citocromo *b_s-f* y el complejo CF_0 de la ATP sintetasa ("coupling factor"). En la medida en que el transporte electrónico y la fosforilación están interrelacionadas existen al menos tres proteínas extrínsecas ligadas a la superficie externa: ferredoxina, ferredoxina-NADP⁺ oxidorreductasa, y el complejo CF_1 de la ATP sintetasa. En la superficie interna de los tilacoides se localizan las proteínas extrínsecas como la plastocianina y

posiblemente algunos componentes implicados en la ruta de transporte electrónico desde el H_2O hasta el centro de reacción, P680 del PS II.

Los detalles precisos de la estructura y composición de muchas de estas proteínas de la membrana de los tilacoides son desconocidas y existen datos conflictivos en la bibliografía.

I 6. DESCRIPCION DEL APARATO FOTOSINTETICO

I 6a. COMPLEJO DEL FOTOSISTEMA I

Los estudios de microscopía electrónica del complejo PS I aislado han mostrado que tiene un diámetro de 106 Å (Mullet, Burke y Artzen, 1980a) y puede tener un peso molecular de aproximadamente 800.000 daltons (Hiller y Goodchild, 1981). Alrededor del 30 % de la clorofila de las plantas desarrolladas en condiciones normales está contenido en este complejo (Thornber, Markwell y Reinman, 1979) con aproximadamente 150-200 moléculas de clorofila *a* por complejo (Anderson, 1980a). Cada complejo contiene un centro de reacción P_{700} y presumiblemente tiene asociado los aceptores electrónicos primarios A_1 , A_2 a la vez que dos centros hierro azufre (Bengis y Nelson, 1979). Los análisis de este complejo muestran niveles bajos de clorofila *b* (Boardman, Anderson y Goodchild, 1978; Wollman y Bennoun, 1982; Ish-Shalom y Ohad, 1983). El complejo del fotosistema I se ha aislado utilizando diferentes detergentes (Thornber, et al., 1979; Mullet, Burke y Artzen, 1980a y b; Anderson, 1980a y b) y mantiene las mismas características espectrales que el PS I *in vivo*, incluso la fluorescencia a 77 K con un pico a 735 nm. Las clorofilas y el β -caroteno están ligadas no

covalentemente a uno o varios polipéptidos de un peso molecular próximo a 68 kd, uno de los cuales contiene el P₇₀₀, mientras que otros polipéptidos de menor peso molecular están asociados con este núcleo, y probablemente provienen de varios aceptores de electrones que constituyen la totalidad del centro de reacción (Bengis y Nelson, 1979; Anderson, 1980b). Las clorofilas se escinden del complejo, mediante tratamientos con detergentes (Mullet et al, 1980a), en dos unidades separadas, una interna con 50 moléculas de clorofila *a* que absorbe a 694 nm y otra antena más periférica con 40-100 moléculas de clorofila *a* que absorbe a 705 nm. El PS I tiene una relación de clorofilas *a/b* menor o igual de 6 y además incluye una forma de LHC que es específica del PS I y que se denomina LHC I (Anderson y Andersson, 1982; Brauman, Weber y Grime, 1982; Skrdla y Thornber, 1982; Ish-Shalom y Ohad, 1983).

Los análisis del supracomplejo del fotosistema I, que incluye el LHC I y el centro de reacción, de tilacoides de espinaca muestran que por cada molécula de P₇₀₀ existen 186 de clorofila *a*, 24 de clorofila *b*, 27 de β -caroteno, 12 de luteína, 2 de neoxantina y 9 de violaxantina (Siefermann-Harms, 1985).

I 6b. COMPLEJO DEL FOTOSISTEMA II.

Este complejo contiene del 10 al 15% de la clorofila total con cerca de 60 moléculas de clorofila *a* por cada *P680* (Anderson, 1980a). Estas clorofilas absorben a 672 nm a temperatura ambiente. Este complejo no contiene clorofila *b*, pero está ligado al β -caroteno (Braumann, Weber y Grime, 1982). Los polipéptidos asociados a la clorofila tienen probablemente pesos moleculares entre 50 y 43 kd (Delapelaire y Chua, 1981; Anderson, 1980b; Satoh, 1981), mientras que otros polipéptidos de distinto peso molecular están asociados con distintos componentes del centro de reacción y del sistema de oxidación del agua como el citocromo *b₅₅₉* (Satoh, 1981). Según Hiller y Goodchild (1981), el peso molecular del complejo PS II nativo podría ser de 600 kd y los estudios de "freeze-fracture" de microscopía electrónica en hojas verdes, le dan un diámetro de 80 Å (Staehelin y Artzen, 1977).

Existe una información muy limitada sobre la composición pigmentaria del fotosistema II, si bien es evidente la presencia de carotenoides debido al hombro a 495 nm. que se observa en los espectros a temperatura ambiente. Los análisis de este complejo muestran que por cada 100 moléculas de clorofila *a*, hay 4 de clorofila *b*, 12.5 de β -caroteno y 2.5 de luteína (Siefermann-Harms, 1985).

I 6b. COMPLEJO CAPTADOR DE LUZ LHC II

Unidos al centro de reacción, y asociados con las proteínas captadoras de luz, de todos los organismos fotosintéticos que desprenden O_2 , se encuentran los sistemas de pigmentos captadores de luz. Estos complejos muestran enormes variaciones en la composición, organización y localización de los pigmentos dentro de la membrana.

En las plantas desarrolladas en condiciones normales de iluminación este complejo constituye el 40-60% del total de clorofila y está íntimamente asociado con el PS II (Anderson 1980a, 1982a, Thornber, 1975; Thornber y Barber, 1979). Contiene dos polipéptidos mayoritarios de pesos moleculares 26 y 28 kd, tiene una relación a/b próxima a 1.5 y muy poco β -caroteno, pero altos contenidos de xantofilas (Thornber, 1975; Braumann, Weber y Grime, 1982). El LHCP₂ solamente funciona como captador de luz con unas 240 moléculas de clorofila por cada P₆₈₀ (Anderson, 1980a; Thornber y Barber, 1979). Los estudios de "freeze-fracture" sugieren que estas clorofilas pueden distribuirse en cuatro complejos LHCP separados que se agregan con un solo PS II para formar una macropartícula de aproximadamente 160 Å de diámetro (Armond y Arntzen, 1977; Mullet y Arntzen, 1981). Esto podría significar que cada LHC II contiene 60 moléculas de clorofila y

tiene un peso molecular aproximado de 300 kd (Hiller y Goodchild, 1981).

En las membranas del tilacoide los complejos captadores de luz se disponen en agregados. La solubilización de las membranas con Triton X-100 permite separar la proteína en el estado oligomérico (LHC) mientras que la solubilización con SDS y la separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida da lugar al monómero LHCP₃, al dímero LHCP₂ y al trímero LHCP₁. Esto no significa que la forma monómera tenga una población de proteínas homogénea, sino que como se ha mencionado anteriormente, existen al menos 2 polipéptidos de 26 y 28 kd (Siefermann-Harms, 1985).

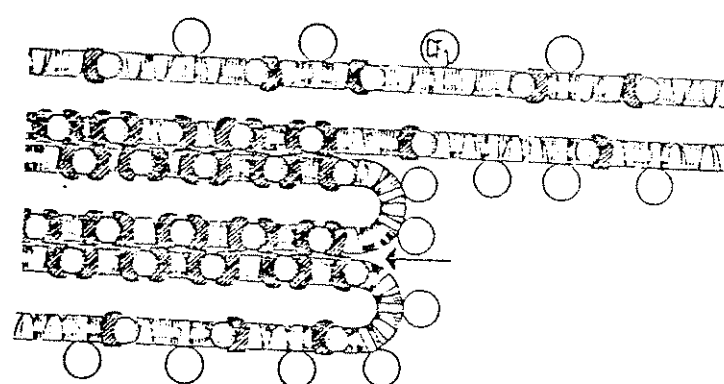
La composición en pigmentos fotosintéticos de este sistema aislado por PAGE o electroenfoque, en distintas especies de algas superiores, muestra el siguiente resultado: por cada 100 moléculas de clorofila a hay 62.5-83.4 de clorofila b, 26.7-44.5 de luteína, 9.5-19.7 de neoxantina, y 2-9.8 de violaxantina (Siefermann-Harms, 1985).

I 60. ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES DE LA MEMBRANA

Contrariamente a la idea, generalmente aceptada, de que los pigmentos del PS II y PS I, están en contacto (distribución continua), la teoría de la heterogeneidad lateral asegura que la mayor parte de la clorofila del PS II está muy separada de la del PS I. De esta forma el transporte de energía de excitación entre ambos fotosistemas está muy restringido. No obstante, la fosforilación reversible de los tilacoides permite migrar cierta parte de la antena del fotosistema II hacia los tilacoides en contacto con el estroma y así es posible regular dinámicamente la energía luminosa entre el PS II y el PS I (Anderson, 1984).

La Figura 8 muestra un modelo de organización, con las relaciones espaciales relativas, de cinco complejos protéicos intrínsecos embebidos en la membrana del tilacoide. El PS II y su LHC están confinados en las membranas apresadas de la partición de los grana, mientras que los complejos CF_0 - CF_1 están localizados en las membranas no apresadas. La validez de este modelo se ha confirmado a través de diferentes líneas de trabajo, especialmente, mediante la fragmentación de Andersson y Anderson (1980), y a la vez por las consideraciones biofísicas basadas en la distribución de cargas eléctricas en la superficie

(Barber, 1980a y b). Los estudios de fragmentación implican la escisión de los tilacoides seguido de técnicas de separación de fase (Albertsson et al., 1982).



Región del grana Región del estroma

- △ Unidad del PS I (centro de reacción en las membranas apesadas)
- △ Unidad del PS I (centro de reacción en las membranas no apesadas)
- Centro de reacción del PS II
- Centro de reacción del PS II parcialmente con un LHC (membranas no apesadas)
- ⊙ Centro de reacción del PS II complementado con LHC (membranas apesadas)
- CF₁-CF₀ Factor de acoplamiento (CF₁-CF₀)

Fig. 8. Representación esquemática del aparato fotosintético según Lichtentaler, et al (1982)
Las partes apesadas de la membrana, que no están en contacto con el estroma no contienen PS I, ni CF₀-CF₁, mientras que las no apesadas son especialmente ricas en estos complejos (Andersson y Haehnel, 1982).

I 7. PIGMENTOS Y MICROELEMENTOS

Si bien la mayor parte de los nutrientes minerales son considerablemente inespecíficos, debido a su papel multifuncional dentro de la célula vegetal e incluso dentro del cloroplasto, se conocen algunos aspectos relacionados con la estructura y/o función cloroplástica, cuando la planta sufre un stress de alguno de estos nutrientes. En este sentido Botrill, Possingham y Kriedemann, (1970), trabajando con espinaca demostró que mientras las deficiencias de N, Mg, Fe, S, Mn, Zn y Mo estaban asociadas con una disminución del contenido en clorofila, las de K, P, Ca y B provocaban un aumento en la concentración de este pigmento.

El nitrógeno es componente de todas las proteínas, por lo que su función se extiende a la práctica totalidad de los procesos fotosintéticos (Nátr, 1972). La deficiencia de este elemento se manifiesta en una pérdida de color en la planta. La deficiencia de fósforo provoca un aumento de la cantidad de pigmentos por unidad de superficie. El fósforo interviene en los procesos de fijación y regulación del carbono, a través de la fosforilación, y su deficiencia produce un aumento de los pigmentos ligados al fotosistema I (Rao et al., 1986). La deficiencia de potasio se manifiesta en las hojas desarrolladas y consiste en una decoloración en la proximidad a los márgenes. La deficiencia de manganeso provoca una disminución de la

relación clorofila *a/b*. Las plantas en estado carencial de zinc manifiestan una marcada disminución del contenido en pigmentos, si bien se carecen de datos acerca de la funcionalidad del zinc en el aparato fotosintético (Mengel y Kirby, 1983). En general, la deficiencia de cobre afecta los contenidos en plastocianina (Droppa, Terry y Horvath, 1984), y provoca una disminución en la cantidad de clorofilas y aparece un color *mate* que sugiere una reducción específica del contenido en carotenoides (Reuther y Labanauskas, 1966).

Cuadro 5

Ejemplos de funciones de los nutrientes minerales y síntomas de deficiencia en plantas superiores*

Elemento	Compuesto orgánico del que forma parte	Deficiencia
N	Proteínas y ácidos nucleicos	Están afectadas las hojas más viejas, Color verde pálido
P	Ácidos nucleicos, coenzimas	Planta de color verde oscuro
Mg	Clorofilas	Clorosis, a veces puntos necróticos
K	Desconocido	Puntos necróticos, a menudo en los bordes de las hojas
Zn	Anhidrasa carbónica, Fosfatasa alcalina	Puntos necróticos generalizados, formación de rosetas
Ca	Pectatos	En hojas jóvenes y en yemas,
B	Desconocido	Las hojas jóvenes y yemas de color verde pálido
Cu	Plastocianina, Oxidasa del ácido ascórbico	Clorosis leve
Mn	Desconocido	Puntos necróticos
S	Proteínas, sulfolípidos	En hojas jóvenes color verde pálido
Fe	Ferredoxina, citocromos	Clorosis intervenal en hojas jóvenes

* Marschner, 1983 y Salisbury y Ross, 1978

La deficiencia de hierro causa una disminución tanto de clorofilas como de carotenoides. Las xantofilas parecen estar menos afectadas que el resto de pigmentos (Terry y Abadía, 1986).

Los micronutrientes minerales parecen no tener una función definida dentro de la biosíntesis de carotenoides y clorofilas. En el caso de los carotenoides parece necesaria la presencia de Mg^{++} como activador de las enzimas en el paso de ácido acético a acetilcoenzima A; también es preciso este ión en los pasos de síntesis desde el ácido mevalónico (MVA) hasta isopentil pirofosfato y a partir de éste el Mg^{++} y/o Mn^{++} actúan hasta la formación del geranilgeranil pirofosfato. El resto de pasos que conducen a la formación de carotenoides no parecen estar influenciados por la presencia de iones metálicos (Porter y Anderson, 1967).

En el caso de las clorofilas, el Fe interviene en el paso de coproporfinógeno a protoporfirina IX y el Mg en el de Protoporfirina IX a Mg-protoporfirina IX (Castelfranco y Beale, 1983).

I 8 PIGMENTOS Y HIERRO

El hierro es un elemento que tiene dos estados de oxidación, Fe^{2+} y Fe^{3+} , siendo el primero fácilmente oxidado al segundo -particularmente cuando se encuentra acompañado en forma de hemo, centros sulfoferricos, etc.- por pérdida de uno de los 6 electrones del orbital 3d, conduciendo a una situación $3d^5$ de electrones sin aparear, con elevado spin y un paramagnetismo aumentado.

El hierro puede estar asociado a proteínas hémicas, tipo citocromos, con estructuras tetrapirrólicas similares a la hemoglobina. En el grupo hemo los dos estados de oxidación Fe(II) y Fe(III) están en coordinación octaédrica, con 4 átomos de N en situación planar como donadores de pares de electrones. La estabilidad de esta estructura y la tendencia a la oxidación de la forma Fe^{2+} a Fe^{3+} , es decir, el potencial redox del sistema, depende de los sustituyentes axiales que, en las hemo proteínas, es un átomo quelante de la proteína conjugada, mientras el otro procede del sustrato (un O de H_2O_2 en las catalasas, etc.). En las sulfoproteínas no hémicas la coordinación es tetraédrica con 4 átomos de S, 2 procedentes de restos de cisteína de la proteína conjugada, y 2 de restos de S^{2-} . Ambas estructuras soportan el rápido juego de óxido reducción -sin

transferencia paralela de H^+ , ni establecimiento y rotura de enlaces covalentes- que determinados procesos metabólicos necesitan. Esto ocurre debido a la arquitectura electrónica, altamente deslocalizada, que se establece entre el átomo de Fe y los grupos quelantes.

El hierro asimilado por la planta a través de las raíces se almacena en una forma no tóxica fácilmente disponible dentro del cloroplasto. Los cloroplastos contienen el 90 % del total del hierro foliar (Price, 1968) y la mayor parte se encuentra en una fosfoproteína férrica denominada fitoferritina, localizada en el estroma del cloroplasto. Según Seckback (1982), esta proteína puede ser transportada íntegramente desde el lugar de su síntesis, en los plastidios, hasta donde el hierro vaya a utilizarse.

El metabolismo de varios orgánulos celulares está regulado por el hierro a través de enzimas estructurales que contienen este elemento. Smith (1984), hace una relación de las proteínas que contienen hierro, en forma hémica y no hémica.

Cuadro 6

ENZIMAS HEMICAS

Enzima	Localización
Citocromo <i>a</i>	mitocondrias
citocromo <i>a₃</i>	mitocondrias
citocromo <i>c</i>	mitocondrias
citocromo <i>b</i>	mitocondrias
citocromo <i>b₅₅₉</i>	cloroplastos
citocromo <i>b₅₆₃</i>	cloroplastos
citocromo <i>f</i>	cloroplastos
citocromo <i>b₇</i>	mitocondrias
catalasa	microcuerpos
peroxidasa	microcuerpos
nitrato reductasa	mesofilo

ENZIMAS NO HEMICAS

ferredoxina	cloroplastos
succinico	
deshidrogenasa	mitocondrias
NADH deshidrogenasa	mitocondrias
xantina oxidasa	citoplasma
piruvato	
deshidrogenasa	mitocondrias
aconitasa	mitocondrias
nitrito reductasa	cloroplastos
sulfito reductasa	cloroplastos

La deficiencia de hierro en plantas superiores afecta, de forma casi exclusiva, al cloroplasto,

mientras que el resto de orgánulos celulares, que contienen hierro, como los peroxisomas, retículo endoplasmático, mitocondrias, etc, parece que no se ven alterados (Platt-Aloia, Thomson y Terry, 1983). Las plantas deficientes en hierro tienen menos clorofila por unidad de cloroplasto, pero el número de estos no disminuye por unidad de hoja. Sin embargo, la reducción en la cantidad de clorofila va acompañada de una alteración, tanto en el número como en el grado de apilamiento de las membranas tilacoidales del cloroplasto, lo que produce una disminución de la capacidad fotosintética por unidad de área (Terry, 1980).

La cantidad total de hierro en el suelo o en una planta no es siempre un buen indicador de su disponibilidad o de su efectividad. A este respecto, el hierro es una excepción entre los microelementos. De acuerdo con DeKock (1981) solo el 10-20 % del hierro total en la planta es fisiológicamente activo.

En las etapas avanzadas de deficiencia de hierro los cloroplastos están completamente desorganizados. Las hojas más jóvenes, incluyendo las venas, se vuelven amarillas, pierden su autotrofía y mueren. En los árboles estos síntomas pueden manifestarse solamente en ramas aisladas. Una hoja aislada deficiente en hierro tiene la misma apariencia externa que otra deficiente en nitrógeno.

Shetty y Miller (1966) y Terry (1980), entre otros, afirman que en condiciones de deficiencia de hierro se observa una disminución en la relación clorofila/carotenoides debido a un incremento relativo de la concentración de xantofilas frente a la de clorofilas y β -caroteno. Por otra parte, mientras para algunos autores (Spencer y Possingham, 1960; Botrill, Possingham y Kriedemann, 1970) la deficiencia de hierro no altera la relación clorofila *a*/clorofila *b*, otros observan modificaciones de esta relación (Stoking, 1975; Bindra, 1980).

La ruta biosintética de la clorofila desde un sustrato de 5-carbonos, tal como el α -cetoglutarato o glutamato hasta el ácido δ -aminolevulínico, precursor de la clorofila, puede ser activada por hierro, a través de la actividad de aconitasa y/o ferredoxina. La ferredoxina es necesaria para activar la enzima de la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (Miller, Pushnik y Welkie, 1984).

Las fotografías de microscopía electrónica de Platt-Aloia, Thomson y Terry (1984) muestran que, bajo deficiencia de hierro, disminuye el número de tilacoides en los grana de los cloroplastos. La reducción de las membranas tilacoidales en situación de deficiencia de hierro viene acompañada de una disminución de todos los pigmentos captadores de luz (clorofilas y carotenoides). La clorofila *a*, clorofila *b* y β -caroteno decrecen en relación directa al nivel de

hierro, mientras que las xantofilas también decrecen, pero en menor proporción que las anteriores (Bolle-Jones y Notton, 1953; Terry, 1980).

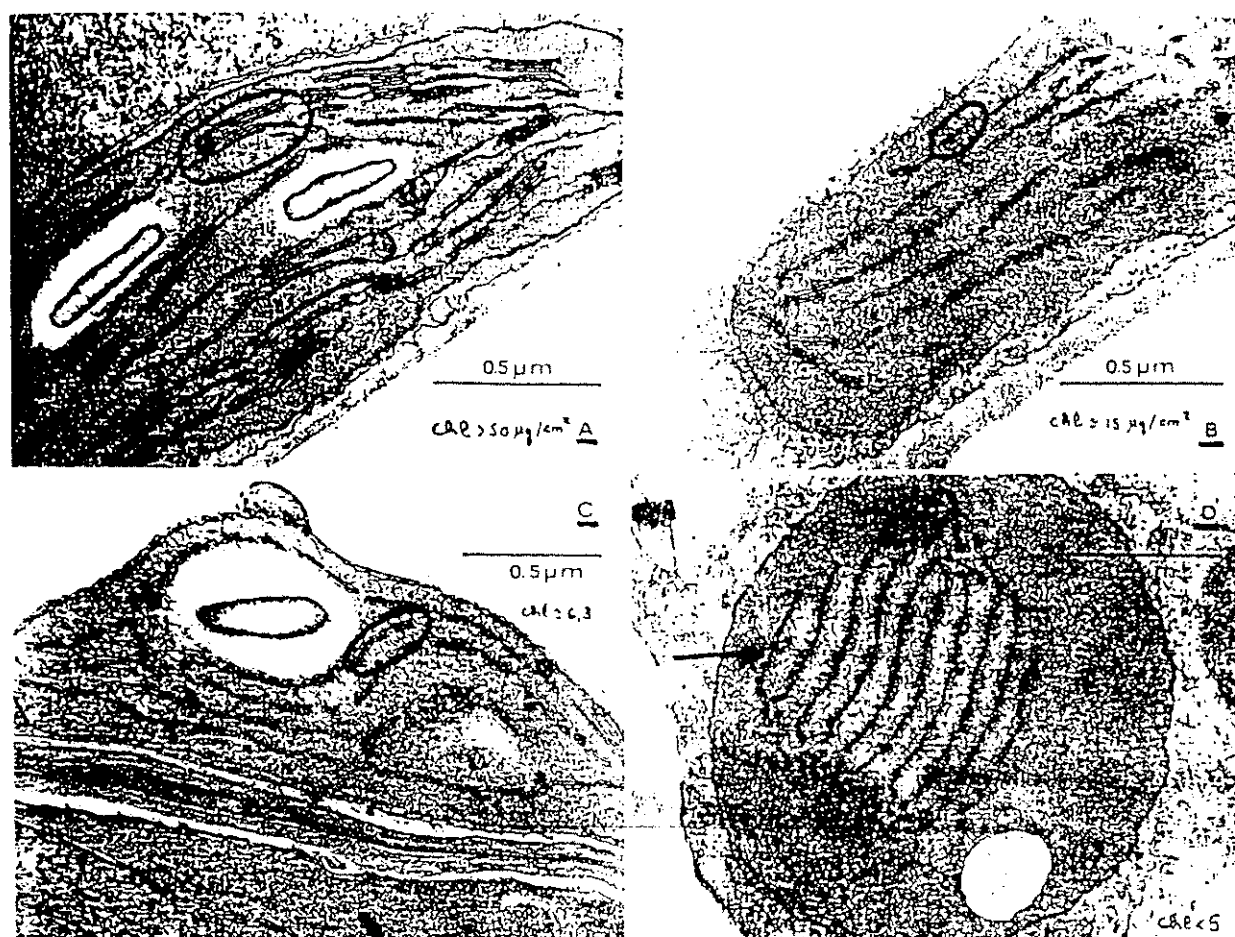


Fig. 9 Diferentes estadios de la deficiencia de hierro en el cloroplasto, en función del contenido en clorofila. Puede observarse que cuanto menor es la concentración de clorofila, mayor es la desorganización de la estructura interna del cloroplasto (Platt-Alcia, et al., 1984)

hierro, mientras que las xantofilas también decrecen, pero en menor proporción que las anteriores (Boller Jones y Notton, 1953; Terry, 1980).

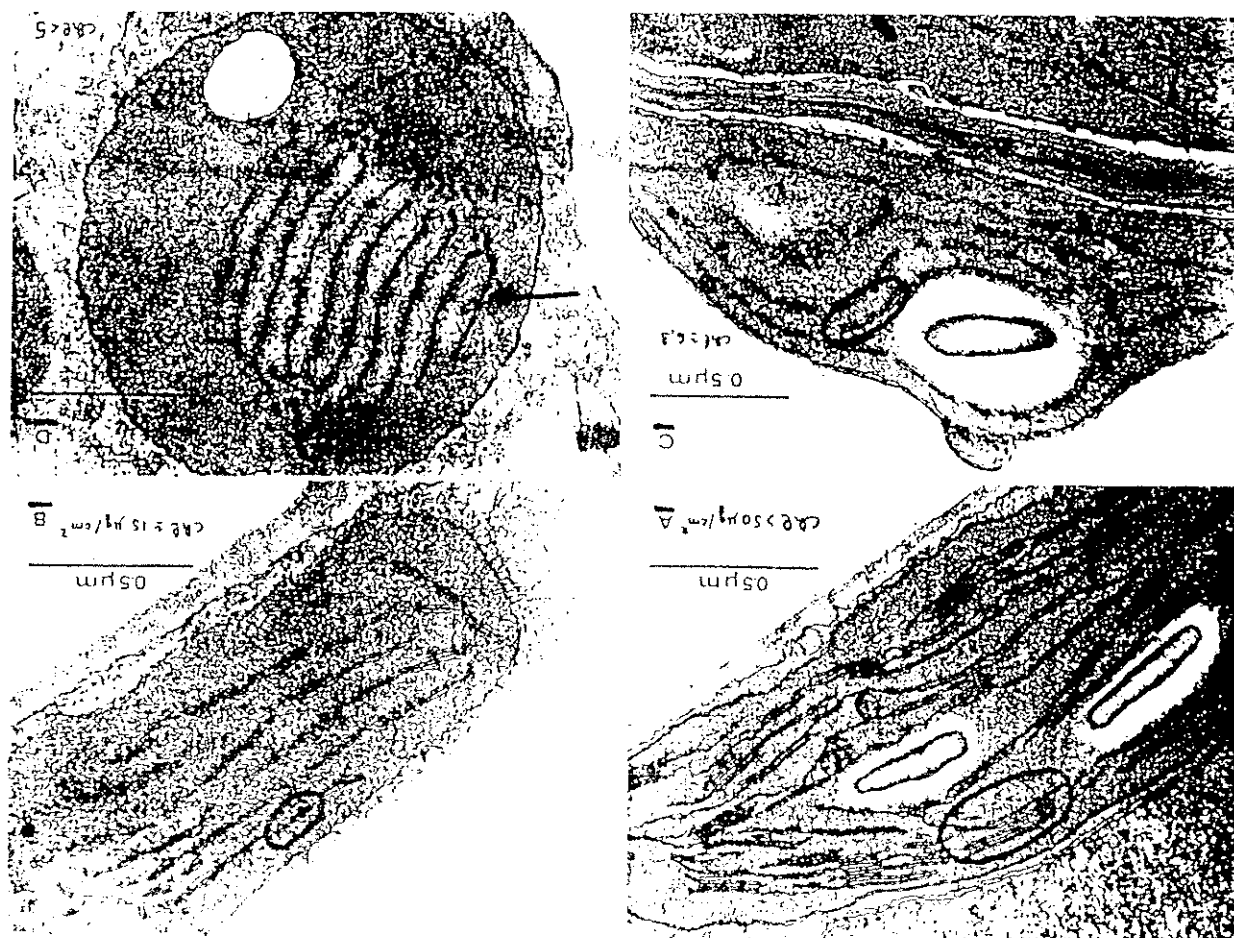


Fig. 9 Diferentes estadios de la deficiencia de hierro en el cloroplasto, en función del contenido en clorofila. Puede observarse que cuanto menor es la concentración de clorofila, mayor es la desorganización de la estructura interna del cloroplasto (Platt-Alota, et al., 1984)

HIPOTESIS DE TRABAJO

Tras el estudio de la panorámica general de los efectos, en la composición pigmentaria, que producen las distintas deficiencias nutricionales, se eligió el hierro como el elemento más adecuado para investigar la inserción de los pigmentos fotosintéticos en las membranas del cloroplasto, debido precisamente a que esta deficiencia parece afectar la estructura fotosintética.

Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha sugieren que el desarrollo cloroplástico inducido por hierro en plantas afectadas por esta deficiencia, provoca la formación, en primer lugar, de la matriz lipídica de la membrana tilacoidal junto con los centros de reacción y transportadores de electrones. Tras las primeras 24 h se sintetizan las antenas (y por lo tanto la mayoría de los pigmentos captadores de luz, clorofilas y carotenoides) y otras proteínas tilacoidales (Terry y Abadía, 1986). Los primeros pasos del desarrollo cloroplastico inducido por hierro transcurren en la formación de un incipiente aparato de transporte electrónico, ya funcional. El transporte electrónico a través del PS I, PS II y cadena completa se desarrolla durante las primeras 24 h tras la adición de hierro, así como los pigmento-proteína asociados con

los centros de reacción del PS I y II, CP I y CPa respectivamente. La configuración, en las primeras etapas, de un aparato de transporte electrónico funcional está acompañada, como es lógico, de un rápido incremento en la tasa de fotosíntesis por unidad de clorofila (Nishio y Terry, 1983; Nishio et al., 1985).

El estudio de la síntesis *de novo* del cloroplasto inducido por hierro debe estar apoyado necesariamente en el análisis de los parámetros y compuestos que intervienen en la fotosíntesis. El problema puede abordarse por caminos diferentes, así las medidas de fotosíntesis *in vivo*, fluorescencia, absorción molecular, complejos pigmento-proteína, etc., proporcionan una información útil a la hora de aplicar esta nueva vía experimental, al estudio del cloroplasto.

En nuestro caso, se analizarán los niveles de pigmentos fotosintéticos en todo el ciclo de recuperación de plantas deficientes en hierro. Asimismo, el análisis de los complejos pigmento-proteína en cada etapa de la síntesis *de novo* del cloroplasto a través de la dinámica de incorporación de hierro a la célula vegetal, proporcionará la información precisa, que permitirá conocer la funcionalidad, evolución y estructura del aparato fotosintético y de los tilacoides, como soporte del conjunto de reacciones químicas más importantes para la vida sobre nuestro planeta.

MATERIAL Y METODOS

M I MATERIAL VEGETAL

El estudio del desarrollo cloroplástico inducido por hierro requiere un material vegetal que reúna algunas características específicas como: a) tamaño de hoja grande, con un grado de pigmentación uniforme; b) que sea fácil inducir la deficiencia de hierro; c) que sea eficiente en la toma de hierro y d) que sea fácil de cultivar en condiciones controladas. Atendiendo a estos condicionantes se eligió una variedad de remolacha (*Beta vulgaris* L. var. Monohill), suministrada por la Unidad

de Genética y Mejora Vegetal de la E.E. de Aula Dei, ya que reunía las características adecuadas, siendo una especie de probada eficacia, según la bibliografía, en este tipo de investigación (Ver trabajos de Terry), y por la propia experiencia en cultivo hidropónico y en deficiencia de hierro.

M I _a CULTIVO EN HIDROPONICO

Se lavan las semillas con agua destilada durante 24 horas, para eliminar el posible fungicida y/o el inhibidor de la germinación que se añade a las semillas para su conservación. Se colocan sobre un lecho poroso previamente humedecido con agua destilada y se cubren con arena lavada, también húmeda. Se lleva el recipiente de germinación a la cámara bioclimática y se mantiene la humedad del lecho con solución nutritiva de concentración 1/8 de la de Hoagland.

En el plazo de una semana se obtienen plántulas con una altura de ≈ 4 cm. En este momento, se extraen cuidadosamente las plántulas del lecho, lavando las raíces con agua destilada. El paso a hidropónico se realiza en dos fases: en primer lugar se colocan 45 plantas en un recipiente de 50 litros de capacidad con solución media de Hoagland, que contenga 2.5 ppm de Fe en forma de quelato, como se describe posteriormente, y

con borboteo de aire. Cuando se desarrollan las primeras hojas se traspasan las plantas a otro recipiente de 20 litros de capacidad con la misma solución nutritiva (4 plantas por recipiente), manteniendo constante el borboteo de aire a través de la solución.

Para inducir deficiencia de hierro, en cualquier especie de planta, es necesario tomar cierto tipo de precauciones para evitar la posible contaminación por hierro, que haría imposible obtener las plantas adecuadas.

A los recipientes que contienen las plantas deficientes en hierro se les añaden 5-10 g de CaCO_3 y 20 ml de NaOH 1 N en el momento de la colocación para evitar la acidificación de la solución. Se controla regularmente el pH y si es preciso se hacen nuevas adiciones de CaCO_3 . De esta forma, si existe hierro en la solución, precipitará en forma de hidróxido y no podrá ser absorbido por las raíces.

M I I I CONDICIONES DE TRABAJO

Fotoperiodo; 16 horas de luz y 8 h de oscuridad.

Temperatura: 25°C

Humedad: 90 %

Intensidad luminosa: 350 μmol cuantos $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Radiación luminosa: 400-700 nm

M I I I I SOLUCION NUTRITIVA

Desde que en 1952 Hoagland definió las necesidades de las plantas en nutrientes inorgánicos, y propuso una solución nutritiva capaz de suministrarlos, la mayoría de investigadores que hasta la fecha han trabajado en medio hidropónico, han tomado como base esta solución.

En nuestro caso utilizamos una solución de concentración mitad de Hoagland, excepto en el hierro que conserva la concentración normal de 2.5 ppm, pero en forma de EDDHA (ácido etilendiamino diacético), marca comercial Sequestrene, con un contenido en hierro del 12 %. La razón de utilizar el quelato se debe a que las raíces toman el hierro en forma de Fe (III) y al pH de trabajo (aproximadamente 7.5) estaría precipitado en forma de hidróxido.

Por razones de operatividad se divide la solución stock en cuatro partes para evitar la precipitación de algunos elementos

SOLUCION STOCK 1

Se preparan 10 litros de esta solución, por la estabilidad de los componentes en disolución acuosa. Con este volumen se podrán preparar 100 cubos de 20 litros de capacidad.

g/10 l	Producto	Pm	M (g/l)	concentración	ppm	ppm
505,5	KNO ₃	101,11	0,5 (50,55)	2,5 mM	97,8	137 K
493,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,50	0,2 (49,300)	1,0 mM	24,3	11,5 Na
272,2	KH ₂ PO ₄	136,09	0,2 (27,218)	1,0 mM	30,1	11,5 Cl
58,5	NaCl	58,5	0,1 (5,85)	0,5 mM	11,5	24,3 Mg

La relación en volumen de Solución 1 a solución hidropónica debe ser 200:1, de forma que se añadirán 100 ml de esta solución a los recipientes de 20 litros de capacidad.

SOLUCION STOCK 2

Con 1 litro de esta solución se pueden preparar 20 cubos de 20 litros. La relación solución 2/sol hidropónica debe ser 400:1, es decir 50 ml/cubo de 20 litros.

g/l l	Producto	Pm	M (g/l)	concentración	ppm	ppm
218	Ca(NO ₃) ₂	218	1 (218)	2,5 mM		100 Ca 70 N

SOLUCION DE MICROELEMENTOS

Se prepara 1 litro de esta solución que se añadirá a la hidropónica en una relación 2000:1, de forma que se podrán preparar 100 cubos de 20 litros.

g/l l	Producto	Pm	mM (g/l)	concentración	ppm
1,81	MnCl ₂ ·4H ₂ O	197,94	9,14 (1,81)	4,6 μM	0,25 Mn 0,33 Cl
2,86	BO ₃ H ₃	61,81	46,3 (2,86)	23,2 μM	0,25 B
0,025	Na ₂ MoO ₄	205,94	0,12 (0,025)	0,06 μM	0,06 Mo
0,23	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	136,38	0,8 (0,23)	0,4 μM	0,026 Zn 0,013 S
0,06	CuSO ₄	159,55	0,37 (0,06)	0,185 μM	0,012 Cu 0,006 S

SOLUCION DE HIERRO

Por ser este el compuesto más inestable en solución se prepara la cantidad justa que vaya a utilizarse en cada experiencia. Se añaden 60 ml por cada 20 litros de solución hidropónica.

g/l l	Producto	concentración final de Fe (ppm)
14	Sequestrene	2,5

INSTRUMENTACION

CAMARA BIOCLIMATICA

MARCA: KOSKA

MODELO: Construida según las especificaciones suministradas
por el Departamento

CARACTERISTICAS:

- Fotoperiodo variable
- Controles independientes para día y noche
 - Humedad
 - Temperatura
- Iluminación distribuida en tres fases: dos fluorescentes y una incandescente (10 % del total)
- Altura de iluminación variable
- Suministro de agua desionizada en el interior de la cámara
- Aireación forzada en los recipientes hidropónicos mediante compresor de 1/4 HP.

M I I . AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

Se toman ≈ 40 g de hojas despeciadas y se muelen con 100 ml de tampon de aislamiento, a velocidad máxima, en 3 periodos de unos 2 segundos. Se filtra a traves de 4 capas de Miracloth. Se centrifuga 4 minutos a 1900 g y se resuspende el precipitado con un pincel. Se añaden ≈ 40 ml de tampon de lavado 1, seguidamente se centrifuga a 12000 g durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado con un pincel en tampon Tricina+Sorbitol (≈ 40 ml), pasando seguidamente la suspensión a un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflon, para romper completamente los cloroplastos por choque osmótico y por fractura mecánica. Se centrifuga de nuevo a 12000 g durante 5 minutos. Se realizan dos nuevos lavados con Tricina+Sorbitol para eliminar la mayor parte del almidón. El último precipitado se resuspende con un pincel en 2 ml del mismo tampon. En este momento se calcula la concentración de clorofilas tomando una alícuota de 50 μ l y llevándola a 10 ml de acetona 100%. Se toman las lecturas de absorbancia a 662, 645 y 470 nm y se aplican las fórmulas de Val, et al. (1985). Una vez conocida la concentración de clorofila total, se distribuye la muestra en fracciones de 50-100 μ l en tubos Eppendorf, introduciéndolas seguidamente en N_2 líquido.

MEDIO BASICO

=====

g/l	Producto	Pm	Conc.	Conc. final
-----	-----	-----	-----	-----
1,180	NaCl	58,3	20 mM	10 mM
2,034	MgCl	203,3	10 mM	5 mM
17,92	Tricina	179,2	100 mM	50 mM
0,672	EDTA	336,2	2 mM	1 mM
0,396	MnCl ₂	179,2	2 mM	1 mM

pH 7.8

TAMPON DE MOLIENDA (100 ml)

=====

50 ml de Medio básico

Añadir antes de usar:

g/100 ml	Producto	Pm	Conc.
-----	-----	-----	-----
1	PVP	10 ⁴ -10 ⁷	1 %
7,29	Sorbitol	182,2	400 mM
0,1	BSA	-----	0,1 %
0,2	Ascorbato Na	198,11	0,2 %

Llevar a 100 ml con H₂O

TAMPON DE LAVADO 1 (100 ml)

=====

50 ml de Medio básico

Añadir antes de usar

g/100 ml	Producto	Pm	Conc.
-----	-----	-----	-----
7,29	Sorbitol	182,2	400 mM

LLevar a 100 ml con H₂O

TAMPON DE LAVADO Y RESUSPENSION 2

=====

g/l	Producto	Pm	Conc.
-----	-----	-----	-----
8,96	Tricina	179,2	50 mM
9,11	Sorbitol	182,2	50 mM

pH 8

INSTRUMENTACION
CENTRIFUGA REFRIGERADA DE
ALTA VELOCIDAD

MARCA: Sorvall

MODELO: RC5C

CARACTERISTICAS:

- Control de temperatura (desde -20 a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Velocidad máxima 20000 rpm (48000 g con rotor SS-34)
- Programa de aceleración y deceleración lenta para separación en gradientes de densidad

ROTORES UTILIZADOS

PRINCIPAL FUNCION

SS-34: 8 tubos x 50 ml

Preparativo
obtención de cloroplastos

SH-MT: 150 tubos Ependhorf

Centrifugación de
cloroplastos
tras la extracción del N_2
liquido

TIPOS DE TUBOS

Policarbonato o polialómero para solventes orgánicos.

PVP transparente para centrifugación en gradiente de densidad

MOLINO HOMOGENIZADOR

MARCA: Sorvall

MODELO: OMNIMIXER

HOMOGENIZADOR DE CLOROPLASTOS

MARCA: POBEL

MODELO: R-15

M I I I . DETERMINACION DE PIGMENTOS POR HPLC

La determinación de pigmentos fotosintéticos por HPLC en fase reversa, constituye un importante capítulo en el apartado de resultados de la presente memoria; no obstante, adelantamos un resumen de las condiciones de análisis, con objeto de agrupar todas las técnicas experimentales utilizadas

EXTRACCION DE PIGMENTOS

Se toman 5-10 discos de hoja de 0.385 cm² de superficie, dependiendo del grado de pigmentación de la hoja. Se trituran en un mortero con 2 ml de acetona del 100%, en presencia de ≈0.02 g de ascórbato sódico para prevenir posibles oxidaciones y formación de feofitinas. Posteriormente se enrasa a 5 o 10 ml. Se centrifuga a 48000 rpm en tubos de polialómero, se recoge el sobrenadante y se filtra a través de una membrana Durapore 0.22 µm

Los procesos y manipulaciones se realizaron con luz tenue de color verde y los extractos se mantuvieron en recipientes cerrados y en frío (-30°C) hasta el momento del análisis. La purificación de los extractos se realizó según la técnica descrita por Eskins y Dutton

(1979). Los reactivos fueron de grado analítico y se purificaron según las recomendaciones de Davies (1976). Todos los solventes fueron filtrados y desgasificados a través de una membrana Durapore de $0.22\ \mu\text{m}$ con un sistema de filtración Millipore.

Al pasar los pigmentos por la cubeta del detector se produce una señal de absorbancia que se registra en el integrador-registrador. El área de cada pico multiplicada por el factor correspondiente, que se mencionan en el apartado de resultados, proporciona directamente la concentración de cada pigmento.

DETERMINACION DE PIGMENTOS

ELUYENTES:

1ª Etapa: Se homogeniza la columna durante 5 minutos con una mezcla MeOH/H₂O (96:4 v/v)

2ª Etapa: Se inyecta la muestra y se desarrolla el cromatograma en EtOH 100%. Tiempo de desarrollo $\approx 5\ \text{min}$.

* Nota: Todos los eluyentes y muestras se filtran a través de membranas Millipore de $5\ \mu\text{m}$.

CONDICIONES INSTRUMENTALES:

Flujo de la bomba: 5 ml/min.

λ del detector: 440 nm

INSTRUMENTACION**CROMATOGRAFO LIQUIDO DE
ALTA EFICACIA**

Equipo modular de diseño propio que consta de:

BOMBA

MARCA: Waters

MODELO: M-45

CARACTERISTICAS:

- Doble pistón sincronizado, para obtener flujo constante
- Flujo: de 0.1 a 10 ml/min.

DETECTOR:

MARCA: Shimadzu

MODELO: SPD-6AV

CARACTERISTICAS:

- Microcubeta de cuarzo de 8 μ l
- Selector de longitud de onda por red de difracción holográfica
- Rango de medida: 190-900 nm
- Lámpara de tungsteno 50 W para el visible y de deuterio para el ultravioleta

COLUMNA Y MODULO DE COMPRESION:

MARCA: WATERS

MODELO: Módulo de compresión radial RCM-100;
Columna μ Bondapack C₁₈ de 10 μ m de diámetro

CARACTERISTICAS:

- El módulo proporciona una compactación homogénea del lecho, aumentando la eficacia de la columna y por tanto el poder de resolución.

REGISTRADOR INTEGRADOR:

MARCA: Shimadzu

MODELO: RC3A

CARACTERISTICAS:

- Integración hasta línea de base o entre valles de picos.
- Posibilidad de programación en Basic
- Cambio de parámetros de integración programables
- Atenuación variable
- Identificación automática de picos por tiempos de retención.

MEZCLADOR DE GRADIENTES:

Diseño propio de mezclador de eluyentes a baja presión, para conseguir un gradiente lineal de polaridad. Consiste en un agitador magnético, una bomba peristáltica y un tubo de mezcla.

M I V . CUANTIFICACION DE PIGMENTOS TOTALES

En algunas determinaciones, es necesario conocer con antelación el contenido en clorofilas o carotenoides, como es el caso de la cantidad de muestra que debe introducirse en electroforesis o la concentración de dodecilsulfato sódico, u otros compuestos que se deben añadir a para la solubilización de una determinada muestra. Para este tipo de análisis u otros semejantes, utilizamos las ecuaciones citadas por Val, Heras y Monge (1985):

$$Cl\ a\ (\mu g.cm^{-2}) = 10.81\ Abs_{662} - 0.75\ Abs_{645}$$

$$Cl\ b\ (\mu g.cm^{-2}) = 19.02\ Abs_{645} - 3.98\ Abs_{662}$$

$$Cl\ t\ (\mu g.cm^{-2}) = 6.83\ Abs_{662} + 18.27\ Abs_{645}$$

$$Carotenoides\ (\mu g.cm^{-2}) = 3.775\ Abs_{470} - 0,21\ Cl\ b$$

El rango óptimo de fiabilidad se encuentra cuando la absorbancia a 662 nm está comprendida entre 0.3 y 0.7; de forma que, si es preciso, se efectuarán las diluciones adecuadas para que se cumpla la ley de Beer.

INTRUMENTACION

ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION MOLECULAR

MARCA: Shimadzu

MODELO: UV 3000

CARACTERISTICAS:

- Rango de medida: 190-900 nm
- Modos de operación: Simple o doble haz; simple o doble longitud de onda
- Dos monocromadores: tipo Czerny-Turner; red holográfica 1200 líneas/mm; distancia focal 350 mm.
- Rendijas: seleccionables desde 0.25 a 5 nm
- Velocidad de barrido: desde 5 a 1200 nm/min
- Fuentes de luz: lámpara de tungsteno de 50 W para el visible y de deuterio para el ultravioleta.
- Corrección automática por línea de base
- Nueve memorias permanentes, para almacenar condiciones de medida, línea de base, etc.
- Posibilidad de realizar espectros en cuarta derivada y espectros diferencia.
- Auto cero
- Salida RS232 para integrador

- Doble compartimento de cubetas u otros
accesorios (iluminación perpendicular,
densitometría óptica, fluorescencia, etc.)

M V. SEPARACION DE COMPLEJOS PIGMENTO-PROTEINA

(Anderson. (1980) BBA; 591:113-126)

PREPARACION DE PLACAS

Las placas de alumina y de vidrio se limpian con mezcla crómica tras cada utilización, se lavan con agua y seguidamente se pasan por agua destilada y se secan en la estufa a 80°C. Las partes móviles del sistema se sellan con grasa de silicona.

En primer lugar se mezclan los reactivos del gel separador excepto el persulfato y el TEMED, se colocan en un Erlenmeyer de 25 ml y se desgasifican con agitación durante 5 minutos.

Sellado de la parte inferior del sistema y colocación del gel separador:

Una vez montado el sistema estanco de placas se sella la parte inferior con agarosa al 1 % en buffer inferior, calentada a la llama hasta su licuefacción ($\approx$ 2.5 ml por placa).

Una vez solidificada la agarosa ($\approx$ 15 min) se vierte la solución de gel separador desgasificada,

habiéndole añadido el persulfato y TEMED. Como la acrilamida no gelifica en contacto con el aire, se añade cuidadosamente (con una jeringuilla Hamilton) agua hasta el final de la placa de alumina.

Acabado de las placas:

La polimerización del gel separador se realizará con 24 horas de antelación a su desarrollo.

Transcurridas las 24 h. se retira el agua de sellado. Se seca el espacio libre con papel de filtro y se vierten 0.5 ml de buffer TRIS/HCl + 1.5 ml de H_2O y 20 μ l de SDS, se deja reposar durante 30 minutos. Posteriormente se quita esta solución y se añaden 100 μ l por placa de gel de muestra sin persulfato ni TEMED, con lo que se lava la superficie de los geles. Se retiran los 100 μ l con papel de filtro y en este momento se vierte la solución de gel de muestra y se introducen los peines dejando gelificar durante $\approx$ 30 minutos.

A los 30 minutos, se retiran los peines, se monta el sistema y se vierte el buffer inferior en la cubeta de PVP, y 150 ml del buffer superior + 1.5 ml de SDS (10 %) en el compartimento formado por la placa de alumina, de forma que cubra la superficie del gel de muestra. En este momento se cierra el sistema con los contactos eléctricos y se realiza la preelectroforesis.

SOLUBILIZACION DE LA MUESTRA CON SDS 10 %

Se toma la muestra de tilacoides congelada en N_2 líquido y se introduce en baño de agua con hielo a $0^\circ C$ hasta la fusión de la suspensión de cloroplastos. Se toma la alícuota adecuada (50-100 μl) y se centrifuga a 38000 g a $0^\circ C$ durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante (Tricina+Sorbitol) con una jeringuilla Hamilton y se resuspende el precipitado (sobre hielo) con buffer de solubilización (TRIS+glicerol pH 8.8) llevando a una concentración final de 0.5 mg Chl/ml. La solubilización con SDS se realiza inmediatamente, añadiendo el volumen adecuado de SDS al 10% a la suspensión de tilacoides (todas estas operaciones se realizan sobre hielo). Se centrifuga durante 5 minutos a 38000 g a $0^\circ C$, para que precipite la fracción sólida y el sobrenadante (complejos solubilizados) se introduce en las oquedades, formadas por los peines en el gel de muestra, para la separación de los complejos.

Ejemplo: Alícuota de cloroplastos 100 μl con una concentración de clorofila de 3 mg/ml. Relación SDS/Chl 8:1

mg de Chl/ml	Vol de tilacoides	μg_{total} de Chl	μl Buffer	μl SDS
-----	-----	-----	-----	-----
3	100 μl	300	600	24

SOLUCIONES MADRE

ACRILAMIDA 29.2 % Acrilamida + 0.8 % bisacrilamida
(filtrar la solución)

PERSULFATO AMONICO 10 %

S. D. S. 10 %

TRIS/HCl 10.172 g Tris/200 ml de H₂O pH 9.35 (pH 8.84 a 20°C).

TRIS/H₂SO₄ 2.664 g Tris/200 ml de H₂O pH 6.14 (pH 5.65 a 20°C).

AGAROSA 1 % 0.25 g/25 ml de Buffer inferior (se distribuye en 5 fracciones de 5 ml, que se guardan en la nevera)

TAMPON ELECTRODOS

SUPERIOR pH 8.64: 41 mM TRIS (4.965 g/litro)+10 ml SDS (10%)+H₃BO₃ (≈3 g hasta alcanzar pH 8.18 a 20°C)

INFERIOR pH 9.35: 430 mM TRIS/HCl (52.073 g/litro) (pH 8.84 a 20°C).

GELES (dos placas)

SEPARADOR (15 ml)

volumen	producto	conc. final
7.5 ml	TRIS/Cl	0.21 M
4.0 ml	Acrilamida	0.80 %
3.3 ml	H ₂ O	22.00 %
15 µl	Persulfato	0.01 %
15 µl	TEMED	0.01 %
150 µl	SDS (10%)	0.10 %

MUESTRA (5 ml)

cantidad	producto	conc. final
2.5 ml	TRIS/H ₂ SO ₄	55 mM
665 µl	Acrilamida	4 %
1.5 ml	H ₂ O	30 %
0.25 g	Glicerol	5 %
5 µl	Persulfato	0.1 %
3.5 µl	TEMED	0.7 %

CONDICIONES DE ELECTROFORESIS

Se realiza una preelectroforesis a 10 mA durante 30 min. Se introduce la muestra a 5 mA durante 1 hora. La separación se desarrolla 10 mA durante 1 h 15 min.

DENSITOMETRIA OPTICA

Doble longitud de onda: $\lambda_S=663$ nm; $\lambda_R=750$ nm

Anchura de rendija: 1 nm

Escala: 0-500 unidades de absorbancia

Scan Speed: 4 (50 nm/min)

λ_S Scale: 6 (20 nm/cm)

INSTRUMENTACION

FUENTE DE ALIMENTACION

MARCA: CAMAG

MODELO: 67520

CARACTERISTICAS:

- Máxima diferencia de potencial: 1000 V.
- Posibilidad de trabajar a: potencia, intensidad o voltaje constantes
- Temporizador programable.

CUBETA DE ELCTROFORESIS

MARCA: Hoeffler

MODELO: Mighty Small.

CARACTERISTICAS:

- Doble compartimento de placas
- Desarrollo simultáneo hasta 12 muestras (según el peine utilizado).
- Mínima cantidad de tampon (100 ml de inferior y 150 ml del superior).
- Fácil visualización por la placa de alumina.



RESULTADOS

R— I EXTRACCION DE PIGMENTOS

Los métodos tradicionales de extracción de pigmentos fotosintéticos de material vegetal han evolucionado en el sentido de conseguir total eficacia y rapidez en el tratamiento de la muestra. La fotolabilidad y la capacidad de reacción con el oxígeno atmosférico de los pigmentos fotosintéticos son, entre otras, las principales causas de degradación de las muestras (Davies, 1976), por lo que es preciso trabajar en condiciones de mínima luminosidad, con solventes orgánicos purificados, exentos de oxidantes y reductores, evitando, en la medida de lo posible, el contacto con el aire. En nuestro caso hemos comprobado, tras el estudio que se detalla a continuación (pag), que si se toman las precauciones necesarias, todos los solventes orgánicos ensayados son similares, en cuanto al rendimiento de extracción.

En gran número de estudios con material vegetal es necesario cuantificar de forma rápida la cantidad de clorofilas de una muestra. Numerosos autores han propuesto ecuaciones matemáticas que permiten obtener las concentraciones de pigmentos totales (clorofila a, clorofila b, y en algún caso carotenoides).

En 1949, Arnon publica las fórmulas para el cálculo de clorofilas en acetona del 80 %. Desde entonces, numerosos autores han proseguido en la misma línea de investigación.

Puesto que el tejido vegetal fresco tiene un alto contenido de agua y los pigmentos fotosintéticos son lípidos solubles, los solventes orgánicos utilizados para la extracción deben ser miscibles con el agua. Teniendo en cuenta esta condición, se comenzó el trabajo realizando un estudio comparativo de la eficacia de los extractantes más frecuentemente utilizados: etanol 96 % (Wintermans y De Mots, 1965), acetona 80 % (Arnon, 1949; Inskeep, 1985), metanol 100 % (Arnon, 1949), Acetona 100 % (Lichtenthaler y Welburn, 1984). El procedimiento de extracción consistió en la homogeneización, en mortero, de 5 discos de hoja de 0.37 cm^2 de superficie ($\approx 8.3 \text{ mg/disco}$), con 10 ml de agente extractante, en presencia de ascorbato sódico para prevenir la formación de feofitinas. La suspensión se filtró a través de un sistema Millipore, con una membrana Durapore de $0.22 \text{ }\mu\text{m}$.

El estudio comparativo de eficacia de distintos extractantes orgánicos, consistió en determinar las concentraciones de pigmentos, aplicando las ecuaciones apropiadas.

Las ecuaciones utilizadas para la realización de este estudio son:

- Acetona 80 % (Arnon, 1949)

$$\text{clorofila}_T = 20.2 \text{ Abs}_{645} + 8.02 \text{ Abs}_{663}$$

$$\text{clorofila } a = 12.7 \text{ Abs}_{663} - 2.69 \text{ Abs}_{645}$$

$$\text{clorofila } b = 22.9 \text{ Abs}_{645} - 4.68 \text{ Abs}_{663}$$

- Acetona 80 % (Inskeep, 1985)

$$\text{clorofila}_T = 17.95 \text{ Abs}_{645} + 7.90 \text{ Abs}_{663}$$

$$\text{clorofila } a = 12.63 \text{ Abs}_{663} - 2.52 \text{ Abs}_{645}$$

$$\text{clorofila } b = 20.47 \text{ Abs}_{645} - 4.73 \text{ Abs}_{663}$$

- Acetona 80 % (Lichtenthaler y Welburn, 1984)

$$\text{clorofila } a = 12.21 \text{ Abs}_{663} - 2.81 \text{ Abs}_{646}$$

$$\text{clorofila } b = 20.13 \text{ Abs}_{646} - 5.05 \text{ Abs}_{663}$$

$$1000 \text{ Abs}_{470} - 3.27 C_a - 104 C_b$$

$$\text{carotenoides} = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

- Metanol 100 % (Arnon, 1949)

$$\text{clorofila}_T = 25.5 \text{ Abs}_{650} + 4.0 \text{ Abs}_{665}$$

$$\text{clorofila } a = 16.5 \text{ Abs}_{665} - 8.3 \text{ Abs}_{650}$$

$$\text{clorofila } b = 33.8 \text{ Abs}_{650} - 12.5 \text{ Abs}_{665}$$

- Metanol 100 % (Lichtenthaler y Welburn, 1984)

$$\text{clorofila } a = 15.65 \text{ Abs}_{666} - 7.34 \text{ Abs}_{653}$$

$$\text{clorofila } b = 27.05 \text{ Abs}_{653} - 11.21 \text{ Abs}_{666}$$

$$1000 \text{ Abs}_{470} - 2.86 C_a - 129.2 C_b$$

$$\text{carotenoides} = \text{-----}$$

245

- Etanol 96 % (Wintermas y De Mots, 1965)

$$\text{clorofila}_T = 20.0 \text{ Abs}_{649} + 6.1 \text{ Abs}_{665}$$

$$\text{clorofila } a = 13.7 \text{ Abs}_{665} - 5.7 \text{ Abs}_{649}$$

$$\text{clorofila } b = 25.8 \text{ Abs}_{649} - 7.6 \text{ Abs}_{665}$$

- Etanol 96 % (Lichtenthaler y Welburn, 1984)

$$\text{clorofila } a = 13.95 \text{ Abs}_{665} - 6.88 \text{ Abs}_{649}$$

$$\text{clorofila } b = 24.96 \text{ Abs}_{649} - 7.32 \text{ Abs}_{665}$$

$$1000 \text{ Abs}_{470} - 2.05 C_a - 114.8 C_b$$

$$\text{carotenoides} = \text{-----}$$

245

- Acetona 100 % (Lichtenthaler y Welburn, 1984)

$$\text{clorofila a} = 11.75 \text{ Abs}_{662} - 2.35 \text{ Abs}_{645}$$

$$\text{clorofila b} = 18.61 \text{ Abs}_{645} - 3.96 \text{ Abs}_{662}$$

$$1000 \text{ Abs}_{470} - 2.27 C_a - 81.4 C_b$$

$$\text{carotenoides} = \text{-----}$$

227

Dependiendo del solvente, así como de su polaridad y de las ecuaciones utilizadas, los resultados varían en un rango muy amplio, como puede observarse en el cuadro 1, . Así, la concentración de clorofila total oscila entre $26.05 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (utilizando la fórmula de Lichtenthaler y Welburn para acetona del 80) y $33.10 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (Arnon, para metanol) y consecuentemente, la relación clorofila a/clorofila b, entre 4.10 y 2.41 respectivamente. Si comparamos valores en un mismo solvente, para acetona del 80%, la concentración de clorofila total varía entre $29.68 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (Arnon) y 26.05 (Lichtenthaler y Welburn). Por lo tanto, en primer lugar, es necesario encontrar un método de cuantificación de pigmentos fotosintéticos, que no dependa ni del solvente ni de ecuaciones. Técnicas, como la cromatografía líquida de baja presión, de capa fina (Hager y Bertenrath, 1965) y de papel, no suelen utilizarse en la cuantificación de pigmentos, debido a que son procedimientos que implican un tiempo de realización considerable (purificación de la muestra, la propia separación, etc.), e incluso pueden causar

Cuadro 1

Comparación de medios de extracción de pigmentos fotosintéticos*

pigmento y relaciones	Etanol 96			Acetona 80			Metanol			Acetona 100
	L	W	L	A	I	L	A	L		L
clorof. b	7.23±0.34	7.40±0.35	5.11±0.26	7.81±0.34	5.95±0.30	9.28±0.39	10.13±0.77	6.83±0.39		
clorof. a	21.27±0.98	21.80±1.01	20.94±1.12	21.87±1.17	21.86±1.12	22.40±2.55	22.97±2.64	23.16±1.87		
I carot.	4.97±0.14		5.84±0.24			4.27±0.39		5.13±0.70		
Σ clorof.	28.50±1.32	29.20±1.36	26.05±1.38	29.68±1.51	27.81±1.42	31.68±2.94	33.10±3.41	29.99±2.26		
rel a/b	2.94	2.95	4.10	2.80	3.67	2.41	2.27	3.39		

* Concentraciones expresadas en $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. Los resultados de este cuadro son las medias de 6 repeticiones

L Fórmulas de Lichtenthaler y Welburn (1984)

W Fórmula de Wintermans y De Mots (1965)

A Fórmulas de Arnon (1949)

I Fórmulas de Inskeep (1985)

la descomposición de los pigmentos (Davies, 1976). Estas técnicas se desecharon además, por su falta de resolución y lentitud, y porque en la de capa fina, tras ensayar varias mezclas de eluyentes y lechos se comprobó que algunos pigmentos sufrían degradaciones (Monge, comunicación personal).

R- I I CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La precisión requerida en la cuantificación, así como la identificación del mayor número de pigmentos, nos indujo a elegir la técnica del HPLC, para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos

En la bibliografía se describen algunos procedimientos de cromatografía líquida de alta eficacia (Eskins et al., 1977; Brauman y Grime, 1981; Lichtenthaler, Prenzel y Khun, 1982), para resolver una mezclas de pigmentos fotosintéticos.

Despues de probar los eluyentes que se especifican en el cuadro 1, hubo que desecharlos puesto que el tiempo de desarrollo del cromatograma era excesivamente largo (superior a los 40 minutos), si bien la resolución de las fracciones era buena. Basándonos en lo expuesto anteriormente sobre extractantes, experimentamos gradientes, seleccionando mezclas metanol/agua:etanol, como fase móvil y variando la polaridad de las mismas con objeto de reducir el tiempo de desarrollo del cromatograma.

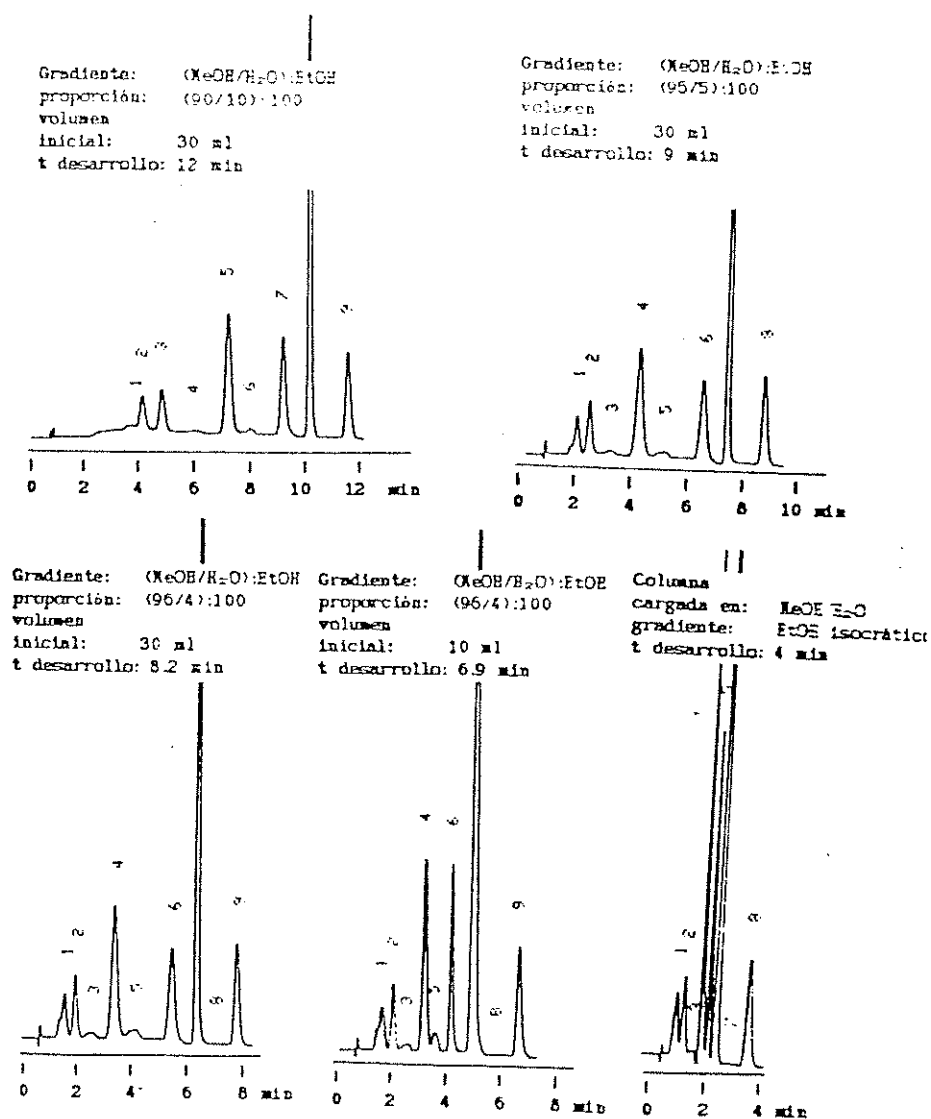


Fig. 1. Estudio del tiempo de desarrollo y resolución de los cromatogramas en función del tipo de gradiente metanol:agua:etanol.

Como puede observarse en la figura 1, el tiempo de desarrollo se acorta desde los 18 minutos, con el primer gradiente, hasta los 4 minutos, donde se utiliza un flujo de 5 ml/min y una fase móvil que consiste en: isocrático de etanol, con la columna homogeneizada en la mezcla metanol:agua (96:4 v/v), siendo estas condiciones las que se utilizarán en el resto del trabajo.

Una vez resuelto el problema de la separación, el siguiente paso consistió en identificar los pigmentos fotosintéticos que aparecen en las plantas superiores, mediante su aislamiento por HPLC y posterior análisis espectrofotométrico.

R- I I I IDENTIFICACION DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

El material vegetal utilizado fue remolacha (*Beta vulgaris* L., var. Monohill). La extracción de los pigmentos se realizó según el método descrito (pag 71). Las fracciones correspondientes a cada uno de los picos individualizados por HPLC fueron recogidas a la salida del detector, diluyéndose con agua (1:1) para incrementar la polaridad de la muestra, y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak C₁₈. Los pigmentos retenidos en el cartucho se eluían con el mínimo volumen de eter dietílico, y este solvente se evaporaba, en oscuridad, en corriente de N₂. Una vez obtenida la fracción seca se disolvió el pigmento cristalizado en el solvente adecuado (cuadro 2) para realizar el espectros de absorción correspondiente (figura 2).

Las diferentes fracciones se identificaron por comparación de sus características espectrales (figuras 2 y 3) con las publicadas en la bibliografía de pigmentos puros (cuadro 2). La ausencia de desplazamientos significativos de los máximos sugiere que los pigmentos están libres de contaminación. Asimismo, se comprobó si los pigmentos aislados y disueltos en etanol presentaban en su estructura química, algún grupo epóxido mediante la adición de una gota de clorhídrico.

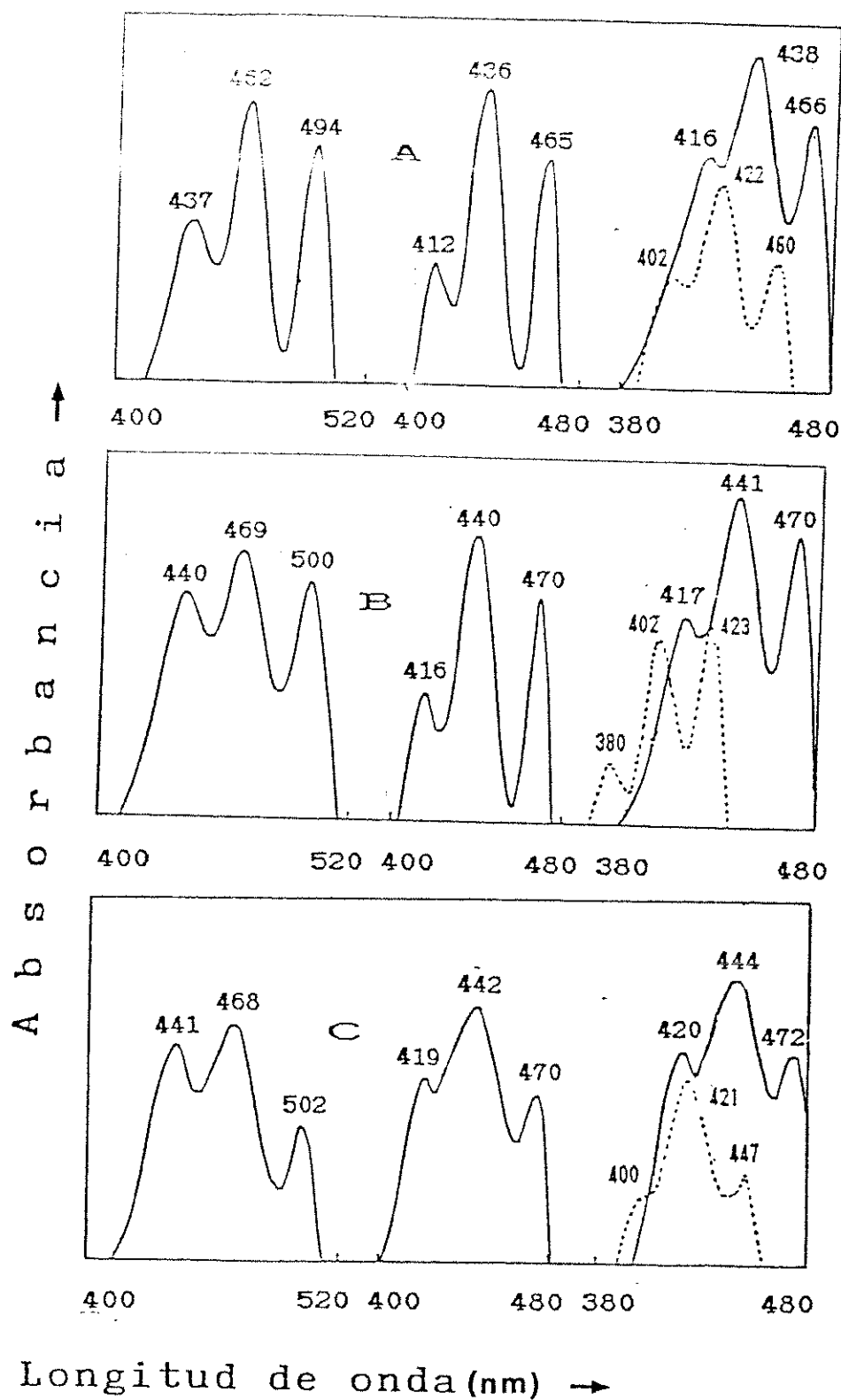


Fig. 2. Espectros en sulfuro de carbono, hexano y etanol de neoxantina (A), violaxantina (B) y taraxantina (C): línea de trazo continuo y con una gota de clorhídrico, trazo discontinuo.

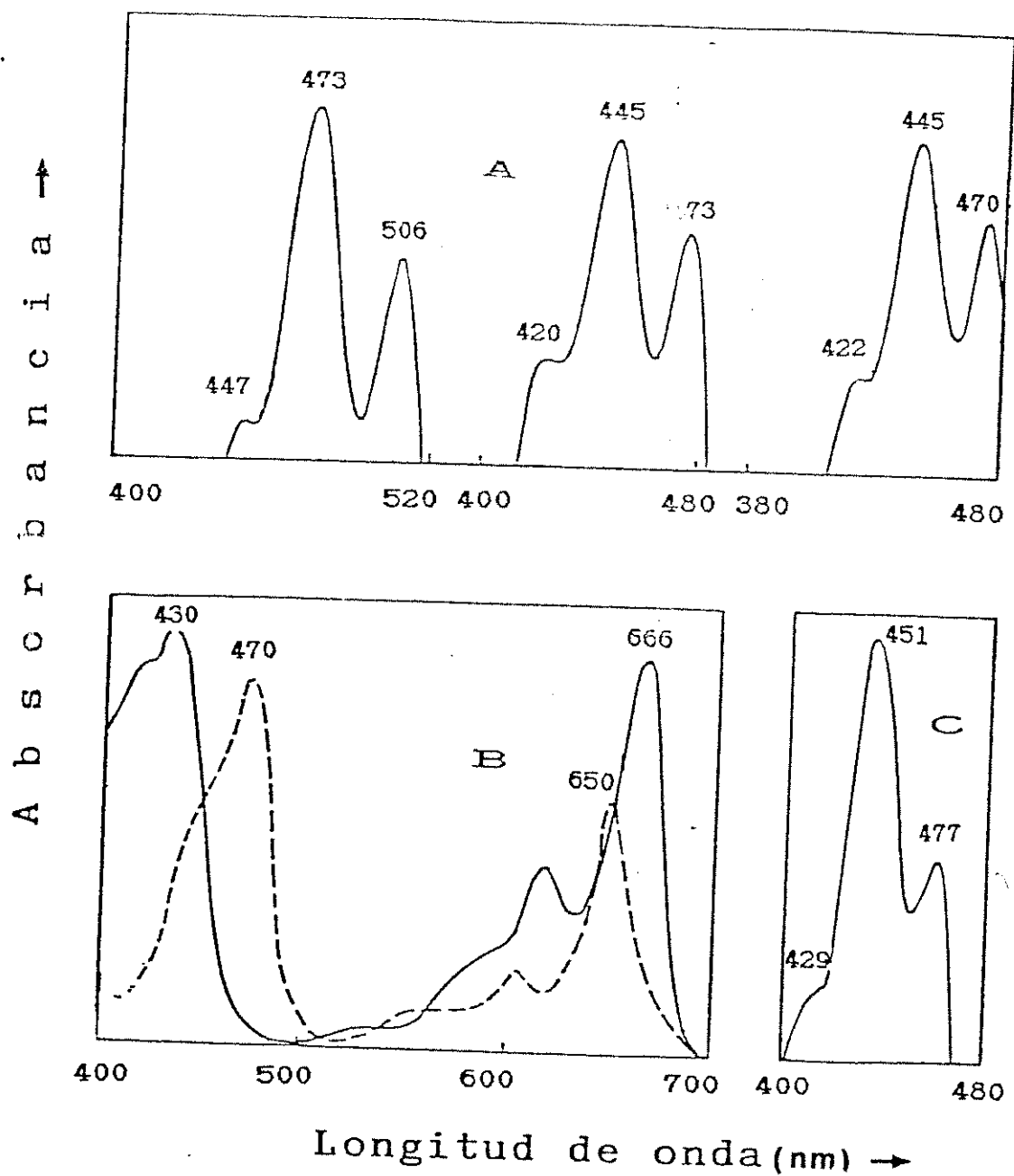


Fig. 3. Espectros en sulfuro de carbono, hexano y etanol de de luteína (A); en etanol de la clorofila a (trazo continuo) y clorofila b (trazo discontinuo) (B), y en etanol del patrón de β -caroteno (C).

Cuadro 2

Máximos espectrales obtenidos y esperados de las ocho fracciones
recogidas a la salida de la columna

Pigmento	Sulfuro de carbono		Hexano		Etanol		HCl/Etanol
	Obtenido	Esperado	Obtenido	Esperado	Obtenido	Esperado	
Neoxantina	437 462 494	- 463 493	412 436 465	415 435 462	416 438 466	415 438 467	402 422 460
Violaxantina	440 469 500	440 470 501	416 440 470	- 443 472	417 441 470	417 440 469	380 402 423
Taraxantina	441 468 502	441 469 501	419 442 470	420 445 470	420 444 472	420 442 471	400 421 447
Luteína	447 473 506	445 475 508	420 445 473	420 445 475	422 445 470	422 445 474	* * *
L1	434 464 503	- - -	420 447 470	- - -	410 440 463	- - -	* * *
Clorofila b	- - -	- - -	- - -	- - -	470 650	470 650	- - -
Clorofila a	- - -	- - -	- - -	- - -	430 666	430 666	- - -
8-caroteno	448 484 518	450 485 520	420 449 476	425 450 477	429 451 477	427 449 475	* * *

*: No se encontró desplazamiento

Los máximos esperados son los recopilados por Davies (1976)

R-IV CUANTIFICACION DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS POR HPLC

La cuantificación se realizó inyectando en el sistema de HPLC, cantidades conocidas de los pigmentos individuales, aislados por el método del Sep-Pak descrito previamente (pag 96). Las concentraciones de pigmentos en las fracciones aisladas se calcularon utilizando los coeficientes de extinción que se muestran en el cuadro 3 (Davies, 1976; Winterman y De Mots, 1965). Los factores de conversión entre área y concentración de pigmentos ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), se determinaron midiendo las áreas de los picos a 440 nm, obteniendo los siguientes valores:

Neoxantina:	$4.26 \cdot 10^{-5}$
Violaxantina:	$3.30 \cdot 10^{-5}$
Taraxantina:	$2.86 \cdot 10^{-5}$
Luteína:	$3.56 \cdot 10^{-5}$
Clorofila b:	$1.65 \cdot 10^{-4}$
Clorofila a:	$1.11 \cdot 10^{-5}$
β -caroteno:	$3.90 \cdot 10^{-5}$

Estos factores se introdujeron en una de las memorias del integrador, de tal forma que los resultados del cromatograma se obtienen directamente en área de pico y en μg de pigmento por unidad de superficie.

Cuadro 3

Coeficientes de extinción utilizados para cuantificar
los pigmentos fotosintéticos

Pico N°	Pigmento	E _{1%} ^{1cm}	λ (nm)	Solvente
1	Neoxantina ^a	2243	439	Etanol
2	Violaxantina	2550	443	Etanol
3	Taraxantina	2800	442	Etanol
4	Luteína	2550	445	Etanol
5	Clorofila b	520	645	Acetona
6	Clorofila a	918	662	Acetona
7	β -caroteno	2620	453	Etanol

- ^a Las unidades de área vienen dadas en cuentas de integrador
^b Los coeficientes de extinción son los citados por Davies (1976) para los carotenoides y Wintermans and De Mots (1965) para clorofilas.

La precisión del sistema, así como el tiempo de retención de cada uno de los pigmentos en la columna, se determinó inyectando nueve alícuotas de un mismo extracto de remolacha. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4

Concentración ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y tiempos de retención (min) para cada pigmento.

Pico N°	Pigmento	Concentración			Tiempos de retención	
		Media $\pm$ SD*	CV	% total pigmento	media $\pm$ SD	CV
1	Neoxantina	1,19 $\pm$ 0,02	1,7	2,2	1,85 $\pm$ 0,09	4,7
2	Violaxantina	1,36 $\pm$ 0,01	0,9	2,5	2,33 $\pm$ 0,10	4,4
3	Taraxantina	0,23 $\pm$ 0,02	10,0	0,4	2,92 $\pm$ 0,09	3,0
4	Luteína	3,12 $\pm$ 0,04	1,3	5,7	3,74 $\pm$ 0,16	4,2
5	Clorofila b	10,55 $\pm$ 0,27	2,6	19,2	5,76 $\pm$ 0,19	3,2
6	Clorofila a	35,45 $\pm$ 0,59	1,7	64,6	6,90 $\pm$ 0,17	2,4
7	β -caroteno	2,75 $\pm$ 0,06	2,2	5,0	8,43 $\pm$ 0,16	1,9

* El número de inyecciones para calcular el SD y el CV fueron 9

Como puede observarse, el coeficiente de variación, referido a la concentración de pigmentos, oscila entre 0.9 y 2.6 (cuadro 4), para los seis pigmentos mayoritarios. Para la taraxantina era mayor (10), debido posiblemente a la poca concentración de esta fracción en el material vegetal estudiado. Por otra parte, respecto a los tiempos de retención, se puede observar que los coeficientes de variación dan valores de alrededor de un 4%.

R—V INFLUENCIA DE LOS SOLVENTES EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS

Una vez resueltos los problemas de puesta a punto del sistema de HPLC, se comprobó si la naturaleza de los solventes ejercía una acción preferencial sobre algún grupo de pigmentos fotosintéticos (xantofilas, clorofilas y carotenos), por su distinta polaridad. Asimismo, se analizó la relación entre cantidad de material vegetal y volumen de extractante.

Como en el primer apartado de este capítulo, se tomaron discos de hoja que se homogeneizaron en mortero con un volumen fijo de extractante ($0.185 \text{ cm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$), en presencia de ascorbato sódico. Se inyectaron 6 extractos distintos de remolacha, de cada solvente, obteniendo los resultados que se muestran en el cuadro 5.

Como puede apreciarse en el citado cuadro, en nuestras condiciones de trabajo, y con el material vegetal empleado, no existen diferencias significativas

entre los distintos extractantes estudiados. Por lo tanto seleccionamos la acetona del 100%, por las razones que se argumentan en el capítulo de discusión (pag. 198).

Cuadro 5

Comparación de la eficacia de extractantes*

	Etanol 96	Acetona 80%	Metanol	Acetona 100%
Pigmento y relaciones				
Neoxantina	1,39±0,14	1,39±0,059	1,23±0,054	1,30±0,043
Violaxantina	1,08±0,18	1,39±0,037	1,48±0,049	1,35±0,058
Luteína	2,50±0,14	2,36±0,069	2,39±0,057	2,34±0,074
clorofila <i>b</i>	8,63±0,66	8,77±0,160	8,84±0,107	8,94±0,234
clorofila <i>a</i>	22,68±1,15	19,44±0,559	21,40±0,332	22,71±0,375
β-caroteno	1,48±0,18	1,36±0,079	1,39±0,112	1,33±0,088

Σ Clorofilas	31,31	30,83	30,23	31,65
Σ Carotenoides	6,45	6,63	6,49	6,32
Σ Relación a/b	2,63	2,51	2,41	2,54

* Concentraciones expresadas en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Los datos presentados son el resultado de 6 repeticiones.

Una vez elegido el extractante, un segundo paso fue estudiar la influencia de la relación volumen de disolvente/área de hoja, sobre el rendimiento de extracción, para lo cual se fijó el volumen de extractante en 10 ml, variando el número de discos a homogeneizar en cada caso (cuadro 6).

Cuadro 6

Influencia de la relación área de hoja/Volumen de disolvente en el rendimiento de extracción*

Relación (cm ² /ml)	Clorof. a	Clorof. b	Carot	Clor total	Rel a/b	Rel Clor/Carot
0,074	31,89±0,21	9,16±0,26	3,04±0,18	41,05	3,48	13,5
0,111	32,04±0,58	9,79±0,36	2,76±0,31	41,83	3,27	12,8
0,148	30,06±0,26	8,84±0,31	2,77±0,33	38,90	3,40	14,0
0,185	30,04±0,63	9,20±0,68	2,81±0,19	39,24	3,27	13,96
0,370	28,28±0,56	9,07±1,09	2,14±0,27	37,35	3,12	17,45
0,740	27,27±0,28	8,53±1,09	1,90±0,21	35,80	3,20	18,84
1,110	20,88±0,94	6,94±0,25	1,37±0,12	27,82	3,01	20,31
1,480	17,31±0,01	5,82±0,02	1,39±0,01	23,13	2,97	16,64

* Concentraciones expresadas en µg.cm⁻². Los datos presentados son el resultado de 6 repeticiones.

Según los valores del cuadro anterior, consideramos que la relación 0.185 cm².ml⁻¹ proporciona el buen rendimiento de clorofilas y carotenoides.

Seleccionada la acetona y determinada la mejor relación área de muestra/volumen de extractante, el último paso fue comprobar la estabilidad de los pigmentos en este extracto a lo largo del tiempo. En el cuadro 7 se muestran los resultados del análisis de 6 extractos de hojas de remolacha (5 discos/10 ml) con acetona del 100 % y una pequeña cantidad de ascorbato sódico. Las muestras se conservaron siempre en la oscuridad en recipientes cerrados conservados a -30°C .

Cuadro 7

Estabilidad del extracto de Remolacha en acetona 100 %
conservado a -30°C^*

pigmento y relaciones	Concentración ($\mu\text{g}, \text{cm}^{-2}$)				
	día 1	día 7	día 14	día 21	día 30
Chl a	$22,71 \pm 0,37$	$22,85 \pm 0,56$	$23,02 \pm 0,37$	$22,64 \pm 0,25$	$23,12 \pm 0,42$
Chl b	$8,94 \pm 0,31$	$8,99 \pm 0,36$	$8,99 \pm 0,21$	$8,89 \pm 0,23$	$8,89 \pm 0,33$
I Chl	$31,65 \pm 0,68$	$31,84 \pm 0,92$	$32,00 \pm 0,68$	$31,53 \pm 0,48$	$32,01 \pm 0,75$
I Xant	$5,00 \pm 0,12$	$4,76 \pm 0,23$	$5,12 \pm 0,17$	$5,00 \pm 0,14$	$4,89 \pm 0,23$
I Carot	$6,32 \pm 0,18$	$6,71 \pm 0,32$	$6,32 \pm 0,21$	$6,32 \pm 0,24$	$6,32 \pm 0,31$
Rel a/b	$2,54 \pm 0,07$	$2,54 \pm 0,09$	$2,56 \pm 0,10$	$2,55 \pm 0,12$	$2,60 \pm 0,08$

* Valores obtenidos de los análisis de 6 muestras homogéneas.

Como se deduce del cuadro anterior, apenas hay variación en las concentraciones de pigmentos entre el día en que se realizó la extracción y las obtenidas transcurrido un mes. Esto hace que la acetona, además de buen extractante, permite almacenar los extractos de las muestras hasta el momento oportuno, ya que conserva, sin degradación los pigmentos.

R-VI PIGMENTOS Y DEFICIENCIA DE HIERRO

En este apartado estudiamos los cambios que la deficiencia de hierro ocasiona en la composición pigmentaria de plantas de remolacha (*Beta vulgaris* L. var. Monohill) cultivada en solución nutritiva bajo condiciones controladas.

Este estudio se realizó en hojas con distinto grado de pigmentación debido a la falta de hierro, comparando el contenido de cada una de las xantofilas, clorofila *b*, y β -caroteno, respecto a la concentración de clorofila *a*. (figuras 4-8).

La figura 4 muestra como varia la concentración de neoxantina en función del grado de deficiencia de hierro, representado por el contenido en clorofila *a*.

La correlación que existe entre ambos pigmentos, es lineal, con un valor de ordenada en el origen prácticamente igual a cero.

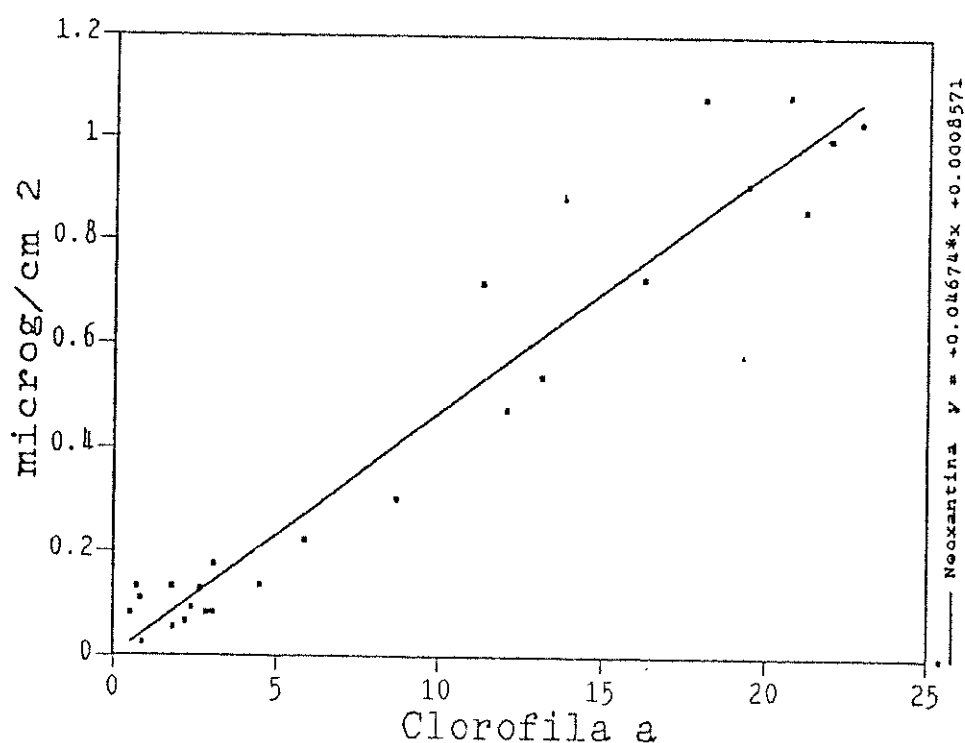


Fig 4. Correlación lineal entre la neoxantina y clorofila a en hojas de remolacha deficientes en hierro

En el caso de la violaxantina (figura 5), se puede observar mayor dispersión de valores que en la gráfica anterior, no obstante sigue existiendo una correlación entre este pigmento y la clorofila a.

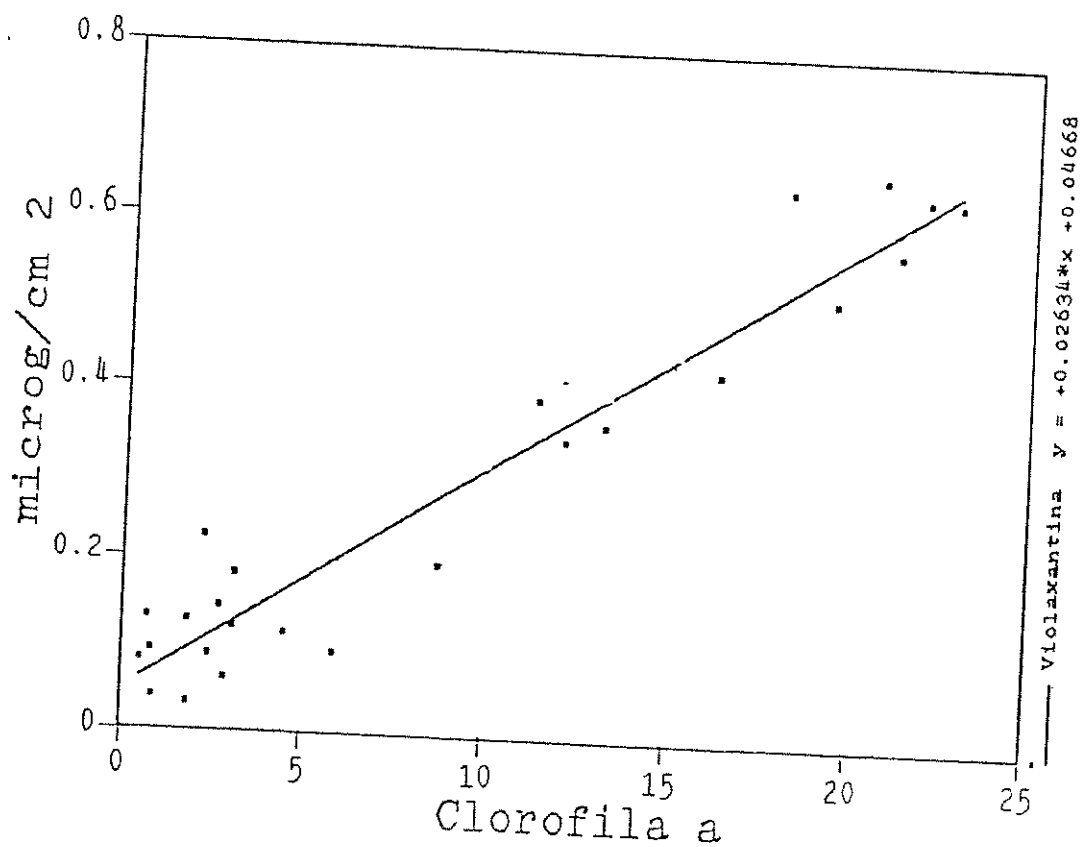


Fig 5. Correlación entre la violaxantina y clorofila a en hojas de remolacha deficientes en hierro.

La luteína (figura 6) constituye una excepción en el grupo de las xantofilas, puesto que la ordenada en el origen de la recta de correlación entre este pigmento y la clorofila a, tiene un valor distinto de cero ($0.58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

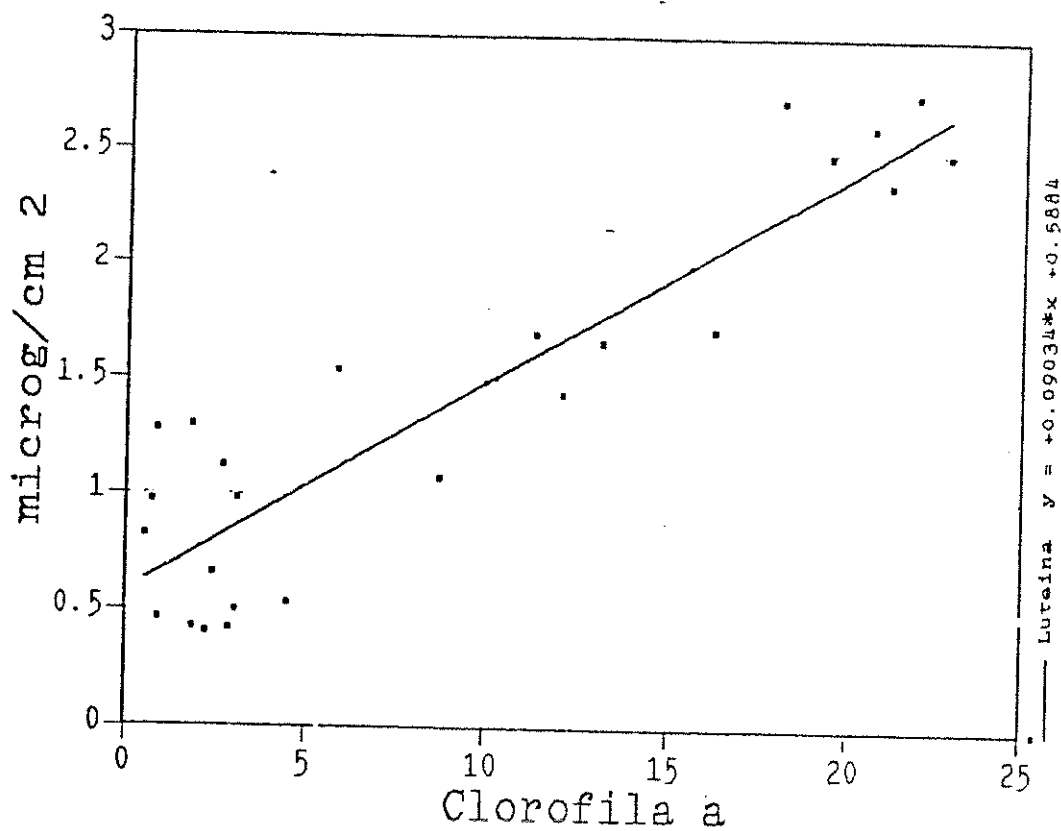


Fig 6. Correlación entre luteína y clorofila a en hojas de remolacha deficientes en hierro

En la figura 7 se representa la estrecha correlación entre β -caroteno y clorofila a, lo cual era de esperar teniendo en cuenta que ambos pigmentos constituyen mayoritariamente los fotosistemas I y II.

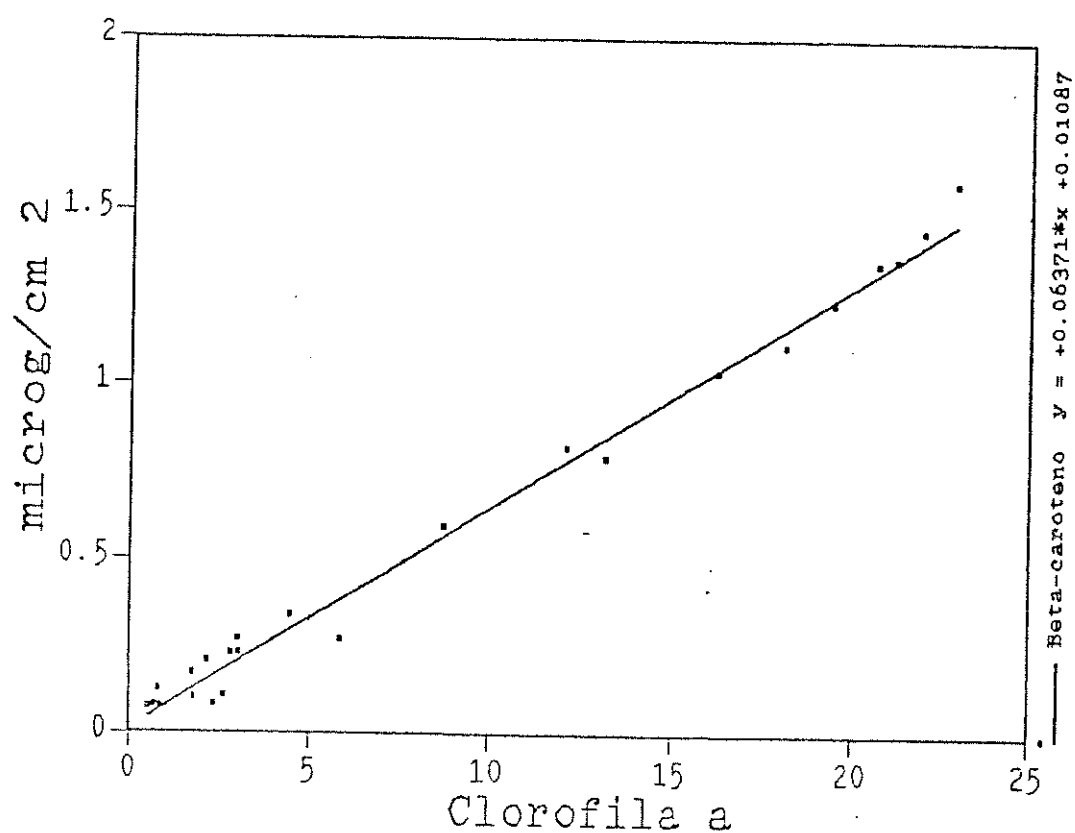


Fig 7. Correlación entre β -caroteno y clorofila a en hojas de remolacha deficiente en hierro.

Teniendo en cuenta la importancia de la relación clorofila a/clorofila b (Diez-Altare, 1959; Heras, 1966; Spiller y Terry, 1980; Nishio y Terry, 1983;

Terry y Abadía, 1986) en los estudios de la deficiencia de hierro, hemos representado, en la figura 8, dicha relación, en función del contenido en clorofila *a*.

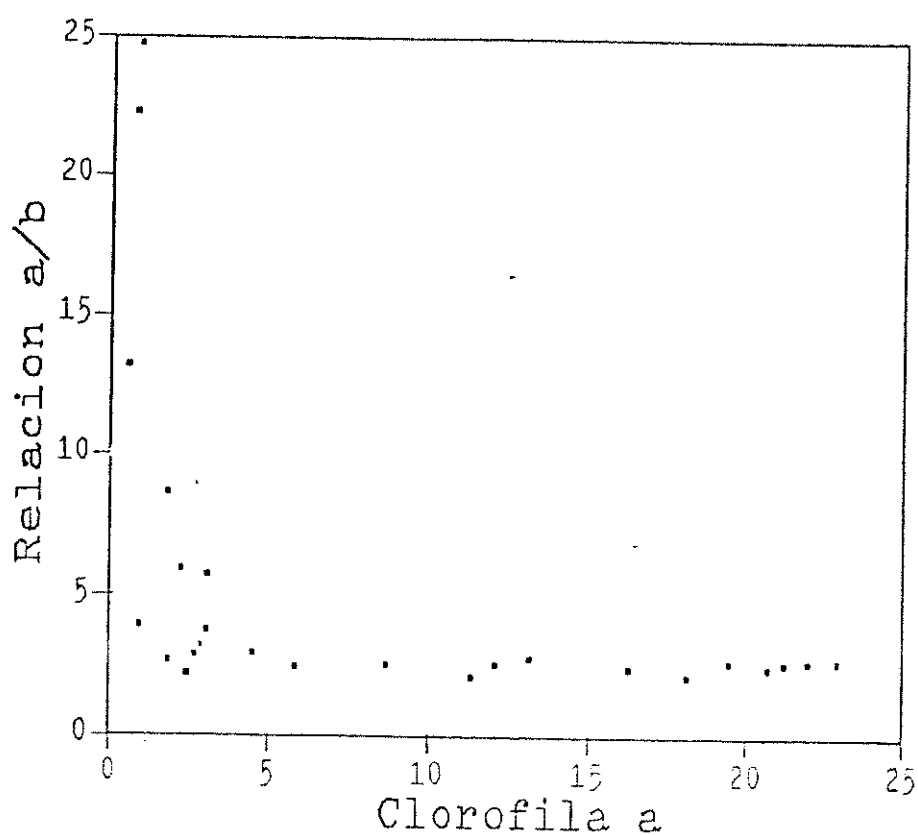


Fig 8. Representación gráfica de la relación clorofila *a*/clorofila *b* en función de la clorofila *a* en hojas de remolacha deficiente en hierro.

En la figura anterior se observa el amplio rango de variación de esta relación en función de la cantidad de clorofila *a*.

R-V I I DESARROLLO CLOROPLASTICO

Basándonos en la relación entre pigmentos fotosintéticos y el grado de deficiencia de hierro en hoja, se abordó el estudio del desarrollo cloroplástico, analizando la evolución que sufren estos pigmentos, así como los complejos pigmento-proteína, mediante la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes en este elemento.

Las membranas tilacoidales de los cloroplastos contienen clorofilas y carotenoides unidos no covalentemente a proteínas intrínsecas en forma de complejos pigmento-proteína, que son partes estructurales del aparato fotosintético, y que se diferencian en complejos captadores de luz (LHCP) y centros de reacción (CP) (Anderson, Waldron y Thorne, 1978).

Para el estudio de estos complejos se pueden utilizar varias técnicas electroforéticas, así como distintos detergentes para la solubilización de membranas tilacoidales. Uno de los procedimientos más usuales es el de Anderson (1982), que solubiliza la membrana lipídica, liberando las agrupaciones moleculares pigmento-proteína, que, en electroforesis, se separan en función de su peso molecular aparente.

Mediante la técnica de Anderson se separan normalmente siete bandas denominadas, por orden de migración hacia el ánodo (Eskins, Dysen y Olson, 1983):

Complejo CP1a. Banda asociada con el fotosistema I, posiblemente, un dímero del CP1, o una asociación del CP1 con un complejo captador de luz.

Complejo CP1. Asociada con el centro de reacción del PSI. Contiene cantidades mínimas de clorofila *b*.

Complejo LHCP₁. Representante de una antena con alto contenido en clorofila *b*.

Complejo LHCP₂. Representante de una antena con alto contenido en clorofila *b*.

Complejo CPa. Asociada con el centro de reacción del fotosistema II. Tiene clorofila *b*, pero la relación entre clorofilas varía entre 2.5 a 7.

Complejo LHCP₃. Representante de una antena con alto contenido en clorofila *b*.

FP. Banda que presenta una cantidad variable de pigmentos dependiendo de las condiciones de trabajo.

Las membranas tilacoidales se obtuvieron según el procedimiento de Nishio y Terry (1983), tal como se detalla en la sección de métodos (pag. 66), pudiéndose conservar en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

El estudio que presentamos sobre la evolución de los complejos pigmento-proteína, se basó principalmente en la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método de Anderson (1982). Con este método conseguimos separar ocho bandas: 4 correspondientes a los complejos de los centros de reacción: CP1, CP1a, CP1a1, y CPa, tres a los complejos captadores de luz: LHCP₃, LHCP₂, LHCP₁, y una perteneciente a pigmentos libres (figura 9).

En este estudio se procuró que la cantidad total de clorofila en las muestras fuera la misma, aunque la cantidad de SDS añadida era, diferente. Así, mientras que en las más cloróticas la relación utilizada (SDS:clorofila) era de 20:1, en el material verde, esta relación no era superior a 8:1.

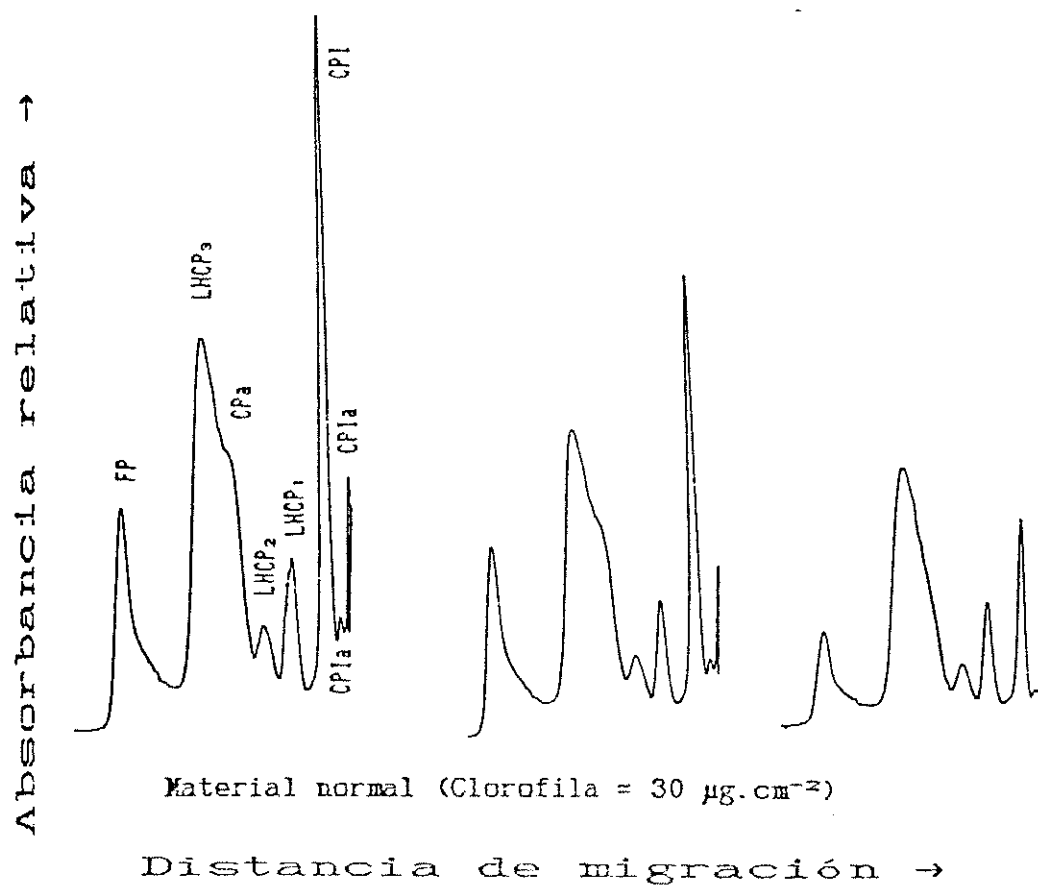


Fig 9. Densitometrias de PACE a tres longitudes de onda (663, 672 y 652 nm, de remolacha normal).

Las densitometrias de la figura anterior están realizadas tomando, como punto inicial de referencia, la línea de unión entre el gel separador y el de introducción de muestras, de forma que no haya distorsión en las distancias de migración, ya que la superposición de cada uno de estos corridos con el de control, indica la posición en la que tendrían que aparecer las complejas proteínopigmento.

Una vez desarrolladas las electroforesis, se procedió a la cuantificación de clorofila contenida en cada banda, mediante densitometría óptica a tres longitudes de onda (cuadro 9):

- a 663 nm que absorben ambas clorofilas
- a 672 nm en el que la contribución de clorofila *a* es mayoritaria
- a 652 nm, longitud de onda del máximo de absorción de la clorofila *b* ligada a proteína.

La lectura a estas longitudes de onda nos permite analizar la estequiometría entre ambas clorofilas y por lo tanto localizar las bandas correspondientes a las estructuras captadoras de luz (LHCP) y de los centros de reacción (CP).

Cuadro 8

Integración media en % de las densitometrías de
electroforesis de remolacha verde

	FP	LHCP ₃	CPa	LHCP ₂	LHCP ₁	CP1	CP1a
663 nm	17	36	12	5	6	16	8
672 nm	14	32	10	7	8	18	10
652 nm	14	43	6	6	8	11	6

Para comprobar lo dicho hasta ahora respecto a la composición de las distintas estructuras en que esta subdividido el aparato fotosintético, y poder realizar posteriores comparaciones con los electroferogramas que se obtengan en el material con distintos grados de recuperación, se realizaron espectros de absorción (figuras 10-11) de cada una de las bandas que aparecen en un corrido electroforético de muestras no deficientes entre 750 y 400 nm. Se ajustó la ganancia del espectrofotómetro de forma que los registros de los espectros tuvieran un tamaño similar.

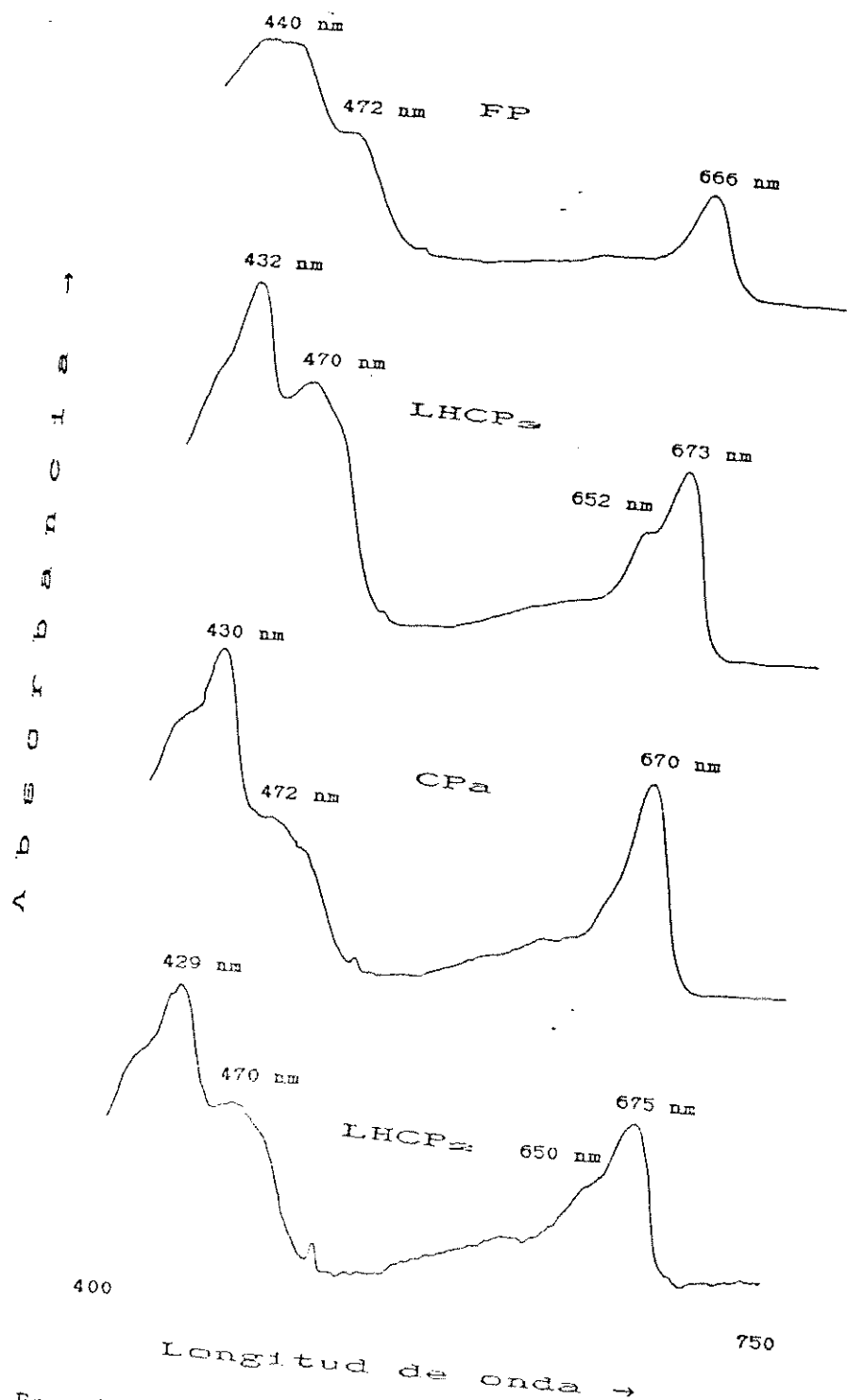


Fig. 10 Espectros de las bandas FP, LHCP₃, CPa, y LHCP₂, separadas por PAGE a partir de tilacoides de remolacha.

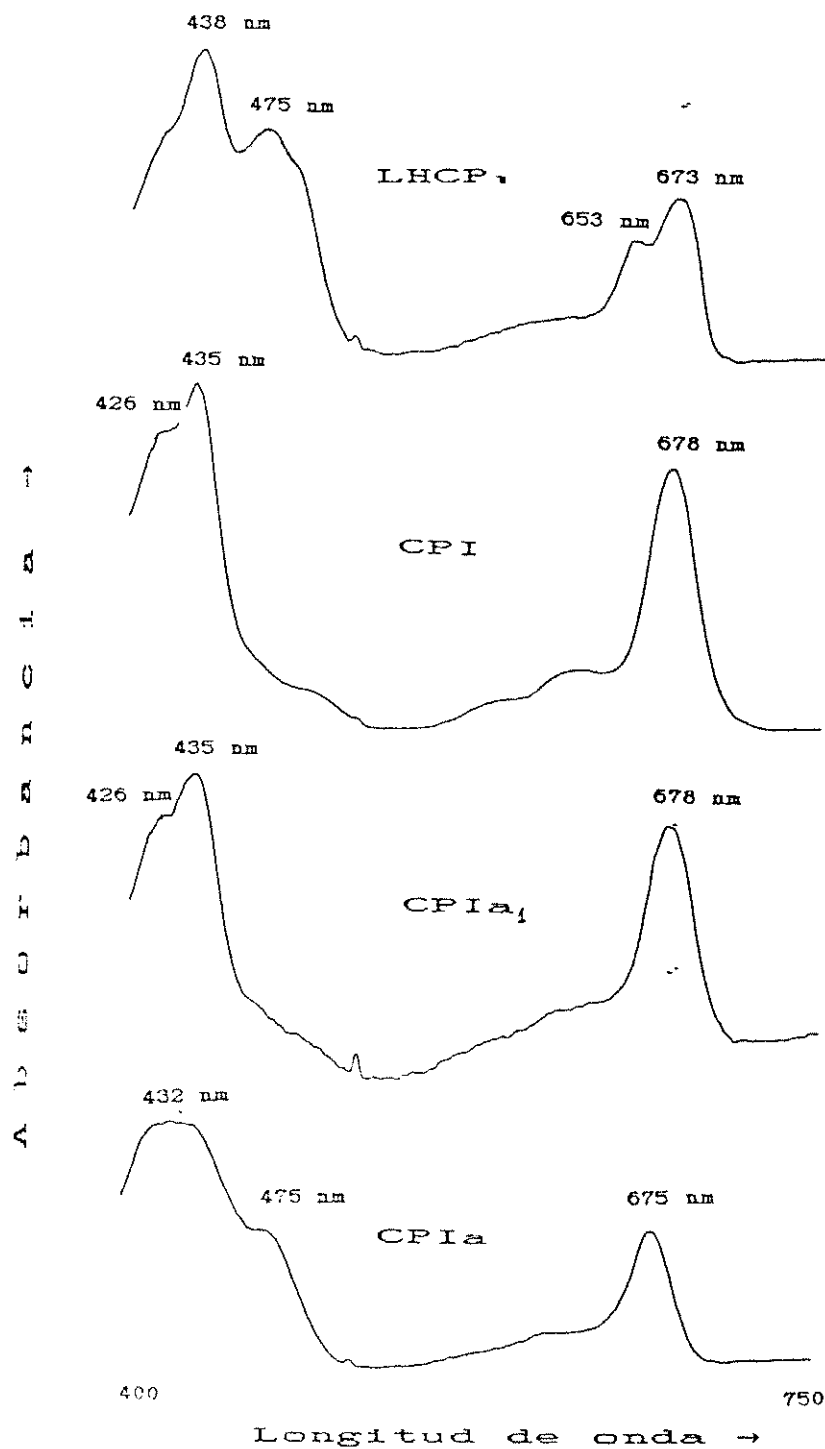


Fig. 11 Espectros de las bandas LHCP₁, CPI, CPIa, y CPIa₁; separadas por PAGE a partir de tilacoides de remolacha.

En estos espectros se observa nítidamente la presencia de clorofila *b* (máximos alrededor de 650 y 470 nm) en los complejos de antena (LHCP), mientras que en los espectros de los centros de reacción apenas se aprecia.

R-VIII. COMPOSICION PIGMENTARIA DE LOS COMPLEJOS PIGMENTO-PROTEINA.

Existen discrepancias acerca de la composición pigmentaria de los complejos pigmento-proteína, pero la mayoría de autores coinciden en señalar que las antenas tienen una relación clorofila *a*/clorofila *b* próxima a la unidad (Thornber, Markwell y Reinman, 1979; Lichtenthaler, Prenzel y Khun, 1982) y son muy ricas en xantofilas, mientras que los fotosistemas están compuestos mayoritariamente por clorofila *a* y β -caroteno.

Los valores presentados en el cuadro 9-A, se obtuvieron recortando bandas, bien definidas de 12 corridos electroforéticos, procedentes de muestras distintas de tilacoides de hojas de remolacha desarrollada en condiciones normales. Una vez agrupadas las fracciones correspondientes a un mismo complejo, se introducían en un homogeneizador adicionando 3 ml del mismo buffer de tricina (pH 8), que se utiliza para la conservación de tilacoides en nitrógeno líquido. Una vez disgregado el gel, se le añadía el mismo volumen de metanol. Este solvente orgánico provoca la deshidratación de la poliacrilamida de forma que al centrifugar a 38000 g, precipita y en el sobrenadante quedan únicamente los pigmentos fotosintéticos. Como la concentración de pigmentos, en esta solución es muy baja, se concentraron pasando la solución a través de

un cartucho Sep-Pak C₁₈, eluyendo posteriormente los pigmentos retenidos con 1 ml de acetona.

Cuadro 9-A

Composición pigmentaria en % de las bandas extraídas por PAGE de tilacoides de remolacha verde

Pigmento	% del total de pigmentos						
	F.P.	LHCP ₃	CP ₂	LHCP ₂	LHCP ₁	CP ₁	CP _{1a}
Neoxantina	0,33	7,6	4,66	3,26	3,33	0,92	1,50
Violaxantina	0,33	2,73	1,23	0,93	0,60	0,56	2,00
Luteína	12,20	16,80	15,59	11,97	14,01	9,73	5,10
clorofila b	7,62	34,22	10,03	34,8	38,83	12,43	36,80
clorofila a	75,20	36,80	65,03	49,09	42,57	71,42	50,60
B-caroteno	4,32	1,85	3,46	0,95	0,66	4,94	4,00
Σ Xantofilas	12,86	27,13	21,48	16,16	17,94	11,21	8,60

Para poder comparar los pigmentos que hay en las bandas, se dió el valor 100 a la clorofila a, de cada una de las fracciones separadas, refiriendo el resto de pigmentos a este valor (cuadro 9-B).



Cuadro 9-B

Relaciones entre pigmentos en las
estructuras fotosintéticas

concentración relativa	Estructura					
	LHCP ₃	CPa	LHCP ₂	LHCP ₁	CP1	CP1a
xantofilas	73,72	33,03	33,60	42,14	15,70	17,00
clorofila <i>b</i>	93,00	15,42	72,50	91,21	17,04	72,73
β -caroteno	5,03	5,32	1,98	1,84	6,92	7,10

Los valores presentados en el cuadro 9-A también se utilizaron para calcular las relaciones entre los pigmentos que consideramos más característicos de los distintos complejos, que nos permiten probar, si las estructuras de antena son más ricas en xantofilas que las correspondientes a los centros de reacción (cuadro 9-C).

Cuadro 9-C

Algunas relaciones pigmentarias en las
estructuras fotosintéticas

relaciones	LHCP ₃	CP ₂	LHCP ₂	LHCP ₁	CP ₁	CP _{1a}
a/b	1,07	6,48	1,38	1,10	5,74	1,37
B/x	0,07	0,16	0,06	0,04	0,44	0,46
Cl b/β	18,50	2,90	36,63	58,83	2,51	9,20

Como puede comprobarse, los LHCP muestran relaciones a/b proximas a la unidad, mientras que en los centros de reacción es mucho más alta. También se aprecian diferencias en las otras dos relaciones calculadas.

R-IX. SELECCION DEL MATERIAL FOLIAR PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO CLOROPLASTICO

Teniendo en cuenta, que la deficiencia de hierro, produce una reducción de las membranas tilacoidales y consecuentemente, una disminución de pigmentos fotosintéticos, hubo que seleccionar un material cuyo grado de pigmentación fuese homogéneo, y con una concentración de pigmentos lo más baja posible, por las razones que se exponen a continuación.

La obtención de este tipo de material presentó numerosas dificultades debido a que el grado de pigmentación en las hojas, varía con la edad de las mismas y con el grado de desarrollo de la planta. Para la obtención de un material homogéneo, se procedió al cultivo de las semillas según el procedimiento descrito en el apartado MI (pag 60), seleccionando las plántulas que presentaran las mismas características fenotípicas. Estas se dejaban desarrollar durante quince días, en una solución completa de Hoagland, cambiándose a un nuevo medio nutritivo sin hierro, en el que permanecían durante otra semana. Este tratamiento, proporciona plantas con siete hojas totalmente desarrolladas y otra incipiente (figura 12). De estas plantas se realizó una nueva selección desechando todas aquellas que no tuvieran dichas características morfológicas y que sus dos hojas centrales tuvieran una concentración de

clorofila de aproximadamente $4 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. Este procedimiento permitió obtener plantas, cuyas dos hojas centrales eran similares en el tamaño y grado de pigmentación (numeradas con el 1 en la figura 12). Cuando se dispuso de plantas con estas características, se procedió a adicionar hierro hasta alcanzar una concentración final de $2.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ en la solución nutritiva.

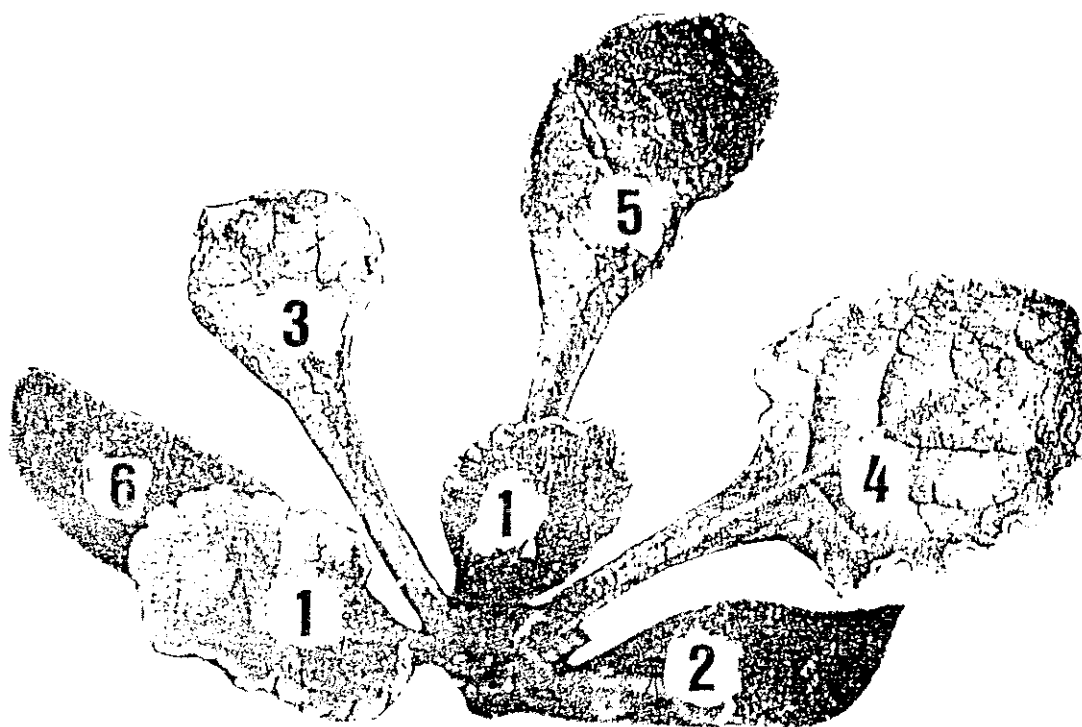


Fig.12. Esquema de una planta de remolacha. La numeración de las hojas corresponde a la citada en el texto. (1+ más joven, 6+ más vieja).

Los tilacoides para el estudio de la evolución de los complejos pigmento-proteína, se obtuvieron utilizando únicamente las dos hojas centrales.

Al seleccionar estas hojas deficientes, se planteó la cuestión de cual sería el material foliar, que se tomaría como referencia. En primer lugar tuvimos que averiguar si las hojas de una planta verde, sin deficiencia, tienen la misma composición pigmentaria, tanto cuali, como cauntitativamente y, ademas, se mantienen las relaciones entre ellas.

Según la numeración mostrada en fotografía de la figura 12, se tomaron muestras de las hojas numeradas del 1 al 6, cuyos datos se expresan en el cuadro 10. En el cual se aprecia que según la edad de la hoja, aunque varía la composición cuantitativa, se mantiene la estequiometría entre los pigmentos.

Asimismo, se realizaron análisis electroforéticos, de tilacoides procedentes de las hojas mencionadas, no encontrándose variaciones significativas en los resultados obtenidos.

Estos datos demuestran que las hojas de una planta no deficiente, se diferencian en la cantidad de pigmentos, aunque no en sus relaciones, por lo tanto, como material de refencia hay que seleccionar hojas con un desarrollo fisiológico lo más similar posible.

Cuadro 10
Composición pigmentaria de hojas verdes de control
según su edad fisiológica

pigmentos y relaciones	Nº de hoja					
	1	2	3	4	5	6
Neoxantina	0.54±0.07	0.91±0.20	1.00±0.13	1.03±0.08	0.86±0.05	0.73±0.13
Violaxantina	0.36±0.05	0.52±0.07	0.64±0.09	0.64±0.07	0.57±0.09	0.43±0.08
Luteína	1.67±0.16	2.48±0.21	2.75±0.34	2.49±0.34	2.35±0.15	1.72±0.15
Clorofila b	4.65±0.46	7.19±0.57	8.04±0.43	8.40±0.13	7.97±0.45	6.60±0.71
Clorofila a	13.15±1.34	19.44±0.94	21.93±1.45	22.67±0.45	21.18±0.37	16.26±0.82
β-caroteno	0.79±0.13	1.23±0.13	1.45±0.35	1.58±0.20	1.37±0.21	1.05±0.01
Rel a/b	2.63±0.03	2.70±0.05	2.72±0.02	2.72±0.02	2.66±0.05	2.46±0.03
Clor/Carot	5.30±0.21	5.18±0.01	5.13±0.12	5.44±0.06	5.65±0.21	5.83±0.13

R-X. INFLUENCIA DEL APORTE DE HIERRO EN LA EVOLUCION DE PIGMENTOS Y ESTRUCTURAS FOTOSINTETICAS.

Los análisis de los pigmentos fotosintéticos, se realizaron tomando 1 disco de 0.2 cm² de cada una de las dos hojas centrales de 10 plantas de remolacha con las mismas características que hemos mencionado; y 10 discos de plantas verdes control. Se tomaron discos de este tamaño para evitar en lo posible, el daño que se produce en la hoja en la toma de muestras, pero manteniendo la relación superficie de hoja/volumen de extractante.

La toma de muestras de material, al que se le había aportado hierro a la solución nutritiva, se realizó a la misma hora, a intervalos de 1 día, para que no hubiese variación en las estructuras fotosintéticas, debido a la cantidad de luz recibida por unidad de superficie. La obtención de membranas tilacoidales se realizó siguiendo la misma metodología que hemos mencionado anteriormente, pero recogiendo únicamente las dos hojas centrales.

La concentración media, así como la desviación típica, de la composición pigmentaria de la hojas control y del material inicial, quedan recogidas en el cuadro 11-A

Cuadro 11-A

Comparación entre la composición pigmentaria de hojas de remolacha testigo y deficientes en hierro

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	0,536 $\pm$ 0,072	0,363 $\pm$ 0,053	1,666 $\pm$ 0,161	4,645 $\pm$ 0,457	13,150 $\pm$ 1,337	0,789 $\pm$ 0,131
Deficiente	0,118 $\pm$ 0,081	0,062 $\pm$ 0,070	0,983 $\pm$ 0,399	0,895 $\pm$ 0,663	3,258 $\pm$ 1,968	0,253 $\pm$ 0,138

Para facilitar el estudio de estos datos, y poder apreciar el momento en que una planta en fase de recuperación alcanza la estequiometría de una planta normal, se le dió a la concentración de clorofila a el valor 100, y las concentraciones del resto de pigmentos se expresaron en base a este valor (cuadro 11-B).

Cuadro 11-B

Expresión de las concentraciones en relación a la clorofila a, dando a

ésta el valor 100 ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2} \times 100/\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ Cl a)

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	4,074 $\pm$ 0,235	2,764 $\pm$ 0,100	12,67 $\pm$ 0,834	35,33 $\pm$ 0,493	100	6,001 $\pm$ 0,218
Deficiente	3,620 $\pm$ 0,403	1,900 $\pm$ 0,254	30,17 $\pm$ 14,03	27,470 $\pm$ 6,041	100	7,770 $\pm$ 1,659

Los datos del cuadro anterior revelan que el material deficiente es mucho más rico, en valores relativos, en β -caroteno, y más pobre en clorofila *b* lo que podría indicar que en material deficiente, las estructuras predominantes deberían ser los centros de reacción. El dato de luteína confirma los resultados anteriormente citados sobre pigmentos y deficiencia de hierro (fig. 6).

Con los datos del cuadro 11-A se han elaborado las relaciones mostradas en el cuadro 11-C, por considerarlas representativas para el estudio de la fisiología de la hoja. La relación *a/b* indica el estado fisiológico del aparato fotosintético, y la de clorofila/carotenoides, lo consideramos un buen indicador del estado de desarrollo cloroplástico y por lo tanto, de la recuperación de la planta:

Cuadro 11-C

Relaciones más importantes entre pigmentos
fotosintéticos, en plantas normales
y deficientes en hierro

	I Clorofila	I Xantofilas	Rel a/b	Rel clor/Carot
Control	17,79 $\pm$ 1,78	2,56 $\pm$ 0,28	2,83 $\pm$ 0,03	5,31 $\pm$ 0,21
Deficiente	4,15 $\pm$ 2,53	1,16 $\pm$ 0,42	3,64 $\pm$ 1,45	2,93 $\pm$ 1,00

Estos datos demuestran que, en el material control hay aproximadamente cinco veces más clorofila y el doble de xantofilas que en el deficiente. La relación entre clorofilas, parece reflejar una mayor proporción de centros de reacción respecto a las antenas, en material deficiente. La confirmación de esta hipótesis tiene que reflejarse en los complejos pigmento-proteína, que se obtienen con la electroforesis de tilacoides procedentes de estas hojas.

En la figura 13, se muestran las densitometrías a 672 nm (Clorofila *a*); 652 nm (clorofila *b*); y 663 nm (clorofilas *a* + *b*), de los electroferogramas procedentes de muestras deficientes en hierro.

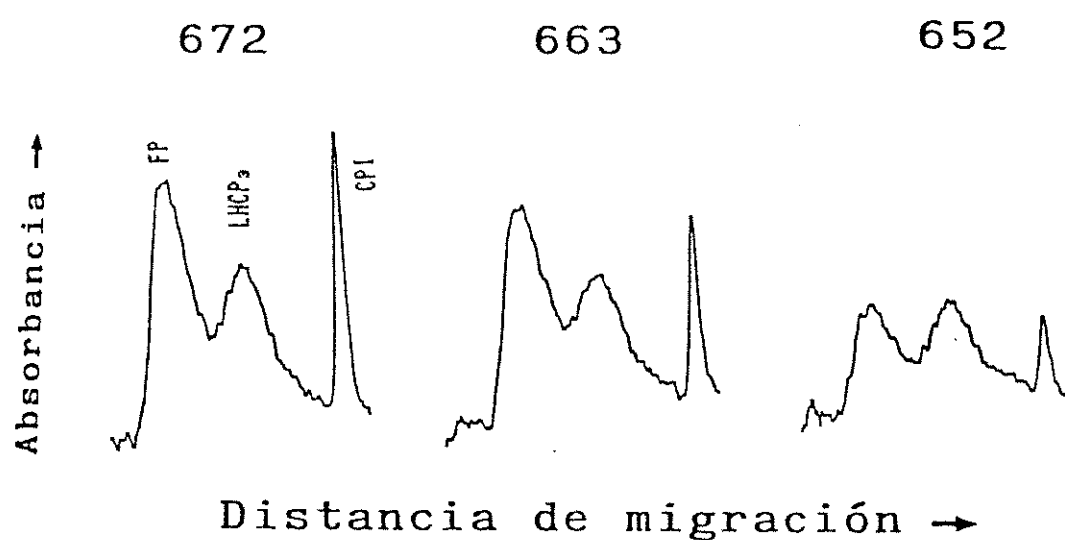


Fig 13. Densitometría óptica del corrido electroforético de remolacha deficiente en hierro (clorofila $\approx 4 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$).

Como se puede observar, las densitometrias efectuadas a esas tres longitudes de onda reflejan unicamente tres picos diferenciados. El pico más agudo, que hemos denominado CPI en la densitometría a 672 nm, debe corresponder a la estructura de un complejo rico en clorofila *a* y por lo tanto es posible identificarlo con uno de los centros de reacción. La posición de este pico corresponde a un complejo CPI, según la nomenclatura de Anderson, Nishida y Thorne (1973),

aunque, en el material verde hay un desdoblamiento del mismo (figura 9).

El siguiente pico, denominado LHCP₃, corresponde a una estructura de antena, como lo demuestra su posición respecto al corrido de una muestra normal, aunque en este último se observa un hombro que corresponde al CPa (fotosistema II). Su condición de antena se pone de manifiesto al compararla con las densitometrias a otras dos longitudes de onda (663, 652 nm), en las cuales no se observa una disminución del área del pico tan drástica como en el caso del CP1.

El siguiente pico, denominado FP, en el corrido electroforético, migra con el frente, y se supone que son los pigmentos liberados de las correspondientes estructuras., por el tratamiento con detergente.

Para comprobar si los picos observados a distintas longitudes de onda, cuya nomenclatura se había asignado por comparación con el desarrollo que aparecía en una muestra normal, correspondían a las estructuras asignadas, se procedió a realizar los espectros de absorción de cada una de las bandas, entre 750 y 400 nm.

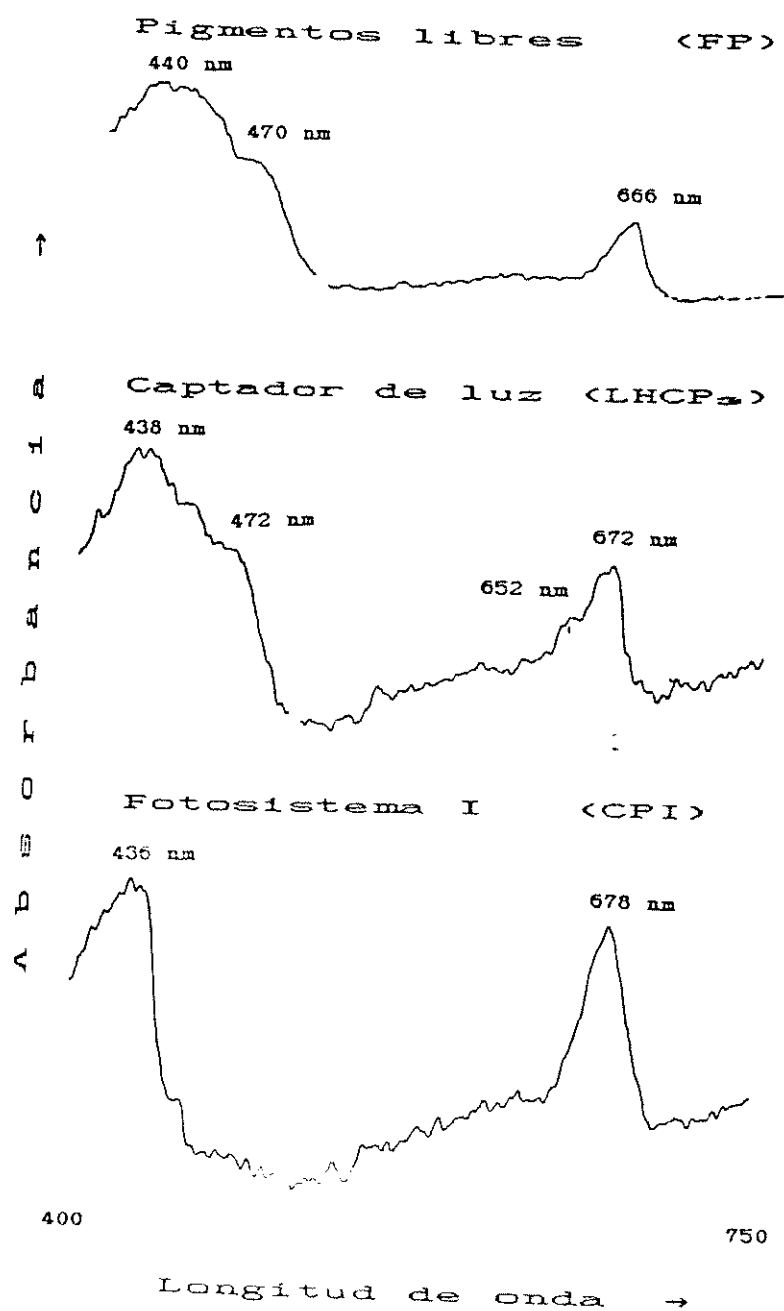


Fig 13. Espectros de absorción molecular de las tres bandas separadas por PAGE en remolacha deficiente en hierro.

El espectro correspondiente a pigmentos libres (FP), en material deficiente, es prácticamente igual al obtenido de la misma banda en material normal, observándose un pico a 666 nm que corresponde al máximo de la clorofila *a* no ligada a ninguna estructura protéica. Aunque existe clorofila *b*, como lo demuestra el hombro característico a 472 nm, ésta no se detecta en la región del rojo, ya que su presencia es minoritaria. La meseta observada en la región de los 440 nm, indica la presencia de otros pigmentos fotosintéticos (xantofilas y carotenos) (figura 13).

El estudio del espectro del LHCP₂ demuestra que esta banda corresponde a una estructura rica en clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides. La presencia de clorofila *b* en cantidades apreciables queda reflejada en el hombro que aparece a 652 nm y en el pico a 470 nm. El pico correspondiente a 673 nm corresponde a clorofila *a* ligada a una proteína. La falta de una total nitidez en el espectro se debe a que hubo que forzar la ganancia del espectrofotómetro, con el consiguiente aumento del ruido de fondo.

El espectro del centro de reacción del fotosistema I (CP1) del material deficiente es idéntico al correspondiente al CP1 del material normal, apreciándose los picos a 678 y 435 nm. El pico correspondiente a 678 nm se debe a la clorofila *a* unida a estructuras oligoméricas. El complejo CP1a, aunque

está definido como oligómero del CP1, según el espectro obtenido por nosotros, más bien correspondería a una estructura de antena, como parece indicarlo el hombro que aparece a 475 nm.

Los valores obtenidos en la integración de los picos que aparecen en las densitometrías de geles de muestras control, y de material inicial (al que aun no se ha aportado hierro), proporcionó los resultados que aparecen en el cuadro 12.

Cuadro 12

Integraciones de las densitometrías de material de control y sin aporte de hierro

	FP	LHCP ₃	CP ₂	LHCP ₂	LHCP ₁	CP1	CP1a
663 nm							
Control	17	36	12	5	6	16	8
Deficiente	50	39	---	---	---	11	---
672 nm							
Control	14	32	10	7	8	18	10
Deficiente	46	37	---	---	---	17	---
652 nm							
Control	14	43	6	6	8	11	6
Deficiente	24	51	---	---	---	25	---

La estructura mayoritaria en el material deficiente es el LHCP₂ con un 39% de la clorofila total y si no tenemos en cuenta la banda de pigmentos libres, este valor asciende al 78%. Estos datos corroboran los del cuadro 9, ya que los análisis de pigmentos de cada una de las bandas de material verde, resueltas por electroforesis, muestran que el LHCP₂ es la antena que tiene mayor contenido en β -caroteno y además es muy rica en xantofilas, principalmente en luteína. La alta relación entre clorofilas (3.64), parece indicar una mayor proporción de centros de reacción, en material deficiente, que en verde (cuadro 11-C).

La segunda toma de muestras a las 24 horas del aporte de hierro proporciona los resultados que se recogen en el cuadro 13-A sobre composición pigmentaria. Los datos del material de control se mantuvieron constantes durante la experiencia.

Cuadro 13-A

Comparación entre la composición pigmentaria de hojas de remolacha testigo y a las 24 horas de recuperación

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	0.636 ± 0.072	0.363 ± 0.051	1.555 ± 0.161	4.845 ± 0.457	12.152 ± 1.237	0.769 ± 0.101
Recuperado	0.145 ± 0.062	0.180 ± 0.063	0.322 ± 0.293	0.351 ± 0.563	4.005 ± 1.585	0.319 ± 0.125

En el cuadro anterior se puede observar que la totalidad de pigmentos presentan concentraciones muy bajas, respecto a los valores del control, aunque son mayores que los dados para muestras sin aporte de hierro.

Al igual que se procedió anteriormente (cuadro 11-A), se elaboró el cuadro 13-B, en el que se observa cómo los valores relativos de β -caroteno, luteína y violaxantina, están por encima del control, mientras que el resto de pigmentos muestran una concentración inferior, lo que demuestra que la estructura pigmentaria de estas plantas aun continúa completamente desorganizada.

Cuadro 13-B

Expresión de las concentraciones en relación a la clorofila *a*, dando a ésta el valor 100 ($\mu\text{g}, \text{cm}^{-2} \times 100 / \mu\text{g}, \text{cm}^{-2}$ Cl *a*)

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	β -caroteno
Control	4,074 $\pm$ 0,235	2,764 $\pm$ 0,100	12,67 $\pm$ 0,834	35,33 $\pm$ 0,493	100	6,001 $\pm$ 0,218
Recuperado	2,870 $\pm$ 0,872	4,500 $\pm$ 1,268	20,80 $\pm$ 5,826	23,775 $\pm$ 3,475	100	7,950 $\pm$ 0,490

Si comparamos estos datos con los del cuadro 11-B, observamos que los pigmentos más afectados son las xantofilas, ya que mientras la luteína y neoxantina disminuyen en un 40% y un 20% respectivamente y la violaxantina se incrementa en un 350%. Estas oscilaciones llevan a pensar en grandes cambios, pero hay que tener en cuenta que son valores relativos, ya

que en absolutos, las xantofilas, únicamente disminuyen en un 30% (cuadro 13-C), debido a que la luteína, que es la xantofila mayoritaria, disminuye en un 15%. Esto parece indicar que la síntesis de estructuras de antena no está afectada durante estas 24 horas, y que a su vez explica que el valor de la clorofila *b*, disminuye de 24.80 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ (cuadro 11-B) a 23.35 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. Según estos datos, durante este día de desarrollo cloroplástico, hay síntesis de centros de reacción, al aumentar en igual proporción clorofila *a* y β -caroteno.

El cuadro 13-C muestra el aumento de la relación *a/b* a las 24 horas del aporte de hierro, como se describe en la bibliografía (Spiller y Terry, 1980), así como el de la evolución de la relación clorofila/carotenoides, aproximándose a los valores de control.

Cuadro 13-C

Relaciones más importantes entre pigmentos fotosintéticos, en plantas normales y recuperadas

	I Clorofila	I Xantofilas	Rel <i>a/b</i>	Rel clor/Carot
Control	17,79 $\pm$ 1,78	2,56 $\pm$ 0,28	2,83 $\pm$ 0,03	5,31 $\pm$ 0,21
Recuperado	4,956 $\pm$ 2,13	1,13 $\pm$ 0,39	4,21 $\pm$ 0,63	3,43 $\pm$ 0,485

El aumento de la relación entre clorofilas se debe a que no se sintetizan en la misma proporción (clorofila $a \approx 20\%$ y clorofila $b \approx 6\%$). Si bien las xantofilas apenas registran cambios de concentración; el incremento que sufre el β -caroteno, respecto al día anterior, es $\approx 25\%$, similar al de la clorofila a .

Según la densitometría de geles, debería observarse una mayor proporción de los complejos pigmento-proteína representativos de los centros de reacción (figura 14).

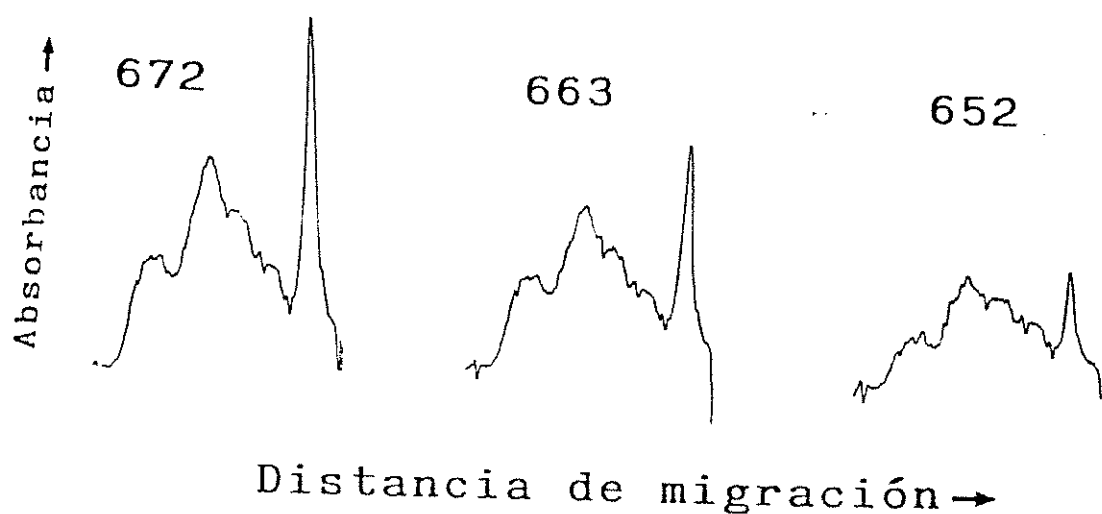


Fig 14. Densitogramas de electroforesis de remolacha deficiente en hierro a las 24 horas de recuperación por aporte de este elemento.

Cuadro 14

Integraciones de las densitometrías de material de control y a las 24 horas de recuperación

	FP	LHCP ₃	CPa	LHCP ₂	LHCP ₁	CP1	CP1a

663 nm							
Control	17	36	12	5	6	16	8
Recuperado	15	64	---	-----	---	21	---

672 nm							
Control	14	32	10	7	8	18	10
Recuperado	8	64	---	-----	-----	28	---

652 nm							
Control	14	43	6	6	8	11	6
Recuperado	16	65	---	-----	-----	19	---

En el cuadro anterior se observa que no existe, todavía, ninguna organización definida de CPa, ni de LHCP₁ y LHCP₂, sin embargo, queda más nítida la banda del fotosistema I (CP1).

Los valores de concentración de los pigmentos fotosintéticos a las 48 horas de la adición de hierro muestran, respecto al material de partida, un incremento en la clorofila total superior al 100%, y en carotenoides de $\approx 20\%$. El incremento de clorofilas se debe a que la clorofila *a* aumenta en un 80% y en un 60% la *b*, respecto del día 0; pero si se hace la comparación respecto a las 24 horas de adición de hierro, se puede observar que ambas clorofilas se sintetizan en la misma proporción $\approx 50\%$. Todo esto explica que la relación a/b , siga siendo similar a la obtenida a las 24 horas de la adición y mayor que la que tienen las hojas cloróticas.

En el cuadro 15-A se recoge la composición pigmentaria correspondiente a hojas de plantas testigo (verde) y plantas deficientes transcurridas 48 horas del aporte de hierro.

Cuadro 15-A

Comparación entre la composición pigmentaria de hojas de remolacha testigo y a las 48 de recuperación

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	β -caroteno
Control	0,536 $\pm$ 0,072	0,363 $\pm$ 0,053	1,666 $\pm$ 0,161	4,645 $\pm$ 0,457	13,150 $\pm$ 1,337	0,789 $\pm$ 0,131
Recuperada	0,167 $\pm$ 0,058	0,236 $\pm$ 0,123	0,815 $\pm$ 0,313	1,418 $\pm$ 0,555	5,890 $\pm$ 1,981	0,482 $\pm$ 0,149

A las 48 horas del aporte de hierro, la concentración de pigmentos, prácticamente, alcanza la mitad de la concentración del control. La luteína, tiene el mismo nivel que una planta sin recuperar, mientras que la violaxantina es nuevamente, la xantofila que más aumenta.

Dando el valor 100 a la clorofila *a*, el resto de pigmentos adquieren los valores que se indican en el cuadro 15-B.

Cuadro 15-B

Expresión de las concentraciones en relación a la clorofila *a*, dando a ésta el valor 100 ($\mu\text{g}, \text{cm}^{-2} \times 100 / \mu\text{g}, \text{cm}^{-2}$ Cl *a*)

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	β -caroteno
Control	4,074 $\pm$ 0,235	2,764 $\pm$ 0,100	12,57 $\pm$ 0,834	35,33 $\pm$ 0,493	100	6,001 $\pm$ 0,218
Recuperada	2,834 $\pm$ 0,461	4,987 $\pm$ 1,907	10,834 $\pm$ 0,607	24,91 $\pm$ 0,565	100	9,190 $\pm$ 0,585

Es interesante destacar que nuevamente la violaxantina y la luteína son los pigmentos que estequiométricamente sufren mayores cambios. Sin embargo, al comparar estos datos con los del día anterior (cuadro 13-B), se observa que tanto las clorofilas *a* y *b*, como el β -caroteno, aumentan en la misma proporción.

Cuadro 15-C

Relaciones más importantes entre pigmentos fotosintéticos, en plantas normales y recuperadas

	% Clorofila	% Xantofilas	Rel a/b	Rel clor/Carot
Control	17,79 $\pm$ 1,78	2,56 $\pm$ 0,28	2,83 $\pm$ 0,03	5,31 $\pm$ 0,21
Recuperada	7,31 $\pm$ 2,52	1,27 $\pm$ 0,38	4,16 $\pm$ 0,48	4,32 $\pm$ 0,98

La relación clorofila *a*/clorofila *b* todavía presenta valores altos, comparados con el control, mientras que la clorofila/carotenoides va incrementando paulatinamente (cuadro 15-C).

La densitometría de los geles obtenidos a las 48 horas de recuperación (cuadro 15), tiene una forma muy similar al blanco de control que se ve a las 24 horas

A las 72 horas de adición de hierro al material deficiente, las clorofilas se han sintetizado en mayor proporción que los carotenoides, 280% y 170%, respectivamente.

Cuadro 17-A

Comparación entre la composición pigmentaria de hojas de remolacha testigo y a las 72 horas de recuperación

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	0,536 $\pm$ 0,072	0,363 $\pm$ 0,053	1,666 $\pm$ 0,161	4,645 $\pm$ 0,457	13,150 $\pm$ 1,337	0,789 $\pm$ 0,131
Recuperada	0,268 $\pm$ 0,075	0,322 $\pm$ 0,073	1,096 $\pm$ 0,439	2,583 $\pm$ 0,792	9,114 $\pm$ 2,632	0,707 $\pm$ 0,196

Como puede observarse, las concentraciones de pigmentos en material recuperado están próximas a los valores del control, lo que induce a pensar en una organización estructural de pigmentos similar al de las plantas control.

La comparación de estos valores con los del día anterior (cuadro 15-A), muestra que la clorofila *a* y el β -caroteno se sintetizan en la misma proporción, aproximadamente un 50%, mientras que la clorofila *b* lo hace en un 85%, lo que podría significar un aumento relativo de la síntesis de complejos de antena.

Siguiendo el mismo procedimiento que en los cuadros precedentes (11-B, 13-B y 15-B) hemos confeccionado el siguiente cuadro.

Cuadro 17-B

Expresión de las concentraciones en relación a la clorofila *a*, dando a

ésta el valor 100 ($\mu\text{g. cm}^{-2} \times 100 / \mu\text{g. cm}^{-2} \text{ Cl } a$)

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	β -caroteno
Control	4,074 $\pm$ 0,235	2,764 $\pm$ 0,100	12,67 $\pm$ 0,834	35,33 $\pm$ 0,493	100	6,001 $\pm$ 0,218
Recuperada	2,947 $\pm$ 0,314	3,530 $\pm$ 0,946	12,02 $\pm$ 1,788	28,34 $\pm$ 1,974	100	7,760 $\pm$ 0,348

El cuadro anterior muestra cómo se van alcanzando la estequiometría entre pigmentos a las 72 horas de la adición de hierro. En el cuadro 15-B (48 del aporte), los valores relativos de β -caroteno, luteína y violaxantina, eran superiores a los de control, mientras que la neoxantina y clorofila *b* eran más bajas. A las 72 horas, la luteína ha alcanzado una proporción normal y la clorofila *b* sigue aproximándose al valor de una planta verde.

Cuadro 17-C

Relaciones más importantes entre pigmentos fotosintéticos, en plantas normales y recuperadas

	I Clorofila	I Xantofilas	Rel a/b	Rel clor/Carot
Control	17,79±1,78	2,56±0,28	2,83±0,03	5,31±0,21
Recuperada	11,70±3,41	1,69±0,64	3,53±0,26	4,90±0,08

La relación clorofila/carotenoides es prácticamente normal, sin embargo la clorofila *a*/clorofila *b*, todavía presenta un valor alto, debido a que la clorofila *b* no ha llegado a alcanzar la proporción estequiométrica suficiente (Cuadro 17-B), lo que indica que aun deben sintetizarse, en mayor proporción, los complejos de antena, ricos en clorofila *b*.

La densitometría de los geles correspondientes a este tiempo de recuperación (figura 16), corrobora el hecho de la síntesis preferencial de complejos antena, ya que pueden distinguirse las bandas LHCP₁ y LHCP₂, que como se ha demostrado anteriormente por sus espectros de absorción (figuras 10 y 11) corresponden a estructuras captadoras de luz. El incremento de la clorofila *a* y del carotenoides, se podría explicar por la

aparición definida de la banda correspondiente al CPa. Es de destacar que la estructura del aparato fotosintético, en plantas con esta fase de recuperación (72 horas), es ya muy similar a la del control (cuadro 18), por lo que podría pensarse que se ha alcanzado, o está a punto de conseguirse, el estado funcional normal de los tilacoides.

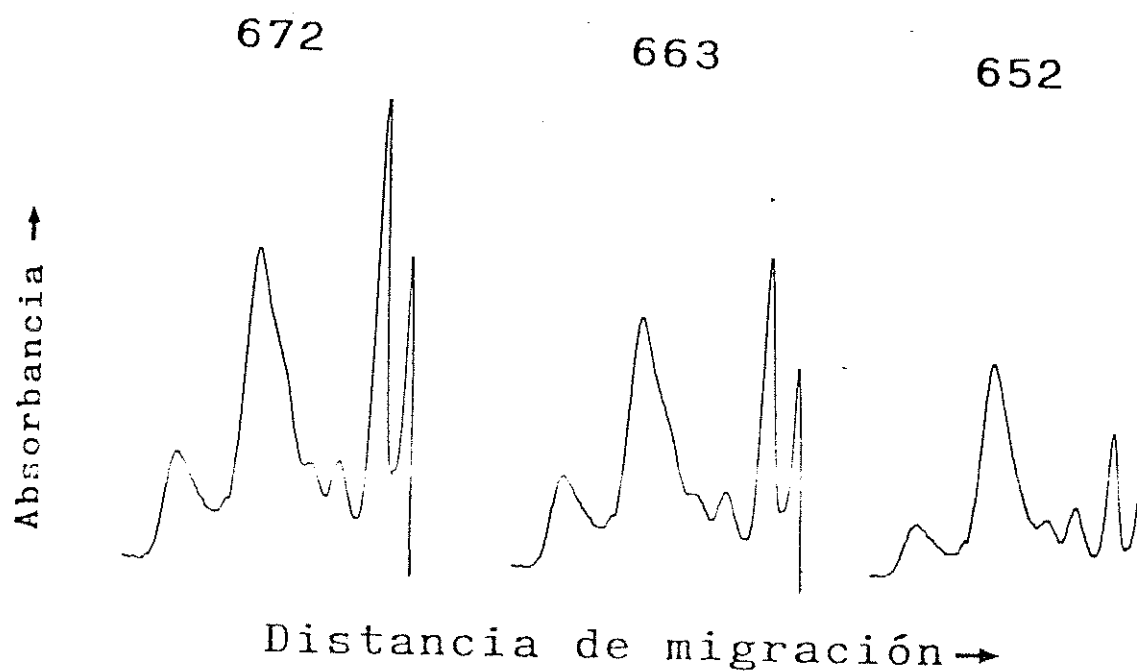


Fig 16. Densitogramas de electroforesis de remblacha deficiente en hierro a las 72 horas de recuperación por aporte de este elemento.

Cuadro 18

Integraciones de las densitometrías de material de control y a las 72 horas de recuperación

	FP	LHCP ₃	CP ₂	LHCP ₂	LHCP ₁	CP ₁	CP _{1a}
663 nm							
Control	17	36	12	5	6	16	8
Recuperada	14	35	11	6	7	18	9
672 nm							
Control	14	32	10	7	8	18	10
Recuperada	12	31	15	5	6	21	10
652 nm							
Control	14	43	6	6	8	11	6
Recuperada	10	45	9	7	9	13	7

A las 96 horas de adición de hierro, las muestras presentan los contenidos que aparecen en el cuadro 19-A, en el que puede observarse que las concentraciones de cada uno de los pigmentos, respecto a las del control, son muy semejantes, así como las relaciones entre los mismos. Esto indica que las estructuras fotosintéticas deben estar prácticamente formadas.

Cuadro 19-A

Comparación entre la composición pigmentaria de hojas de remolacha testigo y deficientes a las 96 de recuperación

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	0,536 $\pm$ 0,072	0,363 $\pm$ 0,053	1,666 $\pm$ 0,161	4,645 $\pm$ 0,457	13,150 $\pm$ 1,337	0,789 $\pm$ 0,131
Recuperada	0,428 $\pm$ 0,143	0,355 $\pm$ 0,244	1,37 $\pm$ 0,388	3,917 $\pm$ 1,144	12,42 $\pm$ 3,316	0,899 $\pm$ 0,213

En el cuadro 19-B se puede apreciar que la estequiometría entre todos los pigmentos (referidos a la clorofila a) se alcanza prácticamente a las 96 horas de la adición de hierro.

Cuadro 19-B

Expresión de las concentraciones en relación a la clorofila a, dando a ésta el valor 100 ($\mu\text{g}, \text{cm}^{-2} \times 100 / \mu\text{g}, \text{cm}^{-2} \text{ Cl a}$)

	Neoxantina	Violaxantina	Luteína	Clorofila b	Clorofila a	β -caroteno
Control	4,074 $\pm$ 0,235	2,754 $\pm$ 0,100	12,57 $\pm$ 0,934	35,33 $\pm$ 0,493	100	6,001 $\pm$ 0,218
Recuperada	3,440 $\pm$ 0,41	2,950 $\pm$ 1,426	11,03 $\pm$ 0,622	31,53 $\pm$ 2,579	100	7,240 $\pm$ 0,524

Los datos expresados en el cuadro 19-B confirman lo dicho anteriormente acerca del estado de la planta recuperada a las 96 horas de hierro. Las ratios de neoxantina y de violaxantina, han alcanzado los niveles de la planta control, mientras que la

relación clorofila *a*/clorofila *b* y clorofila/carotenoides muestran valores similares a los características de las hojas control.

Cuadro 19-C

Relaciones más importantes entre pigmentos fotosintéticos, en plantas normales y recuperadas

	I Clorofila	I Xantofilas	Rel a/b	Rel clor/Carot
Control	17,79±1,78	2,56±0,28	2,83±0,03	5,31±0,2
Recuperada	16,33±4,41	2,15±0,85	3,17±0,25	5,36±0,32

La densitometría de geles con muestras de tilacoides procedentes de plantas de cuatro días de recuperación quedan recogidos en la figura 17.

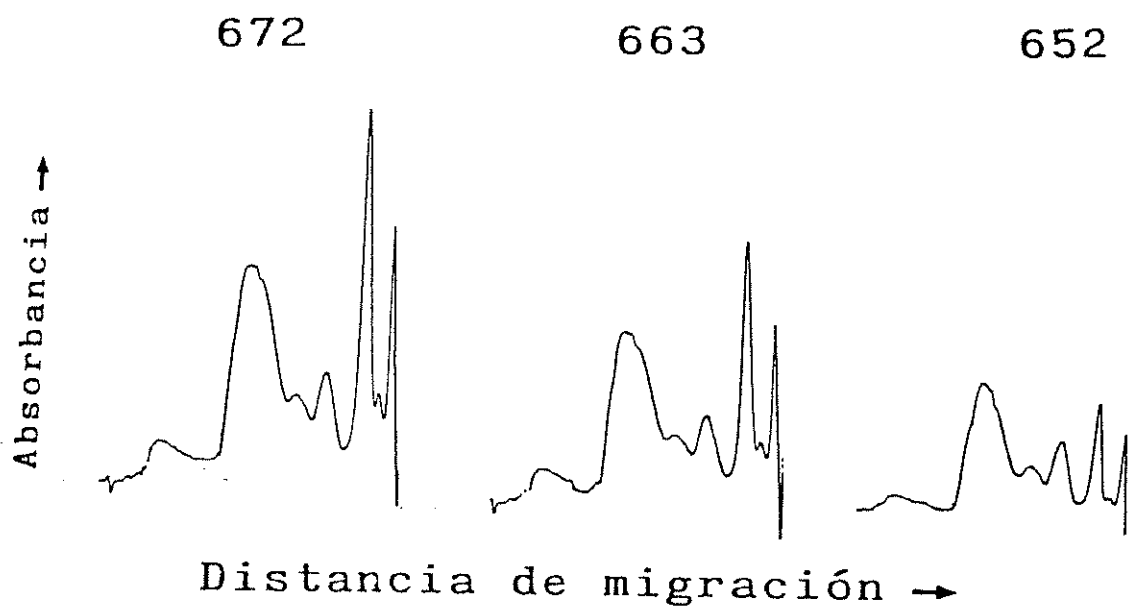


Fig 17. Densitogramas de electroforesis de remolacha deficiente en hierro a las 96 horas de recuperación por aporte de este elemento.

A las 96 horas del aporte de hierro puede observarse una estructura de complejos pigmento-proteína completamente normal. El CPa ha alcanzado su máximo desarrollo, y se han separado las tres bandas en la zona del CP1: CP1, CP1a, y CP1a (figura 17).

Las integraciones de los densitogramas de los vales de las muestras fotocopadas a las 96 horas de recuperación ofrecen los valores que se recogen en el

La resolución de los electroferogramas, y las relaciones estequiométricas de los pigmentos, permitió concluir, que durante las primeras 96 horas del aporte de hierro a plantas de remolacha deficientes, las hojas muestreadas alcanzan un estado de pigmentación con una estequiometría similar a la que presenta una hoja de remolacha de edad fisiológica semejante, desarrollada en solución nutritiva completa.

A fin de observar la evolución cuantitativa de los pigmentos, se continuó tomando muestras hasta que se alcanzaran los niveles característicos de plantas no deficientes.

En las figuras 18 a 25 se representan, en el gráfico A, la evolución de cada pigmento, en función del número de días transcurridos desde el aporte de hierro. Las zonas sombreadas representan el rango de variación que pueden tener los pigmentos de una planta de remolacha cultivada, según nuestras condiciones, en una solución completa de Hoagland.

En los gráficos B de las figuras 19-23, asimismo se representa la variación relativa de cada uno de los pigmentos, referidos, en cada muestreo, al contenido de clorofila a, dando a ésta el valor 100.

En la figura 18 se observa un aumento lineal de la clorofila *a* durante las primeras 48 horas del aporte de hierro, a partir de este momento se incrementa su síntesis hasta que llega a alcanzar los valores del control. Los valores que aparecen en las gráficas para cada uno de los días son la media junto con la desviación de las concentraciones de seis muestras, cada una de ellas, procedente de 10 plantas.

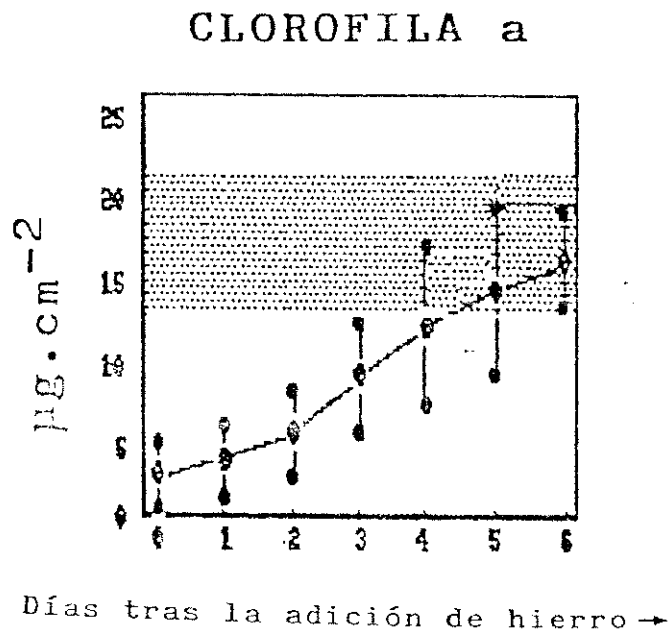


Fig. 18. Representación gráfica de la variación de concentración de clorofila *a* en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

El caso de la clorofila *b* es similar al de la clorofila *a*, ya que a partir de las 48 horas comienza una rápida formación de este pigmento, (de 0.895 a 0.951 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), aunque durante las primeras 24 horas la evolución es más lenta, ya que apenas hay cambios en su concentración (Figura 19-A).

La figura 19-B muestra como evoluciona la clorofila *b* respecto a la clorofila *a*, observándose que en las primeras 48 horas de recuperación la estequiometría entre ambas clorofilas se mantiene constante. A partir del segundo día la relación aumenta hasta alcanzar valores normales al quinto día.

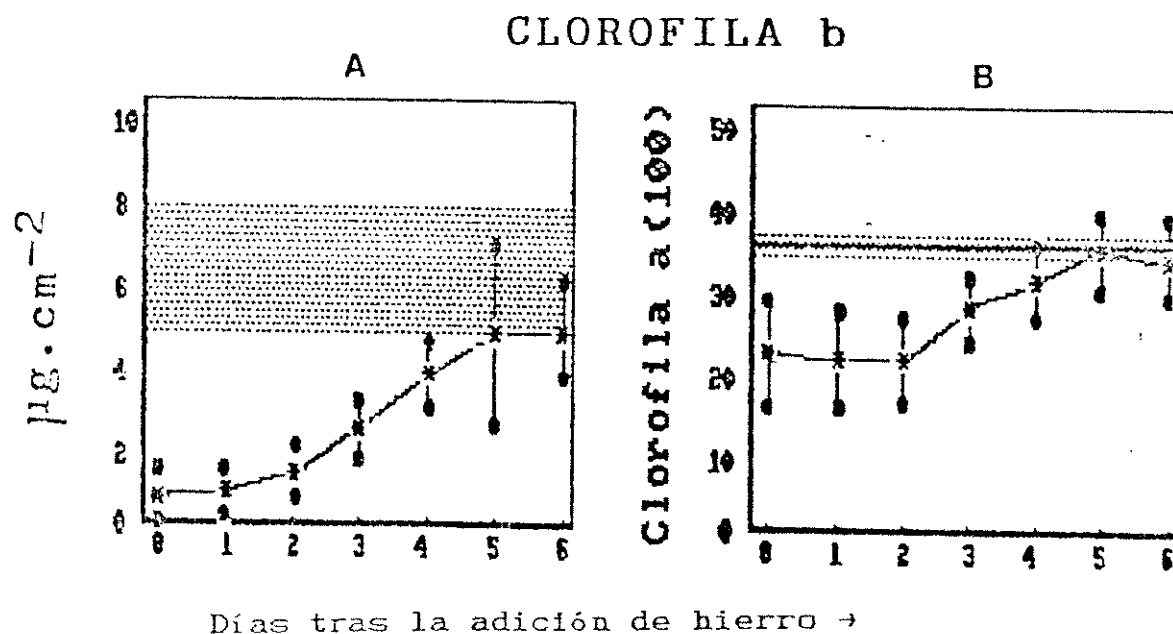


Fig. 19. Representación gráfica de la variación de concentración de clorofila *b* (A) y de la concentración relativa, dando el valor 100 a la clorofila *a* (B) en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

La neoxantina (Figura 20-A), muestra una tendencia similar a la de la clorofila *b*, pudiendo apreciarse un aumento a partir de las primeras 48 horas. Los valores de concentración relativa (figura 20-B) sufren una disminución durante las primeras 24 horas y se estabilizan durante los dos días siguientes, alcanzando niveles próximos a los de control al quinto día del aporte de hierro.

NEOXANTINA

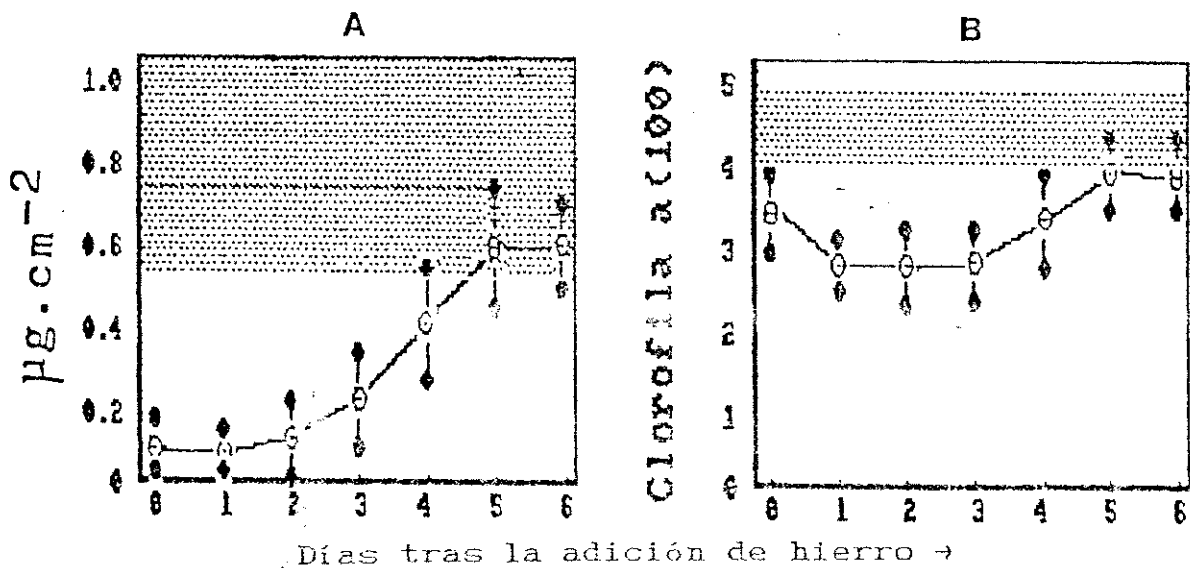


Fig 20. Representación gráfica de la variación de concentración de neoxantina (A) y de la concentración relativa (cambiando el valor 100 a la clorofila *a* (B), en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de *Nenuphar* deficientes.

Cuando se estudian los cambios en la concentración de violaxantina, por unidad de superficie (figura 21-A), puede apreciarse que su comportamiento se aparta del de los pigmentos analizados hasta el momento, pues si bien, existe un aumento lineal durante las primeras 48 horas, éste es muy acusado desde el primer momento. En plantas deficientes el nivel de violaxantina es mínimo ($0.062 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$); a las 24 horas de adición de hierro, la concentración aumenta hasta $0.18 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ y a las 48 horas $0.236 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. El aumento posterior de concentración es más lento apreciándose casi una estabilización a partir de las 96 horas. En la figura 21-B, se aprecia que la violaxantina parte de un nivel inicial inferior al control, pero a las 24 horas de la adición de hierro asciende bruscamente por encima de él, alcanzando la normalidad al cuarto día de la adición de hierro.

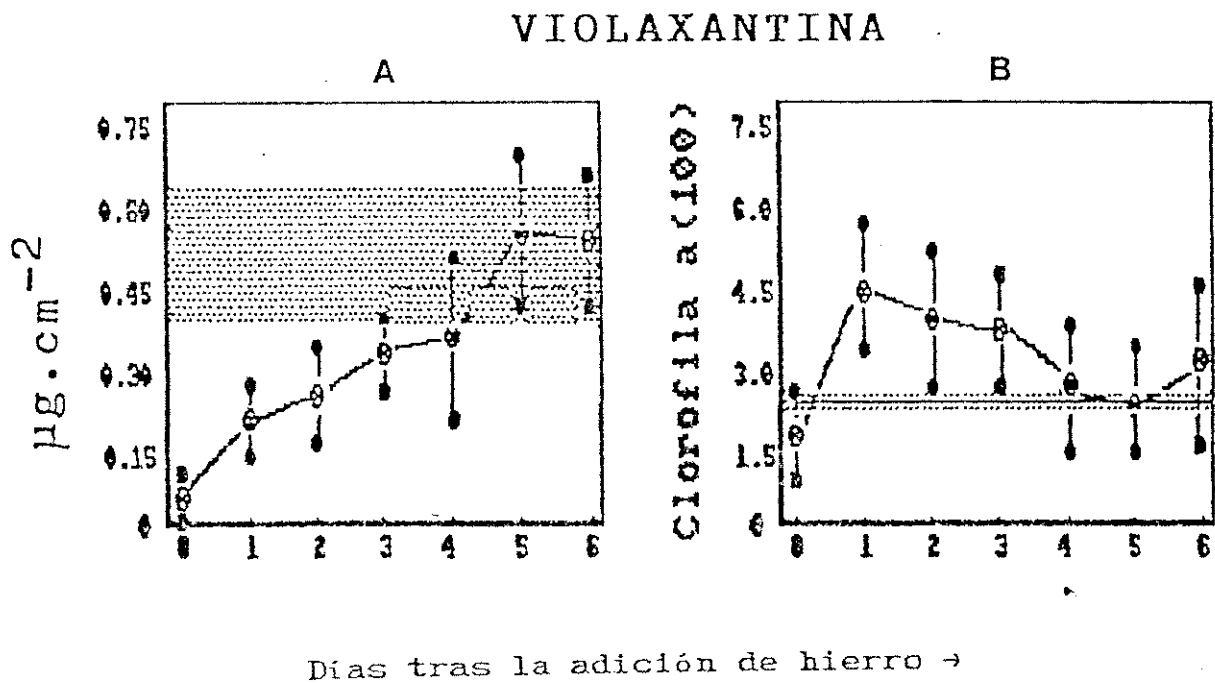


Fig 21. Representación gráfica de la variación de concentración de violaxantina (A) y de la concentración relativa, dando el valor 100 a la clorofila *a* (B), en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

La luteína sigue un comportamiento distinto al resto de pigmentos, puesto que su concentración disminuye durante las primeras 48 horas (desde 0.983 hasta 0.815 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$); a partir de este momento, aumenta hasta alcanzar un valor de 1.783 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ (figura 22-A). Este es el pigmento que sufre menor aumento de concentración a lo largo de la recuperación, e incluso es el que tiene unos niveles, en estado de deficiencia, más próximos a los de las plantas verdes control ($\approx 2.5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$).

Sin embargo en la figura 21-B se aprecia que alcanza la estequiometría de una planta verde, sin apenas variación, a partir de la primeras 48 horas.

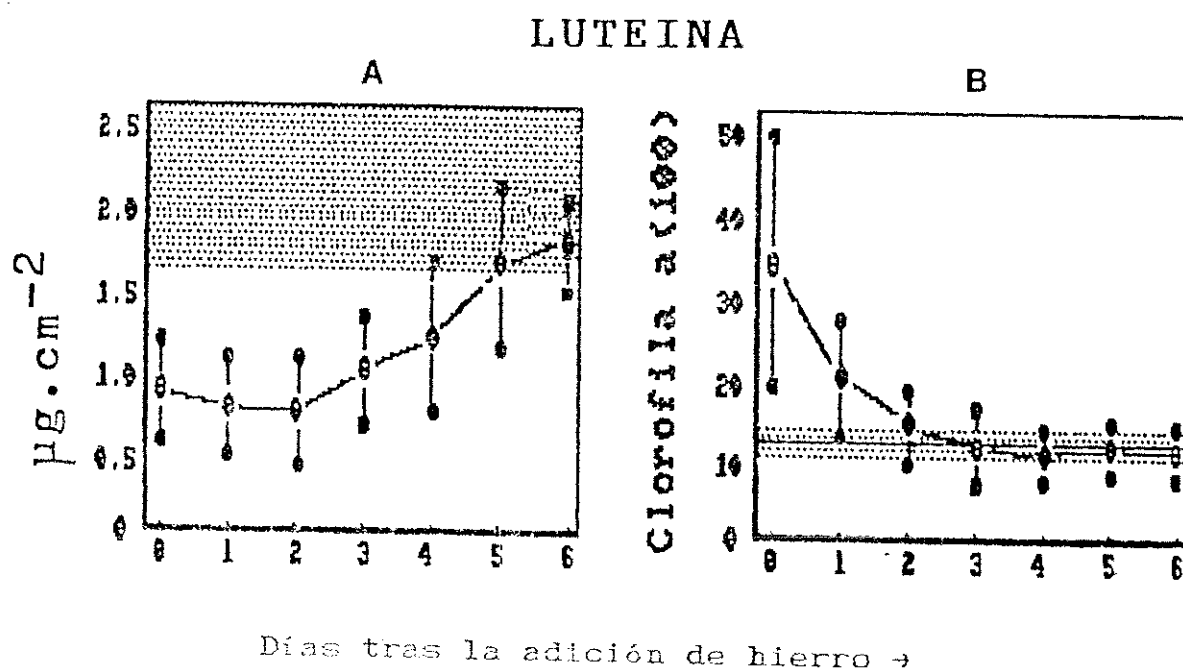


Fig 22. Representación gráfica de la variación de concentración de luteína (A) y de la concentración relativa, dando el valor 100 a la clorofila a (B), en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

El aumento en el contenido de β -caroteno tras la adición de hierro (figura 23-A), es prácticamente idéntico y muy similar al de la clorofila a. La concentración relativa de β -caroteno se mantiene por

encima del control verde incluso a las 144 horas de la adición de hierro.

BETA-CAROTENO

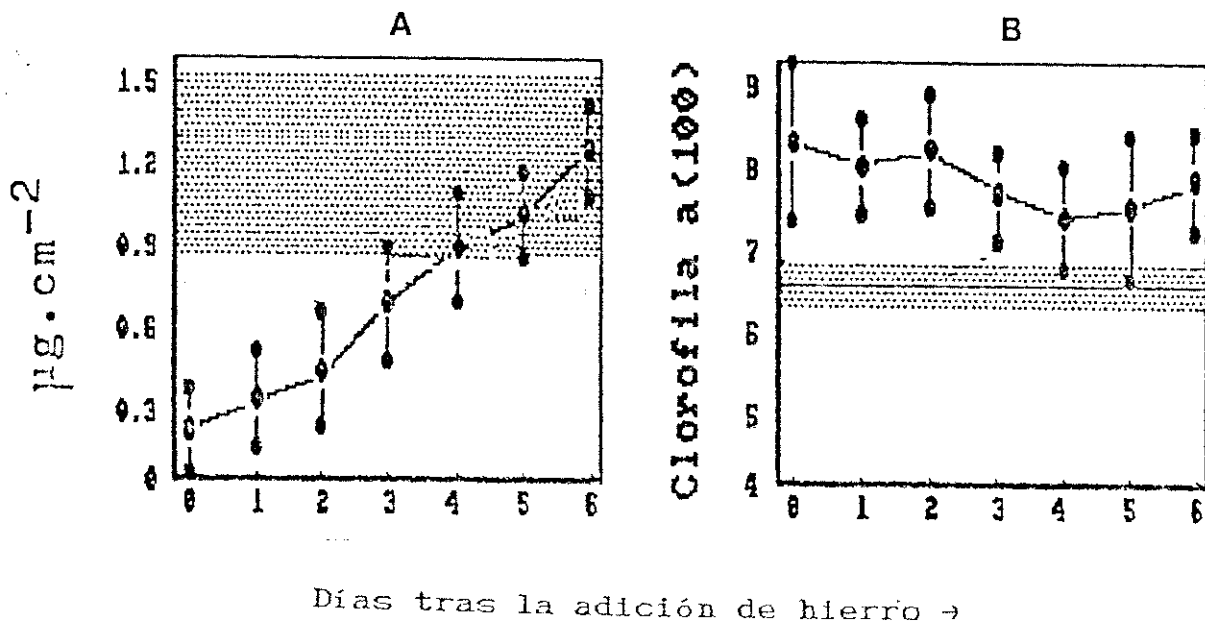


Fig 23. Representación gráfica de la variación de concentración de β -caroteno (A) y de la concentración relativa, dando el valor 100 a la clorofila a (B), en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

La evolución de la relación clorofila a/clorofila b se representa en la figura 24 pudiéndose observar que ésta aumenta en las primeras 24 horas y posteriormente disminuye al irse acercando a los valores normales a partir del quinto día.

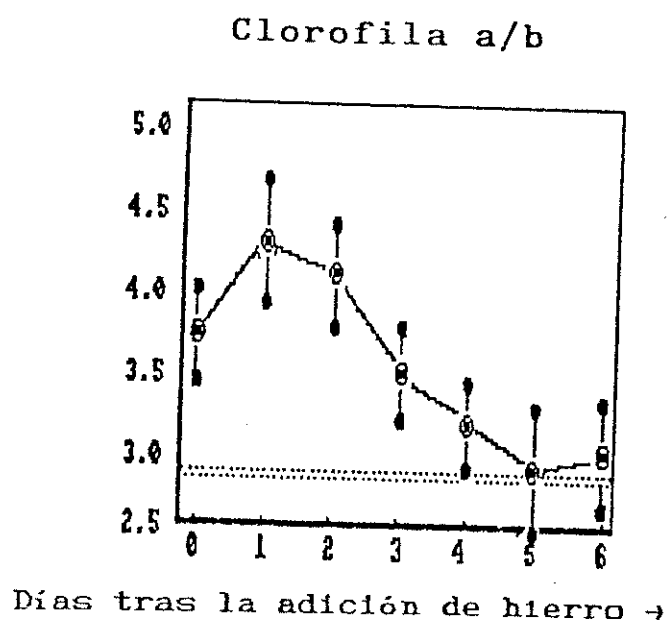
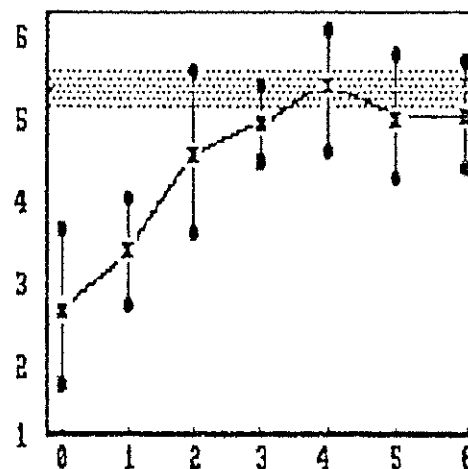


Fig 24. Representación gráfica de la relación clorofila *a*/clorofila *b* en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

El estado de deficiencia en hierro de las plantas puede apreciarse a simple vista por el grado de amarillez de las hojas, debido a que los carotenoides enmascaran el verde de las clorofilas, por lo tanto el valor de la relación clorofila total/carotenoides (figura 25) nos indicará, en general, el grado de amarillamiento de la hoja y, en nuestro

caso, el nivel de recuperación de las hojas deficientes. En la figura 28 se aprecia un rápido ascenso en la relación debido a la síntesis preferencial de clorofilas frente a los carotenoides, llegando a alcanzar el valor normal de las plantas verdes (zona sombreada) a las 96 horas de enverdecimiento.

Clorofila/Carotenoides



Días tras la adición de hierro →

Fig 25. Representación gráfica de la relación clorofila_{total}/Carotenoides en función del número de días transcurridos tras la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes.

R—X I INCIDENCIA DE LA LUZ EN EL DESARROLLO CLOROPLASTICO INDUCIDO POR HIERRO

Hemos encontrado que, en nuestras condiciones de trabajo y con el material vegetal utilizado, la cantidad de pigmentos, así como las estructuras fotosintéticas, varían durante el desarrollo cloroplástico. En los estados iniciales de este proceso, la cantidad de energía recibida por los pigmentos podría tener una particular incidencia en la adaptación del aparato fotosintético, al estar la cantidad de clorofila, muy por debajo de los niveles normales. En este apartado vamos a estudiar si la cantidad de luz recibida afecta los niveles de pigmentos fotosintéticos.

El protocolo de toma de muestras fué distinto al utilizado en el ensayo anterior. Para este estudio se realizaron muestreos sobre las mismas hojas, ya que parece lógico pensar que las variaciones que se produjeran en la composición pigmentaria debían ser mínimas. El cambio de hoja en la toma de muestras podría ocasionar alteraciones en la composición pigmentaria y/o en sus relaciones y, distorsionar los resultados alcanzados, perdiendo fiabilidad el estudio. Por lo tanto se procedió a tomar 20 discos de 0.2 cm².

de 10 plantas utilizando únicamente las dos hojas centrales. Para que las hojas tuvieran un grado de pigmentación lo más homogéneo posible, el proceso de selección de las plantas fué el mismo que el descrito anteriormente

Lógicamente deben estar interrelacionados, el desarrollo cloroplástico con la incidencia de la luz en el aparato fotosintético, por lo tanto los resultados que se obtengan, en esta parte del trabajo, podrán deberse al aporte de hierro y/o a la captación de energía luminosa. Para relacionar cada efecto con su causa específica, hemos utilizado dos poblaciones de plantas control: una verde cultivada en solución nutritiva completa y otra con deficiencia de hierro, al no haber aportado este elemento a la solución. Estos dos tipos de plantas control junto con las deficientes a las que se les había adicionado hierro, sometidos a las mismas condiciones de desarrollo, nos permitieron discernir qué efectos están causados por la luz y/o por el propio desarrollo del cloroplasto.

Durante la fase luminosa se tomaron tres muestras a intervalos aproximados de 4.5 horas, y otra en oscuridad 30 minutos antes de que se iniciara nuevamente el periodo de iluminación. La primera muestra se tomó al iniciarse el ciclo de iluminación, inmediatamente antes del aporte de hierro, mientras que en las días sucesivas se recogió a las 4.5 horas de la

fase de luz, siguiendo posteriormente el ritmo de toma de muestras previamente fijado.

Los resultados obtenidos en la evolución de cada uno de los pigmentos y de alguna de sus relaciones quedan recogidos en las figuras 21 y siguientes. Estas figuras están subdivididas en tres gráficos. En el gráfico A, se representan las fluctuaciones que sufren cada uno de los pigmentos en plantas sin ningún tipo de deficiencia. El gráfico B representa la evolución de los pigmentos en plantas deficientes en hierro. Al tratarse en ambos casos de material de control se comprobó que las situaciones se repetían en los ciclos de 24 horas. En el gráfico C se expresa la interrelación que tiene la luz y el desarrollo cloroplástico en la evolución de los pigmentos sometidos a estudio.

Las tres poblaciones de plantas se sometieron a las mismas condiciones de fotoperiodo seleccionado en la cámara de cultivo (pag.61).

En la figura 26 se recogen los resultados obtenidos para la neoxantina. El gráfico C representa la evolución de este pigmento en plantas deficientes a las que se les ha aportado hierro, y que lógicamente, en cada toma de muestras, las hojas han recibido mayor cantidad de luz. Cada uno de los puntos de la gráfica expresa la concentración media de seis muestras junto a su desviación estandar. En esta figura se observa que,

apenas varía la concentración de neoxantina, durante las primeras 48 horas, sin embargo, durante el primer periodo de oscuridad desciende su nivel. Durante el segundo día del aporte de hierro se observa un brusco aumento cuando han transcurrido 9 horas de iluminación, descendiendo posteriormente. También se da este mismo proceso al segundo día, con el posterior descenso, que continúa durante el periodo de oscuridad. Si observamos el proceso globalmente, se aprecia un suave aumento en la concentración de neoxantina, lo que confirma los resultados obtenidos (pag.163).

Queremos señalar que en el gráfico 26-A, aunque se aprecia un pequeño aumento en los niveles de neoxantina en plantas normales, según transcurre el periodo de iluminación, éste no es significativo, ya que si se utilizara la misma escala que en la figura 26-C daría una recta prácticamente paralela al eje de abscisas.

En el gráfico B, se observa un descenso, durante las 8 primeras horas de luz, en plantas deficientes. Una vez superada esta fase, sus niveles de concentración permanecen constantes.

En la figura 26-C podemos observar, en las tres primeras horas, un descenso similar al que se produce en el gráfico B, pero cada vez menos acusado, debido posiblemente a las cantidades crecientes de hierro en hoja.

N E O X A N T I N A

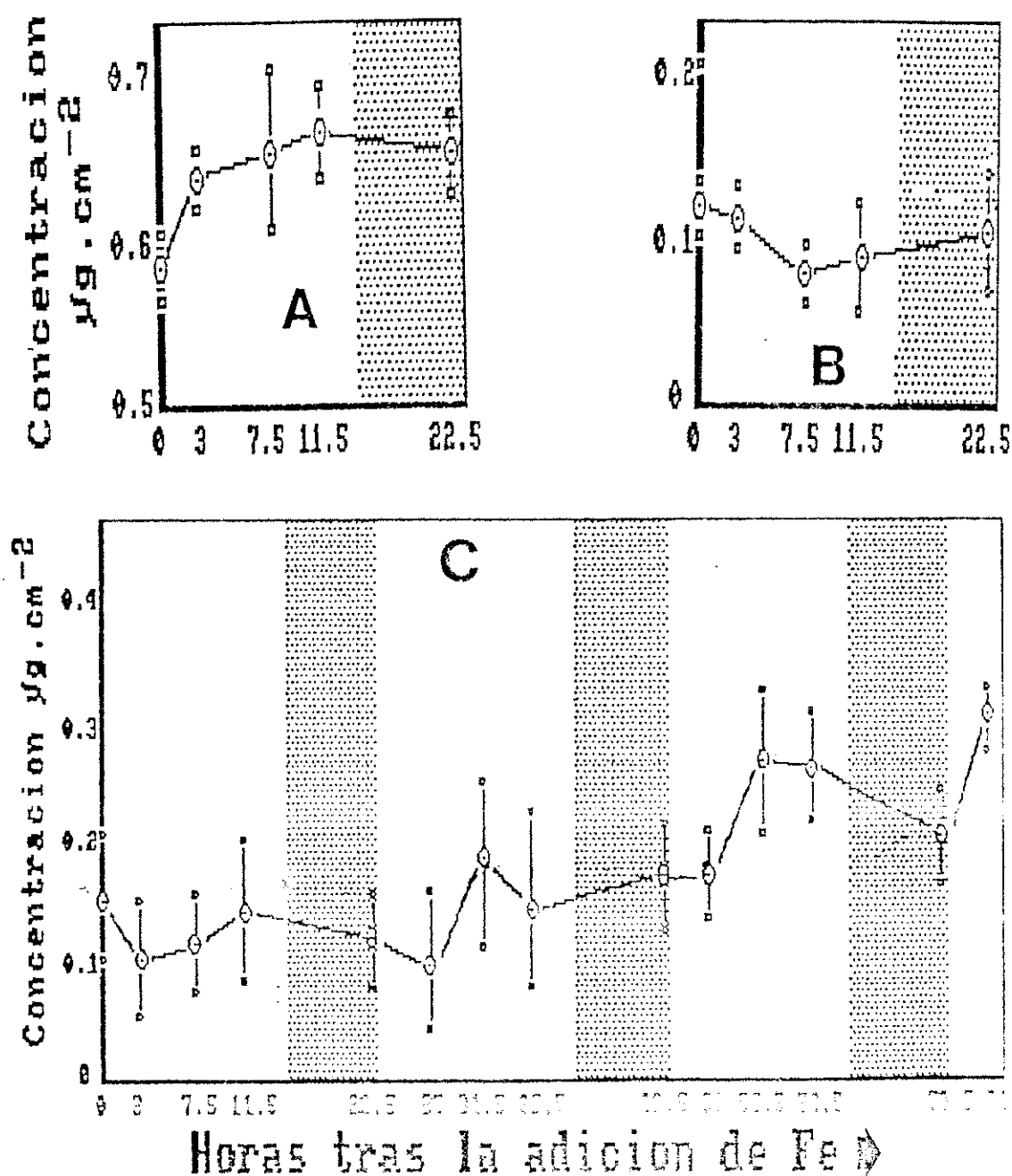


Fig. 26. Evolución de la neoxantina en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C); en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el período de enverdecimiento.

La figura 27-A, indica claramente, que las plantas normales, presentan una síntesis muy acusada de violaxantina durante las primeras 7.5 horas de iluminación alcanzando un máximo, a partir del cual disminuye, incluso durante la fase de oscuridad, mientras que en plantas deficientes no existe prácticamente, síntesis de violaxantina durante la fase luminosa y únicamente se produce en la fase oscura. El gráfico C de esta figura muestra que, en una planta que se está recuperando (gráfico C), el comportamiento de este pigmento durante la primera fase de luz (0-11.5 horas) es totalmente opuesto al de una planta deficiente (gráfico B). Durante las dos primeras fases de oscuridad se produce un gran incremento en la concentración de este pigmento. No obstante, la situación que aparece en el gráfico C, durante la primera fase de iluminación, es más similar a la de una planta verde control, ya que como se puede observar, desde el primer momento de la adición de hierro, la violaxantina se ve afectada considerablemente.

En las primeras 7.5 horas se multiplica por 10 la concentración inicial, y posteriormente disminuye, como ocurre durante la fase luminosa del control normal (figura 27-A). Sin embargo, comparando ambas figuras en su fase oscura, se observa que mientras en la primera hay una disminución, en la segunda hay un incremento del mismo.

V I O L A X A N T I N A

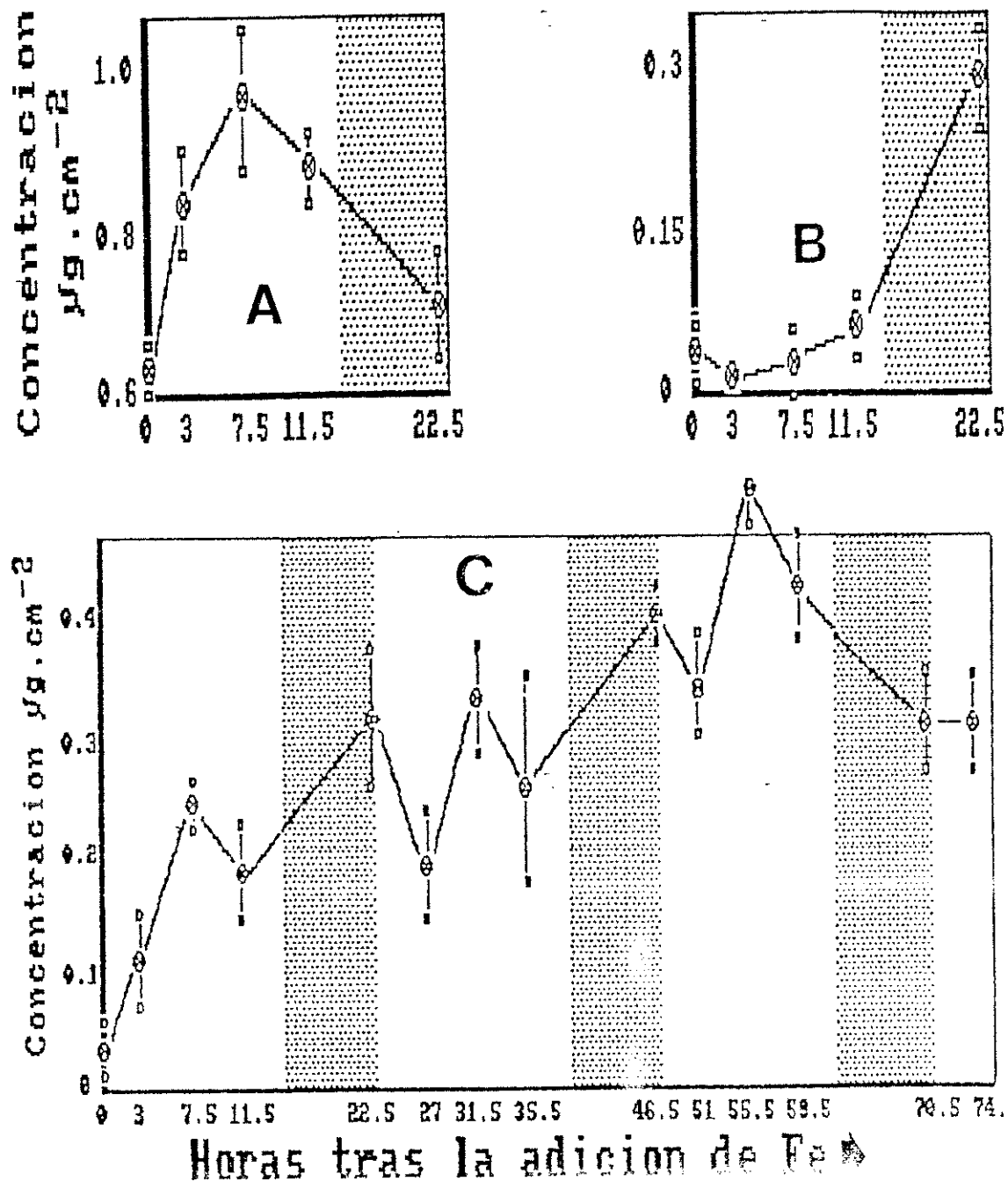


Fig. 27. Evolución de la violaxantina en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C); en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el periodo de oscuridad.

El estudio de la evolución de la luteína basado en la toma de muestras en ciclos de 24 horas, demostró que durante los tres primeros días del desarrollo cloroplástico se producía un ligero descenso en su concentración. Los resultados obtenidos, a partir de toma de muestras a intervalos más cortos, mostrados en la figura 28-C, confirman los anteriores, ya que hasta el tercer día no se observa ningún incremento en la concentración de este pigmento.

La figura 28-A expresa claramente que este pigmento, en plantas sin stress de hierro, no se ve afectado por la luz, ya que la concentración permanece prácticamente constante durante ambas fases. Sin embargo, este factor si que afecta a su concentración, en plantas deficientes (figura 28-B), ya que disminuye durante la fase luminosa, no observandose ningún cambio durante la fase de oscuridad. En la figura 28-C, durante la primera fase luminosa, se puede observar un descenso en la concentración, igual que ocurre en el control B de plantas deficientes, en el que se aprecia una destrucción.

L U T E I N A

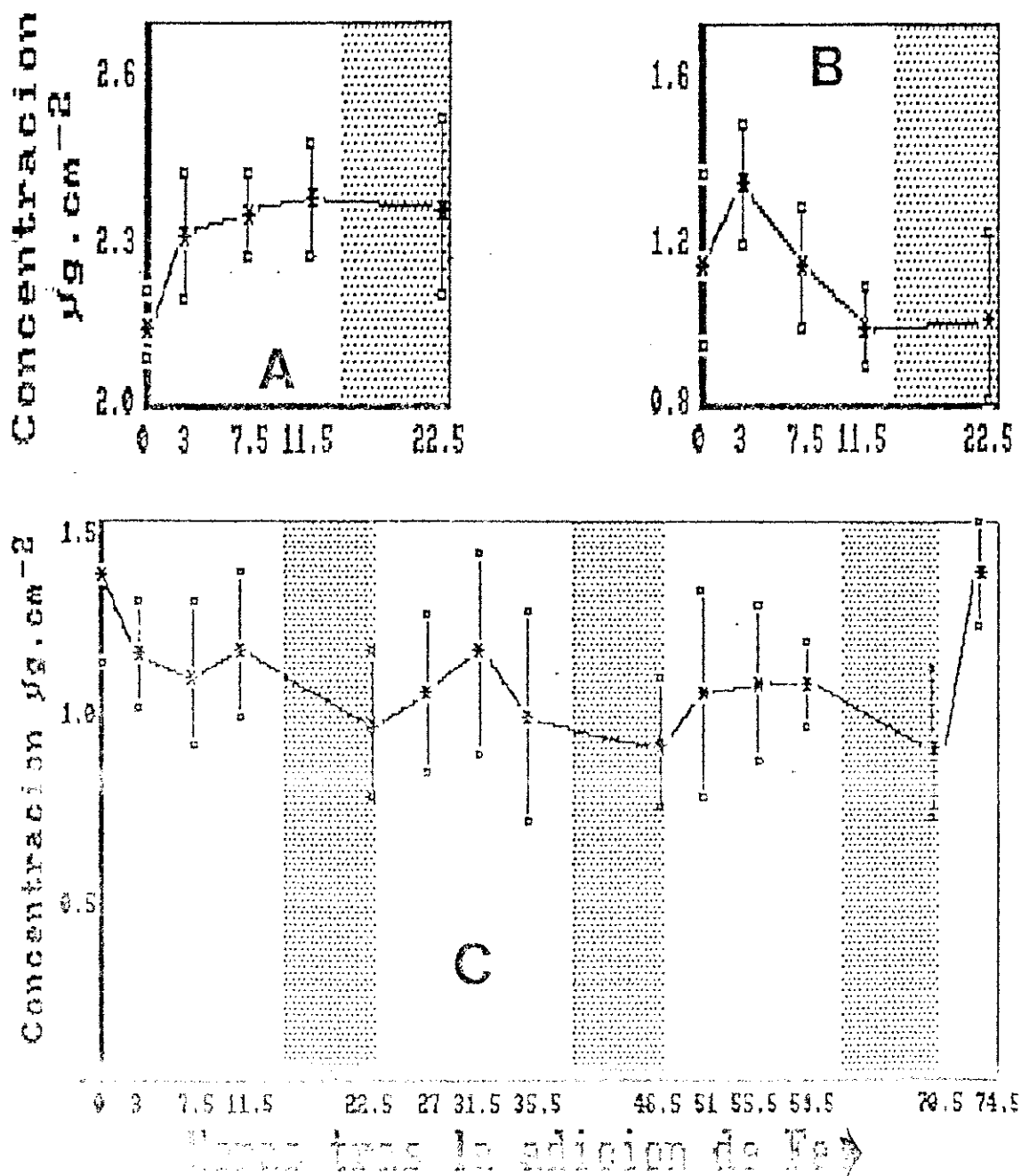


Fig. 2a. Evolución de la luteína en las primeras 74 horas de crecimiento (C), en un ciclo diario en plantas control (B) y deficientes en hierro (A). La concentración de luteína se expresó en $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Las clorofilas son los pigmentos mayoritarios en plantas no deficientes. La evolución de la clorofila *b* en los tres tipos de plantas estudiadas, se muestra en la figura 29. En el gráfico B se observa un incremento de concentración durante la fase de oscuridad. Asimismo, mientras en plantas no deficientes (gráfico A), hay una síntesis hasta las primeras 7.5 horas, en el B se observa una brusca caída en la concentración. El gráfico C muestra que, en plantas sometidas a desarrollo cloroplástico, el comportamiento difiere del control B, ya que en las tres fases oscuras se mantiene o incluso desciende la concentración. En el segundo periodo se incrementa la concentración durante las primeras nueve horas (31.5), y en el tercero continúa el aumento considerablemente, prolongándose durante 13 horas y media (52.5). Asimismo, durante las primeras 48 horas, apenas se registraron cambios en la concentración de la clorofila *b* (figura 29-C), confirmando los resultados del apartado anterior (figura 19).

C L O R O F I L A b

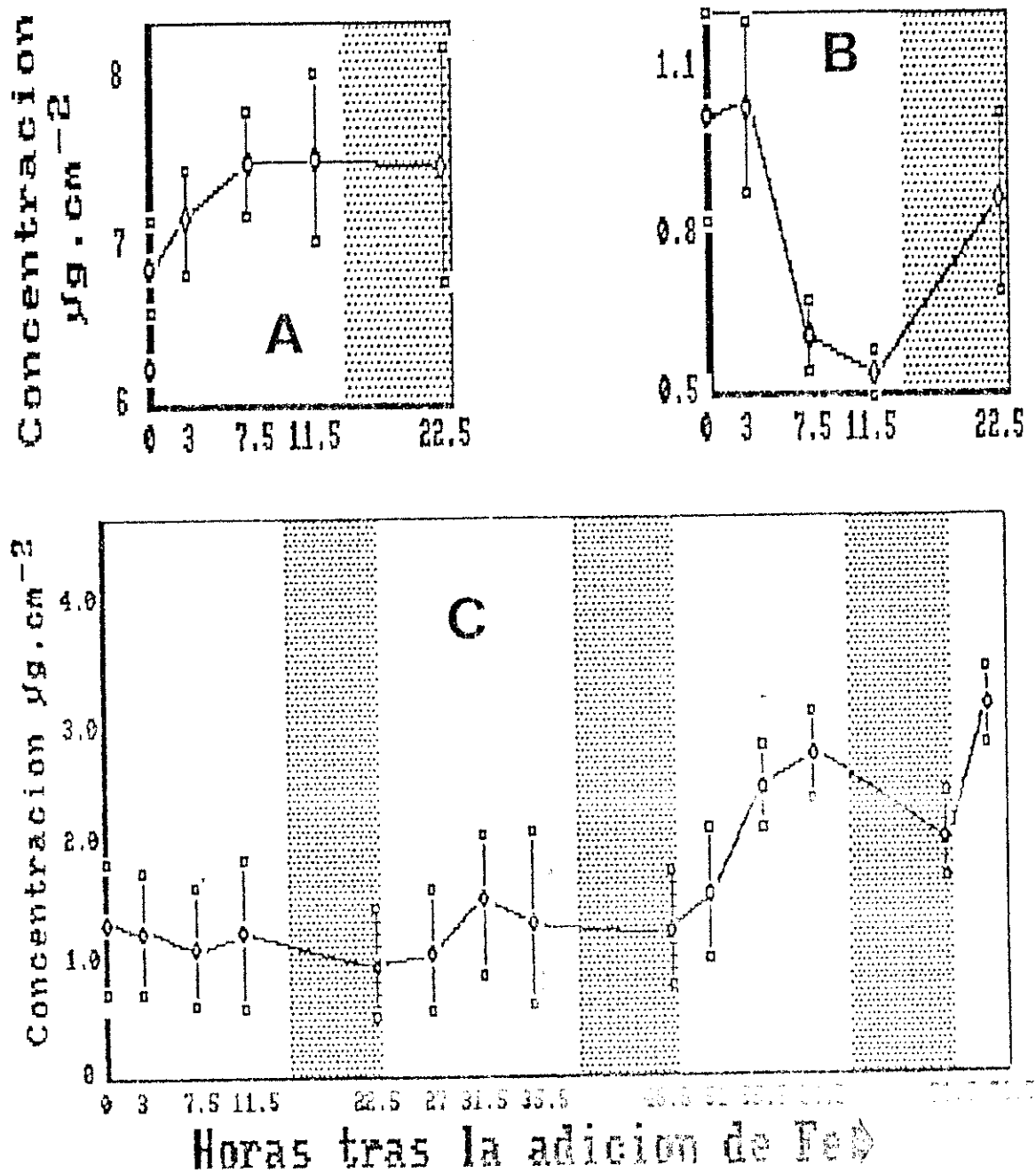


Fig. 29. Evolución de la clorofila b en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C), en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el período de oscuridad.

El gráfico A de la figura 30, demuestra que la clorofila a se sintetiza durante la fase luminosa, mientras que en el periodo de oscuridad hay una disminución en la concentración. En el gráfico B, se observa un incremento en la concentración durante la fase de oscuridad. La evolución de la clorofila a, en plantas sometidas al desarrollo cloroplástico, queda representada en el gráfico C, en el que se observa, durante el primer periodo de fase luminosa, un descenso en la concentración de este pigmento, como ocurre en el caso de las plantas deficientes, pero en los periodos sucesivos, una vez que ha llegado el hierro al cloroplasto, se encuentra una situación similar a la del gráfico A. El gráfico C parece indicar que la clorofila a comienza a acusar los efectos del aporte de hierro en la solución nutritiva a partir de las ocho primeras horas.

C L O R O F I L A a

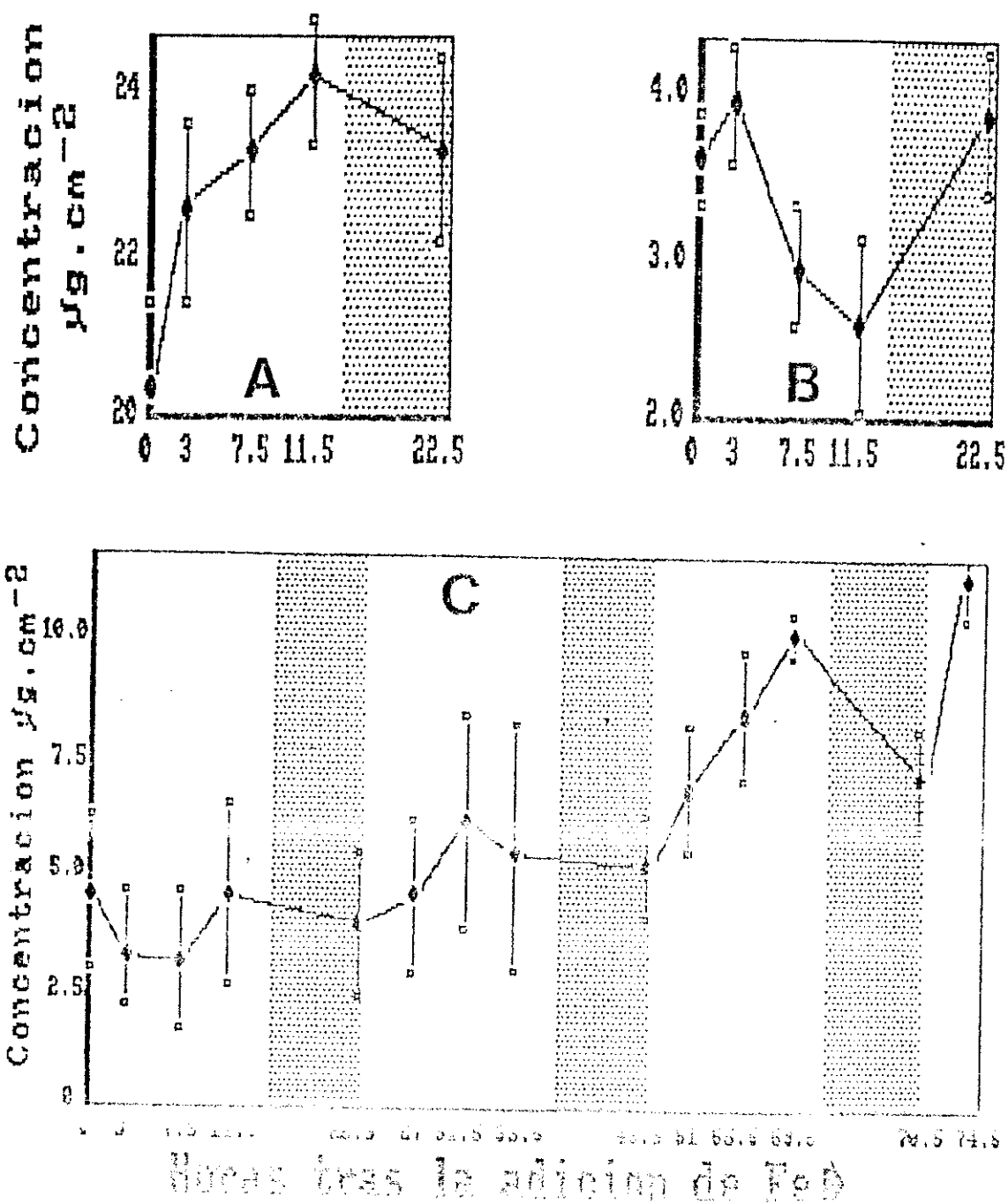


Fig. 30. Evolución de la clorofila *a* en las primeras 74 horas de aclimatación (0h, en el ciclo diario en pleoresplandor) de la *Chlorella* a la luz roja. La zona sombreada indica el período de aclimatación.



El gráfico A de la figura 31, representa la relación clorofila a/clorofila b, en una planta no deficiente. Durante las fases luminosas, esta relación aumenta debido a un incremento de la clorofila a (figura 33). La clorofila b, unicamente se incrementa durante las primeras 8 horas, pero este aumento no es proporcional al de la clorofila a.

El gráfico B muestra la evolución de esta relación durante 24 horas en plantas deficientes. Desde el comienzo, se puede observar un descenso durante las primeras 8 horas, a partir de las cuales hay un ligero incremento, el cual, si observamos los gráficos B de ambas clorofilas, puede estar motivado por una mayor disminución de la clorofila a. Esta relación no varía durante la fase de oscuridad, ya que se sintetizan ambas clorofilas en igual proporción.

El gráfico C muestra cómo se altera la relación entre ambas clorofilas, en plantas sometidas al desarrollo cloroplástico, en las cuales, en el segundo día hay una relación acusadamente alta que desciende paulatinamente hasta los valores normales (aproxiamadamente 3). La caída brusca entre 51-55 horas se debe a que es el periodo de tiempo en el que mientras la clorofila a sufre un incremento proporcional al de los otros periodos, la clorofila b aumenta bruscamente.

R E L A C I O N Clorofila a/Clorofila b

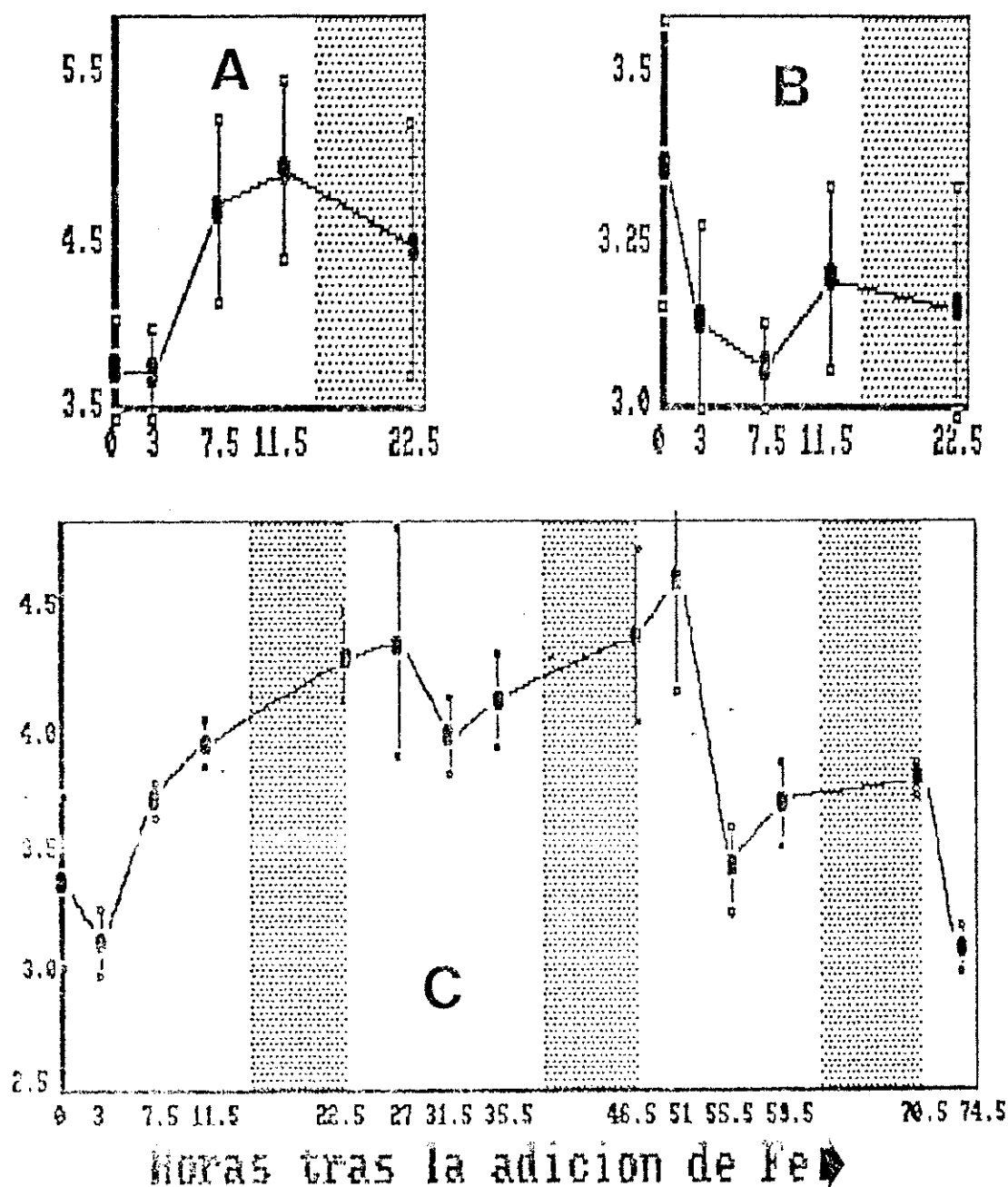


Fig. 31. Evolución de la relación clorofila a/clorofila b en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C), en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el período de oscuridad.

El gráfico A de la figura 32 muestra que hay una síntesis de β -caroteno en plantas no deficientes durante las primeras 8 horas, a partir de las cuales su concentración se mantiene constante, no teniendo ninguna influencia el periodo de fase oscura. Si este comportamiento se compara con el de la clorofila a, se puede observar que es bastante diferente, ya que hay síntesis de la misma durante el periodo luminoso y catabolismo durante la fase de oscuridad.

La evolución observada en la figura 31-A, es muy similar a la que presenta la clorofila b, ya que la síntesis de ambos pigmentos se produce aproximadamente en el mismo periodo de tiempo y posteriormente su concentración se mantiene prácticamente inalterable. El gráfico B muestra para el mismo tipo de plantas la evolución de este pigmento, similar al de las clorofilas a y b, indicando que durante la fase luminosa se produce una destrucción y una síntesis durante la fase de oscuridad.

La representación gráfica de la concentración de este pigmento durante el desarrollo cloroplástico, viene reflejada en el gráfico C, en el que en conjunto se observa el incremento de este pigmento durante la formación de tilacoides y su evolución es similar a la que se observa en ambas clorofilas.

B E T A - C A R O T E N O

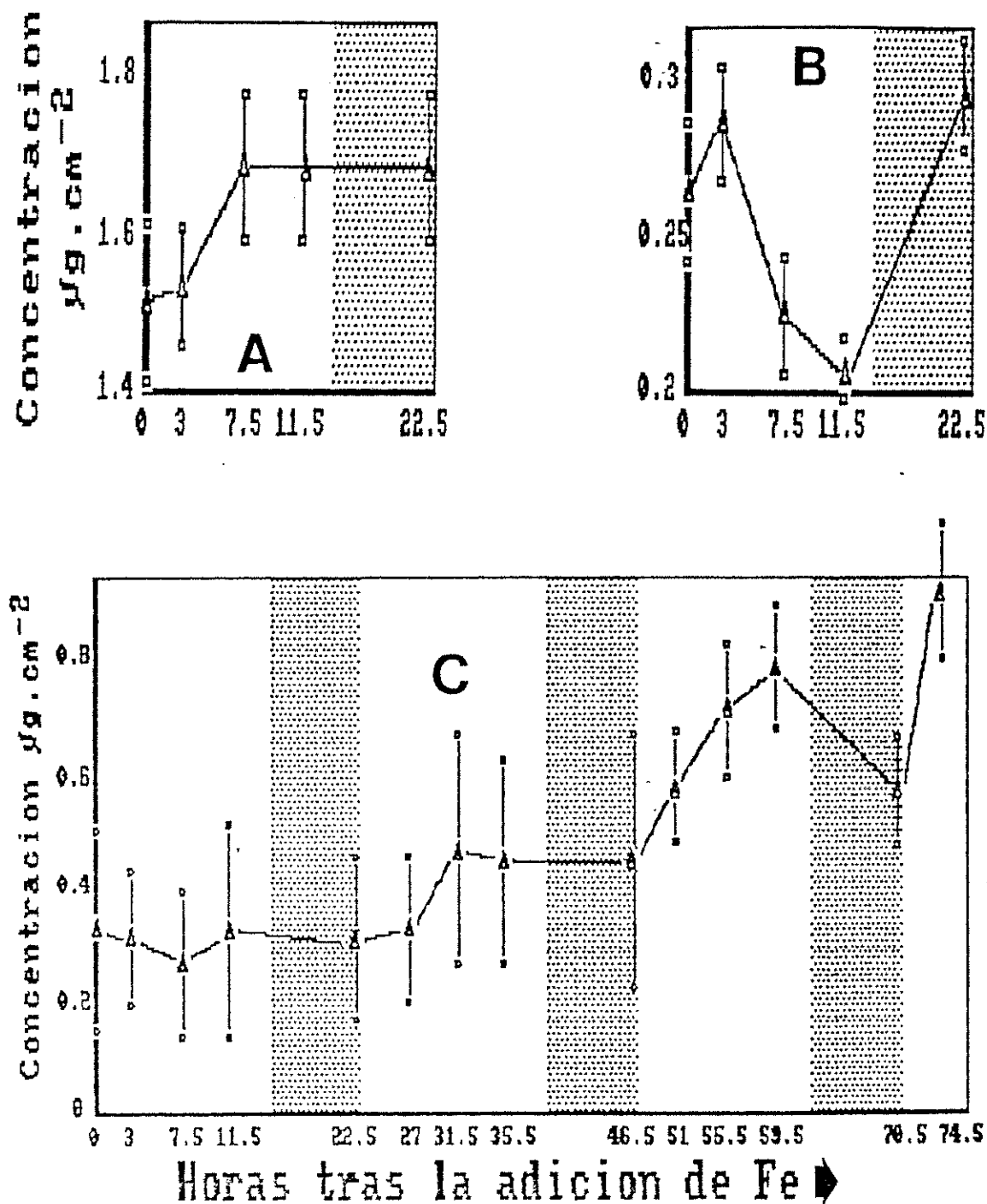


Fig. 32. Evolución del β -caroteno en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C), en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el periodo de oscuridad.

Como ya se demostró (pag. 163), la relación clorofila/carotenoides es un buen indicador del estado de deficiencia de la planta. Como puede observarse en los gráficos A y B, que corresponden a los controles normal y deficiente, esta relación en plantas sin ningún tipo de deficiencia presenta un valor alto (5.5), mientras que en plantas deficientes el valor es bajo (inferior a 3), ya que la cantidad de carotenoides es mucho mayor que la que le corresponde a la clorofila. En la figura 33-C se puede apreciar que existe una fase de "lag", durante el primer ciclo, ya que parece no haber síntesis de los pigmentos durante estas primeras 24 horas. A partir de este momento asciende la concentración hasta las 35.5 horas. En la fase de oscuridad decrece la relación, no por aumento de la concentración de carotenoides, sino porque en estos mismos periodos disminuyen las concentraciones de clorofilas.

R E L A C I O N Clorofila/Carotenoides

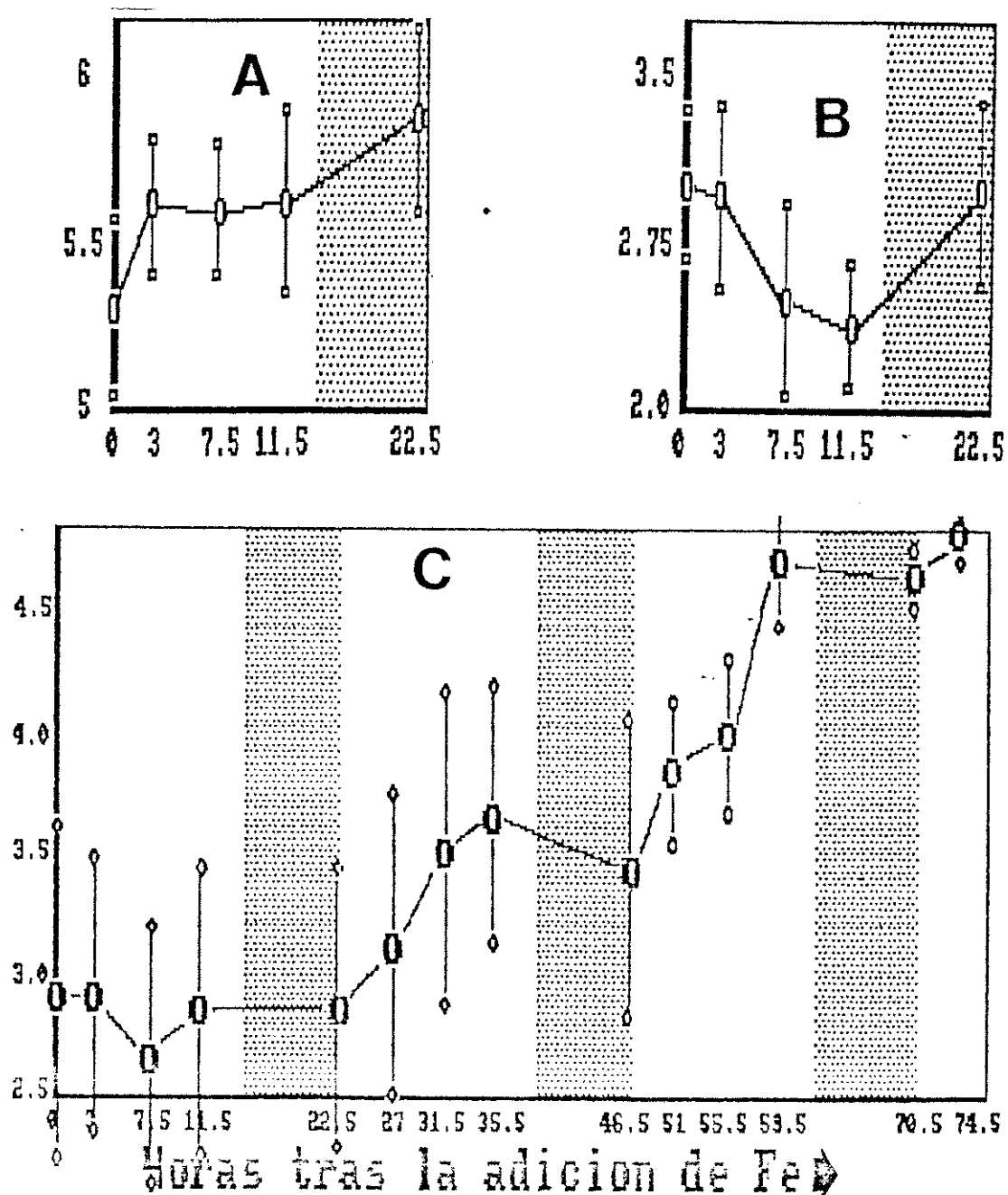


Fig. 33. Evolución de la relación clorofila/carotenoides en las primeras 74 horas de enverdecimiento (C), en un ciclo diario en plantas normales (A) y deficientes en hierro (B). La zona sombreada marca el período de oscuridad.

DISCUSION

El estudio de la evolución de pigmentos durante la formación de membranas tilacoidales, como consecuencia del desarrollo cloroplástico inducido por hieño, debe apoyarse en una metodología que permita la separación y cuantificación de dichos pigmentos.

Al tener estos pigmentos un caracter lipídico, es necesario que se extraigan del material vegetal la totalidad de los mismos, lo que confiere a la elección del extractante un caracter especial. En el cuadro 1 se dan las concentraciones de pigmentos obtenidas, al aplicar las fórmulas ya citadas (pag 28), a un mismo conjunto de muestras, en cuatro solventes distintos. Si

comparamos los distintos extractantes, en principio podría deducirse que el más eficaz es el metanol, ya que aplicando las fórmulas de Arnon, se obtienen $33.10 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de clorofila total y con acetona del 80%, da un valor de $29.68 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. Esto parece indicar que los valores de concentración están influenciados por la naturaleza del extractante. Sin embargo, al utilizar un mismo solvente (acetona del 80%) vuelven a encontrarse diferencias entre valores al aplicar distintas fórmulas. Así, utilizando las de Arnon se obtiene un valor de clorofila total de $29.69 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ y una relación a/b de 2.27; mientras que las de Lichtenthaler dan $26.05 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ y la relación es de 4.10, lo que demuestra que los valores que proporcionan estas ecuaciones están influenciados por factores ajenos a la concentración real de pigmentos en el material vegetal y como es lógico, no se puede deducir ninguna conclusión, a la vista de este cuadro, puesto que la variación en la concentración de clorofila podría achacarse al solvente, a la polaridad, o a la fórmula empleada.

Entre las técnicas que se pueden utilizar para el análisis de pigmentos, una de las más precisas, pensamos que podría ser la cromatografía líquida de alta eficacia.

La mayoría de los lechos que se utilizan en el relleno de columnas para HPLC, suelen ser de partículas de sílice, y su comportamiento cromatográfico está basado en la interacción entre los compuestos de

distinta polaridad de una muestra con los grupos hidroxilo que se encuentran en la superficie de dichas partículas (Si-OH).

La característica cromatográfica de la sílice, puede modificarse sustituyendo sus radicales -OH por otros grupos funcionales, proporcionando lechos de distinta polaridad. La utilización de columnas cuyo relleno sea más polar que la fase móvil, provoca que se retengan más fuertemente, los compuestos más polares (adsorción), por el contrario, si el lecho es menos polar que la fase móvil, quedarán más retenidas las moléculas menos polares. Según esta propiedad, la cromatografía puede ser de fase normal o reversa.

La mayor parte de las separaciones por HPLC se realiza en la actualidad con columnas de fase reversa, porque se equilibran más rápidamente, necesitan menos solvente y tienen un comportamiento químico más versátil que las de sílice sin modificar.

La eficacia de un sistema de HPLC está condicionada, entre otros factores: por la columna y la fase móvil. En una primera etapa probamos las fases citadas por: Lichenthaler, Prenzel y Khun (1984): mezcla isocrática del 9% de agua en metanol; Braumann y Grime (1981): gradiente lineal de metanol-acetonitrilo 25/75 (v/v):agua; Eskins (1977): mezclas discontinuas metanol:agua, aunque posteriormente Eskins y Dutton (1979) utilizaron: un programa lineal de metanol del 90%

y acetato de etilo. El tiempo de desarrollo de los cromatogramas con estos eluyentes en las condiciones establecidas por los autores, era excesivo, debido probablemente al mayor número de platos de nuestras columnas, lo que las hacía poco adecuadas para nuestro sistema.

La mayoría de las fórmulas empleadas en la cuantificación de pigmentos se basaban en extracciones con metanol, etanol o acetona, bien en estado puro, o diluías con distintas proporciones de agua; puesto que las características de nuestra columna nos permitían trabajar con estos solventes, ensayamos distintas fases móviles, que tenían como base los solventes anteriormente mencionados. La fase móvil, así como el gradiente se fueron simplificando al máximo, hasta llegar a los resultados que se presentan en la figura 1. Los solventes orgánicos más apropiados, en nuestras condiciones de trabajo, eran el metanol, etanol, y la dilución acuosa del primero en mayor o menor proporción, lo que nos permite reducir el tiempo de desarrollo (4 a 8 minutos), manteniendo la integridad de los distintos picos en el cromatograma; además de resolver perfectamente, los picos representativos de cada uno de los pigmentos, a excepción de la zeaxantina. Por lo tanto seleccionamos las condiciones especificadas en el último cromatograma de esta figura, ya que se obtenía una buena resolución en un tiempo muy breve.

El capilar del inyector de muestras (*loop*), era de volumen fijo (20 μ l), que a su vez permite inyecciones repetidas de una muestra hasta un máximo de 120 μ l, sin distorsionar ni la forma del cromatograma, ni la correlación entre la concentración y el área de cada uno de los picos.

La detección de las fracciones separadas por el sistema cromatográfico se realizó a 440 nm, ya que la totalidad de pigmentos fotosintéticos presentan absorción a esta longitud de onda (Val, Heras y Monge, 1985).

La identificación de los picos que aparecen en los cromatogramas de HPLC se realiza generalmente por comparación de las movilidades relativas de los compuestos con las de patrones. La obtención de patrones de ciertos pigmentos fotosintéticos que no se encuentran disponibles comercialmente o de dudosa pureza, presentó algunas dificultades, ya que algunos no se encuentran disponibles comercialmente, y además pudimos comprobar que únicamente las clorofilas a y b y el β -caroteno, eran puros, mientras que las xantofilas y el resto de carotenos presentaban contaminación debido a la presencia de productos de degradación y a otros pigmentos con similar movilidad en el procedimiento de obtención.

Esta circunstancia nos obligó a obtener nuestros propios patrones de pigmentos fotosintéticos, mediante

la utilización de cartuchos Sep-Pack, basándonos en la técnica de purificación de muestras para el análisis de pigmentos fotosintéticos por HPLC (Eskins y Dutton, 1979).

Una de las características de los carotenoides es su espectro de absorción molecular, que está en función del grupo cromóforo y de la cadena de polieno. Asimismo, está influenciado por las características estructurales y por el solvente. Aunque hoy en día la identificación de pigmentos puede basarse en la espectroscopía: de masas, de infrarojos y de resonancia magnética nuclear, uno de los procedimientos más usuales es la determinación del espectro de absorción en la región del visible, en distintos solventes (Davies, 1976).

El método de identificación de pigmentos utilizado por nosotros, implica la previa separación por HPLC, el aislamiento por el método del Sep-Pack, y el estudio del espectro de absorción en distintos disolventes orgánicos.

La fracción correspondiente a cada uno de los pigmentos individualizados, se redisolvió en sulfuro de carbono, hexano y etanol. Los desplazamientos relativos de los espectros de los carotenoides en hexano y en sulfuro de carbono, permiten identificar los máximos espectrales con un margen de error mínimo. Si bien, los pigmentos en etanol, en la mayoría de los casos, presentan un espectro muy semejante a cuando están

disueltos en hexano, fue determinante la elección de este solvente, ya que permite discernir entre pigmentos que sufrían un desplazamiento en los máximos al añadirle una gota de clorhídrico, es decir, diferenciar monoepóxidos y diepóxidos (figura 2).

Los espectros de las clorofilas *a* y *b* (figura 3-B), únicamente se registraron en etanol, por ser estos pigmentos fácilmente distinguibles del resto al ofrecer una absorción característica en la región del rojo. Asimismo, solo se ofrece el espectro en etanol del β -caroteno (figura 3-C), ya que procedía de un patrón adquirido comercialmente (SIGMA).

Mención especial merece el caso de la luteína y la zeaxantina. Prenzel y Lichtenthaler (1982) lograron separar estos dos pigmentos trabajando con dos columnas en serie. Braumann y Grime (1981) indican que es posible separar ambos pigmentos mediante pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil. Aunque hemos ensayado diferentes eluyentes e incluso las mismas fases móviles recomendadas por los citados autores, en ningún caso se observó hombro o desdoblamiento en el pico identificado por nosotros, como luteína, a pesar de aumentar la polaridad de las fases recomendadas por dichos investigadores. No obstante, para comprobar este punto, después de concentrar la fracción correspondiente a este pigmento se sometió a cromatografía de capa fina, según las condiciones de Hager y Bartenrath (1966), obteniendo una sola mancha. Según nuestras condiciones de trabajo,

el cromatograma presenta un pequeño pico entre la luteína y la clorofila b, al cual le asignamos la denominación de L1. Aunque en pequeñas cantidades se logró aislar este pigmento, y se comprobó que también aparecía en otras especies. El estudio de sus máximos espectrales en los solventes utilizados no nos permitió identificarlo con ningún otro carotenoide citado en la bibliografía. Podría pensarse que esta fracción L1 fuera la zeaxantina, pero en hexano, ésta ofrece los siguientes máximos en nanómetros: 424, 449, 476; en sulfuro de carbono: 450, 482 y 517; los máximos en etanol son: (428), 450 y 478; por lo que al compararlos con los obtenidos para el L1, se observa que no existe relación entre un pigmento y el otro. Por otra parte, a diferencia de la zeaxantina, el L1 debe tener una estructura carente de grupos epóxido, ya que al añadirle una gota de clorhídrico, al pigmento disuelto en etanol, no se observó ningún desplazamiento de los máximos.

Jeffrey et al. (1974), demostraron que las membranas externas de cloroplastos de espinaca sometidas a altas intensidades de luz, presentaban una relación violaxantina/(luteína+zeaxantina) de 0.75, mientras que para tratamientos con bajas intensidades esta relación era de 3.5 aproximadamente. El que Prenzel y Lichtentaler (1982) pudieran identificar la zeaxantina, podría deberse al hecho de trabajar con plantas sometidas a altas intensidades de luz, ya que en los experimentos que se realizaron en plantas cultivadas con

bajas intensidades, no consiguen identificar dicho pigmento.

La cuantificación de los pigmentos, se realizó inyectando cantidades conocidas de cada uno de ellos, registrando el cromatograma a 440 nm, determinando las áreas de estos picos, y aplicando los factores de conversión, mencionados en el capítulo correspondiente (pag 100).

La concentración de los patrones obtenidos por nosotros de cada uno de los pigmentos se calculó midiendo la absorbancia en los máximos y aplicando los coeficientes de extinción citados en la bibliografía (cuadro 3).

Una vez obtenida una solución stock, de concentración conocida, se procedió a inyectar, en el cromatógrafo, diferentes diluciones de dicha solución, que proporcionaron picos con distinta área, que sirvieron para elaborar rectas de regresión para cada uno de los pigmentos, en las que se correlacionaron las áreas obtenidas con las concentraciones.

En el cuadro 4, se puede observar la pequeña variación que sufren los tiempos de retención de los pigmentos en la columna, presentándose las mayores discrepancias, pero no superiores a 4.7 en el CV, para el primer pigmento en aparecer, la neoxantina, a partir de la cual dicho coeficiente va disminuyendo, alcanzando

el valor de 1.9, para el último pigmento del cromatograma, el β -caroteno.

Los coeficientes de variación de las concentraciones sobre nueve alícuotas del mismo extracto vienen expresados en el cuadro 4, en el que se puede observar que el mayor valor corresponde a la taraxantina, pigmento que se presenta en concentraciones muy bajas. Hemos de indicar que a pesar de haber encontrado un nuevo pigmento (L1), no lo hemos cuantificado, ni se ha considerado en resultados posteriores, ya que para ésto habría sido necesario, bien asignarle un coeficiente de extinción ficticio, o haber calculado éste, con el inconveniente del pequeño rendimiento que se puede obtener de las plantas, insuficiente para obtener una cantidad susceptible de ser pesada.

Una vez puesta en marcha la técnica de HPLC, se dispuso de la herramienta adecuada para determinar la influencia del solvente, en la eficacia de extracción de pigmentos fotosintéticos de material foliar.

Como puede apreciarse en el cuadro 5, no existen diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre el solvente ensayado y por lo tanto, elegimos la acetona 100 %, por varias razones, principalmente por la sencillez de disponer de un disolvente sin necesidad de mezclas, que en el caso de algún pequeño error podrían variar los coeficientes de

extinción de los pigmentos. Por otra parte, según algunos autores (Wintermans y De Mots, 1965), el metanol puede producir alomerizaciones.

El cuadro 6 permite deducir que para conseguir el mayor rendimiento de extracción deben utilizarse relaciones **área de hoja/volumen de extractante** muy bajas, puesto que para valores de la relación superiores a 0.185 hay una clara disminución de la concentración de clorofila total y en mayor medida de la cantidad de carotenoides, como puede deducirse teniendo en cuenta la relación clorofila/carotenoides. Teniendo en cuenta que la utilización de relaciones muy bajas nos obligaría a emplear grandes volúmenes de extractante, o bien a tomar muy pocos discos de hoja, lo cual perjudicaría la representatividad de la muestra, consideramos que la relación 0.185 proporciona un buen rendimiento de clorofilas y carotenoides, y además, la representatividad de la muestra es suficiente en la mayoría de los casos (5 discos de 0.37 cm² en 10 ml).

La disminución de clorofila en plantas deficientes viene acompañada por una alteración en la estructura de las membranas tilacoidales (Platt-Aloia et al., 1983), y de sus componentes de la membrana, incluyendo los pigmentos captadores de luz, clorofilas y carotenoides. Habitualmente se habla de una disminución de la relación clorofila/carotenoides (Terry, 1980; Shetty y Miller, 1981), debido a una mayor disminución relativa de las

clorofilas y carotenos respecto a las xantofilas (Terry, 1980; Bolle-Jones y Notton, 1953).

En condiciones de deficiencia de hierro, también pueden observarse cambios en la relación clorofila *a*/clorofila *b* (Diez-Altarés, 1959; Heras, 1960; Bindra, 1980; Terry y Abadía, 1986), si bien Spiller y Terry (1980) no aprecian diferencias significativa de esta relación en hojas de plantas de remolacha.

Resueltos los problemas referentes a la extracción, conservación (cuadro 7) y análisis de muestras, procedimos a estudiar cómo afecta la deficiencia de hierro a cada uno de los pigmentos fotosintéticos. Estos se representaron en función de la concentración de clorofila *a*, ya que las plantas deficientes en hierro tienen menor cantidad de clorofila por unidad de cloroplasto, que las normales.

Observando las figuras 4 y 5 referentes a la variación de neoxantina y violaxantina, el valor de las ordenadas en el origen de las rectas de correlación entre estos pigmentos y la clorofila *a* es de 0.046 y 0.07 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ respectivamente. Asimismo, el valor de la ordenada en el origen de la recta que representa al β -caroteno (figura 7), es de 0.01 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. La clorofila *b*, aunque no viene representada frente a la clorofila *a*, también tiene una ordenada en el origen cercana a cero, como se puede deducir de los valores de la gráfica en que viene representada la relación entre ambas

clorofilas (figura 8). Todo ésto demuestra que la disminución de clorofila a, lleva aparejada una disminución gradual de los pigmentos mencionados, y la desaparición de esta clorofila, produciría una ausencia de todos los pigmentos, a excepción de la luteína.

La luteína (fig. 6), cuando no hay clorofila a, tiene un valor de $0.6 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, lo que nos indica que este pigmento es el menos afectado por la deficiencia de hierro.

Estos resultados confirman el que la xantofilas disminuyan en menor proporción que el resto de pigmentos (Terry, 1980), pero cómo nosotros demostramos, ésto es debido a la presencia de concentraciones relativamente altas de luteína.

El valor atípico de la ordenada en el origen de la luteína, explicaría por qué las hojas con deficiencia de hierro presentan tonalidades cada vez más amarillas, según va disminuyendo la concentración de clorofila, ya que este pigmentos es el único que puede dar color a las hojas.

Los resultados presentados en las figuras 4 a 7, demuestran que, una supuesta hoja carente de clorofila a, solamente contendría luteína, ya que su ordenada en el origen es la única que tiene un valor significativamente distinto de cero ($0.6 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$). En este supuesto, puede pensarse que no existe estructura

tilacoidal, y por lo tanto teniendo en cuenta que como indican Nishio y Terry (1983), los cloroplastos deficientes en hierro no contienen cuerpo prolamelar, por lo tanto esta xantofila tendría que estar localizada en otros lugares distintos aparte del tilacoide, como podrían ser los glóbulos osmiofílicos o bien las membranas de envoltura del cloroplasto.

Los valores de la relación clorofila *a*/clorofila *b* que figuran en la bibliografía, en condiciones normales suelen oscilar entre 2.5 y 3.5. Si observamos la figura 8, se aprecia que esta relación se mantiene prácticamente constante con un valor alrededor de 3, para valores superiores a 5 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de clorofila *a*. En el caso de plantas con una concentración de clorofila *a*, inferior a 5 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, la relación entre ambos tipos de clorofila aumenta espectacularmente, debido a que la clorofila *b* disminuye en mayor proporción.

Una posible explicación para el incremento de esta relación que se encuentra en hojas afectadas por deficiencia inducida de hierro, podría ser la fotodescomposición de la clorofila *b*.

En algunos casos de deficiencia de hierro, además de la ausencia de uno o varios elementos, interviene el factor luz, que actúa acentuando los síntomas de amarillez. Virgin (1955) demostró que con altas intensidades de luz, se produce menos clorofila, fenómeno que atribuye a la destrucción del pigmento y no

a la falta de formación del mismo. Sagronsky (1956), observa que cuando se reduce la intensidad de luz en un 48%, se forman mayores cantidades de clorofila, en plantas de tomate, mientras que para intensidades crecientes de luz disminuye el contenido en clorofila, permaneciendo constante la relación a/b .

Aach (1954), trabajando con *Chlorella*, encuentra que las formas menos oxidadas; por lo tanto la cloropfila a desaparece antes.

Strain (1949) afirma, que la clorofila b es más susceptible a la fotooxidación que la a . Myers (1940), muestra que la relación clorofila a/b , es idéntica en luz y oscuridad. Smith y Koski (1947, 1948), encuentran en plantas cultivadas en oscuridad un valor normal de la relación entre clorofilas, y según estos autores la iluminación no tiene influencia sobre estos pigmentos.

Diez-Altare (1959), trabajando con peral y cacahuete, afectados por clorosis calcárea, observó un aumento del contenido en clorofilas, en ambas clases de material, al disminuir en un 98% aproximadamente la intensidad de la luz. Asimismo, observa que la fotodescomposición de la clorofila por influjo de altas intensidades de luz, llegando a la conclusión de que la forma b de la clorofila, es la más fotolábil.

Los datos representados en las figuras 29 y 30, demuestran que, en plantas no deficientes, es decir con

el característico color verde (gráfico A), la clorofila *a* disminuye en la oscuridad, mientras que la clorofila *b*, permanece constante. Esto explica que la relación entre ambas clorofilas disminuye durante los periodos de oscuridad, como se observa en el gráfico A de la figura 31.

En plantas deficientes (gráficos B), tanto la clorofila *a*, como la *b* se incrementan durante el periodo de oscuridad, mientras que en las fases luminosas disminuyen notablemente. Esto parece indicar que, aunque el hierro no interviene en la síntesis de clorofilas, de alguna forma juega un papel en la fotoprotección de estos pigmentos, y la relación entre ambas clorofilas prácticamente no varía durante el periodo de oscuridad.

Todo esto demuestra que los valores de las relaciones entre ambas clorofilas dependen de la presencia en mayor o menor proporción de hierro en el cloroplasto, lo que produce su enverdecimiento, y a su vez parece, que las clorofilas, hasta una concentración de clorofila *a* superior a $5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, no se encuentran afectadas significativamente por la luz. Al trabajar con material con un contenido en clorofila *a*, inferior a $5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, aparecen estas relaciones tan altas, debido a un disminución preferencial en el contenido de la clorofila *b*, sin poder especificar, si es debido a la fotodescomposición, o por el contrario, está motivado por el papel que parece jugar el hierro en su mecanismo de protección.

Según Díez-Altare (1959) el orden de destrucción de los pigmentos, en el caso de deficiencia inducida de hierro es:

Clorofila b → clorofila a → xantofilas → carotenos

Según nuestros datos (figura 26), en material normal, la luz no afecta a los pigmentos fotosintéticos (gráficos A). Sin embargo, en material deficiente (gráficos B), se observa una fotodestrucción, quedando más afectada, en porcentaje: clorofila b, clorofila a, β -caroteno y xantofilas.

Si como hemos dicho, a los carotenoides se les asigna el papel fotoprotector de las clorofilas, se podría pensar que debido a la deficiencia de hierro, las clorofilas no estaban suficientemente protegidas. Si sumamos los valores de los carotenoides y los dividimos por la cantidad de clorofila (cuadros 11-A, 13-A, 15-A, 17-A y 19-A) observamos que esta relación varía entre 0.34, para los casos más deficientes y 0.19 para el más recuperado, lo que demuestra que la cantidad de carotenoides por unidad de clorofila es mayor en el material más deficiente, y por tanto que hay suficiente cantidad de carotenoides para fotoproteger las clorofilas. Esto podría explicar el escaso o nulo papel de la luz en el mantenimiento de la relación a/b.

La figura 3 sirve para explicar la discrepancia entre distintos autores, ya que mientras unos mantienen

que esta relación es constante (Spencer y Possingham, 1960; Bottrill, Possingham y Kriedemann, 1970), otros afirman que aumenta (Stocking, 1975 y Bindra, 1980). Por lo tanto podemos afirmar que en plantas superiores la relación entre clorofilas puede ser constante o variable dependiendo del grado de deficiencia de la planta.

Las membranas tilacoidales contienen pigmentos unidos de forma no covalente a proteínas, formando los complejos pigmento-proteína que constituyen las piezas fundamentales de las estructuras del aparato fotosintético. El primer paso en el estudio de los complejos clorofila-proteína es la elección de un detergente adecuado para solubilizarlos y liberarlos de la matriz lipídica.

Para cada problema (desnaturalización, solubilización, estabilización, reconstitución,...) existe un detergente apropiado que se pueden agrupar en tres tipos: aniónicos, no iónicos y zwitterionicos. Todos rompen la bicapa lipídica de las membranas, separando los lípidos de los complejos protéicos, en condiciones características según el tipo. Para romper totalmente las membranas y separar cada uno de los componentes protéicos, a menudo los investigadores utilizan detergentes de tipo iónico, siendo los más usados el dodecilsulfato (SDS) y el laurilsulfato de sodio (LiDS).

La principal información que se obtiene de las proteínas solubilizadas con SDS, es la posibilidad de

calcular su peso molecular al someterlas a electroforesis y comparar su movilidad con patrones de proteínas conocidos, ya que éstas generalmente se hallan desnaturalizadas e inactivas. Asimismo, la solubilidad de este detergente permite utilizarlo en electroforesis sobre geles de poliacrilamida a temperaturas entre cero y cuatro grados.

Las membranas tilacoidales se diferencian en apiladas, formando los grana y las que están en contacto con el estroma, y por lo tanto no apiladas. Los polipéptidos de estas membranas están organizados en cuatro subunidades embebidas en una capa bilipídica: el PS II-LHC II, el PS I-LHC I, el citocromo b6-f y el CF₀-CP₁ ATPasa.

Análisis de los tilacoides procedentes de las membranas apesadas y no apesadas, demuestran que las cuatro subunidades mencionadas anteriormente están distribuidas desigualmente entre las capas lipídicas de los grana y las que están en contacto con el estroma.

Los primeros intentos de separar los complejos pigmento-proteína, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y solubilización de los tilacoides con SDS, pusieron de manifiesto la existencia de dos complejos clorofila-proteína, CP₁ y CP₂ (Ogawa, Obata y Shibata, 1966; y Thornber, 1975). Técnicas más recientes (Anderson, 1982) han servido para demostrar que el CP₁ consta de 2 o más complejos clorofila-proteína (CP₁ y

CP1a), y el CP2 puede resolverse en varios complejos captadores de luz (LHCP) y en el CPa. El CP1a, asociado con el fotosistema I, se trata posiblemente de una agrupación del CP1 con un captador de luz (Wild y Hurschel, 1980).

Los oligómeros y monómeros de los captadores de luz LHCP₁, LHCP₂, y LHCP₃, presentan una relación clorofila a/clorofila b de 1.1 a 1.9; en el CPa, asociado con el centro de reacción del fotosistema II, esta relación es más alta, (2.5-7) (Eskins, Duysen y Olson, 1983). El LHCP₃, tiene además de una relación a/b, baja (1.1-1.3), la luteína como principal carotenoide. El CP1 está caracterizado por relaciones a/b altas y el β -caroteno es el principal carotenoide (Lichtenthaler, Prenzel y Khun, 1982). La neoxantina, violaxantina y luteína son los carotenoides principales de los complejos captadores de luz, con una relación neoxantina/violaxantina de 1.4 a 3.2 (Eskins, Duysen y Olson, 1983).

El estudio de los complejos pigmento-protéicos, se realizó mediante la técnica de electroforesis solubilizando las membranas con SDS, según el método de Anderson (1982). Con este procedimiento y una vez realizada la densitometría correspondiente (figura 9), pudimos distinguir 8 bandas de color verde, de las cuales, tres pertenecían a complejos de centros de reacción (CP) y cuatro a los captadores de luz (LHCP). Con la técnica de Anderson, otros autores han conseguido

separar nuevas bandas pertenecientes a complejos antena, que denominaron LHCP_w y LHCP_v (Braumann, Weber y Grime, 1982; Lichtentahler, Prenzel y Khun, 1982; Prenzel y Lichtenthaler, 1982). La aparición de estas bandas podría deberse a la diferencia en el material vegetal utilizado por nosotros y los autores mencionados.

La densitometría de los geles se realizó a tres longitudes de onda distintas (672, 663 y 652 nm), para diferenciar las estructuras ricas en clorofila *a* o *b*, distinguiendo, de esta forma, los centros de reacción de los fotosistemas (ricos en clorofila *a*) y las antenas que se caracterizan por la presencia de cantidades importantes de clorofila *b*. La densitometría a 672 nm destaca las bandas electroforéticas con clorofila *a*, mientras que la realizada a 652 nm, evidencia la presencia de clorofila *b*. Al ser los centros de reacción más ricos en clorofila *a* que en clorofila *b* (cuadro 9-A), la densitometría a 672 nm, pondrá de manifiesto los centros de reacción, mientras que la lectura a 652 nm revelará, con mayor área, las correspondientes a los complejos captadores de luz, ya que en éstos, la cantidad de clorofila *b* es similar a la de clorofila *a* (cuadro 9-A). La densitometría a 663 nm, es la forma más usual de registrar los densitogramas de electroforésis de complejos pigmento-proteína, ya que expresa la contribución media de ambas clorofilas, como se deduce de los cuadros que recogen los valores de las integraciones (cuadros 12, 14, 16, 18 y 20).

Para la comparación de las bandas que se obtuvieron en los electroferogramas procedentes de muestras de cloroplastos deficientes o con distinto grado de recuperación, se realizaron los espectros de absorción de cada una de ellos. En los espectros correspondientes a los complejos de antena, se aprecia un hombro en las inmediaciones de 650 nm y un máximo a 470 nm, con ligeros desplazamientos, dependiendo de la proteína a la que estén unidas (figura 10). Asimismo, los espectros correspondientes a los centros de reacción, al tener mayoritariamente, clorofila *a*, quedan definidos por la falta de hombro a 650 nm y únicamente se detecta la presencia de clorofila *b*, en el CPa, por la meseta a 472 nm (figura 10).

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y solubilizando los tilacoides de remolacha con SDS, hemos encontrado tres complejos clorofila *a*-proteína, correspondientes a centros de reacción, según la nomenclatura de Anderson (1980): CP 1, CPa1 y CP a; y tres complejos captadores de luz clorofila *a/b*-proteína: LHCP₁, LHCP₂ y LHCP₃.

Al realizar el análisis de pigmentos de las bandas verdes sepradas por electroforesis, obtuvimos los datos del cuadro 9-A. En el que se observa, que el único complejo que es significativamente diferente del resto, por su contenido en xantofilas, es el LHCP₃, ya que las demás tienen valores inferiores. Queremos señalar el alto contenido en xantofilas (21%) que hemos encontrado

en el CPa, ya que por su caracter de centro de reacción, debía tener un contenido de estos pigmentos bastante menor, ya que supera, en concentración, a las otras dos antenas (LHCP₂ y LHCP₁). Una posible explicación del alto contenido en xantofilas en el CPa es que en los desarrollos electroforéticos realizados con la técnica de Anderson (1982), este complejo migra muy próximo al LHCP₃, lo que hace probable, que en el aislamiento de estas bandas se produzca contaminación entre ambas, pero esto contrasta, en cierta forma, con el contenido en clorofilas de ambos complejos, ya que de existir contaminación sería de todos los pigmentos y la relación entre clorofilas (cuadro 9-C) del CPa, sería menor. Esto parece indicar que el CPa es el centro de reacción con mayor contenido en xantofilas.

Al comparar las relaciones entre clorofilas de cada uno de los complejos (cuadro 9-C), podemos observar que hay dos grupos diferenciados, unos con valores de esta relación inferiores a 1.5 y otro con valores superiores a 5.5, lo que permite clasificarlos en complejos de centros de reacción y complejos de antena. La multiplicidad de antenas LHCP en electroforesis se atribuye a la formación agregados oligoméricos de alto peso molecular de un único LHC monomérico (Anderson, Waldron y Thorne, 1978). Si el LHCP₃ es considerado como el monómero del LHC II, debía esperarse una esquiometría entre pigmentos muy similar.

Analizando la relación entre las clorofilas *a* y *b*, en los complejos de antena se observa la semejanza entre el LHCP₃ y LHCP₁ (1.07 y 1.10 respectivamente), mientras que la correspondiente al LHCP₂, muestra un valor de 1.38. Por el contrario, teniendo en cuenta los resultados que se presentan en el cuadro 9-B, que se refieren a un contenido de clorofila *a* igual a 100, parecen indicar, tanto por la concentración de xantofilas, como de β -caroteno, que el LHCP₂ es independiente de los otros dos y que corresponden a estructuras diferenciadas. Estos datos confirman los resultados obtenidos en el análisis espectrofotométrico de las bandas de los complejos (figuras 10 y 11).

Mención especial merece el CP1a, ya que aunque la relación entre clorofila *a*/clorofila *b* la identifica con una antena, el resto de relaciones, la perfilan como un centro de reacción.

En la figura 9, se sitúa el CP1a detrás del CP1, y todos los complejos que aparecen en esa zona tienen una nomenclatura semejante, ya que se cree que pertenecen al fotosistema I.

En este estudio, se ha integrado el complejo CP1a, junto con el CP1, por tener características de centros de reacción, al tratarse de un oligómero del CP1 (Prenzel y Lichtenthaler, 1982); su densitometría ofrece valores muy bajos, y no aparece sistemáticamente en los corridos electroforéticos de todas las muestras.

El CP1 y el CP1a contienen, entre los dos el 24% de la clorofila total, según la densitometría realizada a 663 nm, siendo un 16% para el CP1 y un 8% para el CP1a (cuadro 8). En diferentes análisis del CP1a, Prenzel y Lichtenthaler (1982), demostraron que la relación entre clorofilas era más baja que la que obtenían para el CP1, indicando que la fracción CP1a contiene un componente de complejo de antena, pero no pudieron discernir si era propio del mismo complejo o por el contrario era una unidad oligomérica de alguno de los complejos de antena. Nuestros resultados confirman la naturaleza de antena de este complejo, ya que la relación entre las clorofilas (cuadro 9-C) es 5.73 para el CP1 y 1.37 para el CP1a. Por otra parte, el CP1 y CP1a, presenta una relación muy similar entre β -caroteno y xantofilas. Sin embargo la relación clorofila *b*/ β -caroteno, sugiere una estructura intermedia entre antena y centro de reacción. Por lo tanto, según nuestros datos, tampoco podemos distinguir si el CP1a, es un complejo que contenga ambas estructuras de forma intrínseca o por el contrario, se trata de dos complejos que, en nuestras condiciones de trabajo, tienen la misma movilidad electroforética.

Otro complejo con una relación entre clororofilas altas es el CPa, probablemente centro de reacción del fotosistema II, contiene aproximadamente un 12% de la clorofila total de los tilacoides (cuadro 8). Muestra una relación clorofila *a*/clorofila *b* de 6.48, semejante a la que presenta el CP1 (5.73). Lo mismo ocurre con la

relación clorofila *b*/ β -caroteno, lo que le confiere un caracter de centro de reacción, sin embargo, la cantidad de xantofilas (cuadro 9-B), es casi el doble que la que presenta el otro centro de reacción.

En los datos que aparecen en la bibliografía (Lichtenthaler, Prenzel y Khun, 1982; Prenzel y Lichtenthaler, 1982; Braumann, Weber y Grime, 1982; y Eskins, Duysen y Olson, 1983), la relación clorofila *a*/clorofila *b* muestra valores altos para los centros de reacción y próximos a la unidad, para los complejos de antena, lo que concuerda con los datos obtenidos, mediante nuestro análisis sobre las bandas electroforéticas.

En el resto de relaciones se puede observar que la referente a β -caroteno/xantofilas da valores extremadamente bajos para las estructuras de antena (cuadro 9-C), lo que es lógico si tenemos en cuenta que estos complejos son pobres en β -caroteno y ricos en xantofilas (Braumann y Grime, 1983). Por el contrario en estas estructuras, la relación entre clorofila *b* y β -caroteno es más alta, lo cual era de esperar ya que en las antenas se encuentra el mayor contenido en este tipo de clorofila (cuadro 9-B).

La luteína respecto a la clorofila *b* muestra una relación prácticamente constante, en los complejos de antena, lo que parece indicar que esta xantofila juega un especial papel en los complejos captadores de luz.

Ello puede deberse a que el grupo hidroxilo de la luteína interviene en la formación de un complejo entre los carotenoides y la clorofila, preferencialmente *b*, produciendo un campo eléctrico permanente (Eswe y Reich, 1977).

Una de las principales objeciones que se pueden oponer a establecer una relación porcentual de clorofilas y carotenoides para cada uno de los complejos clorofila-proteína, consiste en que aproximadamente un 17% de las clorofilas se encuentra no ligado a proteína, en la banda de pigmentos libres. En nuestras condiciones, el análisis, esta banda ha mostrado su contenido en xantofilas es aproximadamente de un 12%, un 4.32 de β -caroteno y una relación de clorofila *a*/clorofila *b* de 11. Teniendo en cuenta estos datos todo parece indicar que esta fracción proviene principalmente de complejos centro de reacción.

Como hemos citado en la introducción de la presente memoria, se pueden utilizar diversos sistemas experimentales para estudiar el desarrollo del cloroplasto. Así, la conversión de etioplasto a cloroplasto, bajo diferentes condiciones luminosas; la utilización de mutantes con carencia de clorofila *b* y por lo tanto con una estructura fotosintética distinta; la incubación de secciones tisulares con productos marcados o de bloqueo; son las vías seguidas más frecuentemente en este tipo de investigación. Nishio y Terry (1983), trabajando con remolacha y Guikema y

Sherman (1983) con cianobacterias, inician el estudio del desarrollo cloroplástico a partir de vegetales deficientes en hierro, a los que posteriormente se les suministra este elemento. La principal diferencia entre el estudio del desarrollo cloroplástico inducido por hierro y el resto de sistemas experimentales consiste principalmente, en que las plantas deficientes en hierro, aparentemente, no contienen cuerpo prolamelar, por lo tanto la síntesis de los tilacoides se realizará *de novo*, sin pasar por esta etapa.

En condiciones de deficiencia de hierro, las plantas de remolacha tienen los sistemas de captación de luz y de transporte electrónico muy disminuidos (Spiller y Terry, 1980; Taylor, Terry y Huston, 1982; y Terry, 1980), pero al volver a suministrar hierro a las plantas deficientes se produce una síntesis de pigmentos y en definitiva la desaparición de los síntomas de clorosis (Platt-Aloia, Thomson y Terry, 1983; Terry, 1979).

Durante las primeras horas de enverdecimiento se produce una síntesis preferencial de P_{700} (Nishio y Terry, 1983). de citocromo f (Nishio, Taylor y Terry, 1985). A las 48 horas del suministro de hierro, comienza la síntesis y ensamblaje de los complejos captadores de luz, como resultado, la relación clorofila a /clorofila b disminuye junto con la tasa de transporte electrónico. Entre 48 y 96 horas la síntesis de todos los componentes tilacoidales continúa incluyendo la de la mayor parte de clorofila y proteínas tilacoidales y la relación

clorofila a/clorofila b, adquiere valores normales (Terry y Abadía, 1986)

El estudio del desarrollo cloroplástico, lo hemos centrado, en la evolución que sufren los pigmentos fotosintéticos, así como los complejos pigmento proteína por la adición de hierro a plantas de remolacha deficientes en este elemento.

La obtención de un material homogéneo para el estudio del desarrollo cloroplástico fue una de las fases más críticas de solventar, ya que como se explica en el apartado correspondiente (pag 127), había que partir de hojas jóvenes con concentraciones uniformes de clorofila lo más bajas posible, que nos permitiera estudiar el mayor número de etapas en el desarrollo cloroplástico. Asimismo, hubo que elegir el material foliar que sirviera como referencia. Al tener las plantas no deficientes un grado de desarrollo mayor que las deficientes en hierro, antes de seleccionar las hojas, que debían servir como control, se procedió al estudio sistemático de pigmentos en cada una de las hojas (figura 12), obteniéndose los valores que se citan en el cuadro 10.

En el cuadro 10, puede observarse que, efectivamente, se dan diferencias cuantitativas, dependiendo de la edad fisiológica de la hoja; sin embargo, las relaciones entre clorofilas y entre clorofilas y carotenoides, son similares en todas las

hojas, exceptuando la más vieja, lo que es lógico, ya que ésta muestra síntomas de senescencia. Por lo tanto, comprobada la constancia en las relaciones, se puede concluir que la estructura básica, en cuanto a pigmentos, es la misma en todas las hojas de una planta verde de remolacha. Por lo tanto se eligieron como material de referencia, las hojas que tuvieran un tamaño aproximado a las que se tomaban para el estudio.

Por otra parte, se realizaron análisis electroforéticos, a partir de tilacoides de las hojas mencionadas y se comprobó que aparecían las mismas estructuras y se conservaban las relaciones entre ellas.

En el cuadro 11-A, se puede observar que la composición pigmentaria de las plantas deficientes difieren considerablemente frente a las de control. La relación entre clorofilas es mucho más alta (3.64 frente a 2.83), mientras que la relación entre clorofilas y carotenoides está disminuída prácticamente a la mitad (cuadro 11-C).

Puesto, que el pigmento mayoritario es la clorofila a y se le podría otorgar el papel principal en el desarrollo cloroplástico, aparte de los valores absolutos que alcanzan cada uno de los pigmentos durante las sucesivas etapas del desarrollo, se confeccionaron nuevos cuadros (señalados con la letras B, en este apartado), en los cuales se igualaba la concentración de clorofila a de la planta control con la deficiente. Para

hacer ambas concentraciones iguales se les dió el valor 100, a partir del cual se recalculó el valor porcentual relativo del resto de pigmentos fotosintéticos, en ambos materiales.

En el cuadro 11-B, observamos que mientras la concentración de luteína es extremadamente alta y el de β -caroteno es ligeramente superior, el resto de pigmentos está en menor proporción. Esto nos indica, que por la cantidad relativa de clorofila a hay un exceso de xantofilas, debido, como hemos indicado a la luteína, lo que nuevamente confirma, el comportamiento excepcional de este pigmento, en relación con el resto de xantofilas. La presencia de β -caroteno, en cantidad relativa superior al control, induce a pensar en la presencia de centros de reacción.

El valor de las xantofilas totales (cuadro 11-C) desciende prácticamente a la mitad, lo que nos nuevamente nos indica que, por la composición pigmentaria en el material deficiente, las estructuras fotosintéticas predominantes deberían ser centros de reacción, aunque si comparamos la relación más significativa, para calificar las estructuras como antena y centros de reacción (relación a/b), vemos que en ningún caso alcanza los valores encontrados en el análisis de pigmentos de los centros de reacción tenían los valores de 6.40 y 6.74 respectivamente (cuadro 9-C), por lo tanto, esto parece indicar que la estructuras

tendrían que ser centros de reacción con sus respectivas antenas.

La densitometría de los geles con muestras procedentes de material deficiente en hierro, a las tres longitudes de onda (figura 13), no revelan la totalidad revelado el resto de estructuras que aparecen en el material desarrollado en condiciones normales, ya que no aparecen las otras dos agrupaciones oligoméricas de antena LHCP₂ y LHCP₁, y el desdoblamiento del CP1 en CP1, CP1a y CP1a₁.

A partir de los datos sobre la composición pigmentaria de las hojas de remolacha deficientes y recuperadas, por aporte de hierro a la solución nutritiva, se elaboró el cuadro 21, en el que se expresan los porcentajes de aumento en la concentración, respecto al valor que presentaban en los días precedentes.

Esta forma de expresar la evolución permite apreciar que pigmento está más influenciado por el hierro, así como las fases de esta evolución.

Cuadro 21

Porcentaje de aumento de concentración ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)
del día señalado en abscisas respecto al de ordenadas

	Días de adición				
	1	2	3	4	
Neoxantina	-3	42	127	263	0
		45	133	272	1
			60	156	2
				60	3
Violaxantina	190	281	419	473	0
		31	79	97	1
			36	50	2
				10	3
Luteína	-15	-14	11	39	0
		-2	32	65	1
			36	68	2
				25	3
Clorofila <i>b</i>	6	58	189	338	0
		49	172	312	1
			82	176	2
				52	3
Clorofila <i>a</i>	23	81	180	281	0
		47	128	210	1
			55	111	2
				36	3
β -caroteno	26	91	179	255	0
		52	122	183	1
			47	87	2
				27	3

A la vista del cuadro 21 puede apreciarse que la concentración de neoxantina no sufre variación en el primer día del aporte, pero a partir de las 48 horas tiene un aumento regular (45, 60 y 60%). Este pigmento, desde el día 0 hasta las 96 horas, incrementa su concentración en hoja aproximadamente 2.6 veces, lo que indica que en plantas verdes normales, la neoxantina no es fotolábil.

La violaxantina es el pigmento más influenciado por el aporte hierro, puesto que a las 24 horas multiplica por 2 su concentración en el material deficiente, ascendiendo regularmente en los días sucesivos, hasta alcanzr una concentración final ≈ 4.7 veces la inicial.

El caso de la luteína es también atípico, pero al contrario que la violaxantina, desciende su concentración a las 24 horas, apreciándose un ligero aumento a partir de las 72 horas de la adición de hierro, de forma que su concentración a las 96 h es, tan solo, un 0.39% más alta que la de partida.

Los porcentajes de aumento de la clorofila *b*, solo se asemejan a los de la neoxantina, puesto que en el primer día de la recuperación solo aumenta en un 6%, y a las 48 horas comienza el ascenso progresivo hasta alcanzar una concentración final 3.4 veces mayor que la del día 0 del aporte de hierro.

La clorofila *a* y el β -caroteno, tienen una evolución similar, lo que demuestra que forman parte del mismo tipo de estructuras.

La relación clorofila *a*/clorofila *b* es uno de los mejores indicadores del aparato fotosintético. Relaciones altas entre estos dos pigmentos indican, de forma aproximada, la proporción que existe entre los principales componentes del aparato fotosintético. En

nuestras condiciones, se observa un aumento de la relación a las 24 horas del suministro de hierro (de 3.74 en el estado inicial a 4.21), que se mantiene durante las siguientes 24 horas (4.15) y posteriormente desciende paulatinamente hasta alcanzar el nivel normal en plantas verdes (≈ 2.9) (Figura 24).

Para poder observar la evolución de estructuras fotosintéticas en conjunto, hemos agrupado las figuras que representan las densitometrías correspondientes a los electroferogramas realizados en cada una de las etapas del desarrollo cloroplástico que se produce al adicionar hierro a plantas deficientes. Las figuras 34, 35 y 36, muestran las densitometrías de las mencionadas electroforesis a 663, 652 y 672 nm.

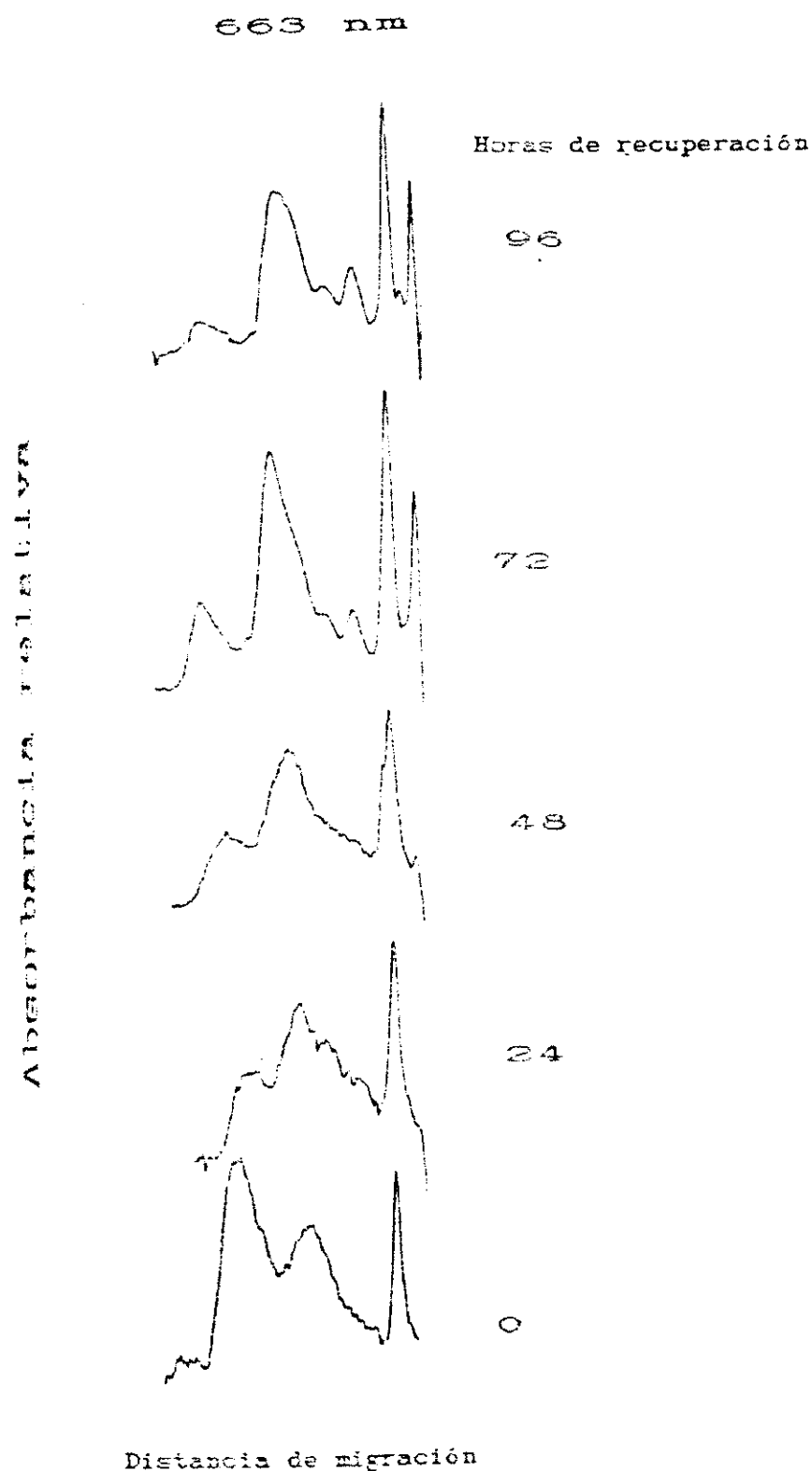


Fig. 34 Evolución de las estructuras fotosintéticas a lo largo del tiempo de recuperación por hierro de plantas de remolacha deficientes. Densitogramas a 663 nm.

672 nm

FF LUCP₂ C₁a LUCP₂ LUCP₁ C₁ C₁a

Absorbancia relativa

Horas de recuperación

96

72

48

24

0

Distancia de migración

Fig. 35 Evolución de las estructuras fotosintéticas a lo largo del tiempo de recuperación por hierro de plantas de remolacha deficientes. Densitogramas a 672 nm

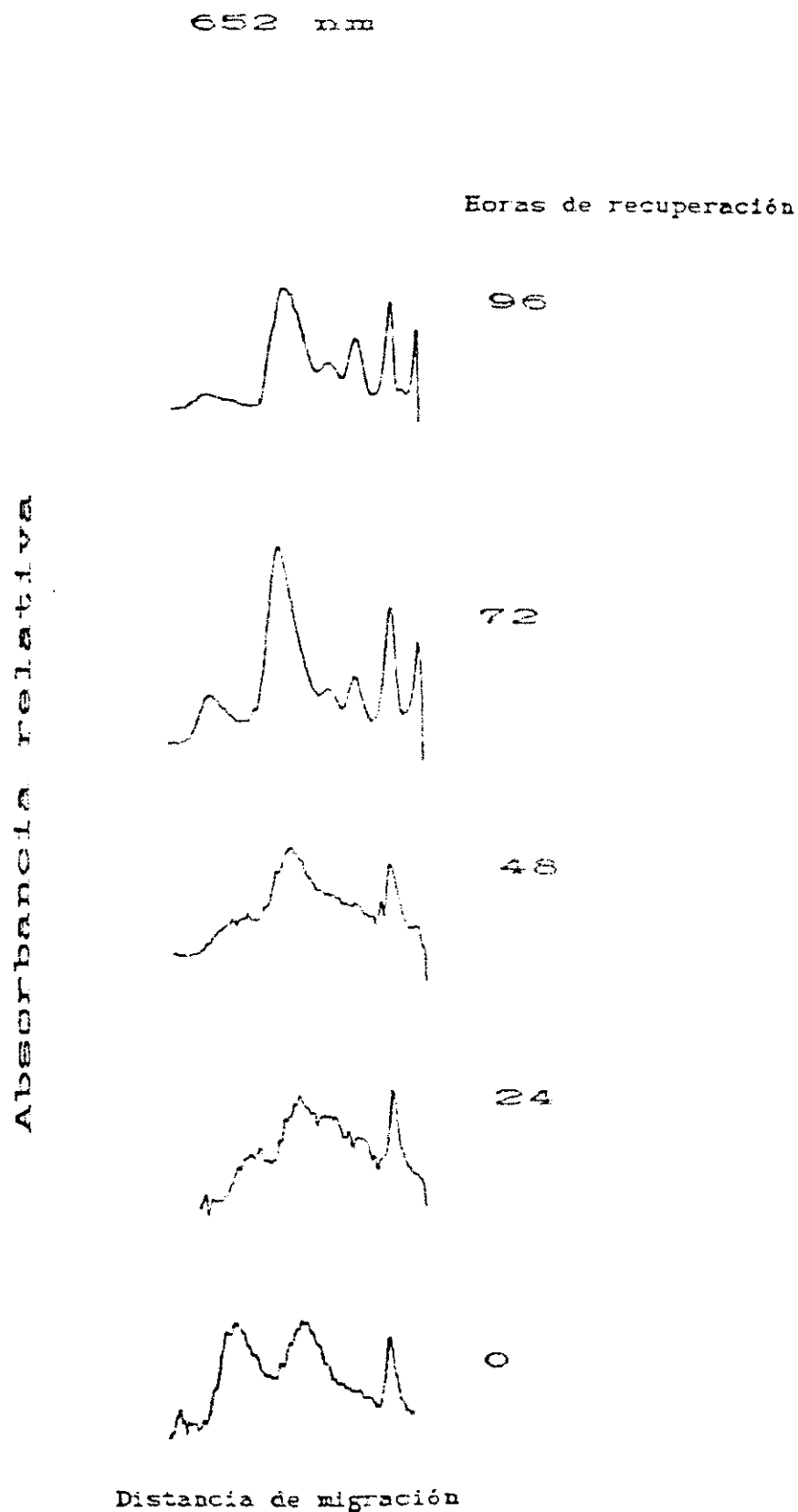


Fig. 36 Evolución de las estructuras fotosintéticas a lo largo del tiempo de recuperación por hierro de plantas de remolacha deficientes. Densitogramas a 652 nm.

Durante los tres primeros días del aporte de hierro, el aspecto de los densitogramas (figuras 34-36), es muy similar, indicando, que de existir cambios en la estructura tilacoidal, serán a nivel de desarrollo del sistema lamelar, puesto que la no aparición de CPa, indica la falta de estructura granal, ya que el complejo PS II-LHC II, está localizado en las zonas granales, mientras que el PS I-LHC I se encuentra exclusivamente en las partes no apresadas. (Anderson, 1982; y Anderson, 1981). A partir de las 72 horas las plantas de remolacha cultivadas en hidropónico, deficientes en hierro, comienzan a recuperar la compleja estructura de asociación entre pigmentos y proteínas, hasta que se alcanza la normalidad al cabo de los 5 días del suministro de hierro a la solución nutritiva.

También puede apreciarse este paso fundamental, en los gráficos A de las figuras 18, 19, 20, 22 y 23, en los que se aprecia que existe un periodo crítico de 48 horas, en el que los aumentos de concentración de pigmentos son mínimos, y en algún caso, como la luteína, incluso descienden.

Hasta la fecha no se ha seguido la evolución de los pigmentos fotosintéticos durante las primeras horas del desarrollo cloroplastico inducido por hierro. Es evidente que la estructura cloroplástica se modificara

en este proceso, y que las principales unidades funcionales de la fotosíntesis (antenas y fotosistemas) sufriran cambios y reestructuraciones, que se pondrán de manifiesto, entre otros parámetros, en la composición pigmentaria. Desde este punto de vista, se planteó investigar las primeras 74 horas de desarrollo cloroplástico que, tras los ensayos en que la toma de muestras se realizaba cada 24 horas, parecen ser las cruciales, para que el aparato fotosintético sea funcional.

El estudio detallado a intervalos de tiempo más cortos de la relación clorofila *a*/clorofila *b*, demuestra que a las 24 aumenta este valor, que continúa siendo alto a las 48 horas (figura 31).

La neoxantina (figura 26) y el β -caroteno (figura 32) aumentan de forma más o menos lineal, pero la luteína tiene un comportamiento distinto, ya que parece que no hay variación en la concentración de este pigmento a lo largo del periodo de tiempo estudiado. El aumento más drástico parece sufrirlo la violaxantina ya que a las 3 horas de recuperación triplica la concentración inicial y a las 7 horas es aproximadamente 10 veces más alto. También puede destacarse la fluctuación que tiene la concentración de este pigmento con arreglo al tiempo de iluminación, que aunque se aprecia en el resto de pigmentos, la influencia no es tan evidente.

El descenso de concentración de neoxantina que se aprecia en la figura 26-B podría indicar que, en material deficiente, el hierro debe desencadenar un mecanismo protector de este pigmento, ya que prácticamente, una vez superada la fase de destrucción, sus niveles de concentración permanecen constantes, lo que indica que la luz no tiene una excesiva influencia en el catabolismo de la neoxantina.

En la figura 26-C que refleja la evolución de este pigmento durante el desarrollo cloroplástico, podemos observar, en las tres primeras horas, un descenso similar al que se produce en el gráfico B, pero cada vez menos acusado, debido posiblemente a las cantidades crecientes de hierro en hoja, lo que explicaría el brusco incremento que sufre entre las 70.5 y 74.5 horas, ya que estas hojas deben tener tasas de hierro similares o incluso superiores a las de una normal.

La violaxantina es el pigmento mayoritario de las membranas de envoltura del cloroplasto (Lichtenthaler, et al., 1981), y por lo tanto, el aumento que sufre este pigmento a las 24 horas del aporte de hierro (cuadro 21), podría indicar, por comparación con el resto de pigmentos, que su síntesis, al menos en las primeras etapas del desarrollo cloroplástico, sigue pautas distintas al resto de pigmentos. Esto podría indicar que al aportar hierro a una planta deficiente, se produciría, en primer lugar, una expansión de la membrana externa, que permitiese el asentamiento de las

asentamiento de las estructuras tilacoidales, que se formen *de novo*. No obstante, esta teoría, que podría ser lógica, se rebate al realizar el estudio de la evolución de pigmentos, a intervalos de tiempo más cortos. En la figura 27, puede apreciarse un disparo instantáneo de la concentración de violaxantina a las tres horas y media del aporte de hierro, de donde se deduce que no debe tratarse de un proceso de síntesis, sino de interconversión de algún otro pigmento, en violaxantina.

Al comparar el comportamiento de plantas sometidas a desarrollo cloroplástico (figura 27-C), con las de control verde y clorótico (figuras 27-A y 27-B), se deduce que el drástico incremento que sufre este pigmento durante las primeras horas del aporte de hierro, no puede deberse a su evolución natural, ya que los controles no se comportan de la misma forma, e incluso, en el clorótico desciende rápidamente la concentración cuando comienza la fase luminosa.

En las figuras 27-C y 28-C, se observa que la luteína decrece en la misma proporción que aumenta la violaxantina, por lo tanto puede existir un equilibrio luteína $\leftrightarrow$ violaxantina o bien zeaxantina $\leftrightarrow$ violaxantina, aunque nuestro sistema cromatográfico no sea capaz de separar la zeaxantina del pico de luteína.

En el segundo periodo de la figura 27-C, el nivel de violaxantina es bastante considerable, y también se observa una brusca caída en las primeras horas de

iluminación, lo que parece demostrar que en plantas deficientes, este pigmento se destruye fácilmente con la luz. Por otra parte, el hierro debe desencadenar algún mecanismo de protección frente a la misma, ya que en los primeros periodos de luz de los siguientes ciclos, aunque sigue produciéndose una disminución de concentración, ésta es cada vez menos acusada, llegando a estabilizarse en las últimas horas del estudio. Asimismo, en todos los ciclos de luz de la figura 27-C, se puede apreciar una síntesis de este pigmento, mostrando un gráfico muy semejante al de las plantas control (figura 27-A), a excepción de las primeras horas de luz, o en fase de oscuridad, ya que aunque se trata de plantas a las que se les ha aportado hierro, el mecanismo de regulación de este pigmento se asemeja más al del control B.

Queremos señalar que como se demostró anteriormente (figura 6), la luteína es la xantofila mayoritaria en plantas e incluso, hipotéticamente, en los casos más acusados de deficiencia, llegaría a sobrepasar los valores de clorofila a. Esta característica le proporciona un tratamiento especial, ya que si consideramos las posibles interconversiones entre pigmentos, nos podría indicar que en plantas deficientes, esta concentración no esperada, constituye la base inicial de formación del resto carotenoides.

La figura 28-A expresa claramente que este pigmento, en plantas sin stress de hierro, no se ve

afectado por la luz, ya que la concentración permanece prácticamente constante durante las fases oscura y luminosa. Sin embargo, este factor si que afecta a la concentración de este pigmento en plantas deficientes (figura 28-B), ya que disminuye durante la fase luminosa, sin embargo, no se observa ningún cambio durante la fase de oscuridad.

El conjunto neoxantina, violaxantina y luteína forman parte de las xantofilas, que nuestro sistema cromatográfico permite separar. Como se ha indicado anteriormente, las xantofilas constituyen los pigmentos principales de protección de las clorofilas, en los complejos de antena, lo que nos permite tratar estos tres pigmentos globalmente. Los gráficos A de las figuras 26, 27 y 28, indican que durante las primeras horas de iluminación se produce un incremento, lo que indicaría que la formación *de novo* de estos pigmentos está favorecida por la luz, exceptuando a la violaxantina. En plantas deficientes (figuras B), no parecen apreciarse modificaciones significativas a excepción de la luteína, que tiene un ligero aumento durante las primeras tres primeras horas, pero éste no guarda una proporción estequiométrica con la disminución de las otras dos, lo que parece indicar que esta síntesis, se produce por otras causas.

Tratamiento especial merecen las plantas con desarrollo cloroplástico, puesto que todo parece indicar que existe un antagonismo entre la violaxantina y la

luteína. Si observamos los gráficos C de las figuras 27 y 28, podemos apreciar que mientras la violaxantina se incrementa en $2 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, en las primeras 7.5 horas, la luteína sufre aproximadamente la misma disminución, lo que es posible, ya que este tipo de interconversión entre estas dos xantofilas ha sido demostrado por otros autores (Porter y Anderson, 1967).

Aunque existen otras interconrversiones entre pigmentos: violaxantina/anteraxantina/zeaxantina, como hemos indicado, nuestro sistema no se ha mostrado lo suficientemente eficiente como para detectar la presencia de zeaxantina, que podría estar enmascarada dentro del pico de la luteína, lo que proporcionaría la vía de relación entre las oscilaciones que presentan la violaxantina y los datos mostrados por nosotros, como luteína. Asimismo, en las plantas control (gráficos A y B), indican un comportamiento distinto de la neoxantina y luteína, respecto a la violaxantina, ya que mientras las dos primeras, en ambos controles durante la fase de oscuridad, no presentan alteraciones en su concentración, la violaxantina en plantas no deficientes (grafico A), durante la esta fase, desciende significativamente, mientras que en plantas deficientes se incrementa. Este particular comportamiento podría deberse a que la violaxantian en pequeñas concentraciones estaría en la membrana que rodea al cloroplasto y no en los tilacoides (Lichtenthaler, et al., 1981).

La evolución de la clorofila *b* en los tres tipos de plantas estudiadas, se muestra en la figura 29. El gráfico A y el B corresponden a la evolución de este pigmento en plantas normales y deficientes respectivamente. El incremento que se produce durante la fase de oscuridad, en las hojas deficientes, demuestra que este pigmento se encuentra muy afectado por la luz. Asimismo, parece ser que el hierro juega un papel en el sistema de protección, ya que mientras en plantas normales (gráfico A), hay una síntesis hasta las primeras 7.5 horas, en el B se observa una brusca caída en la concentración. El gráfico C muestra que el comportamiento de las plantas sometidas a desarrollo cloroplástico, el difiere del de las plantas deficientes, ya que en las tres fases oscuras, la concentración se mantiene o incluso desciende, lo que demuestra su asociación con las xantofilas como captadores de luz, ya que la neoxantina y la luteína también descienden durante la fase de oscuridad. El comportamiento de la clorofila *b*, durante la primera fase del desarrollo cloroplástico, parece indicar que hay un equilibrio entre el sistema de protección que puede ejercer el hierro y el efecto destructivo de la luz, dando lugar a una fase de "lag", sin embargo en los siguientes ciclos de iluminación se observa que este pigmento se sintetiza cada vez en mayores cantidades: en el segundo periodo se incrementa durante las primeras nueve horas, y en el tercero continúa el aumento, prolongándose hasta las 13.5 horas.

Durante las primeras 48 horas, apenas se registraron cambios en la concentración de la clorofila b (figura 28-C), confirmando los resultados que aparecen en la figura 19. Queremos hacer notar que este gráfico es muy similar al de la neoxantina, por lo que parece que ambas síntesis son paralelas, y por lo tanto podría apuntarse que ambos pigmentos se localizan en el mismo tipo de estructuras.

La clorofila a es el pigmento mayoritario en las estructuras fotosintéticas. Forma parte principalmente de los centros de reacción y en menor proporción de las antenas. El gráfico A de la figura 29, demuestra que este pigmento se sintetiza durante la fase luminosa, debido probablemente a su mayor requerimiento, para la captación de luz y el transporte electrónico, mientras que en el periodo de oscuridad hay una disminución en la concentración debido posiblemente, a la falta de actividad fotosintética. El gráfico B, nos indica que el hierro interviene como protector de la fotodestrucción de este pigmento, puesto que se observa un incremento en la concentración durante la fase de oscuridad. También podría deducirse que hay una síntesis continua de clorofila a, y que su disminución se debe a la falta de membranas tilacoidales, ya que el hierro regula el desarrollo de las mismas (Platt-Aloia, Thomson y Terry, 1983).

La evolución de la clorofila a, en plantas sometidas al desarrollo cloroplástico, queda

representada en el gráfico C de la figura 30, en el que se observa, durante el primer periodo de fase luminosa, un descenso en la concentración de este pigmento, como ocurre en el caso de las plantas deficientes, pero en los periodos sucesivos, una vez que ha llegado el hierro al cloroplasto, se encuentra una situación similar a la del gráfico A. Este gráfico parece indicar que la clorofila a comienza a acusar los efectos del aporte de hierro en la solución nutritiva a partir de las ocho primeras horas.

El caso de la clorofila a (figura 29-C) es similar al de la b, respecto a la posibilidad de superposición de este gráfico con el del β -caroteno, puesto que tiene un aumento lineal, y los cambios de concentración se dan en los mismos periodos de tiempo, por lo que como en el caso anterior, se confirma que ambos pigmentos deben estar en las mismas estructuras.

La relación entre las dos clorofilas permite diferenciar la distinta proporcionalidad entre centros de reacción y antenas. El gráfico A de la figura 30, que representa la relación clorofila a/clorofila b, en una planta no deficiente, muestra que durante las fases luminosas, esta relación aumenta debido a un incremento de la clorofila a (figura 30), y por lo tanto a una mayor proporción de centros de reacción, ya que si éste se debiera a una mayor formación de antenas, la clorofila b tendría que incrementarse en proporciones semejantes, puesto que esta relación en los complejos

de antena es de alrededor de 1 (pag 126). La clorofila b, unicamente se incrementa durante las primeras 8 horas, pero este aumento no es proporcional al de la clorofila a, por lo tanto durante este periodo, aparte de sintetizarse las antenas, debe existir una mayor proliferación de centros de reacción.

El gráfico B muestra el desarrollo de esta relación durante 24 horas en plantas deficientes, en el que se puede observar un descenso durante las primeras 8 horas, a partir de las cuales hay un ligero incremento, que puede estar motivado por una mayor disminución de la clorofila a, y por lo tanto a una fotodestrucción preferencial de los centros de reacción. Esta relación no varía durante la fase de oscuridad, ya que se sintetizan ambas clorofilas en igual proporción, lo que nuevamente demuestra que la síntesis de clorofilas parece no estar interrumpida por la falta de luz.

El incremento en la relación, en plantas sometidas a desarrollo cloroplástico (gráfico C), se debe probablemente a una síntesis preferencial de clorofila a y por lo tanto a una mayor necesidad, en este tipo de plantas, de centros de reacción. La caída brusca entre 51-55 horas se debe a que es el periodo de tiempo en el que mientras la clorofila a sufre un incremento proporcional al de los otros periodos, la clorofila b aumenta bruscamente, lo que podría indicar que durante los dos primeros días del aporte de hierro, los cloroplastos sufren modificaciones en su estructura

encaminadas a incrementar la cantidad de centros de reacción, mientras que a partir de este momento, al existir una síntesis relativamente más alta de clorofila *b* las estructuras de antena comienzan a equilibrarse con los centros de reacción.

En la figura 32 se estudia la variación de la relación clorofila *a*/clorofila *b*, que nos permite ver si la cantidad de luz recibida modifica la relación entre centros reacción (representados por la cantidad de clorofila *a*) y de captadores de luz (representado por la clorofila *b*). Asimismo, en el control deficiente se puede observar si el hierro estabiliza esta relación. Excepto en el primer periodo de iluminación que desciende la relación, por destrucción de clorofila, como se aprecia en la figura 36, esta relación aumenta durante las primeras 24 horas de forma constante, con un máximo a las 27 horas del aporte de hierro, lo que está de acuerdo con la bibliografía (Spiller y Terry, 1980). Siguiendo el estudio de la figura 32, se aprecia que a las 31 horas ha descendido el nivel de la relación clorofila *a*/clorofila *b*, seguido de un suave aumento que llega hasta las 51 horas. En el 3 día de enverdecimiento, es decir a las 55.5 horas vuelve a producirse el descenso de la relación, pero no por destrucción de clorofila *a*, sino por un mayor aumento del nivel de *b*, como puede observarse en las figuras 29 y 30. A las 74 horas del aporte de hierro baja la relación, hasta un nivel próximo al que tienen las hojas normales.

El β -caroteno es el pigmento al que se le asigna una localización más específica en los centros de reacción que en las antenas, por lo tanto su comportamiento debe ser similar al de la clorofila a. El gráfico A muestra que hay una síntesis en plantas no deficientes durante las primeras 8 horas, a partir de las cuales su concentración se mantiene constante, no teniendo ninguna influencia el periodo de fase oscura. Si este comportamiento se compara con el de la clorofila a, se puede observar que es bastante diferente, ya que hay síntesis de la misma durante el periodo luminoso y catabolismo durante la fase de oscuridad. Esto parece indicar que en plantas normales, el β -caroteno, debe tener su ubicación en distintos lugares que la clorofila a, ya que al haber formación de centros de reacción debería existir una proporcionalidad en la síntesis de β -caroteno.

Como se mencionó anteriormente, la relación clorofila/carotenoides, podría ser un buen indicador del estado de desarrollo cloroplástico de las plantas, ya que refleja el grado de coloración de la hoja. Valores de esta relación por encima de 3.5 indican un claro predominio del color verde y por debajo de este valor se destacan los amarillos, debido a la mayor presencia de xantofilas, principalmente de la luteína. El gráfico A de dicha relación muestra un incremento continuo, descendiendo ligeramente durante la fase de oscuridad, este comportamiento es lógico ya que en plantas sin ningún tipo de deficiencia el pigmento mayoritario es la

clorofila a, acusando únicamente una pequeña discrepancia durante la evolución nocturna, ya que mientras las clorofilas descienden en su concentración, los carotenoides se mantienen prácticamente constantes.

La figura 33-B muestra esta relación en plantas deficientes, observandose un aumento relativo de carotenoides durante la fase luminosa, debido a la mayor fotolabilidad de las clorofilas. Este gráfico es similar al de las clorofilas a y b. En el gráfico C se observa cómo esta relación va incrementándose en los distintos días. Queremos destacar que las desviaciones obtenidas en estos resultados eran muy grandes, pero según aumenta el valor de la relación se iban haciendo cada vez menores.

CONCLUSIONES

- 1 El sistema de HPLC utilizado permite separar, identificar y cuantificar: neoxantina, violaxantina, luteína, clorofila b, clorofila a y β -caroteno, en menos de cinco minutos. Mediante este método se ha demostrado que los solventes orgánicos utilizados para la homogeneización de material vegetal tienen idéntica capacidad extractora, pero en ningún caso se debe sobrepasar la relación 0.185 cm^2 de hoja por ml de solvente o de 41 mg de peso fresco/ml.
- 2 Los pigmentos fotosintéticos, en remolacha, están correlacionados linealmente con el grado de deficiencia de hierro. En casos extremos de esta carencia, la luteína es el único pigmento fotosintético que no llega a desaparecer. La relación entre clorofilas aumenta a partir de concentraciones de clorofila a inferiores a $5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$.
- 3 El desarrollo cloroplástico inducido por el aporte de hierro a plantas de remolacha con hojas que tengan una concentración de clorofila inferior a $5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, queda prácticamente ultimado a las 96

horas del aporte de y hasta las 72 horas no comienzan a diferenciarse las distintas estructuras fotosintéticas.

- 4 A excepción de la neoxantina y la luteína, el resto de pigmentos fotosintéticos están influenciados por la luz, tanto en los materiales de control verde y clorótico, como durante el proceso de desarrollo cloroplástico inducido por hierro.

A N E X O
D E
B I B L I O G R A F I A

Aach, H. G. (1954) *Zeits. für Naturforsch.* 96, 481-486
(Citado por Calvo, 1965)

Albertsson, P. A., Andersson, B., Larsson, C. y
Akerlund, H. E. (1982) Phase partition- a
method for purification and analysis of cell
organelles and membrane vesicles. *Methods of
Biochemical Analyses* 28, 115-150.

Allinger, N. L., Cava, M. P., De Jongh, D. C., Lebel, N.
A. y Stevens, C. L. (1978) *Química orgánica.*
Vol 2. Reverte. Barcelona.

Anderson, J. M., Waldron, J. C. y Thorne. S. W. (1978)
Chlorophyll-protein complexes of spinach and
barley tilakoids. Spectral characteristics of
six complexes resolved by an imprved
electrophoretic procedure. *FEBS Letters.* 92,
227-233.

Anderson, J. M. (1980a) Chlorophyll-protein complexes of
higher plant thylakoids, distribution
stoichiometry and organisation in the
photosynthetic unit. *FEBS Letters.* 117, 327-
331.

- Anderson, J. M. (1980b) P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 591, 113-126.
- Anderson, J. M. (1981) Consequences of the spatial separation of photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters*, 124, 1-10.
- Anderson, J. M. (1982a) The significance of grana stacking in chlorophyll b-containing chloroplasts. *Photobiochemistry and Photobiophysics*. 3, 225-241.
- Anderson, J. M. (1982b) The role of chlorophyll-protein complexes in the function and structure of chloroplast thylakoids. *Mol. Cell Biochem.* 46, 161-172.
- Anderson, J. M. y Andersson, B. (1982) The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends in Biol. Sci.* 7, 288-292.
- Anderson, J. M. (1984) Molecular organization of chloroplast thylakoid membranes. En: *Advances in photosynthesis research*. (C. Sybesma, ed.) Vol III. pp 1-10 Nijhoff/Junk. The Hage.

- Andersson, B. y Haehnel, W. (1982) Location of photosystem II reaction centres in different thylakoid regions of stacked chloroplasts. *FEBS Letters* **146**, 13-17.
- Armond, P. A. y Arntzen, C.J. (1977) Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamellae. *Plant Physiology* **59**, 398-404.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxydase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15
- Barber, J., Mills, J. y Love, A. (1977) Electrical diffuse layers and their influence on photosynthesis processes. *FEBS Letters*. **74**, 174-181
- Barber, J. y Chow, W. S. (1979) A mechanism for controlling the stacking and unstacking of chloroplasts thylakoid membranes. *FEBS Letters*. **105**, 5-10.
- Barber, J. (1980a). An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I. *FEBS Letters*. **118**, 1-10.

- Barber, J. (1980b) Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 594, 261-295.
- Bengis, C. y Nelson, N. (1979) Subunit structure of chloroplasts photosystem I reaction centre. *J. Biol. Chem.* 252, 4564-4569.
- Bennoun, P. y Jupin, H. (1974) The relationship between thylakoid stacking state I and state II phenomena in whole cells and the cation effects in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. En: Proceedings of 3rd International Congress on Photosynthesis, (ed. M. Avron) pp 163-169. Elsevier. Amsterdam.
- Bindra, A. S. 1980. Iron chlorosis in horticultural and field crops. *Annu. Rev. Plant Sciences* II, 221-312.
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. and Douce, R. 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 12011-12018.

- Boardman, N. K., Anderson, J. M. y Goodchild, D. J. (1978) Chlorophyll-protein complexes and structure of mature and developing chloroplasts. En: Current topics in Bioenergetics (ed. D. R. Sanadi y L. P. Vernon) Vol 7. pp 35-109. *Academic Press*. New York.
- Bolle-Jones, E. W., y Notton, B. A. (1953) The relative proportions of the chloroplast pigments as influenced by different levels of iron and potassium supply. *Plant Soil*. 5, 87-100.
- Botrill, D. E., Possingham, J. V. Kriedemann, P. E. (1970) The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant Soil* 32, 424-438.
- Braumann, T. y Grimme, L. H. (1981) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 637, 8-17.
- Braumann, Th., Weber, G. y Grimme, L. H. (1982) Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction centre proteins of the thylakoid membrane. *Photobiocem. and Photobiophys.* 4, 1-8.

- Britton, G. (1976) Biosynthesis of carotenoids. En: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T. W. Goodwin (Ed.), Vol 1, pp. 262-327. *Academic Press*, New York, .
- Brown, I. S., Alberto, R. S. and Thornber, J. P. (1975) Comparative studies on the occurrence and spectral composition of chlorophyll-protein complexes in a wide variety of plant material. *Proc. 3rd Int. Cong. Photosynthesis 1974*. pp 1951-1962. Rehovot Israel. (N. Avron ed.). Elsevier. Amsterdam.
- Bushway, R. J. (1986) Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 409-412.
- Calvo, M. C. (1965) Influencia de los fenómenos de deficiencia sobre la estructura de los plastos. *Tesis Doctoral*. Fac. Ciencias Univ. Zaragoza.
- Castelfranco, P. A. y Beale, S. I. (1983) Chlorophyll biosynthesis: recent advances and areas of current interest. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 241-272.

- Charles, S. A. y Halliwell, B. (1981) The effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts fructose biphosphatase. *Biochemistry Journal*. 189, 373-376.
- Coombs, J. y Greenwood, A. D. (1976) Compartmentation of the photosynthetic apparatus. En: The Intact Chloroplasts. Vol 1. Topics in Photosynthesis (ed. J. Barber). pp1-51. Elsevier. Amsterdam.
- Davies, B. H. (1976) Carotenoids. En: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T. W. Goodwin (Ed.), Vol 2, pp. 38-165. Academic Press, New York, .
- DeKock, P. C. (1981) Iron nutrition under condition of stress. *Journal of Plant Nutrition* 3, 513-521.
- Delapelaire, P. Y Chua, N. H. (1981) Electrophoretic purification of chlorophyll a/b-protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide composition. *Journal of Biological Chemistry* 256, 482-493.
- Delapelaire, P. Y Chua, N. H. (1983) Fotodescomposición de clorofilas en casos de deficiencia de hierro. *Anales de Aula del*, 6, 1-60.

- Droppa, M., Terry, N. y Horvath, G. (1984) Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport (phase transition of membrane lipid/photosystem II). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2369-2373.
- Eskins, K., Scholfield, R. y Dutton, H. J. (1977). High-performance liquid chromatography of plant pigments. *Journal of Chromatography* 135, 217-220.
- Eskins, K. y Dutton, H. J. (1979) Sample preparation for high-performance liquid chromatography of plant pigments. *Analytical Chemistry*. 51, 1885-1886.
- Eskins, K., Duysen, M. E. y Olson, L. (1983) Pigment analysis of chloroplast pigment-protein complexes in wheat. *Plant Physiology*. 71, 777-779.
- Foote, C. S. y Denny, R. W. (1968) Chemistry of singlet oxygen XII. Quenching by β -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6233-6235.
- Foote, C. S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet state oxygen: consequences in biological systems. In: Free radicals and biological systems (ed. W. A. Pryor) pp 85-133. Academic Press, New York.

- Genge, S., Pilger, D. y Hiller, R. G. (1974) The relationship between chlorophyll *b* and pigment-protein complex II. *Biochim. Biophys. Acta* 347, 22-30.
- Goodwin, T. W. (1958) Studies in carotenogenesis 25. *Biochemistry Journal*. 70, 612-617.
- Guikema, J. A. y Sherman, L. A. (1983) Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation. *Plant Physiology*. 73, 250-256.
- Hager, A. y Bertenrath, T. M. (1966). Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dunnschicht-chromatographischer methoden. *Planta* 69, 198-217.
- Halliiwell. B. (1983) Chloroplast metabolism. pp 179-205 Clarendon Press. Oxford.
- Heras, L. (1961) Potencial de oxido-reducción en clorosis férrica inducida. *Anales de Aula Dei*. 6, 123-134.

- Hiller, R. G. y Goodchild, D. J. (1981) Thylakoid membrane and pigment organization. En: *Biochemistry of Plant* (ed. M. D. Hatch y N. K. Boardman) Vol 8. pp 1-49. *Academic Press*. London.
- Hoagland, D. C. y Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plant without soil. *Calif. Agric. Sta. Bull.* 47,
- Holden, M. (1976). Chlorophylls. En: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T. W. Goodwin (Ed.), Academic Press, New York, Vol 2, pp. 2-37.
- Hufford, T. L. (1978) Botany. Basic concepts in plant biology. *Harper & Row, Publ.* New York
- Inskeep, W. P. y Bloom, P.R. (1985) Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80 % acetone. *Plant Physiology* 77, 483-485.
- Jackson, A. H. (1976) Structure, properties and distribution of chlorophylls. En: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. T. W. Goodwin (Ed.), Academic Press, New York, Vol 1. pp. 1-63.

Jeffrey, S. W., Douce, R. y Benson, A. A. (1974) Carotenoid transformations in the chloroplast envelope. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71, 807-810.

Joyard, J., Billecoq, A., Bartlett, S. G., Block, M. A., Chua, N-H. y Douce, R. (1983) Localization of polypeptides to the cytosolic side outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 258, 10000-10006.

Krinsky, N. I. (1966) The role of carotenoid pigments as protective agents against photosensitized oxidations in chloroplasts. En: *Biochemistry of Chloroplasts.* (ed. T. W. Goodwin) Vol 1, pp 423-430. *Academic Press.* New York.

Krinsky, N. I. (1968) The protective functions of carotenoid pigments. En: *Photophysiology.* (ed. A. C. Giese) Vol 3, pp 423-430. *Academic Press.* New York.

Krinsky, N. I. (1971) Function. En: *Carotenoids.* (ed. O. Isler), pp 669-716. *Birkhäuser Verlag.* Basle.

Krinsky, N. I. (1973) Non-photosynthetic functions of carotenoids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 284, 331-561.

- Krinsky, N. I. (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure & Appl. Chem.* 51, 649-660.
- Kyle, D. J., Staehelin, A. L. y Arntzen, C. J. (1983) Lateral mobility of the light harvesting complex in chloroplasts membranes controls excitation energy, distribution in higher plants. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 222, 527-541.
- Lichtenthaler, H. K., Prenzel, U., Douce, R., y Joyard, J. (1981) Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 641, 99-105.
- Lichtenthaler, H. K., Prenzel, U. y Khun, G. (1982) Carotenoid composition in the chlorophyll-carotenoid-proteins from Radish chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 37, 10-12.
- Lichtenthaler, H. K. y Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. En: Abstracts of 6Th International Congress on Photosynthesis. pp 117. Brussels.



Lopez-Gorge, J. L. y Chueca, A. (1986) Papel biológico de los nutrientes en la planta. En: Nutrición vegetal. Algunos aspectos químicos y biológicos. pp 1-43. (M. Lachica y C. Gonzalez, ed.). Organización de las Naciones Unidas para la Educación y la Cultura.

Marschner, H. (1983) General introduction to the mineral plant nutrition. En: Inorganic Plant Nutrition. Vol I, pp 5-60. (A. Läuchli y R. L. Bielski). Springer-Verlag, Berlin.

Mengel, K. y Kirby, E. A. (1983) Principles of plant nutrition. 3th Ed. International Potash Institute. Worblaufen-Bern/Switzerland.

Myers, J. (1940) *Plant. Physiol.* 15, 575-588. (Citado por Calvo, 1965)

Miller, G. W., Pushnik, J. C. y Welkie, G. W. (1984) Iron chlorosis, a world-wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *Journal of Plant Nutrition* 7, 1-22.

Moran, R. y Porath, D. (1980) Chlorophyll determination in intact cells by using 8-Anilino-1-naphthalene-sulphonic acid. *Plant Physiology* 65, 473-479.

- Moran, R. (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. *Plant Physiology* 69, 1376-1381.
- Mullet, J. E. y Arntzen, C. J. (1981) Identification of a 32-34 kilodaltons polypeptide as a herbicide receptor protein in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 635, 236-248.
- Mullet, J. E., Burke, J.J. y Arntzen, C. J. (1980) Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiology* 65, 814-822.
- Nátr, L. (1972) Influence of mineral nutrients on photosynthesis of higher plants. *Photosynthetica* 6, 80-99.
- Nishio, J. N. y Terry, N. (1983) Iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiology* 77, 705-711.
- Nishio, J. N., Taylor, S. E. y Terry, N. (1985) Changes in thylakoid galactolipids and proteins during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiology* 77, 804-807.
- Ogawa, T., Obata, T. y Shimada, H. (1981) The pigment-proteins in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 112, 228-234.

- Ojakian, G. K. y Satir, P. (1974) Particle movements in chloroplasts membranes. Quantitative measurements of membrane fluidity by freeze-fracture technique. *Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A.*, 21, 2052-2052.
- Paolillo, D. J. (1970) The tree-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts. *J. Cell. Sci.* 6, 23-30.
- Pelletier, P. J. y Caventou, J. B. (1818). (Citado por Jackson, A. H.). *Ann. Chim. et Phys.* 9, 194.
- Platt-Aloia, K. A., Thompson, W. W. y Terry, N. (1983) Changes in plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Protoplasma*. 114, 85-92.
- Porter, J. W. y Anderson, D. G. (1967) Biosynthesis of carotenes. *Annual Review of Plant Physiology* 197-228.
- Prenzel, U. y Lichtenthaler, H. K. (1982) Localization of β -carotene in chlorophyll a-proteins and changes in its levels during short-time light exposure of plants. In: *Biochemistry and metabolism of plant lipids*. (J.F.g.M. Wiermans y P.J.C. Kuiper, ed.) Elsevier Biomedical Press B.V. London.

- Punnet. T. (1970) Environmental control of photosynthetic efficiency. *Science*. 171, 284-286.
- Pushnik, J. C., Miller, G. W. y Manwaring, J. H. (1984) The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis. *Journal of Plant Nutrition* 7, 733-758.
- Rabinowitch, E. y Govindjee, T. (1971). La función de la clorofila en la fotosíntesis. En: *Selecciones del Scientific American*. Ed. Blume. Madrid.
- Rao, M., Abadía, J. y Terry, N. (1987) Leaf phosphate status and photosynthesis *in vivo*: changes in light scattering and chlorophyll fluorescence during photosynthetic induction in sugar beet leaves. *Plant Science* (en prensa).
- Reuther, W. y Labanauskas, C. K. (1966) Copper. En: *Diagnostic criteria for plants and soils* (H.D. Chapman, ed.) *University of California Press*.
- Sagromsky, H. (1956) *Zeits. Naturf.* 11, 548-554. (Citado por Calvo, 1965).
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1978) Photosynthesis. En: *Plant Physiology*. (J.C. Carey, ed.) *Wersworth Publising Co.* Belmont.

- Satoh, K. (1981) Further characterization of the photosystem II chlorophyll a protein complex purified from digitonin extracts of spinach chloroplasts-polypeptide composition. En: Proceedings of 5th International Photosynthesis Congress. (G. Akoyonoglou, ed.) Vol3, pp 607-616. Balaban International Scientific Service. Philadelphia.
- Shetty, A. S., y Miller, G. W. (1966) Influence of iron chlorosis on pigment and protein metabolism in leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **41**, 415-421.
- Siefermann-Harms, D. (1985) Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta.* **811**, 325-355.
- Skrdla, M. P. y Thornber, J. P. (1982) The involvement of chlorophyll b in excitation of long wavelength fluorescence from a PS I fraction. *Plant Physiology.* **69**, Suppl. 71 (abstract 399).
- Smith, J. H. C. (1948) *Arch. Biochem.* **19**, 449-454.
(Citeda per Galvo, 1983).
- Smith, J. H. C. (1950) (Citeda per Jackson, A. H.) *Proc. R. Soc.* **21**, 442.

- Spencer, D. and Possingham, J. V. (1960) The effect of nutrient deficiencies on the Hill reaction of isolated chloroplast from tomato. *Amer. J. Biol. Sci.* 13, 441-445
- Spiller, S. and N. Terry. 1980. Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol.* 65, 121-125.
- Staehelin, L. A. (1976) Reversible particle movements associated with unstaking and restaking of chloroplasts membranes *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, 71, 136-158.
- Staehelin, L. A., Armond, P. A. y Miller, K. R. (1977) Chloroplast membrane organisation at the supramolecular level and its functional implications. *Brookhaven Symposium on Biology*. 28, 278-315.
- Stokes, G. G. (1864) (Citado por Jackson, A. H.) *Proc. R. Soc.* 13, 144.
- Stokinger, C. B. (1975) Iron deficiency and the structure and physiology of maize chloroplasts. *Plant Physiol.* 55, 513-521.

- Strain, H. H. (1949) Photosynthesis in plants. (J. Frank y W. E. Leemis, ed.), *Iowa State College Press*. Ames.
- Taylor, S. E., Terry, N. y Huston, R. P. (1982) Limiting factors in photosynthesis. III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolites. *Plant Physiology*. **70**, 1541-1543.
- Terry, N. (1979) The use of mineral nutrient stress in the study of limiting factors in photosynthesis. En: Photosynthesis and Plant Development. (R. Marcelle, H. Clijeters, y M. Van Pouce, ed.) *Dr. W. Junk, Publ.* The Hague, Netherlands.
- Terry, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiol.* **65**, 114-120.
- Terry, N. y Abadía, J. (1986) Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*. **9**, 609-646.
- Thornber, J. P. (1975) Chlorophyll-proteins light-harvesting and reaction centre components of plants. *Annual Review of Plant Physiology*. **26**, 127-158.

- Thornber, J. P., Markwell, J. P. y Reinman, S (1979)
Plant chlorophyll protein complexes: recent
advances. *Photobiochem. and Photobiophys.* 29,
1205-1216.
- Thornber, J. P. y Barber, J. (1979) Photosynthetic
pigments and models for their organisation *in*
vivo. En: Photosynthesis in relation to model
systems. Vol 3. Topics in Photosynthesis (J.
Barber ed.) pp 27-70. Elsevier Amsterdam.
- Tswett, M. (1906) (Citado por Jackson , A. H.). *Ber. dt.*
bot. Ges. 24, 384.
- Val, J., Heras, L. y Monge, E. (1985) Nuevas ecuaciones
para la determinación de pigmentos
fotosintéticos en acetona. *Anales de Aula Dei.*
(3-4), 231-238.
- Virgin, H. I. (1955) *Phyiol. Plant.* 8, 630-643. (Citado
por Calvo, 1965).
- Wang, A. Y. I. y Packer, L. (1973) Mobility of membrane
particles in chloroplasts. *Biochimica et*
Biophysica Acta. 305, 488-492.
- Weedon, B. C. L. (1971) En: Carotenoids (ed. O. Isler)
pp 29-59. Birkhäuser. Basel

- Wild, A. y Urschel, B. (1980) Chlorophyll-protein complexes of *Chlorella fuca*. *Z. Naturforsch.* 35, 627-637.
- Wintermans, J. F. G. M. y De Mots, A. (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 109, 448-453.
- Wollman, F. A. y Bennoun, P (1982) A new chlorophyll protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 680, 352-360.

