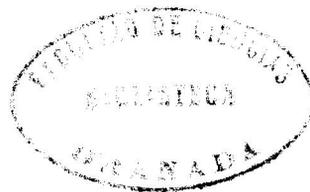


12/11

Matilde Barón Ayala

**ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO DEL
MECANISMO BIOQUIMICO DE ACCION DE HERBICIDAS
CARBAMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA**



TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE CIENCIAS



01611468

1984

BIBLIOTECA
CIENCIAS
113
3
151-



T
10
159

ESTUDIOS "IN VITRO" E "IN VIVO" DEL MECANISMO
BIOQUIMICO DE ACCION DE HERBICIDAS CARBAMICOS
SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA

Memoria presentada para aspirar al Grado
de Doctor, por la Licenciada en Ciencias
Biológicas Matilde Barón Ayala



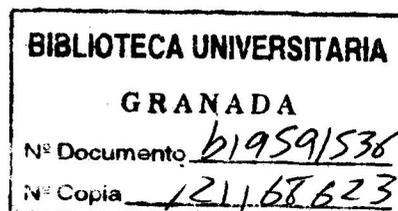
Fdo.: Matilde Barón Ayala

Los Directores de la Tesis

Fdo.: Julio López Gorgé
Investigador Científico
del C.S.I.C.

Fdo.: Ana Chueca Sancho
Investigador Científico
del C.S.I.C.

Granada, Junio de 1984



18. 29. 211

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS "IN VITRO" E "IN VIVO" DEL MECANISMO BIOQUIMICO DE
ACCION DE HERBICIDAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA

Matilde Barón Ayala

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1984

Tesis Doctoral dirigida por los Dres. D. Julio López Gorgé y D^a Ana Chueca Sancho, Investigadores Científicos del C.S.I.C.. Fue leída el día 6 de Julio de 1984, ante el Tribunal formado por los Profesores: Recalde Martínez; García Peregrín; Cárdenas Torres; Alvarez Tinaut y López Gorgé.

Obtuvo la calificación de Sobresaliente "cum laude".

La Memoria que presentamos ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.).

La elaboración del trabajo fue financiada por una Beca del I.N.A.P.E., Beca del C.S.I.C. y una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Parte de los resultados han sido presentados en el II Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology (Santiago de Compostela, 1980), en el X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica (Santander, 1982) y en el IV Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology (Estrasburgo, Francia, 1984).

Esta Tesis ha sido parcialmente publicada en los *Proceeding of the Fifth International Congress on Photosynthesis*, vol. VI, 555 (1981) y en *Revista Española de Fisiología*, 38 supl., 315, (1982).

La idea de que la ciencia puede y debe regirse según unas reglas fijas y de que su racionalidad consiste en un acuerdo con tales reglas no es realista y está viciada. *No es realista*, puesto que tiene una visión demasiado simple del talento de los hombres y de las circunstancias que animan, o causan, su desarrollo. Y *está viciada*, puesto que el intento de fortalecer -- las reglas levantará indudablemente barreras a lo que los hombres podrían haber sido, y reducirá nuestra humanidad incrementando nuestras cualificaciones profesionales. Podemos librarnos de la idea y del poder que pueda poseer sobre nosotros recordando que la separación existente entre las ciencias y las artes es artificial, que es el efecto lateral de una idea de profesionalismo que deberíamos eliminar, que un poema o una pieza teatral pueden ser inteligentes a la vez que informativas (Aristófanes, Hochhuth, Brecht), y una teoría científica agradable de -- contemplar (Galileo, Dirac), y que podemos cambiar la ciencia y hacer que esté de acuerdo con nuestros deseos. Desde luego, es asunto nuestro elegir un dragón o una gatita como compañía.

Paul Feyerabend

(*Contra el método*)

A mis padres, por su generosidad.

Durante el tiempo de realización de esta Memoria, he contraído numerosas deudas de gratitud con todos aquellos que generosamente pusieron a mi alcance sus conocimientos, sus instalaciones, sus habilidades o simplemente (y no es poco ...) su presencia amiga.

Ahora que mi Tesis Doctoral es una "realidad encuadrada", me alegra que sus primeras páginas les hagan justicia -- citándolos. Son :

Los Drs. Julio López Gorgé y Ana Chueca Sancho, Investigadores Científicos del C.S.I.C., cuya Dirección hizo posible este trabajo, iniciando así mi formación científica.

Mis compañeros de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal, incluidos los que pasaron por ella en estos años y aún echo de menos. Entre ellos, mi especial gratitud a Matilde Garrido.

La Unidad Estructural de Fisiología Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín que me facilitó el uso de las -- técnicas polarográficas y asesoramiento sobre cultivos hidropónicos.

El Instituto de Astrofísica de Andalucía (C.S.I.C.) y el Departamento de Medicina Legal de esta Universidad, en los cuales desarrollé las técnicas de fluorimetría. Por la colaboración en su montaje y en la resolución de otros muchos problemas puntuales, destacaría al Dr. Francisco Girela.

La Estación Experimental del Zaidín que siempre me acogió de forma favorable y donde tengo repartidos un buen número de amigos que son una estimulante compañía.

Julia Martínez, Juan Rodríguez y Manuel Martínez por su cuidado trabajo de mecanografía, fotografía y dibujo de gráficas.

Para finalizar este breve listado que quisiera cargar de afecto, y siendo consciente de que mi actividad profesional es permeable a la que desarrollo fuera del laboratorio, tengo que citar a los principales protagonistas de ésta: mis amigos.

INDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCION</u>	1
Fotosíntesis: Generalidades	3
<u>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION</u>	70
Inhibidores antifotosintéticos	71
Herbicidas carbámicos	103
<u>PLAN DE TRABAJO</u>	119
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	123
I. MATERIAL UTILIZADO	125
A. <u>Material vegetal</u>	125
B. <u>Soluciones de herbicidas</u>	126
II. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FOTOSINTETICA	128
A. <u>Transporte electrónico</u>	128
A.1 Operatividad de la cadena de transporte $H_2O \rightarrow NADP^+$	128
A.2 Operatividad de la cadena de transporte $H_2O \rightarrow \{Fe(CN)_6\}^{3-}$	132
A.3 Operatividad de la cadena de transporte Ascorbato/DPIP $\rightarrow NADP^+$	133
B. <u>Fotofosforilación fotosintética</u>	140
B.1 Fotofosforilación total	140
B.2 Fotofosforilación acíclica	144
B.3 Fotofosforilación cíclica	145
C. <u>Asimilación de CO_2</u>	145

C.1 Fijación neta de CO ₂	145
C.2 Productos de asimilación del CO ₂	147
D. <u>Pigmentos fotosintéticos</u>	149
D.1 Determinación de clorofilas	150
D.2 Determinación de pigmentos carotenoides	150
III. MECANISMO DE ACCION	153
A. <u>Constante de inhibición</u>	153
B. <u>Experiencias con preparaciones tripsinadas</u>	155
<u>RESULTADOS</u>	163
I. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FOTOSINTETICA	165
<i>Experiencias "in vitro"</i>	165
A. <u>Transporte electrónico</u>	165
A.1 Operatividad de la cadena de transporte H ₂ O → NADP ⁺	165
A.2 Operatividad de la cadena de transporte H ₂ O → {Fe(CN) ₆ } ³⁻	165
A.3 Operatividad de la cadena de transporte Ascorbato/DPIP → NADP ⁺	169
B. <u>Fotofosforilación fotosintética</u>	169
B.1 Fotofosforilación total	169
B.2 Fotofosforilación acíclica	169
B.3 Fotofosforilación cíclica	169
C. <u>Asimilación de CO₂</u>	173
C.1 Fijación neta de CO ₂	173

C.2 Producto de asimilación de CO ₂	173
<i>Experiencias "in vivo"</i>	
<i>Tratamiento por vía radicular y foliar</i>	182
A. <u>Transporte electrónico</u>	182
A.1 Operatividad de la cadena de transporte H ₂ O → NADP ⁺	182
A.2 Operatividad de la cadena de transporte H ₂ O → {Fe(CN) ₆ } ³⁻	185
A.3 Operatividad de la cadena de transporte Ascorbato/DPIP → NADP ⁺	185
B. <u>Fotofosforilación fotosintética</u>	185
B.1 Fotofosforilación total	185
B.2 Fotofosforilación acíclica	188
B.3 Fotofosforilación cíclica	188
C. <u>Asimilación de CO₂</u>	188
C.1 Fijación neta de CO ₂	188
C.2 Productos de asimilación de CO ₂	188
D. <u>Pigmentos fotosintéticos</u>	203
II. MECANISMO DE ACCION	206
A. Constante de inhibición	206
B. Experiencias con preparaciones tripsinadas .	213
<u>DISCUSION</u>	229
<u>CONCLUSIONES</u>	281
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	287

INTRODUCCION: ESTUDIO TEORICO

FOTOSÍNTESIS: GENERALIDADES

La Fotosíntesis se puede definir, en un sentido amplio, como la conversión de la radiación lumínica en potencial reductor y energético que, posteriormente, se utiliza para la reducción y asimilación de elementos biogénicos que se encuentran en un alto estado de oxidación o en formas de baja reactividad. El potencial reductor procede de una molécula más o menos oxidada que, por un complejo mecanismo de fotoactivación, cede equivalentes de reducción. Estos, transportados por una cadena secuencial de intermedios, llegan al aceptor último NADP^+ , liberándose a lo largo de esta secuencia de reacciones de oxido-reducción una energía que, en parte, es utilizada para la síntesis paralela de enlaces energéticos en forma de ATP. Mientras que los organismos verdes, prokariotes o eukariotes, utilizan H_2O como fuente de potencial reductor, con desprendimiento simultáneo de O_2 como producto secundario (organismos oxigénicos), las bacterias fotosintéticas -- operando, en general, en condiciones anaerobias, utilizan como origen de potencial reductor compuestos azufrados reducidos, hidrógeno, etc., sin que por lo tanto exista liberación de O_2 . Finalmente, el potencial reductor y energético así sintetizado es empleado para la asimilación reductora tanto del carbónico, como del nitrato, sulfato y, aún, nitrógeno molecular.

Ambas fases del proceso fotosintético --generación de potenciales reductor y energético, y asimilación reductora de compuestos oxidados-- están íntimamente relacionadas, como ya veremos, por sofisticados mecanismos de regulación, teniendo lugar de forma independiente en estructuras bien diferenciadas que, en los vegetales y algas eukariotes, constituyen los cloroplastos. Estos, salvo casos excepcionales, presentan una sorprendente homogeneidad en lo que respecta a estructura, composición, enzimología y función, pu-

diéndose delimitar en ellos tres regiones bien definidas: envolturas, estructura lamelar y estroma amorfo.

Organización del cloroplasto.

La envoltura del cloroplasto consta de dos membranas separadas por un espacio intermembranal, de las que la externa es inespecíficamente permeable, siendo la cubierta interna la auténtica barrera selectiva del cloroplasto. En general, su naturaleza lípido-proteica le hace exhibir una baja permeabilidad a los compuestos iónicos, siendo totalmente permeable, seguramente por difusión, al CO_2 y algunos ácidos orgánicos monocarboxílicos (formato, acetato, glicolato y glicerato), mientras que es prácticamente impermeable a los azúcares bifosforilados, hexosas y heptosas monofosfatos, pirofosfato, NADP^+ y NADPH , azúcares libres, y aminoácidos tipo glicina y serina (1). Otros compuestos, por el contrario, exhiben una -- permeabilidad controlada, siendo transportados de manera competitiva por un translocador específico a través de la envoltura interna mediante cambio equimolecular con compuestos de naturaleza análoga existentes en el espacio extraorganular.

Existe un "translocador de fosfatos" (2), un polipéptido situado sobre la membrana interna de las cubiertas cloroplastídicas, cuya especificidad se extiende al P_i y compuestos que presentan un resto fosfórico unido al carbono 3-terminal, un "translocador de -- dicarboxilatos", específico para ácidos orgánicos y aminoácidos tipo malato, oxalacetato y aspártico-glutámico, y un "translocador -- de adenilatos", funcional para el bloque AMP-ADP-ATP, aunque con -- tan baja capacidad que bien puede decirse que las cubiertas del -- cloroplasto son impermeables a los adenilatos (3). Las pentosas-5-P presentan una permeabilidad activa, aunque para ellas aún no ha llegado a describirse ningún translocador específico.

En todos estos casos, el translocador actúa en cierta medida como un cambiador, de tal forma que la entrada de un metabolito se encuentra acoplada a la salida de otro, con lo cual el transporte viene dirigido, no sólo por la especificidad del translocador, sino también por la concentración de metabolitos al cambiar en uno y otro compartimento. Según Kursanov (4) el flujo medio de salida de glúcidos fuera del cloroplasto es de $3.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de envoltura/hora, valor que podría llegar a $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$ en condiciones de iluminación.

En la estructura lamelar se encuentran localizados los pigmentos fotoactivos y restantes componentes de la cadena de transporte electrónico, así como el sistema subsidiario de síntesis de compuestos energéticos. Observada al microscopio dicha estructura, denominada grana, semeja pilas de discos verdes o tilakoides, constituidos por una envoltura lamelar de unos 75 \AA de espesor, que limita un espacio intratilakoidal, estando conectados éstos entre sí por interconexiones membranales. Aparece así el cloroplasto fundamentalmente compartimentado en dos espacios: el propiamente estromático, y un segundo intracisternal limitado por las capas lamelares de la grana (5), al par que las membranas lamelares se muestran diferenciadas entre aquéllas que, apiladas, constituyen los tilakoides -lamelas granales-, y las que sirven de conexión entre las pilas tilakoidales -lamelas estromáticas-. Las zonas de contacto entre las lamelas granales se denominan "particiones", mientras que los bordes, no anastomosados, de las lamelas granales, y las lamelas estromáticas, son denominados "márgenes". Ambas zonas exhiben una composición pigmentaria y funcionalidad claramente diferenciadas.

En la estructuración de la arquitectura granal parecen desempeñar una función esencial ciertos iones inorgánicos, fundamentalmente Mg^{2+} , como se demuestra por el hecho de que cloroplastos preparados en un medio de baja fuerza iónica muestren una estructu-

ra granal desorganizada. La ausencia de iones provoca también una mayor sensibilidad al calor del aparato fotosintético, especialmente en aquellos puntos en que la relación estructura-función aparece más dependiente: sistema de lisis del H_2O , fotofosforilación, etc.

La composición de las lamelas es aproximadamente un 50% de lípidos y un 50% de proteínas, con casi total ausencia de carbohidratos (6). No obstante, esta distribución no es homogénea a todo lo largo del tilakoide; existe un 15% de lípidos y un 85% de proteínas en la superficie exterior de las lamelas (7), de lo que se deduce una localización mayoritaria de lípidos en las zonas que miran al lumen tilakoidal. Los lípidos son fundamentalmente diferentes de los de otras estructuras de la planta, con un elevado porcentaje de glicolípidos -mono y digalactosildiglicéridos- y fosfolípidos, y un bajo contenido en triglicéridos (8).

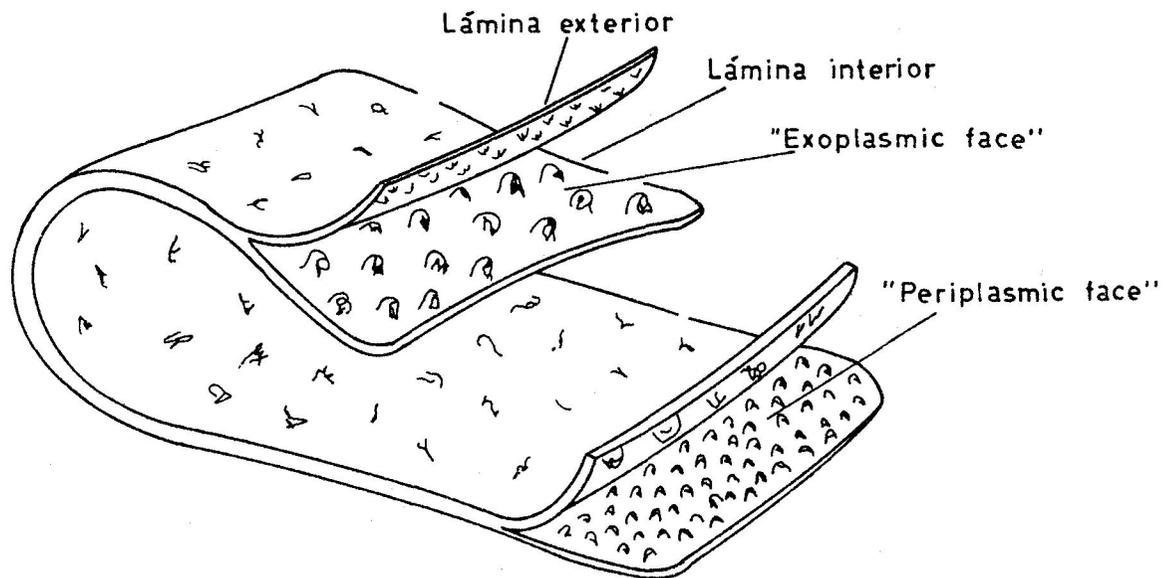
Los ácidos grasos insaturados constituyen, principalmente el ácido linolénico, que llega a alcanzar un 80% de los ácidos grasos totales, un porcentaje muy importante de estos acil-lípidos; este elevado contenido se ha relacionado con una fluidez suficiente de las membranas tilakoidales, de tal forma que la disminución de la actividad fotosintética por el frío se achaca a una transición de la estructura de las membranas desde una fase líquido-cristalina a otra sólida, impidiéndose así el libre tránsito entre ambas caras de la plastoquinona (9). Más aún, la aclimatación a las bajas temperaturas de muchas especies viene acompañada de un incremento de la razón ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados, para compensar dicho efecto (10).

Los pigmentos constituyen el 20% del contenido lipídico total, siendo alrededor del 80% clorofilas, y el resto carotenoides y otros pigmentos. Los principales carotenoides son, en orden de mayor a menor contenido: luteína, β -caroteno y, cantidades análogas de violoxantina, neoxantina y zeaxantina.

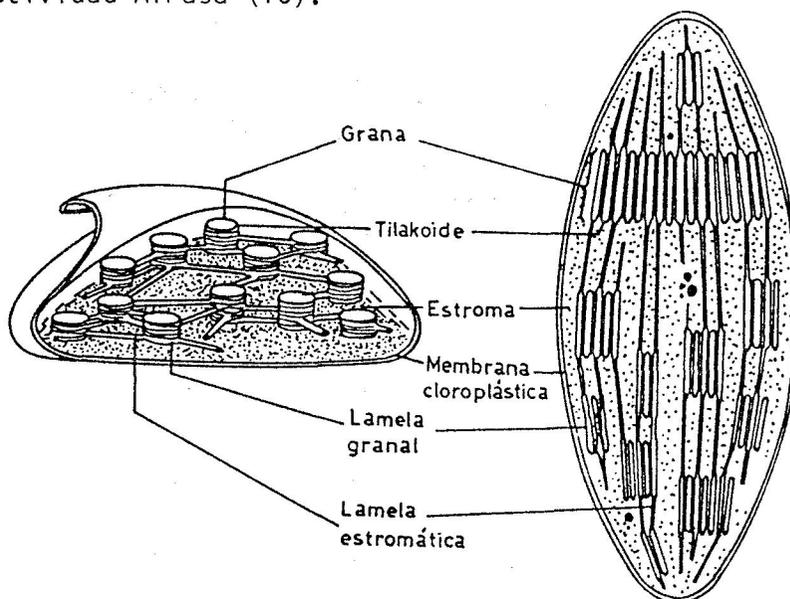
Las proteínas pueden ser estructurales, intrínsecas de las membranas, o bien débilmente ligadas a ellas, extrínsecas o periféricas, pudiendo estas últimas ser separadas por tratamientos suaves sin pérdida de su funcionalidad. Cuando se estudian por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS preparados de membranas solubilizadas con detergentes, se llegan a detectar alrededor de 40 fracciones polipeptídicas distintas.

Los componentes proteicos y lipídicos están íntimamente relacionados por razones de polaridad y/o apolaridad, constituyendo un entramado tridimensional claramente diferenciado a lo largo del espesor de la membrana lamelar (11), de tal forma que se advierte un incremento de agrupaciones polares hacia el exterior del tilakoide con una densidad de cargas negativas equivalentes a $1-3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (12), y una mayor densidad de grupos apolares en el espacio interior, hechos que tienen una radical importancia en la distribución pigmentaria de elementos intermediarios de la cadena de transporte electrónico, en relación con su funcionalidad. El efecto estabilizador, antes mencionado, de las sales radica en que los cationes salinos impedirían las repulsiones electrostáticas intra e intermembranales derivadas de este acúmulo de cargas negativas sobre la superficie lamelar (13).

La aplicación de técnicas de microfractura sobre material congelado, muestra una escisión selectiva en dirección longitudinal a la membrana, según un plano determinado, con exposición de dos superficies distintas, lo que define la estructura asimétrica del espesor de las lamelas (14). La lámina interior exhibe mayor espesor, mostrándose su plano de fractura -EF o "exoplasmic face" tapizado de partículas de gran tamaño, frente a las numerosas pequeñas partículas del plano de fractura -PF o "periplasmic face" de la lámina exterior, si bien ésta presenta en su cara externa frecuentes resaltes. Material enriquecido en uno u otro tipo de -



partículas por sonicación o tratamiento con detergentes, manifiesta el carácter de Fot. I de las pequeñas partículas y el de Fot. II de las grandes, lo que corrobora la localización más interna de éste respecto a aquél (15); análogamente, el arrastre con EDTA de los grandes resaltes más externos ha permitido identificar éstos con actividad ATPasa (16).



El espacio limitado por las envolturas cloroplastídicas, y en el que nadan las lamelas granales e intergranales, constituye el estroma. Su volumen viene a ser 2-3 veces menor que el del cloroplasto total, y en él se encuentra en solución un potente -- equipo enzimático -- fundamentalmente los enzimas del ciclo de Calvin-, siendo su constituyente principal la llamada fracción I, -- identificada con la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa-oxigenasa. Contiene también un discreto número de partículas, siendo las más comunes granos de almidón y los glóbulos osmiofílicos; más abundantes en hojas viejas y constituídos por acúmulos de material lipídico (17). Finalmente, se observan partículas ribosómicas tipo 70S, cuya misión es dirigir la síntesis de algunas proteínas cloroplastídicas, entre las que se encuentra la subunidad mayor de la fracción I (18). Efectivamente, muchos caracteres del alga *Chlamydomonas reinhardtii* son transmitidos biparentalmente, según los postulados de Mendel, lo que los define como codificados por el -- genoma nuclear. Por el contrario, otros lo son uniparentalmente, del predecesor más caracterizado, y están vinculados al genoma -- cloroplastídico.

Origen y desarrollo de la estructura cloroplastídica.

El DNA cloroplastídico es muy diferente del DNA nuclear -- en lo que respecta a su composición en bases -- carece de 5-metilcitosina, encontrada en el núcleo-, ausencia de histonas y resistencia a la desnaturalización; por el contrario, el DNA de cloroplastos de diferentes especies es muy similar, dada su facilidad de hibridación con rRNA y tRNA heterólogos y su nula o escasa con rRNA y tRNA nuclear, incluso de la misma especie, lo que indica una conservación de identidad de material genómico a lo largo de millones de años, aún a pesar de la diversificación específica.

Por otro lado, el DNA cloroplastídico presenta una complejidad génica equivalente a 1×10^8 daltons, lo que teóricamente equivale a una capacidad codificadora de unas 120 proteínas de un p.m. medio de 50.000. Esto es a todas luces insuficiente para justificar la existencia de una autonomía como la que presenta este orgánulo, ya que dicho número de proteínas es requerido sólo para la autoproducción de dicho material génico (RNA polimerasa, proteínas ribosómicas, etc.). Así pues, hay que admitir que parte de las proteínas cloroplastídicas son codificadas por DNA nuclear, sintetizadas en el citoplasma y exportadas al cloroplasto, o bien que existe una transferencia a éste de un mDNA, soluciones ambas que justifican el elevado contenido proteico -cerca del 50% del contenido proteico total de la célula- del cloroplasto, y su alta densidad ribosómica.

En esta transferencia de macromoléculas del citoplasma al cloroplasto podrían estar implicadas las invaginaciones que sufren las cubiertas cloroplastídicas en procesos de crecimiento de las lamelas tilakoidales (19). Datos recientes del grupo de Chua (20) indican la posibilidad de una síntesis citoplasmática post-translacional de plastocianina y ferredoxin-NADP⁺-reductasa, así como el transporte de precursores de las mismas -de peso molecular mayor que las proteínas cloroplastídicas- al interior del cloroplasto.

El descubrimiento que la subunidad de alto p.m. de la ribulosa-1.5-bisfosfatos carboxilasa -una proteína soluble-, y tres de las subunidades del CF₁ -una proteína ligada a membranas-, se sintetizaban en el cloroplasto ha llevado al pensamiento de una intervención del cloroplasto exclusivamente a nivel de síntesis proteica de algunas subunidades de sistemas enzimáticos heterogéneos (21). Sin embargo esto no es así, pues existen evidencias de una síntesis integral cloroplastídica de proteínas enzimáticas, como la nitrito-reductasa, algunas proteínas ribosómicas, etc. mientras que otras proteínas típicamente fotosintéticas -fosforribulokinasa, ferredoxina, triosa-P-isomerasa, etc.-, dependen biosintéticamente

del citoplasma.

En cualquier caso, el número de proteínas que actualmente se conoce se sintetizan en el cloroplasto, no va más allá del 5-10% de las que es presumible lo sean según se deduce de la información génica almacenable por el DNA de la organela, quedando un 90% del genoma del mismo sin justificar (22). De ello se deduce que, bien la información génica existente para determinadas proteínas es altamente reiterativa -justificable en el caso de la subunidad de alto p.m. de la carboxi-dismutasa por su elevada concentración-, o que parte del DNA es informativamente irrelevante, o que codifican proteínas que se encuentran a tan baja concentración que aún no se han podido detectar.

La colaboración del genoma citoplasmático y cloroplastídico en la síntesis de algunas proteínas del cloroplasto, ha quedado, no obstante, corroborada al verse influenciada tanto por cloranfenicol y lincocina, inhibidores de la síntesis protéica por los ribosomas tipo 70S, como por cicloheximida, inhibidor de los ribosomas 80S (23). Laubhere y Dorne (24) indican la posible vinculación de los ribosomas 80S implicados en la síntesis de proteínas cloroplastídicas a las membranas externas del orgánulo.

Un hecho interesante a analizar se refiere a la herencia del aparato fotosintético. Los vegetales exhiben grandes diferencias en la forma como sus plastidios son heredados. La mayor parte de las especies derivan de uno sólo de los ascendientes (herencia uniparenteral), generalmente el materno, mientras que en otros ambos ascendientes contribuyen a la dotación plastídica de la progeñie (herencia biparenteral), aunque en estos casos la contribución del predecesor materno es siempre mucho mayor (25).

Muy diversos son los procedimientos de los que el vegetal se vale para excluir los plastidios paternos, o minimizar su influencia, en la dotación cloroplastidial del cigoto. Frecuentemente como

ocurre en muchas algas y plantas superiores, el gameto masculino -- contiene un solo plastidio o de reducida dimensión, frente a varios plastidios de mayor desarrollo del femenino, lo que se debe a una reducción del DNA plastidial que tiene lugar durante la gametogénesis. Otras veces, como ocurre en muchas especies de algas, los plastidios de uno y otro origen aparecen en el cigoto, pero raramente llegan a fusionarse, sino que por una u otra vía los de procedencia paterna son eliminados: degeneración y digestión dentro del propio cigoto, segregación a lugares marginales de la célula y eliminación por extrusión vesicular, etc. Un sistema parecido es usado por las Angiospermas, en las que algunas veces incluso el gameto masculino llega al óvulo de forma aplastidial, habiéndose deshecho previamente del rudimentario cloroplasto por alguno de los procedimientos indicados.

En algunas algas como *Chlamydomonas*, e, incluso, en ciertas Angiospermas como *Oenothera* y *Pelargonium*, llega a haber una fusión en el cigoto de los plastidios de ambas procedencias, aunque por la precaria dotación génica del plastidio del precursor paterno, la herencia materna predomina (26). Un caso excepcional lo constituyen las Coníferas, en las que los plastidios del precursor paterno no sólo aparecen en el cigoto, sino que por una serie de circunstancias -- localización de los plastidios paternos rodeando al núcleo fusionado primero y al pro-embrión después, tendencia de los plastidios maternos a degenerar, etc. -- los plastidios del óvulo quedan relegados, siendo la herencia plastidial de la progenie total o fundamentalmente paterna.

En resumen, en el gameto masculino el citoplasma y sus organelas tienden a reducirse al mínimo y pocos, si algunos, plastidios son conservados. Por el contrario, el gameto femenino -- la célula hospedadora del futuro huevo -- aparece grande conteniendo numerosas organelas. La fertilización, pues, produce un balance favorable a -

éste, con el inconveniente adicional que cualquier plastidio paterno que llegue al huevo, entre en contacto con un ambiente predominantemente ajeno. Desde un plano evolutivo, Tilney-Bassett (26) indica que esta diversidad de circunstancias parecen señalar la transición de una primitiva herencia biparental a una uniparental de predominio materno.

Cuando una plántula inicia su desarrollo, sus protoplastos, indiferenciados primitivamente, evolucionan en etioplastos en las células etioladas de la hoja; la característica dominante de estos etioplastos es la presencia de una estructura cuasi-cristalina de elementos prolamelares que, si bien carecen de clorofila, contienen cantidades apreciables de protoclorofilidos, de los que existen formas distintas con máximos de absorción a 628, 637 y 650 nm (27). Un posterior desarrollo, consecuencia de la iluminación, es la evolución de estos etioplastos a cloroplastos auténticos, - lo que ocurre con pérdida de la regularidad de la estructura cristalina prolamelar, que evoluciona hacia formas tilakoidales de una auténtica "grana". Esto se correlaciona con una transformación de parte de los protoclorofilidos en clorofilidos "a", primero, y clorofila "a", después, proceso en que tiene lugar la sustitución del geraniol por fitol como alcohol esterificante (28). La aparición de clorofila "b" es una etapa posterior, sugiriéndose que ésta se forma a expensas de la clorofila "a". Esta clorofila de formación temprana la dedica la planta principalmente al desarrollo del sistema de "antenas", indispensable para la captación lumínica.

Las partículas EF de cloroplastos de hojas etioladas exhiben un tamaño de 80 Å, muy homogéneas, que como consecuencia de la iluminación se asocian a agregados de "antenas" para dar las partículas EF del cloroplasto maduro, más heterogéneas, de un tamaño medio de 140 Å (13-17 nm). Análogamente, las partículas PF evolucionan, desde su tamaño inicial de 70 Å, a otro de 105 Å (9-12 nm) (29).

La aparición de la estructura granal implica un incremento en el nivel de galactolípidos y fosfatidil-glicerol, así como una rápida síntesis de polipéptidos de peso molecular medio, que llegan a constituir el principal componente de la estructura tilakoidal. La aparición de citocromos y otros elementos de la cadena de transporte electrónico fotosintético tiene lugar en la fase de maduración del cloroplasto, lo que contrasta con la presencia del CF_1 adherido ya a las membranas prolamelares del etioplasto (30). De lo dicho se desprende que el Fot. I se desarrolla con anterioridad al Fot. II, lo que unido a la temprana aparición del CF_1 , hace que la fotofosforilación cíclica con PMS como cofactor se detecte en estadios previos. Un Fot. I acoplado con un Fot. II se manifiesta ya al comienzo del desarrollo granal, si bien las unidades fotosintéticas son pequeñas comparadas con las del cloroplasto maduro.

La evolución de la estructura granal del cloroplasto recuerda, en resumen, y como es una constante en biología del desarrollo, a la evolución filogenética del aparato fotosintético: tilakoides no apilados, con ficobilisomas, de las Cianobacterias y algas rojas, bosquejo de apilamiento típico de las algas pardas, y un apilamiento generalizado de las algas verdes y plantas superiores (31).

El desarrollo de la capacidad de fijación de CO_2 es más tardío, no alcanzándose el punto de compensación con el O_2 liberado hasta pasado bastante tiempo. Esto indica una lenta síntesis de, al menos, algunos de los enzimas del ciclo de Calvin, por lo que un sustrato para la disipación del potencial energético y reductor originado tendrá que proceder del citoplasma. Efectivamente, se ha observado un activo desprendimiento de O_2 acoplado con el uso de 3-P-glicerato como sustrato, pero no con CO_2 (32).

Finalmente, el desarrollo del cloroplasto está sometido -

dentro de la célula a un estricto control, en el que un componente lumínico juega un papel esencial (33). En sus primeros estadios el cloroplasto obtiene energía, poder reductor y pequeñas moléculas - del resto de la célula - mitocondrias y citoplasma-, lo que conlleva una degradación de los polisacáricos de reserva y un incremento de la actividad respiratoria. Este proceso parece estar bajo el control de fotorreceptores no plastidiales, que en las plantas superiores es el fitocromo, el cual también ejerce un control en la transcripción del DNA nuclear, haciendo disponibles a la organela sus propias proteínas que son sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos. Cuando el plastidio acumula suficiente material, -- inicia su propia actividad biosintética, probablemente también bajo un fotocontrol vía protoclorofilidos, destacando la transcripción del DNA plastidial para formar su propio rRNA. El O_2 desprendido por el cloroplasto funcional, y quizás también su propio sistema fotorreceptor, ejercen una inducción de procesos no plastidiales, seguramente a través de una molécula mediadora que viaja hacia las zonas no plastidiales.

Bennoun (34) ha indicado recientemente la existencia de una actividad respiratoria en el cloroplasto (clororrespiración), con un consumo de O_2 diferenciable del derivado de la respiración luminosa (fotorrespiración) y de la reacción de Mehler. Tal proceso tendría lugar en las propias membranas tilakoidales, tal como ocurre en los organismos prokariotes fotosintéticos.

Tipos de cloroplastos y partículas subcloroplásticas

El aislamiento de cloroplastos de un material vegetal puede constituir una operación sencilla o complicada, dependiendo del grado de integridad con que se quieran obtener y de la homogeneidad de la preparación a conseguir. Ambas circunstancias vendrán condicionadas -

por la naturaleza del ensayo a que vayan a ser sometidos estos cloroplastos, habiéndose establecido correlaciones entre grado de integridad, funcionalidad e, incluso, método de preparación. En cualquier caso, conviene tener en cuenta que las condiciones óptimas para un determinado test de actividad pueden ser distintas atendiendo al grado de integridad del cloroplasto; así, es clásica la caída al valor 6.0 del pH óptimo de actividad de cloroplastos rotos en lo que a la reducción del ferricianuro o NADP^+ se refiere (35).

Dejando a un lado los métodos de preparación de cloroplastos en medio no acuoso (36), solamente útiles con fines preparativos de determinados componentes, han sido efectuados numerosos esquemas de preparación y clasificación funcional. Las primeras indicaciones (37) hablaron de la existencia de dos tipos de cloroplastos en los preparados pretendidamente intactos: los de Clase I, que aparecían al microscopio muy refringentes y dentro de los cuales no podía distinguirse ningún tipo de estructura, y los de Clase II, en los que era fácil la identificación de material granal. A los primeros se les consideró como cloroplastos íntegros, que conservaban en su preparación la doble cubierta membranal. Una clasificación en cloroplastos íntegros P y rotos Ps, con normas sistematizadas de preparación y nomenclatura standardizada atendiendo al número de lavados-P₁, P₁ s₁, etc.—, fué establecida por Arnon y col. (38).

Todos los procedimientos de obtención de preparados cloroplásticos se basan generalmente en la preparación de homogenados de hojas en condiciones más o menos controladas, y en centrifugaciones diferenciales subsiguientes. No obstante, técnicas en que se han utilizado centrifugaciones en gradiente de densidad, separación por distribución en contracorriente, y otras, han sido también utilizadas. Otro factor determinante en el grado de funcionalidad de los cloroplastos —especialmente crítico en la fijación de CO_2 por cloroplastos intactos— es el sistema buffer utilizado, no sólo en su

preparación, sino en su conservación y ensayo, lo que ha llevado al abandono de los clásicos buffers a base de fosfatos, Tris, etc., y a la adopción de aquellos otros a base de HEPES, MES, etc. Todo ello ha conducido al desarrollo de técnicas muy precisas en la preparación de cloroplastos, en las que se controla desde la velocidad y tiempo de homogeneización hasta las más mínimas condiciones de centrifugación, circunstancias especialmente críticas cuando de la preparación de cloroplastos intactos, con un porcentaje lo más alto posible de elementos con la cubierta exterior intacta, se trata (39, 40, 41).

Esta diversidad de métodos ha llevado a una situación confusa, y a una dificultad en la comparación de los resultados obtenidos por distintos investigadores. Dirigido a solucionar este problema, Hall (42) ha hecho una clasificación de los distintos preparados de cloroplastos, indicando características morfológicas y bioquímicas, métodos de preparación, y asimilando a esta clasificación los tipos anteriormente descritos por otros autores.

La clasificación de Hall se inicia con los de tipo A, cloroplastos en toda su integridad, con alta tasa de fijación de CO_2 , en los que el ferricianuro es reducido a un bajo ritmo a nivel del Fot. I debido a dificultades de permeabilidad —criterio éste usado frecuentemente para determinar el porcentaje de cloroplastos íntegros existentes en un preparado (43)—, y que se obtienen sólo en medios isotonzados con azúcares mediante una sola centrifugación. Los cloroplastos tipo A con una mayor tasa de fijación de CO_2 se obtienen por el método de Jensen y Bassham (44), a base de HEPES-sorbitol y una única centrifugación a 2.500 g; sin embargo, exhiben numerosas impurificaciones por otras organelas, de las que se pueden separar por centrifugación en gradiente de sacarosa o percoll.

Los del tipo B son también cloroplastos íntegros que han perdido al menos parcialmente, su cubierta más externa, correspon-

diéndose fundamentalmente con los cloroplastos de Clase I antes mencionados; fijan CO_2 , aunque a una baja tasa, reducen el ferricianuro a un buen ritmo ya a nivel del Fot. II, pueden reducir el NADP^+ sin adición de ferredoxina exógena, y admiten dos centrifugaciones en su preparación. Los cloroplastos de tipo C son los clásicos cloroplastos rotos de la Clase II, que no fijan CO_2 y requieren ferredoxina exógena para reducir NADP^+ ; no obstante, mantienen un buen ritmo de transporte electrónico y fotofosforilación.

Los de tipo D son en realidad "lamelas" cloroplásticas que aún mantienen un buen control fotosintético y pueden fijar CO_2 cuando se les adiciona un extracto de cloroplastos y un intermediario - adecuado, aceptor de los equivalentes de reducción producidos. Esto no lo realizan ya los preparados de tipo E, fragmentos de cloroplastos que, si bien mantienen un transporte electrónico, no sintetizan ATP. Finalmente, los tipos F son en realidad partículas subcloroplásticas obtenidas por sonicación o tratamiento con detergentes, con un transporte electrónico limitado al fotosistema en que se hallan enriquecidos; requieren, según el caso, un aceptor y/o donador de electrones adecuado.

La preparación de partículas subcloroplásticas plantea una problemática metodológica particular. En primer lugar el enriquecimiento en Fot. I o Fot. II de un determinado preparado subcloroplástico puede efectuarse siguiendo la relación entre los contenidos de clorofila "a", existente en ambos fotosistemas, y clorofila "b", exclusiva del Fot. II; un enriquecimiento en Fot. II o, lo que es lo mismo en "grana", se traducirá en una disminución de la razón clorofila a/b, mientras que un enriquecimiento en Fot. I o "lamelas" estromáticas, representará un aumento de la misma. Un criterio paralelo - se puede seguir con el enriquecimiento en xantofilas, pigmento auxiliar vinculado exclusivamente al Fot. II. Cálculos similares pueden efectuarse siguiendo la distribución de determinados transportadores

electrónicos vinculados a uno u otro fotosistema, cuando su contenido se exprese en razón a la cantidad de clorofila; así, el componente C-550 y el citocromo b_{559} están exclusivamente asociados al Fot. II, y son fácilmente determinables. Lo mismo cabe decir de las actividades fotoquímicas asociadas a uno u otro fotosistema, con el empleo de donadores y/o aceptores artificiales de electrones. Sin embargo, el método más sensible consiste en la determinación de la fluorescencia de emisión que, a la temperatura del nitrógeno líquido tiene lugar a 730 nm para el Fot. I y a 685 nm para el Fot. II (45).

Una separación estructural de las "lamelas" granales de las estromáticas puede conseguirse tratando los cloroplastos con digitonina, aunque el mejor procedimiento para conseguir esta separación manteniendo intacta la estructura granal parece ser la prensa de French. En cualquier caso, estos tratamientos deben continuarse con una centrifugación diferencial, obteniéndose a 10.000 g una primera fracción que contiene fundamentalmente grana, a 50.000-80.000 g una segunda -- constituida por granas rotas y a 150.000 g las "lamelas" estromáticas. Mediante este procedimiento Boardman y Anderson (46) han conseguido fracciones pesadas granales con una razón de clorofila a/b de 2, y fracciones ligeras estromáticas con una razón de hasta 7. Un método adicional de separar partículas cloroplásticas enriquecidas en Fot. I o en Fot. II es el tratamiento con Tritón x-100. El sedimento obtenido después de una corta centrifugación a 150.000 g se designa TSF-2, constituyendo partículas relativamente planas con gran actividad de Fot. II. El sobrenadante suministra por centrifugación prolongada -- unas partículas TSF-1 en forma de agregados discoidales, que exhiben una clara actividad de Fot. I (47).

Una clasificación de los distintos tipos de partículas cloroplásticas ha sido también hecha (48). Las denominadas P-I incluyen, por un lado, fragmentos granales capaces de soportar un flujo electrónico del H_2O al $NADP^+$ y, por otro, partículas más pequeñas que foto-

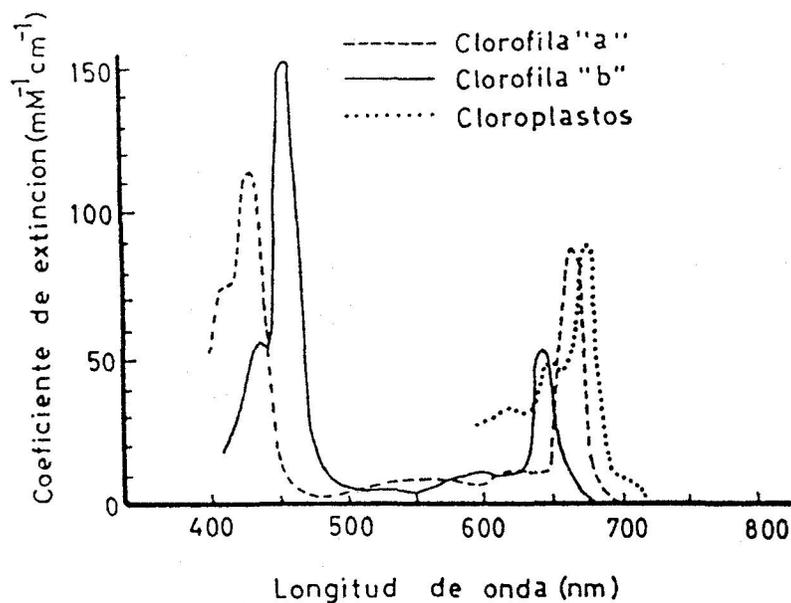
rreducen al NADP^+ cuando se agrega un donador de electrones adecuado; ambas muestran magníficas tasas de fotofosforilación y se obtienen por tratamiento con digitonina. Las partículas P-II mantienen el desprendimiento de O_2 asociado al Fot. II, aunque la reducción del NADP^+ requiere normalmente la adición de plastocianina; la síntesis de ATP aparece generalmente desacoplada, siendo éstos los preparados que se obtienen por tratamiento ultrasónico o con la prensa de French. Aunque verdaderamente la pérdida de plastocianina puede usarse como indicativo del grado de fragmentación, otros autores sostienen que este tipo de partículas pueden reducir normalmente el NADP^+ aún sin adición de plastocianina, de lo que deducen la no necesidad de la misma para un normal transporte electrónico (49). Las partículas P-III se caracterizan por tener dañado el mecanismo de descomposición del H_2O , aunque el Fot. II es operativo con un donador artificial de electrones adecuado; parecen derivar de granas fragmentadas. Las P-IV tienen ya categoría de fotosistemas purificados, aunque aparecen asociadas con otros componentes membranales, particularmente pigmentos accesorios. Finalmente, las partículas P-V constituyen los centros de reacción purificados.

La preparación de cloroplastos de plantas C_4 presenta unas especiales características dado que en este tipo de vegetales coexisten dos tipos de ellos. Los primitivos métodos de separación de cloroplastos del mesófilo de los del parénquima vascular implicaban el uso de procedimientos mecánicos de homogeneización diferencial con o sin una previa digestión enzimática, toda vez que las células del primero son más fácilmente separables que las del segundo de la estructura foliar. De esta forma se obtenían fracciones simplemente enriquecidas en el contenido de uno u otro tipo de células. Actualmente estos procedimientos se completan con una purificación de las fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad o filtración por geles, obteniéndose así cloroplastos de ambos tipos con pequeña o nula contaminación cruzada (50).

Etapas fotoquímicas de la Fotosíntesis.

La captación de la energía radiante la realiza el cloroplasto mediante las llamadas antenas, bloques de sistemas pigmentarios - constituidos en los cloroplastos de plantas superiores por clorofilas "a" y "b", carotenos y xantofilas, que asociados a moléculas --- proteicas constituyen los "light harvesting complex" (LHC). Tal diversidad pigmentaria y su distinto estado de asociación a entidades proteicas permiten al cloroplasto extender la anchura espectral de la radiación captada (51). Cada "centro de reacción" correspondiente al Fot. I ó II posee su propia antena, con unas 300 moléculas de clorofila en cada una, y puesto que cada saco granal soporta hasta 10^5 de dichas moléculas, se deduce que en cada disco tilakoidal operan unas 200 cadenas de transporte (52). No obstante, la composición pigmentaria de los LHC vinculados a los Fot. I y II no es exactamente la misma, estando los del Fot. II enriquecidos en clorofila "b", xantofilas y β -caroteno, y en clorofila "a" los del Fot. I, que contiene también un importante "pool" de β -caroteno. Esto, dada la mayor longitud de la radiación absorbida por la clorofila "b", facilita la -- transferencia energética del Fot. I al II, explicando al mismo tiempo el efecto Emerson, o incremento de la actividad fotosintética cuando adicionalmente se ilumina el cloroplasto con radiación del rojo lejano (53).

Un pigmento primario de la antena capta un cuanto de luz de una λ determinada, quedando en situación de excitación electrónica. - Esta energía puede transferirla a un pigmento vecino siempre que la - distancia entre los mismos y la orientación de los grupos cromóforos permita el establecimiento entre ambos de un estado bipolar de resonancia, de tal forma que la probabilidad de esta transferencia sea mayor que el gasto del estado excitado en otros procesos: emisión de fluorescencia, calor, etc. Puesto que la estabilidad del pigmento fotoexci



tado es pequeña, la transferencia energética entre los mismos ha de tener lugar muy rápidamente, no siendo posible cuando la distancia entre pigmentos vecinos supere los 100 Å (54), lo que viene a ser el orden del espesor de las membranas fotosintéticas. Esto lleva a una estrecha asociación de los pigmentos, pudiendo tener lugar alrededor de 125 pasos de transferencia dentro de una antena antes de que el $h\nu$ absorbido aparezca reflejado en el correspondiente fotosistema, lo que ocurre en 0.3-1.8 nseg en el Fot. II y en < 30 pseg en el Fot. I (55). De ello cabe deducir que en el Fot. I cada transferencia ocurre en un tiempo < 2.5×10^{-13} seg., lo que sólo es explicable en base a la teoría del excitón (56).

En las plantas adaptadas a bajas intensidades de iluminación el defecto lumínico queda en parte superado mediante un aumento de la unidad fotosintética entendido en el sentido de una cooperación de varias unidades antena en ambos Fotosistemas para promover el flujo electrónico de una misma cadena de transporte (57). -

Ello se traduce en un elevado cociente clorofila/citocromo f, índice informativo del tamaño de la unidad fotosintética.

Está generalmente aceptado que las antenas de los Fot. I y II no se encuentran segregadas, sino comunicadas por transferencia de energía de excitación. Esto ha podido comprobarse experimentalmente entre las antenas vinculadas a centros de reacción II, pero no entre las correspondientes a centros I. Por otro lado, es evidente un trasvase de situaciones de excitación entre ambos tipos de centros de reacción, especialmente en el sentido II \rightarrow I, lo que al menos en parte invalidaría el efecto Emerson. Parece ser, sin embargo, que la regulación de este trasvase viene dada por la generación de un gradiente de Mg^{2+} a través de la membrana tilakoidal, cosa que, como se sabe ocurre a consecuencia de la iluminación (58). La ventaja fisiológica de controlar la distribución de cuantos de energía entre ambos fotosistemas por este procedimiento es obvia. La radiación solar normal es recogida por el equipo pigmentario del Fot. II con un mejor rendimiento; sin embargo, el concomitante gradiente de Mg^{2+} originado estimula el trasvase energético al Fot. I, que de esa forma absorbe el flujo electrónico procedente del Fot. II, haciéndolo operativo.

Prácticamente la dotación de moléculas de clorofila de un cloroplasto es la misma durante toda su vida. Un paso metastable del proceso de fotoexcitación de la clorofila es la formación de un estado "triplete" que, si bien muy fugaz, la hace muy susceptible a la destrucción por el oxígeno, siempre presente en los organismos oxigénicos a consecuencia de la lisis del H_2O . El estado "triplete" decae a la situación normal con emisión de fluorescencia, pero su desaparición es aún acelerada por el cloroplasto mediante un mecanismo de defensa basado en una transferencia del estado "triplete" a las moléculas de β -caroteno, muy abundante en ambos Fotosistemas, que rápidamente disipa dicha extra-energía por interacción con oxígeno (59).

La cinética de la emisión de fluorescencia por cloroplastos iluminados después de un período de oscuridad es un fenómeno complejo. Una primera y rápida onda fluorescente P es seguida por una situación de cuasi "steady-state" S, a los 1-1.5 minutos, continuada por una segunda ola fluorescente M de menor intensidad, seguida de un valor terminal de equilibrio T (60). La onda fluorescente P ha de vincularse, por un lado, a la "fluorescencia muerta" o energía perdida en los procesos de transferencia a nivel de antena, y que es un factor constante y, por otro, a la situación de oxidoreducción del "quencher" Q y de los inmediatos transportadores de la cadena de transporte, así como al "status" energético del cloroplasto, es decir, a los valores de las razones $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ y ATP/ADP . Como consecuencia, dicha fluorescencia tiene dos componentes de "quenching" (61): uno denominado q_0 , que se manifiesta cuando la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ es baja y, en consecuencia, se dinamiza el flujo acíclico de electrones con vistas a la síntesis de NADPH , y un segundo denominado q_e , que se evidencia cuando la razón ATP/ADP es baja, y va ligado al establecimiento de un ΔpH alto a nivel de membranas tilakoidales, como consecuencia de un activo flujo electrónico cíclico y pseudocíclico con vistas a la síntesis de ATP. En resumen, la onda fluorescente P está vinculada a la consecución por el cloroplasto de una razón ATP/NADPH adecuada para la fijación de CO_2 el cual, naturalmente, actúa como "quencher" de la misma.

La segunda ola fluorescente M es la denominada "efecto Kautsky" (62), y en cierta manera indica la puesta en marcha del proceso de asimilación de CO_2 , una vez superada la "fase de inducción" con la que en cierto modo se puede identificar en el tiempo la onda P. La puesta en marcha de tal proceso distorsiona transitoriamente el "pool" de NADPH y ATP establecidos, tanto más cuanto menor sea el nivel alcanzado de éstos, que como tales actúan como "quenchers" de dicha fluorescencia tardía. Robinson y Walker (63) la vinculan a la reduc-

ción del 3-P-Glicerato a P-gliceraldehido. Esto viene corroborado porque el D, L-gliceraldehido, un inhibidor de la asimilación del CO_2 , y el NH_4^+ , un activo desacoplante eliminan o sustancialmente modifican esta segunda onda fluorescente (64).

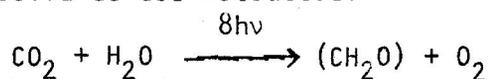
Otra forma de disipación energética es la llamada "delayed" luminiscencia, descrita por primera vez por Strehler y Arnon (65), que tiene lugar más tardíamente que la emisión de fluorescencia, -- en un intervalo de tiempo entre 10^{-3} y 10^{-1} segundos, después de iluminar. Se encuentra vinculada al Fot. II y es indicativa del -- grado de funcionamiento del "centro de reacción" (66).

Dos fotorreacciones operan en serie para elevar electrones desde el H_2O , un donador con alto potencial redox al aceptor NADP^+ de bajo potencial. Estas fotorreacciones tienen lugar en sendos -- "centros de reacción" denominados Fot. I y Fot. II, cuyos componentes fotoactivos son, respectivamente, los denominados P-700 o clorofila "a₁" y P-680 o clorofila "a₂". El componente P-700 --denominado así por presentar un máximo de absorción a dicha longitud de onda, aunque su banda de absorción se extienda entre 400 y 730 nm--, origina por fotooxidación un radical catiónico cuyo electrón desapareado aparece en EPR deslocalizado sobre dos anillos porfirínicos, lo que sugiere se trata de un dímero de dos moléculas de clorofila "a" (67). Lo mismo cabe aplicar al componente P-680 --con banda de absorción entre 400 y 700nm-- llamado también "trampa" por ser el elemento que capta de forma irreversible los $h\nu$ atrapados por las antenas del Fot. II. El potencial redox del P-700 es de +450 mV, -- alcanzando por fotoexcitación -1.350 mV, con un gradiente energético del que aproximadamente el 50% se pierde por disipación. Cede -- el electrón excitado a un aceptor primario X de naturaleza aún desconocida recuperándolo después de un donador primario: la plastocianina. Análogamente, el componente P-680 tiene un potencial redox de +500 mV, llegando a alcanzar en el fotoacto -700 mV; al igual que --

antes, parte de este gradiente energético se disipa al reducir al -
 aceptor primario, probablemente de naturaleza quinónica, aceptando
 luego electrones del donador Z de estructura desconocida.

Tanto los componentes fotoactivos P-680 como P-700 parecen
 estar incrustados en una matriz proteica. Se ha apuntado que la pro-
 teína matriz actuaría "canalizando" el flujo electrónico del componen-
 te fotoactivo a los aceptores primarios, pero no hay base experimen-
 tal para ello.

Este planteamiento sobre la base de dos Fotosistemas ha con-
 ducido al clásico esquema en Z de Hill y Bendall (68), con un requere-
 rimiento teórico de 8 hv por mol de O₂ desprendido, toda vez que la
 transferencia de cada equivalente de reducción requiere la interven-
 ción sucesiva de dos fotoactos:

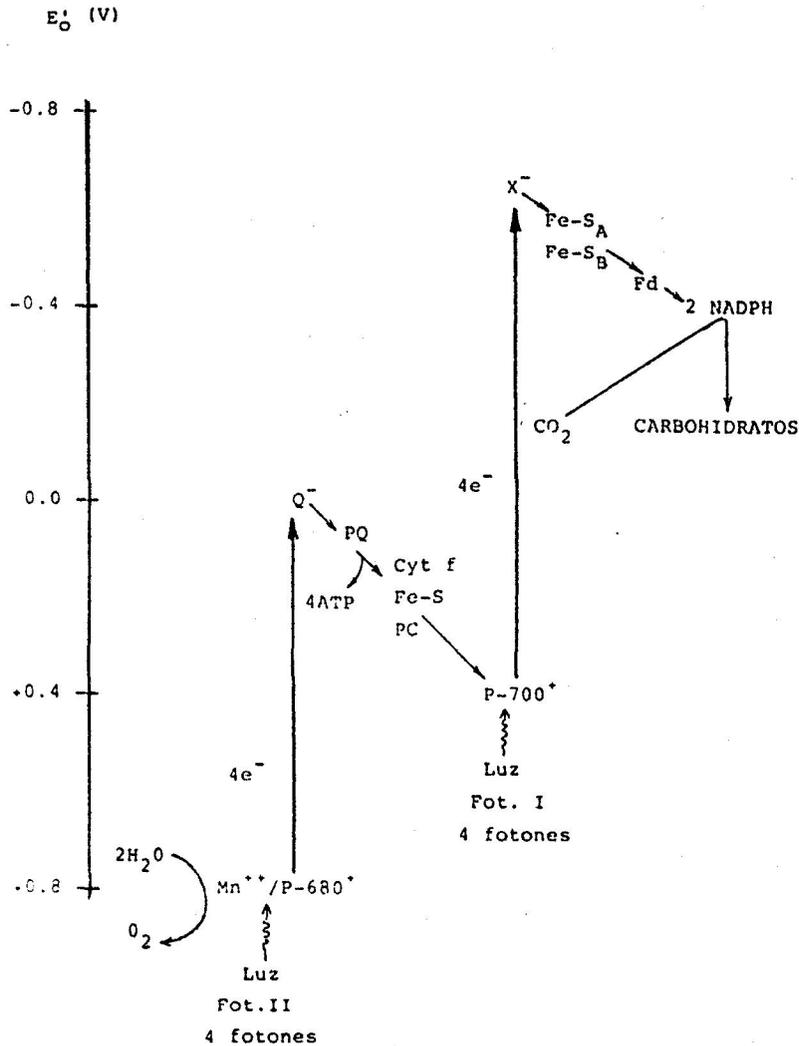


A consecuencia del Fot. II tiene lugar un tránsito de + 800
 mV del sistema H₂O - O₂ al -35 mV del aceptor primario del Fot. II,
 mientras que en el Fot. I se consigue el tránsito de +450 mV del com-
 ponente P-700 al -340 mV del NADPH. Así pues, el tránsito neto de po-
 tencial redox entre ambos extremos es de +800 mV a -340 mV, con un -
 gradiente de 1.140 mV.

Como puede observarse en el esquema adjunto, la fuerza que
 impulsa el transporte electrónico y el gradiente protónico anejo no
 es más que la derivada de la separación espacial de cargas que tiene
 lugar como consecuencia de ambos fotoactos: P₆₈₀⁺-Q⁻ en el Fot. II y
 P₇₀₀⁺-X⁻ en el Fot. I. Esta separación de cargas es la responsable -
 del llamado "efecto electrocrómico", producido por la distorsión que
 este campo eléctrico produce en el espectro de absorción del siste-
 ma pigmentario de las antenas (69).

Mientras ambos Fotosistemas son responsables del flujo ací-
 clico de electrones, sólo el Fot. I es el responsable del flujo cí-

Potencial redox



clico. Este esquema se conoce como el de "2 reacciones lumínicas" - frente a la hipótesis de "3 reacciones lumínicas" postulada por Arnon (70), según la cual la reducción del $NADP^+$ depende de dos fotoactos conducidos por el Fot. II que, directamente, es capaz de reducir a la ferredoxina a través de una feofitina, recientemente descrita como el aceptor primario de dicho Fotosistema. Un tercer fotoacto, dependiente del Fot. I, iría dirigido, no a la síntesis de $NADPH$, sino de ATP.

Cadena de transporte electrónico.

Además de los componentes fotoquímicos P-700 y P-680 mencio

nados, existen una serie de transportadores electrónicos en la cadena fotosintética (ver Fig. anterior y siguiente) a los cuales nos vamos a referir sucintamente. Magníficas revisiones sobre el particular han sido publicadas por Barber (71), Velthuys (72) y otros (73).

Sistema de escisión del H_2O . El conjunto de la cadena de -- transporte comprendido entre el H_2O y el Fot. II constituye la zona más lábil y, desde luego, menos conocida. Vinculada a ella ha sido demostrada la necesidad de iones Cl^- y de Mn, del que las 2/3 partes del contenido total cloroplastídico resulta esencial para el desprendimiento de O_2 , si bien no todo él se encuentra en el mismo estado, sino en forma de tres diferentes "pools" (74).

Han sido aisladas de cloroplastos cadenas polipeptídicas - que contienen Mn ligado, y que de alguna forma se encuentran unidas a las moléculas de clorofila del Fot. II. Este Mn podría considerarse vinculado al defecto en formación de grana que la deficiencia en este elemento ocasiona (75). Más aún, Kuwabara y Murata (76) detectan la liberación por tratamiento a pH alcalino de preparados de -- Fot. II de tres entidades polipeptídicas, al mismo tiempo que desaparece la capacidad de desprendimiento de O_2 . En general, el "locus" lamelar en que reside el sistema de lisis del agua es muy susceptible a la acción de fermentos proteolíticos, como la tripsina (77). Por el contrario, aniones como el citrato, succinato, etc., que se encuentran muy altos en la serie de Hofmeister, actúan estabilizando dicho sistema, protegiéndolo en cierta medida frente a la acción del calor y agentes caotrópicos (78), lo que podría ser debido a -- una protección conformacional de las entidades proteicas vía una estabilización de las moléculas orientadas de H_2O que, como una coraza, crean un microambiente protector de las proteínas, de cuya correcta estructuración depende en última instancia el mantenimiento del Mn ligado.

El hecho básico en la elucidación del mecanismo de actuación del componente Z fué la observación de que cuando se iluminaba el cloroplasto con 4 golpes de "flash", el desprendimiento de O_2 tenía lugar a cada cuatro golpes de iluminación, lo que sugería 4 actos fotoquímicos sucesivos antes de que tuviera lugar el desprendimiento gaseoso (79). Puesto que cada fotoacto implica la cesión de un electrón al componente P-680, ello indicaba que Z puede experimentar cuatro estadios sucesivos de oxidación, $S_1-S_2-S_3-S_4$, desde la situación base S_0 , produciéndose a nivel del estado S_4 la oxidación del H_2O , recuperándose la situación S_0 con desprendimiento concomitante de un mol de O_2 . La estabilidad de estos estados de oxidación es muy precaria, estando aumentada por la formación de compuestos de coordinación en los que interviene el Mn como ión central, en estados de oxidación variables aún no definidos, y en los que se han detectado las especies H_2O , OH^\cdot , H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ (80).

Citocromo b_{559} . Existe en el cloroplasto en dos formas, ambas vinculadas al Fot. II. La forma de alto potencial tiene alrededor de +370 mV, y ha sido sugerida por algunos como donador primario de electrones del Fot. II. Un papel alternativo es la posibilidad de catalizar un flujo electrónico cíclico alrededor del Fot. II entre Q^- y cit. b_{559}^+ en condiciones de alta irradiación, cuando el aporte electrónico procedente del H_2O no es suficiente para abastecer el alto ritmo de fotooxidación de la clorofila, impidiéndose así los efectos deletéreos derivados de una vida prolongada de la especie P-680⁺ (81). Una forma de bajo potencial, de un potencial redox próximo a 0 mV, se sitúa entre el aceptor primario Q y el "pool" de plastoquinona (82).

Aceptor primario del Fot. II. El componente Q —hasta hace poco considerado como el aceptor primario— exhibe un potencial de -35 mV, —según la versión más segura, aceptando un solo electrón. Su naturaleza química es aún desconocida, aunque parece imponerse la idea de un tipo especial quinónico. Se le denomina también "quencher" por disipar la fluorescencia emitida por el P-680 en condiciones en que el flujo electrónico hacia el Fot. I se encuentra inhibido (83). La medida de esta fluorescencia constituye un buen procedimiento de medida del estado redox del componente Q y, por tanto, de la funcionalidad de la cadena de transporte en el lado reductor del Fot. II.

Recientemente (84) se ha postulado para él una forma especial de plastoquinona, espacial y funcionalmente independiente del "pool" de plastoquinona, que sería reducida en el fotoacto a un radical de tipo semiquinónico. Por otro lado, los trabajos de Klimer y colaboradores (85) parecen sugerir que un componente con naturaleza de feofitina "a" pueda actuar como aceptor primario del Fot. II. Este, llamado aceptor I podría ser el mismo componente C-550, anteriormente descrito como feofitina vinculada al aceptor Q.

Componente B. Descubierto por Bouges-Bocquet (86) —y posteriormente llamado R por Velthuys y Amesz (87)—, tiene también naturaleza quinónica, aceptando ya electrones por pares del componente Q antes de transferirlos como tales al "pool" de plastoquinona. En 1976 —Renger (88) propuso que los componentes Q y B estaban rodeados por — una estructura proteínica de naturaleza lipofílica, que en ese sentido sirve como de aislante de los mismos frente a la fase acuosa — estromática. Como luego veremos, dicha estructura parece jugar un — papel clave en la regulación del flujo electrónico a nivel de los — componentes Q y B, constituyendo además el punto de anclaje de distintos inhibidores del mismo.

Recientemente (89) se ha descrito la necesidad de CO_2 - probablemente en forma de CO_3H^- - para que el propio proceso de transporte electrónico pueda tener lugar, estando localizado su lugar de actuación entre el aceptor primario de electrones Q del Fot. II y la plastoquinona, probablemente por interaccionar con el aceptor secundario B. Aunque la forma de anclaje sobre el mismo parece ser la de CO_3H^- , Vermaas y Van Rensen (90) proponen un mecanismo más complejo dada la dificultad que el CO_3H^- ha de encontrar -dadas las cargas negativas que, especialmente al pH del cloroplasto iluminado, bloquean el pasillo de acceso al lugar de anclaje- para alcanzar dicho lugar, cargado positivamente. Los autores proponen un acceso al lugar de anclaje en forma de CO_2 , donde sería fijado por exceso de carga como CO_3H^- . Este lugar de anclaje sería el mismo que el de los inhibidores fotosintéticos tipo DNOC.

Plastoquinona. Es el elemento mayoritario de la cadena de transporte, constituyendo el llamado "pool" de plastoquinona, con un potencial redox de -30 mV. Su concentración en el cloroplasto es muy discutida, siendo lo más probable la existencia de 7 moléculas por "centro de reacción", de las que en condiciones de iluminación media, 4 permanecen en forma reducida (91). Puesto que puede aceptar hasta 2 electrones por molécula, ello implica un reservorio de 8 equivalentes de reducción, lo que le permite servir de enlace entre distintas cadenas de transporte -un sólo "pool" puede sustentar hasta 10 cadenas de transporte (92)-, y suplir así posibles deficiencias -- del sistema de antena o del propio P-680.

Puesto que entre la plastoquinona y el Fot. II pueden sólo almacenarse tres electrones adicionales como máximo, resulta evidente que la transición plastoquinona a citocromo f, con transferencia de un electrón, constituye el paso limitante de la cadena de transporte, puesto de manifiesto de que aún en condiciones de fuerte ilu-

minación, la plastoquinona aparezca fundamentalmente al estado reducido, mientras que el citocromo f aparece en estado oxidado (93).

Citocromo f y b_6 . Ambos aparecen asociados al Fot. I. El primero —un citocromo c, a pesar de su nombre— tiene un potencial redox de +360 mV, siendo su posición más admitida inmediatamente antes de la plastocianina. Constituye el componente minoritario de la cadena total, siendo por lo tanto el punto crítico por lo que al transporte de electrones se refiere (94). El citocromo b_6 , con un potencial de 0 V, se encuentra fuera de la cadena principal de transporte y vinculado al flujo electrónico cíclico, siendo reducido por el aceptor primario X del Fot. I, y oxidado a nivel del "pool" de plastoquinona (95).

Plastocianina. Es una cuproproteína con un potencial redox de + 370 mV, débilmente ligada a la estructura lamelar. Su posición en la cadena de transporte ha sido muy discutida, siendo la más aceptada la definida por reducción por el citocromo f y su fotooxidación por el P-700.

S-Fe proteína tipo Rieske. Tiene un potencial redox de + 290 mV, y se encuentra vinculada al Fot. I, aunque en una posición aún no determinada.

Componente X. La identificación del aceptor primario de electrones del Fot. I. ha sido objeto de gran controversia en la historia reciente, y aún no se ha llegado a dilucidar. Los datos suministrados por el EPR indican se trata de una ferrosulfoproteína no hemínica, ha-

biéndose propuesto sucesivamente las candidaturas de la propia ferredoxina, la llamada "ferredoxin-reducing-substance", los "centros A y B" y, más recientemente por Evans y col. (96) una sulfoferroproteína atípica, por cuanto presenta al EPR una señal a $g = 1.76$ que cae fuera del rango conocido para estos compuestos. Actualmente se admite que - ambos "centros A y B", con potenciales redox respectivos de -530 mV y -580 mV, forman parte de la cadena de transporte entre la ferredoxina y el aceptor primario X, mientras que pruebas indirectas han predicho para este último un potencial redox del orden de -730 mV (97).

Ferredoxina.

Es una sulfoferroproteína con hierro no hemínico y azufre lábil. Aunque presenta una gran variedad según su procedencia, las existentes en cloroplastos de algas y plantas superiores pertenecen al tipo $2 \text{ Fe} - 2\text{S}$, siendo su peso molecular alrededor de 12.000. El centro activo y cromóforo de este grupo de ferredoxinas presenta la estructura $(\text{R-S})_2\text{Fe} = \text{S} = \text{Fe} (\text{S-R})_2$, en la que ambos átomos de hierro se encuentran al estado Fe^{3+} en la ferredoxina oxidada, pasando uno de ellos a la forma Fe^{2+} en la reducida. Admite por lo tanto un electrón en el juego de oxido-reducción, siendo su potencial redox de -420 mV.

Su contenido en el cloroplasto es de una molécula por cada 300-400 moléculas de clorofila, es decir, aproximadamente de una ferredoxina por cadena de transporte electrónico, lo que indica que - ha de tener un "turnover" muy rápido. En las plantas C_4 se admite - la existencia de un mayor contenido que en las C_3 , seguramente por la incidencia que tiene este compuesto en la fotofosforilación cíclica y pseudocíclica, que proporcionan el ATP adicional que requieren aquéllas (98). Las ferredoxinas intervienen, además de en la cadena

de transporte electrónico de la Fotosíntesis, en una serie de procesos oxido-reductores de la planta: asimilación del nitrato y sulfato, activación lumínica del ciclo de Calvin, etc. Aunque en principio se trata de un componente soluble, y como tal se encuentra en el contenido estromático, presenta cierto grado de unión a las membranas tilakoidales dada su gran afinidad a la ferredoxin-NADP⁺-reductasa.

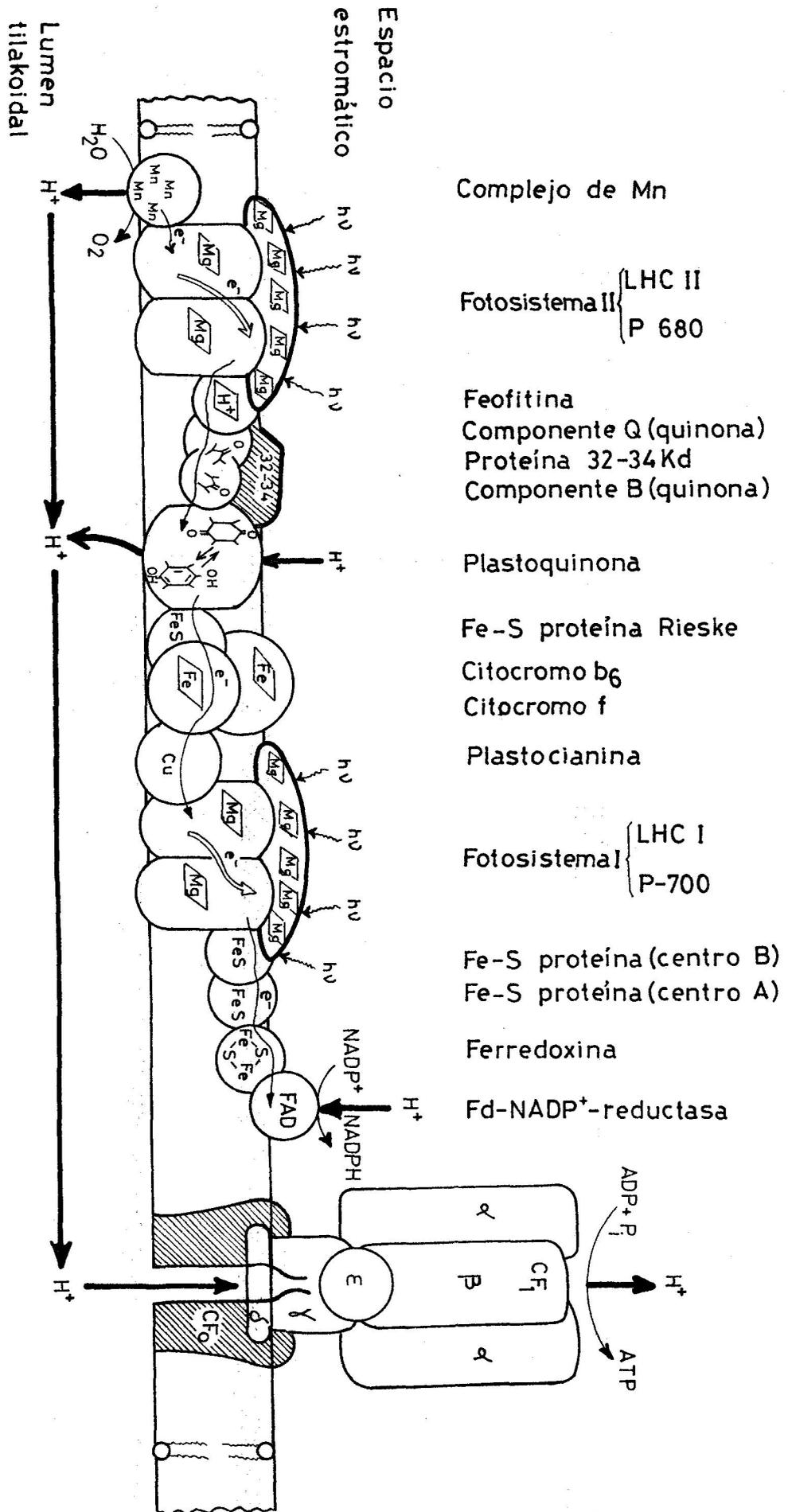
Ferredoxin-NADP⁺-reductasa. Es una proteína de p.m.40.000, con un resto de FAD como grupo prostético. Tiene un potencial redox de -380 mV y, aunque en condiciones normales admite un solo electrón, en situaciones forzadas puede admitir un segundo con reducción total (99). Topográficamente está localizado en la superficie externa de las lamelas, formando al actuar auténticos complejos con la ferredoxina, su donador de electrones, necesarios para la transferencia de los mismos al NADP⁺. En presencia de NADPH puede, en reacción inversa, reducir a la ferredoxina, así como a otros aceptores naturales y artificiales.

El transporte electrónico del H₂O al NADP⁺ sirve dos funciones: la producción de equivalentes de reducción en forma de NADPH al final de la cadena, y la síntesis de ATP a través de la formación previa de un potencial electroquímico mediante reacciones de transferencia que tienen lugar, por un lado, al comienzo de la cadena como consecuencia de la fotólisis del H₂O y, otro, en una zona intermedia a nivel del "pool" de plastoquinona. Este flujo electrónico tiene lugar merced al bombeo de los electrones circulantes a un nivel de reducción más elevado, lo que ocurre dos veces a lo largo de la cadena por sendas reacciones fotoquímicas, y a una diferencia de potencial redox entre elementos consecutivos de cada tramo

de la cadena. De ello se deduce que una ordenación espacial de los elementos integrantes será necesaria para un funcionalismo en la - cadena de transporte, ordenación que afectará a una secuencia topográfica de los elementos transportados, a una orientación de los - elementos fotoquímicos en orden a una adecuada captación lumínica, a una disposición de los eslabones en que tiene lugar la liberación de H^+ adecuada para un óptimo tránsito de éstos, y a una localiza-ción funcional de aquellos elementos a nivel de los cuales liberan, bien productos de desecho, bien compuestos reguladores de etapas -- subsiguientes.

Experiencias de fragmentación de membranas y el uso de anticuerpos específicos frente a determinados componentes de la cadena de transporte, han permitido fijar la posición de éstos dentro - del espesor de las mismas y establecer un esquema del flujo electrónico y transferencia protónica. Estos resultados coinciden con aquellos otros que localizan al Fot. II vinculado a la membrana interna de las lamelas granales, y al Fot. I a una zona más externa de la - membrana tilakoidal, de tal forma que todos los componentes de la - cadena de transporte aparecen asociados con sendos complejos glóbulares insertos en las membranas, pudiendo separarse por las técni-cas de fragmentación antes apuntadas.

Lam y Malkin (100) han conseguido reconstruir la funcionalidad del mecanismo de transporte electrónico acíclico $H_2O \rightarrow NADP^+$ a partir de los tres complejos proteicos separados de las membranas cloroplastídicas: Fot. I, Fot. II y complejo citocromos b_6-f , a los cuales hay que adicionar los componentes ferredoxina, plastocianina y ferredoxin-NADP⁺-reductasa, el primero de ellos soluble, y los -- otros dos débilmente ligados a las membranas, de las que se separan en el proceso de aislamiento de los complejos mencionados. Estos -- exhiben la funcionalidad correspondiente de forma aislada usando aceptores y/o donadores artificiales de electrones, conteniendo el Fot. II además de su correspondiente sistema de antenas y centro de reac-



ción P-680, el sistema de lisis del H_2O , cit. b_{559} y aceptores hasta el componente B; el Fot. I es portador del centro P-700 y su sistema de antenas, junto con los aceptores de electrones correspondientes; finalmente, el complejo cit. b_6-f porta, además, de ambos citocromos, plastoquinona y la ferrosulfoproteína tipo Rieske.

En resumen, durante el fotoacto la oxidación del H_2O ocurre en la superficie interna del tilakoide, liberando H^+ en su interior y produciéndose O_2 que difunde al exterior de las lamelas. El electrón atrapado en este fotoacto cruza la membrana hacia el exterior y produce la reducción del aceptor primario, localizado cerca de la superficie externa, y, sucesivamente, la de los transportadores Q y B. Este reduce en dicho nivel a la plastoquinona, proceso para el cual se requiere un H^+ , que es captado del espacio estromático, con alcalinización simultánea del mismo; la plastoquinona reducida vé así exacerbado su carácter lipófilo, lo que le permite cruzar el espesor de la lamela hacia la cara interna del tilakoide, donde es reoxidada por el cit. f, abandonando en el lumen intratilakoidal el H^+ anteriormente aceptado.

Dado que la plastoquinona se encuentra formando un "pool" de moléculas, a cuyo nivel se pueden producir interconexiones de varias cadenas de transporte, la transferencia de H^+ del espacio exterior al interior podría tener lugar mediante una sola molécula que viajase a través del espesor de la membrana -"diffusion type mechanism"-, o por transferencia de H^+ y electrones de una a otra molécula del "pool", estadísticamente distribuidas a lo largo de dicho espesor -"hopping type mechanism"- (101).

En cualquier caso, en el Fot. I los electrones son de nuevo bombeados hacia la superficie exterior, donde se produce la reducción del aceptor primario X y, subsiguientemente la de la ferredoxina y $NADP^+$, que queda en el espacio estromático como NADPH previa captación de dos electrones y un H^+ , procedente éste de dicho -

espacio, que sufre una alcalinización adicional. De esta forma los electrones atraviesan tres veces el espesor lamelar durante su flujo del H_2O al $NADP^+$: dos en dirección al exterior, y una intermedia en sentido inverso, mientras que se produce un flujo de H^+ hacia el espacio interior. Respecto al flujo electrónico cíclico la situación es similar, con un cit. b_6 embebido en el espesor de las membranas, haciendo de puente entre el aceptor primario X y la plastoquinona.

Como consecuencia de esto se establece un gradiente de cargas -positivas en el interior- y de pH -alcalinización externa-, que conduce a la creación de una fuerza protón-motriz que conduce, como último fin a la síntesis de ATP. Estrictamente consideradas -- las reacciones de transporte que inciden en el flujo protónico transmembranal no son electrogénicas "in sensu strictu", pues las cargas -inducidas están localmente compensadas (en el caso de la plastoquinona hay una compensación entre H^+ y electrones). Como se dijo anteriormente las únicas reacciones auténticamente electrogénicas, con verdadera separación de cargas, son las reacciones fotoquímicas de ambos fotosistemas: $P-680^+I^-$ y $P-700^+X^-$, en las que cada una contribuye con 25 mV en cada "turnover" al potencial neto de membrana de 50 mV (102).

Fotofosforilación.

Varias revisiones existen en relación con el mecanismo que acopla el transporte electrónico con la síntesis de ATP en el cloroplasto (103, 104). La "teoría quimiosmótica" de Mitchell (105) postula que, como consecuencia del transporte vectorial de H^+ que, desde un plano mecanicista, demanda la existencia de un mecanismo translocador de sentido inverso que restaure la situación de equilibrio anterior. Esto genera una llamada "fuerza protonmotriz", constituida por un componente de gradiente de pH, y un segundo de gradiente elec

troquímico, de los que el primero tiene indudablemente mucha mayor importancia, con un ΔpH de aproximadamente 3 —alrededor de 5.0 en el espacio interior y 8.0 en el exterior— frente a un $\Delta\Psi$ de unos 90 mV. Que esto es así viene confirmado por la síntesis inducida de ATP, en la oscuridad, después del establecimiento artificial de un gradiente de pH entre los espacios intra y extratila-koidales -- (106). La formación de gradientes mayores, queda limitada, por un lado, por la propia capacidad tamponante del contenido intratila-koidal (107) y, por otro, por la existencia de un flujo compensador de iones, principalmente Mg^{2+} , en dirección al espacio estromático -- (108), lo que, como luego veremos, tiene también una gran importancia en un plano regulador.

Este activo movimiento iónico a través de la membrana tila-koidal induce cambios conformacionales patentes en la estructura de la misma que, si bien de naturaleza aún desconocida, se patentizan incluso como una disminución del grosor de la membrana, detectable por densitometría de las microfotografías electrónicas. Efectivamen-te, se han observado cambios de accesibilidad de distintos grupos -funcionales de la membrana en la transición luz-oscuridad. Horton y Cramer (109) encontraron que los citocromos f y b_{559} presentaban -- una distinta accesibilidad al ferricianuro, de lo que deducen la -- existencia de una reagrupación de estos elementos en el espesor de la membrana.

Una consecuencia importante de la "teoría quimiosmótica" - es que el transporte electrónico y el mecanismo de síntesis de ATP no necesitan estar juntos ni en el espacio ni en el tiempo, ya que dada la estructura del espacio intratila-koidal, que aparece como un contínuo, hay que considerarlo como un gran reservorio protónico co-mún a todo el cloroplasto. Esto no quiere decir que ambos procesos no estén en la práctica coordinados, y el término "acoplamiento" in-cide en ello, a pesar de la existencia de un "transporte electróni-co basal" independiente de una fosforilación paralela. Efectivamen-

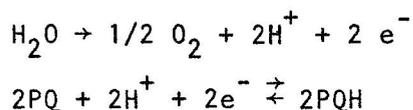
te, el concepto "acoplamiento" permite predecir la existencia de un fácil mecanismo de control fotosintético y de síntesis equilibrada de NADPH y ATP.

El término "acoplamiento" tiene un doble sentido, pues no existirá fotofosforilación si no existe transporte electrónico, y no existirá éste si el cloroplasto no tiene disponibles los sustratos ADP y Pi, necesarios para la fosforilación. No obstante, cloroplastos aislados muestran una pequeña tasa del antes mencionado --- "transporte electrónico basal" independiente de una fosforilación paralela, y que constituye el llamado "estado 1" del cloroplasto; - una fotofosforilación endógena, dependiente de las concentraciones propias en ADP y Pi del cloroplasto, lleva a una tasa de transporte electrónico que define el llamado "estado 2". La adición de un exceso de ADP lleva, bajo condiciones saturantes de iluminación, a un ritmo máximo de fotofosforilación, constituyendo las circunstancias del "estado 3", siendo el "estado 4" el ritmo de flujo electrónico que se establece cuando dicho ADP se ha agotado.

Puesto que la translocación de H^+ se deriva de un mecanismo de transporte electrónico, la existencia de un elevado gradiente protónico retardará dicha translocación y, paralelamente, el -- ritmo de la cadena de transporte; una síntesis de ATP hará disminuir el gradiente, y pondrá de nuevo en marcha un ritmo acelerado del - flujo electrónico. Por supuesto, cualquier otro proceso que conlleve fuga de H^+ del espacio intratilkoidal provocará también una activación de la cadena de transporte. Tal es el caso de los desacoplantes, tanto los que disipan el gradiente de pH (aminas, nigericina), como el gradiente electroquímico (valinomicina), como ambos a la vez (gramicidina, ionóforos de protones tipo FCCP).

Se llaman "lugares electrogénicos, o conservadores de energía" aquellos puntos de la cadena de transporte en que tiene lugar el aporte de H^+ al espacio intratilkoidal, denominándose "punto 11"

al correspondiente a la lisis del H_2O , y "punto I" al lugar de actuación de la plastoquinona; puesto que en cada uno tiene lugar la liberación de un H^+ por electrón transferido, se dice que la razón $H^+/2e^-$ es 4:



Respecto al flujo electrónico cíclico sólo existe como "lugar electrogénico" el "punto I", por lo que sólo debería liberarse un H^+ por cada electrón circulante, aunque en la realidad el rendimiento parece ser mayor, como luego veremos.

Compuestos artificiales que tengan valores adecuados de potencial redox, y características de hidro o lipofilicidad convenientes, podrán integrarse en puntos concretos de la cadena de transporte electrónico. Si, además, su mecanismo de óxido-reducción implica, al igual que con la plastoquinona, no sólo un transporte electrónico, sino también un transporte de protones, estos compuestos podrán dar lugar a lugares electrogénicos artificiales. De ellos hay descritos uno a nivel del donador primario de electrones del Fot. II, y otro a nivel de la plastocianina.

En la fotofosforilación acíclica, vinculada al transporte electrónico $H_2O \rightarrow NADP^+$, participan ambos "lugares electrogénicos", estando involucrados ambos Fotosistemas I y II, como se deduce por su cese mediante inhibidores específicos y por su espectro de acción. En consecuencia, en dicho proceso se producen simultáneamente ATP y NADPH en una relación que, sobre la base de $H^+/ATP = 3$ (110), puede estimarse en $ATP/NADPH$ (ó P/e_2) = 1.33. Aunque Reeves y Hall (111) han encontrado estequiometrías que se acercan a 2, lo cierto es que el valor 1.33 no llega al 1.5 derivado de los tres ATP y dos NADPH necesarios por mol de CO_2 asimilado según el ciclo de Calvin, ni - menos aún a los 5 ATP y dos NADPH de los vegetales tipo C_4 . La tasa absoluta de la fotofosforilación acíclica se ha estimado alrede-



dor de 200 μ moles de ATP/mg de clorofila/hora, valor que entra en el margen de los 150-600 μ moles necesarios para justificar los niveles de 50-200 μ moles de CO_2 fijados/mg de clorofila/hora.

Tambi3n ambos "lugares electrog3nicos" participan en la -fotofosforilaci3n pseudoc3clica. En ella el flujo electr3nico procedente del H_2O se deriva, a nivel de la ferredoxina por reacci3n de Mehler, a una reoxidaci3n por el propio O_2 producido en la lisis del H_2O . Como en esta reoxidaci3n se produce H_2O_2 , resulta mayor el O_2 consumido que el liberado intracloroplast3dicamente, por lo que su ritmo viene ya limitado por este factor. En cualquier caso, el car3cter t3xico del H_2O_2 finalmente formado, y del $\text{O}_2^{\cdot-}$ intermedio, obliga a su r3pida eliminaci3n a trav3s de la peroxidasa y Cu, Zn-Super3xido dismutasas cloroplast3dicas, a lo que tambi3n contribuye la alta concentraci3n de ascorbato reducido del org3nulo. Se han medido niveles de fotofosforilaci3n pseudoc3clica de unos 20 μ moles de ATP/mg de clorofila/hora. Aunque discutido, el principal papel de la fotofosforilaci3n pseudoc3clica estriba en suministrar el ATP adicional requerido para la asimilaci3n carbonada.

En la fotofosforilaci3n c3clica parece incidir, no s3lo el "punto I" como "lugar electrog3nico", sino tambi3n un segundo probablemente situado entre el Fot. I y el cit. b_6 , como parece deducirse de la necesidad de 2 hv por mol3cula de ATP sintetizada. Su independencia del Fot. II se deduce por la insensibilidad al DCMU y por su espectro de acci3n, y su vinculaci3n al Fot. I por ser inhibida por dibromotimoquinona y DSPD, antagonistas espec3ficos de la plastoquinona y ferredoxina, respectivamente. Es inhibida por la antimicina A, que bloquea el transporte electr3nico c3clico entre el cit. b_6 y la plastoquinona (112), y estimulada por la fenazina metasulfato, - que aporta a nivel del cit. b_6 un flujo electr3nico suficiente para cebar el ciclo. El proceso c3clico muestra una alta capacidad fosforilante, con 250 μ moles de ATP sintetizado/mg de clorofila/hora en

condiciones anaerobias, y 80 μ moles en aerobiosis, bajo condiciones de iluminación saturantes. Aunque se ha reclamado su papel en el -- aporte del extra-ATP necesario para la fijación del CO_2 , parece más clara su participación en el suministro del ATP adicional necesario en el período de inducción y en otros procesos (fijación de N_2 , sín tesis protéica, etc.). Para otros, dada su precocidad filogenética y única fuente de ATP en bacterias fotosintéticas, su presencia en eukariotes tiene carácter relíctico (113).

El control del nivel de fotofosforilación descansa, fundamentalmente, en dos parámetros: la razón ATP/NADPH, y el "potencial fosforilante" $(\text{ATP})/(\text{ADP})(\text{P}_i)$. El equilibrio ordenado entre los niveles de ATP y NADPH depende, a su vez, del "turnover" de la pareja NADP^+ -NADPH (114), y pivota fundamentalmente en el estado redox de la ferredoxina y plastoquinona, toda vez que la primera puede derivar el flujo electrónico hacia la síntesis de NADPH vía flujo acíclico, hacia la reducción de O_2 vía flujo pseudocíclico, o hacia el cit. b_6 vía flujo cíclico, y la segunda constituye el punto de entrada de este último en la cadena principal.

Si no hay aporte de CO_2 o de otro aceptor electrónico, la mayor parte del NADP^+ estará en forma reducida, y el concomitante acúmulo de ferredoxina reducida provocará, por un lado, una ralentización de la cadena acíclica de transporte, y por otro, una exaltación de su oxidación vía flujos pseudocíclico y cíclico. Si, por el contrario, hay disponibilidades de CO_2 , el flujo acíclico será predominante con vistas a la síntesis continuada de NADPH; no obstante, como la fosforilación a él acoplada no aporta ATP suficiente, parte del flujo electrónico se desviará a nivel de ferredoxina hacia la síntesis adicional de ATP vía fotofosforilación pseudocíclica (115), o aún cíclica.

El "potencial fosforilante", definible también por la --- "carga energética" ATP/ADP, dada la concentración no limitante --

de P_i del cloroplasto, llega a aumentar entre dos y cuatro veces en la transición oscuridad-luz, supuesto un aporte suficiente de CO_2 . Una disminución del "potencial fosforilante" por consumo de ATP, incrementará la tasa de fosforilación debido al control que el sistema adenílico ejerce sobre la cadena de transporte electrónico. En cualquier caso el "turnover" de síntesis e hidrólisis de ATP en el cloroplasto debe ser muy grande, pues sólo existen en él entre 30 y 50 nmoles de ATP/mg de clorofila, mientras que un cloroplasto en perfecto funcionalismo puede fijar entre 100 y 200 μ moles de CO_2 /mg de clorofila/hora.

Finalmente, un intercambio de NADPH y ATP entre el cloroplasto y citoplasma constituye, como luego se verá, un factor adicional de regulación. No hay que olvidar, no obstante, la existencia de otros procesos en el cloroplasto que consumen ATP, aunque en verdad ninguno de ellos a las elevadas tasas exigidas por la asimilación del CO_2 . Experiencias efectuadas con organismos heterotróficos indican que la conversión de carbohidratos en componentes estructurales celulares requiere 2-3 moles de ATP por mol de C transformado (116). Estos, unidos a los 3 ó 5 moles de ATP utilizados en la asimilación del CO_2 -según se trate de vegetales C_3 ó C_4 - en carbohidratos, totalizan entre 5 a 8 moles de ATP por mol de C incorporado. Puesto que en ese mismo tránsito se consumen 2 moles de NADPH, ello conlleva una razón ATP/2e entre 2.5 y 4.0. Como antes indicamos, nunca se han dado en la literatura relaciones ATP/2e superiores a 2.0, lo que implica una activa fotofosforilación cíclica, o "lugares adicionales de conservación energética" hasta ahora no detectados. En cualquier caso, la existencia de un acoplamiento flexible entre el transporte electrónico y la fotofosforilación parece ser el mecanismo fundamental que conserva la razón ATP/NADPH dentro de unos límites óptimos para las necesidades actuales de la célula (117).

Los niveles de flujo electrónico y de fosforilación acoplada correspondientes a estos estados varían fundamentalmente, como - anteriormente se indicó, en función de la situación de integridad - del cloroplasto. Las mayores tasas de fotofosforilación endógena se consiguen con los cloroplastos intactos tipo A de Hall que, en este sentido, constituyen la mejor arma de trabajo para analizar las circunstancias de la fotofosforilación "in vivo". Efectivamente, la mayor parte de los estudios sobre fotofosforilación se han efectuado "in vitro" utilizando cloroplastos rotos y membranas tilakoidales -- aisladas, que si bien presentan una ventaja para analizar los mecanismos bioquímicos del proceso --permite una modificación de las -- condiciones de pH y fuerza iónica del medio, la adición de donadores y aceptores artificiales de electrones, la adición de inhibidores del transporte electrónico y de la fotofosforilación, la implantación de las situaciones límites correspondientes al "estado 3" y "estado 4", la creación artificial de nuevos "lugares de conservación energética", etc.--, se alejan de la situación fisiológica -- real.

Esta diferencia procede fundamentalmente del hecho de -- que el cloroplasto intacto presenta una doble envoltura que lo aisla básicamente del medio exterior, y que se pierde en el proceso de aislamiento de los fragmentos membranales. Esto trae como consecuencia una desaparición de la capacidad de fijación de CO_2 y de otras reacciones que consumen ATP; una pérdida de componentes solubles, ferredoxina y NADP^+ , de la cadena de transporte electrónico, que - se vé así alterada en su ritmo, además de verse totalmente afectada la fotofosforilación cíclica, estrictamente dependiente de la - existencia de ferredoxina; una alteración del "potencial fosforilante" y, en general, una serie de consecuencias derivadas de la - puesta en contacto de componentes del cloroplasto con los del citosol.

Se puede definir la fotofosforilación "in vivo" como aquella que tiene lugar en células vegetales intactas, o en cloroplastos intactos "tipo A", y que tiene lugar a expensas de los componentes de transporte electrónico y sustratos de fosforilación endógenos a la propia célula o cloroplasto, sin adición alguna del medio exterior. Un requisito adicional es que exista una capacidad elevada de asimilación de CO_2 , entre 50 y 200 $\mu\text{moles/mg}$ de clorofila/hora (118). El principal inconveniente para su estudio radica en la dificultad de su cuantificación sin recurrir a técnicas destructivas que, por lo demás, introducen el error derivado del largo tiempo que consumen.

Eficiencia fotosintética.

Mientras que la ganancia energética derivada de los 2H^+ bombeados al espacio intratilakoidal por electrón transferido es de 0.4 eV, la correspondiente a la reducción del NADP^+ es de 1.2 eV, lo que hace un total de 1.6 eV. Puesto que ello requiere la absorción teórica de 2 hv, que a la longitud de onda de 680 nm equivale a 1.8 eV, la eficiencia global teórica de los procesos de transporte electrónico y fotofosforilación es del 40%, con una cuarta parte de la energía acumulada en forma de gradiente protónico.

Si la fotosíntesis tiene por meta la reducción de CO_2 a nivel de glucosa, la energía fijada por mol de O_2 liberado —o lo que es lo mismo, por mol de CO_2 asimilado— será de 115 Kcal, es decir, la sexta parte del calor de combustión de la glucosa. En condiciones de total iluminación solar la radiación más eficazmente utilizada —en común por ambos fotoactos es la de 680 nm. La energía almacenada por cada fotón a 680 nm es de 40 Kcal., y puesto que el rendimiento cuántico por mol de O_2 liberado es de 10 hv^{-1} sería el valor teórico derivado de la transferencia de 4 electrones, con dos fotoac-

tos cada uno—, se deduce que la fijación de un mol de CO_2 consume 400 Kcal., lo que representa una eficacia fotosintética de alrededor del 30%. Esta eficiencia sería sólo del 22% para la radiación de 450 nm.

Hasta ahora hemos analizado la eficacia fotosintética del vegetal en función de la radiación que llega a la superficie del mismo. Pero considerémosla ahora desde la perspectiva de la radiación global que llega a la tierra. La radiación solar incidente en el exterior de la atmósfera terrestre —la llamada radiación solar AM0— es del orden de 1.353 W.m^{-2} , con fluctuaciones de $\pm 3.5\%$ a lo largo del año, debido a la elíptica de la órbita terrestre. Al atravesar la atmósfera no sólo hay una disminución de la radiación total, que pasa a ser del orden del 75% de la anterior, sino que a nivel de la superficie terrestre —la llamada radiación solar AM 1.2— hay cambios sustanciales de tipo cualitativo. Debido a la absorción por el O_2 y O_3 atmosféricos no existe prácticamente radiación por debajo de 300 nm, y estas regiones del infrarrojo están, por la absorción debida al H_2O y CO_2 , virtualmente ausentes. La atenuación de la radiación de la zona de 680-700 nm, la de utilización óptima por la planta, obliga a ésta a usar una radiación de mayor frecuencia y, por tanto, con mayor energía por cuanto de luz, lo que hace descender el rendimiento anterior del 30% al 20%.

Más aún, aproximadamente sólo el 50% de la radiación solar puede ser utilizada por el aparato fotosintético del vegetal —la comprendida entre 400 y 700 nm—, de forma tal que el rendimiento fotosintético queda ya situado a nivel del 10% de la radiación solar incidente. Sin embargo, como resultado de una serie de factores que tienden a degradar la eficiencia fotosintética —densidad de siembra con la formación de sombras que ello implica, —fotorrespiración y, sobre todo, el que más abajo se indica— ésta

no suele exceder del 2% —valor que se alcanza en algunos vegetales C_4 , como la caña de azúcar, jacinto de agua, etc.—, con una mayor frecuencia de valores entre el 0.5 y el 1.5% (119).

Una molécula de clorofila es capaz de absorber alrededor - de 10 fotones por segundo, lo que representaría una capacidad límite de captación de 2.000-3.000 cuantos cada segundo por cada "centro - de reacción". Sin embargo, existe entre ambos Fotosistemas, a nivel del cit. f, una zona limitante, con un "turnover" máximo de 100 -- equivalentes por segundo, lo que representa un factor de reducción de al menos 1/20 en relación con la capacidad teórica de captación lumínica. Esto explica el que para la mayor parte de las especies el límite máximo en el valor de fotosíntesis neta esté situado en el teóricamente correspondiente a una densidad de clorofila en hoja de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (120), y no aumente más aún cuando esta última lo haga. Ello parece indicar, además, que el aparato fotosintético está diseñado para operar a bajas condiciones de iluminación. Efectivamente, en la mayor parte de las especies se alcanza ya un nivel de saturación fotosintética con el 25% de la radiación total incidente en un día de plena iluminación, de tal forma que la eficiencia fotosintética decrece a partir de dicho nivel de radiación.

Por otro lado, la concentración atmosférica 0.03% de CO_2 —aproximadamente $10 \mu\text{M}$ — es insuficiente para saturar el sistema fijador de CO_2 de la carboxi-dismutasa, cuya K_m "in vivo" es de $46 \mu\text{M}$ y, por tanto, con una capacidad de saturación cerca de diez veces - la concentración ambiental de CO_2 . Sin embargo, un aumento indefinido del CO_2 atmosférico no logra sobrepasar una cantidad doble de -- CO_2 asimilado, lo que indica la existencia de otro factor limitante, probablemente el arriba mencionado del transporte electrónico entre ambos fotosistemas.

Asimilación fotosintética del CO₂

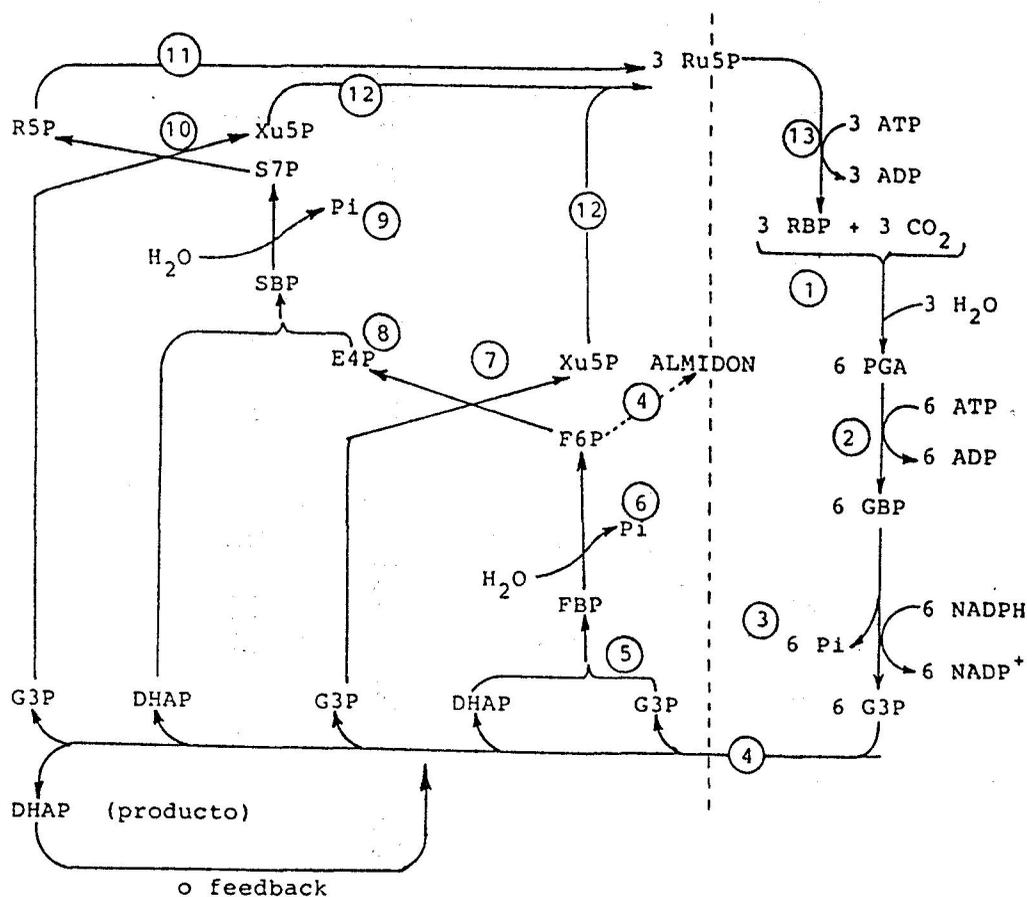
El ciclo reductivo de las pentosas-P, o ciclo de Benson-Calvin, constituye el proceso bioquímico básico por el que el CO₂ es convertido en azúcares durante la Fotosíntesis. Con excepción de algunas bacterias fotosintéticas (121), dicho proceso se encuentra presente en todos los seres fotoautótrofos, existiendo en el reino vegetal tanto en los organismos eucariotes como en las algas verde-azuladas prokariotes.

En algunas plantas superiores, las denominadas tipo C₄ y CAM, existe un proceso adicional por el que el CO₂ es previamente incorporado en compuestos con 4 átomos de carbono, pero en ellas el carbónico es de nuevo liberado a nivel de las células del parénquima vascular, en cuyos cloroplastos es reasimilado según el ciclo de Calvin. No constituye, pues, una alternativa al mismo, sino un paso previo conducente a aumentar la concentración local de CO₂ en el microambiente del enzima carboxilante del ciclo, la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa.

Dicho proceso tiene lugar en el espacio estromático del cloroplasto, estando catalizado por hasta 12 sistemas enzimáticos que se encuentran solubilizados en el estroma. De ellos sólo dos utilizan ATP generado en el proceso de fotofosforilación —la fosfoglicerato kinasa y la fosforibulokinasa—, mientras que uno sólo —la triosa-P deshidrogenasa— emplea el NADPH originado en dicho proceso. Puesto que la tasa de fijación "in vivo" de CO₂ por cloroplastos aislados se aproxima a los 200 μmoles/hora/mg de clorofila, y el contenido de ATP y NADPH del orgánulo iluminado es pequeño —30-40 nmoles/mg de clorofila para el primero (122), y alrededor de 120 μM para el segundo (123)—, ya se comprende que el ciclo ha de verse sometido a un control muy preciso.

En la fase inicial del ciclo 3 moléculas de ribulosa-1.5-bisfosfato son carboxiladas en una reacción catalizada por la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa para dar 6 moléculas de fosfoglicerato, después de la rotura hidrolítica del intermediario inestable

2-carboxi-3-cetorribitol-1.5-bisfosfato. El fosfoglicerato es fosforilado a 1.3-difosfoglicerato por la fosfoglicerato kinasa, y, entonces, reducido por una triosa-fosfato deshidrogenasa a 3-fosfogliceraldehido, en reacciones que consumen ATP y NADPH, respectivamente. Previa isomerización de parte del 3-fosfogliceraldehido a -fosfodihidroxiacetona por una triosa-fosfato isomerasa, 5 moléculas de triosas-fosfato experimentan una serie de condensaciones e isomerizaciones que llevan a la formación de 3 moléculas de ribulosa-5-fosfato, mientras que la sexta molécula de triosa-fosfato puede dirigirse hacia la formación de almidón en el propio cloroplasto, o ser translocada al citoplasma como forma de exportación de energía o para la síntesis en él de sacarosa.

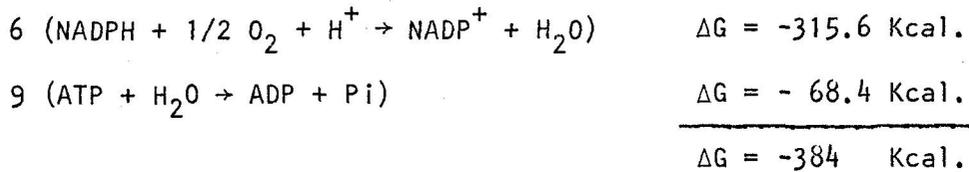


El proceso se inicia con una condensación de parte del 3-fosfogliceraldehido y de la fosfodihidroxiacetona mediante una reacción aldolásica que conduce a la formación de fructosa-1,6-bisfosfato que, posteriormente, se hidroliza a fructosa-6-fosfato en un proceso catalizado por la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Una transketolasa transfiere entonces los dos primeros carbonos de la fructosa-6-fosfato al 3-fosfogliceraldehido, originándose eritrosa-4-fosfato y xilulosa-5-fosfato. La primera se condensa con fosfodihidroxiacetona en una reacción catalizada por la misma aldolasa anterior, con producción de sedoheptulosa-1,7-bisfosfato que, por la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, se desfosforila a sedoheptulosa-7-fosfato. Una segunda transketolasa transfiere también los dos primeros carbonos de esta heptosa a otra nueva molécula de fosfogliceraldehido, originándose xilulosa-5-fosfato y ribulosa-5-fosfato. La xilulosa-5-fosfato, por una pentosa-isomerasa, y la ribosa-5-fosfato, por una pentosa-epimerasa, se transforman en ribulosa-5-fosfato. Finalmente, la ribulosa-5-fosfato es fosforilada, con consumo de ATP, para regenerar el sustrato carboxilante ribulosa-1,5-bisfosfato, cerrándose así el ciclo.

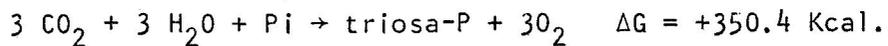
Hay que hacer notar que, debido al carácter autocatalítico del mismo, la sexta molécula de triosas-P puede también entrar en el ciclo, al igual que las otras cinco, lo que conducirá a un aumento del nivel cloroplastídico de ribulosa-1,5-bisfosfato y, subsiguientemente de los restantes metabolitos del ciclo, de tal forma que si toda la triosa-fosfato originada sigue esta vía, por cada 15 moléculas de CO_2 fijado, queda doblado el nivel de intermediarios del ciclo (124).

En resumen, por cada 3 moles de CO_2 asimilados en una vuelta de ciclo se consumen 9 moles de ATP y 6 de NADPH, con una formación neta de 1 mol de triosas-fosfato. Teniendo en cuenta que el cambio de energía libre en la oxidación del NADPH es de -52.6 Kcal/mol, y en la hidrólisis de ATP de -7.6 Kcal./mol, la cantidad de --

energía consumida en cada vuelta de ciclo será:



Puesto que la energía acumulada en la síntesis de un mol de triosas-fosfato es de +350.4 Kcal/mol:



se deduce que la energía disipada en cada vuelta del ciclo es sólo de 33.6 Kcal., lo que representa un rendimiento de alrededor del 91%. Sin embargo, estos valores están basados en puras concepciones termodinámicas, con cambios de energía libre determinados sobre rendimientos máximos de las reacciones enzimáticas derivados de unas concentraciones óptimas de los sustratos correspondientes. Cuando dichos valores se calculan en función de las concentraciones fisiológicas de metabolitos existentes en el cloroplasto, el rendimiento del ciclo de Calvin baja a valores reales próximos al 83% (125).

Cuando una hoja o cloroplastos aislados se iluminan después de mantenidos un período en la oscuridad, la tasa de fijación de CO₂ no alcanza un valor máximo estable hasta que transcurren varios minutos. Este período se llama "fase de inducción" (126), y el hecho de que no lo presenten el transporte electrónico fotosintético y la fotofosforilación concomitante cuando se analizan desacoplados el proceso de fijación de CO₂, hizo pensar que dicho fenómeno se encontraba vinculado al ciclo de asimilación del mismo.

Actualmente se explica admitiendo, según veremos, que existe una desactivación en la oscuridad de algunos enzimas que intervienen en la asimilación del CO₂, lo que unido al cese del aporte de NADPH y ATP conduce a un defecto del nivel de intermediarios del ciclo de Calvin, fundamentalmente del aceptor primario del CO₂, que baja de unos 130 a 10 nmoles/mg. de clorofila (127). Esto queda confir

mado por acortarse la "fase de inducción", y aún anularse, cuando el intervalo de oscuridad disminuye y/o se hace preceder de un período de iluminación, o cuando se utilizan cloroplastos preparados rápidamente a partir de hojas sometidas a intensa iluminación. Análogamente la "fase de inducción" se acorta cuando se agregan al medio intermediarios del ciclo de Calvin que, como el fosfoglicerato o las triosas-fosfato, son permeables a las paredes del cloroplasto, o bien -- cualquier otro cuando las experiencias se llevan a cabo con cloroplastos reconstituídos, mientras que se alarga cuando se adiciona P_i que, por el equilibrio impuesto por el "translocador de fosfatos", fuerza la salida del cloroplasto de los ésteres fosfóricos intermediarios - permeables al mismo.

Cuando un cloroplasto es iluminado después de un período de oscuridad, la producción de NADPH y ATP se inicia inmediatamente sin "fase de inducción" alguna. De ambos es el ATP el de más perentoria necesidad, ya que el NADPH no podrá ser objeto de uso hasta que el difosfoglicerato haya subido a una concentración suficiente, lo que a su vez dependerá de una previa síntesis de ribulosa-1.5-bisfosfato. Efectivamente, la síntesis de éste constituye el objetivo primario de la "fase de inducción", consumiéndose en la fosforilación de la ribulosa-5-fosfato todo el ATP originado en los primeros momentos de iluminación, lo que es posible por el bajo valor de K_m de la fosforribulokinasa frente al de la fosfogliceratokinasa (128).

Regulación del ciclo de asimilación del CO_2 .

Hace ya años Latzko y Gibbs (129) demostraron que, con excepción de la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa, fructosa-1.6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa, todos los restantes enzimas del ciclo exhibían una actividad en el cloroplasto suficiente para justificar los niveles de asimilación de CO_2 por el mismo. Re-

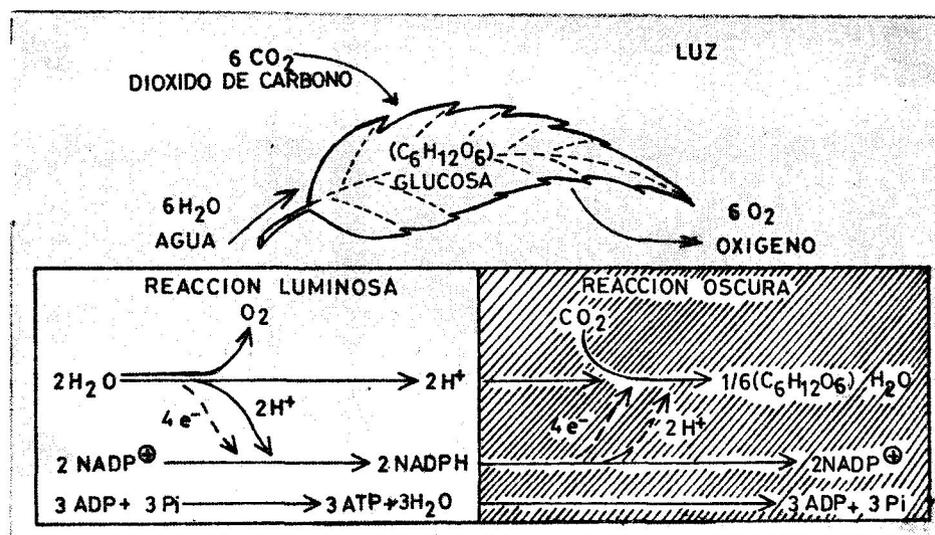
cientes mejoras en los métodos de extracción y ensayo han permitido determinar para los dos primeros niveles estrictamente adecuados a las tasas de asimilación carbonada (130). Quedando sólo los de la sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa por justificar.

Bassham y Krause (125), han calculado los cambios de energía libre en situación fisiológica de equilibrio para cada una de las reacciones del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato. Los pasos que se muestran limitantes según este criterio son: la catálisis por la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa, con un valor ΔG^S cercano a -10 Kcal., las reacciones catalizadas por la fructosa-1.6-disfosfatasa y sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa, con valores de cambio de energía libre de -6.5 y -7.0 Kcal., respectivamente, el paso regulado por la fosforribulokinasa con un $\Delta G^S = -4.0$ Kcal., y la reducción del fosfoglicerato a triosas-fosfato con un $\Delta G^S = -1.6$ Kcal.

De lo expuesto parece deducirse que en la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa y en las bisfosfatasas parecen radicar los pasos con mayor incidencia reguladora en el ciclo de Calvin. De los intermediarios del ciclo del vegetal puede sustraer, cuando lo requiera, los componentes necesarios para la biosíntesis de carbohidratos, grasas y proteínas. Un rápido análisis del ciclo nos muestra que los compuestos de arranque para la síntesis de grasa y proteínas cloroplastídicas —triosas-fosfato y fosfoglicerato— aparecen dentro del ciclo después de la reacción de carboxilación y antes de la actuación de la fructosa-1.6-bisfosfatasa. Por otro lado, el material de partida para la biosíntesis de almidón —la fructosa-6-fosfato— se origina como consecuencia de la propia actividad bisfosfatásica, antes de que tenga lugar la fijación del CO_2 . Análogos son los precursores para la síntesis de proteínas, grasas y glúcidos —fundamentalmente sacarosa— citoplasmáticos, con la salvedad que en estos casos será necesaria una exportación previa al citoplasma de los intermediarios fosfoglicerato o triosas-fosfato. Cambios en la razón de actividades de ambos sistemas enzimáticos llevará aparejada una

acumulación de unos u otros intermediarios, de acuerdo con las necesidades biosintéticas del vegetal.

Es clásico encontrar en los textos de Bioquímica Vegetal una división de las etapas de la Fotosíntesis en "fase luminosa" y "fase oscura", según la cual en esta segunda tiene lugar, mediante una serie de reacciones independientes de la luz, el proceso de asimilación del CO_2 a expensas del NADPH y ATP originado en la previa "fase lumínica".

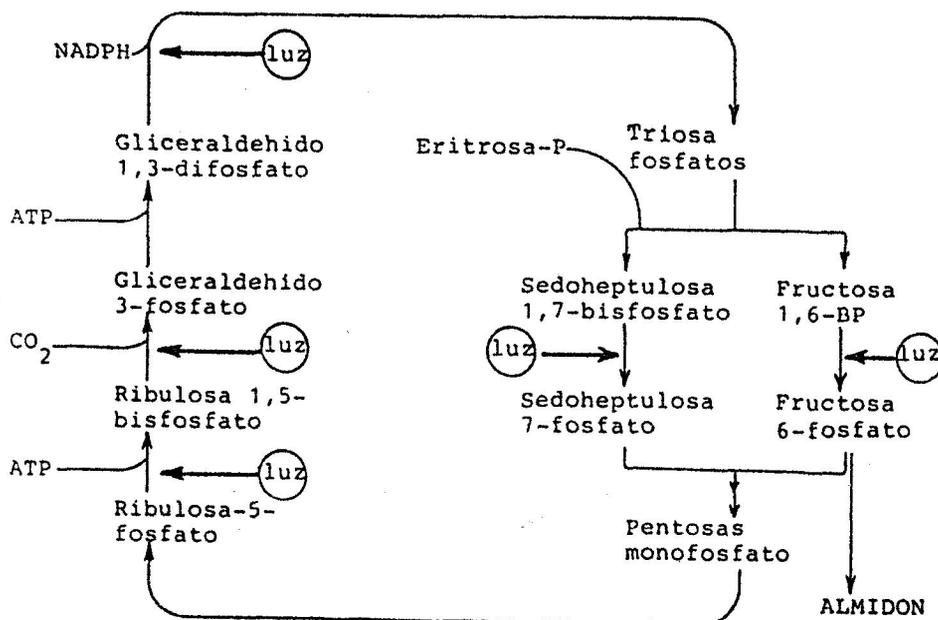


La evidencia acumulada en los últimos 15 años muestra, sin embargo, que el ciclo reductivo de las pentosas-fosfato requiere luz para la activación de una serie de enzimas del mismo, y adicionalmente de otros enzimas relacionados con diferentes procesos metabólicos de la planta: reducción de ácidos dicarboxílicos, asimilación de sulfato, ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato, etc. Varias monografías han sido desarrolladas sobre el particular (131, 132, 133). Más aún, diferentes hechos experimentales muestran que la luz ejerce ade

más, un efecto adicional sobre el nivel de muchos de estos enzimas a través de un control de su síntesis. Así, Vidal y Gadal (134) -- han encontrado una cantidad 14 veces mayor de NADP⁺-malato deshidrogenasa en el proceso de enverdecimiento por la luz de plántulas etioladas de maíz, lo que se debe a una síntesis "de novo" en el citoplasma de este enzima cloroplastídico. Análogamente, Chueca y colaboradores (135) encuentran una inducción por la luz de la síntesis de la fructosa-1.6-bisfosfatasa fotosintética de hojas de espinaca. En otro orden de cosas, también se considera la necesidad de iluminación para la integración de las moléculas de ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa en el cloroplasto (136).

Utilizando cloroplastos de espinaca o guisante, diferentes investigadores (137, 138, 139, 140, 141) han puesto de manifiesto la existencia de una fotoactivación de la NADP⁺-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa y fosforribulokinasa, a las que posteriormente hubo que unir la fructosa-1.6-bisfosfatasa (142), y los enzimas no vinculados al ciclo de Calvin malato deshidrogenasa NADP⁺-dependiente (143), y piruvato dikinasa (144). De esta forma quedó completo el cuadro de la fotoactivación como elemento regulador de aquellos enzimas juzgados como controladores de la dinámica del ciclo de Calvin. Resta el caso de la ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa, que si bien es activada por iluminación previa de cloroplastos aislados (145, 146), el incremento de actividad es tan pobre --a diferencia de lo que ocurre en experiencias "in vitro" en presencia de concentraciones fisiológicas -- de efectores--, que su significación fisiológica ha sido puesta en duda por Robinson y colaboradores (147).

Por el contrario, exhiben una fotoinhibición dos enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfofructokinasa (137, 148), así como tres enzimas del metabolismo del almidón: fosforilasa, fosfoglucomutasa y fosfoglucosa isomerasa (148, 149). Además, dos enzimas del metaboli



mo del nitrógeno, la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, son también activados por la luz en algas (150), habiéndose descrito una fotoactivación de una protein-kinasa operativa en la fosforilación del complejo clorofila-proteína del sistema de antenas, y que hace posible la transferencia energética entre ambos fotosistemas (151).

Derivados de la iluminación, existen varios factores que, aisladamente o de forma concurrente, inciden en el fenómeno de fotoactivación. Ellos son los siguientes:

pH. Ya los estudios efectuados con cloroplastos aislados pusieron de manifiesto que el aumento de pH que tiene lugar en el espacio estromático en la transición oscuridad-luz inducía la activación de algunos enzimas del ciclo de Calvin. Heldt y col. (152) determinaron un

tránsito de pH aproximadamente entre 7.0 y 8.0, derivado en condiciones fisiológicas del gradiente protónico que ocurre al iluminar, pero que puede ser mimificado en la oscuridad, independizando así el efecto del pH de cualquier otro inducido por la luz. Experiencias adicionales "in vitro" con enzimas aislados han demostrado - críticos requerimientos de pH, con una brusca activación en la zona alcalina de la fructosa-1.6-bisfosfatasa (153, 154), sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa (155) y fosforribulokinasa (156). Así pues, el pH del espacio estromático se configura, quizás, como el principal regulador del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato (157). Conviene aquí indicar que los cambios de actividad de estas enzimas en función de los valores de pH y de la concentración de Mg^{2+} se encuentran muy relacionados, de tal forma que una modificación del pH conlleva un cambio en los requerimientos de Mg^{2+} y viceversa (153, 158).

Concentración de Mg^{2+} . Consecuencia de la iluminación tiene lugar un aumento de la concentración de Mg^{2+} en el estroma debido, según indicamos con anterioridad, a un flujo compensador de iones hacia el espacio estromático que contrarresta en cierta medida el flujo protónico en sentido inverso. Aunque se han dado concentraciones estromáticas de Mg^{2+} de 10-15 mM bajo iluminación, los valores -- más fiables parecen indicar un gradiente de 1 a 3 mM (159) o de 2 a 5 mM (126) en la transición oscuridad-luz. La influencia del Mg^{2+} en la activación, en general, del ciclo de Calvin ha sido objeto de amplia controversia (160, 161), especialmente debido a, la apuntada antes, interrelación entre concentración del mismo y pH del medio, y bajas diferencias de concentración en el tránsito luz-oscuridad. Sin embargo, Portis y col. (162) concluyeron - que tal gradiente de concentración era básico para la activación de la fructosa-1.6-bisfosfatasa, resultados confirmados posteriormente por otros autores (153, 154).

ATP-NADPH y otros metabolitos. Una activación de enzimas del ciclo de Calvin por ATP y NADPH podría ser, en principio, de gran interés a causa del aumento de concentración de los mismos en el estroma a consecuencia de la iluminación. Tanto el NADPH como el ATP inducen la disociación de la forma de alto peso molecular y baja actividad de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, en la forma de bajo peso molecular y fuertemente activa con NADPH, la llamada "forma reguladora" (163). Una particularidad, común a otros enzimas fotoactivables, es que la velocidad de activación es mucho más lenta que la propia actividad catalítica, por lo que a menos que se efectúe una preincubación con los efectores, se observará siempre un período inductivo (164); Frieden (165) ha denominado a tales actividades enzimáticas "enzimas histeréticos".

El NADPH ha sido también descrito como activante de la --ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa, resultados que parecen confirmarse de las experiencias de Hatch y Jensen (166), que confirmaron tal efecto en preparados enzimáticos previamente activados por preincubación con CO_2 y Mg^{2+} . Un incremento en el valor de la "carga energética" ATP/ADP parece constituir un factor clave en la regulación de la fosforribulokinasa y, muy posiblemente también, de la fosfogliceratokinasa (167).

Un nivel moderado de P_i en el espacio estromático, existente en el estroma del cloroplasto iluminado, favorece la actividad NADP^+ -gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, pero estos mismos niveles --y menos aún los superiores del orden 4-25 mM presentes en condiciones de oscuridad-- se muestran inefectivos en tal activación en ausencia de NADPH y/o ATP (164). Una inactivación --por P_i ha sido sugerida para la fructosa-1.6-bisfosfatasa (168) y, sobre todo, para la sedoheptulosa-1.7-bisfosfatasa, tanto en ensayos con cloroplastos aislados (169) como con preparados enzimáticos purificados (170).

Sin embargo, Charles y Halliwell (171) han estudiado recientemente de forma detenida la cuestión, y no encuentran efecto negativo alguno "in vitro" sobre la actividad fructosa-1.6-bisfosfatasa por Pi. Antes bien, indican que las concentraciones estromáticas de Pi —alrededor de 10 mM— ejercen un efecto estabilizante sobre el enzima (168). Lo que sí existe es un retardo de la actividad en cloroplastos aislados por Pi —así como una aceleración de la misma por P-hidroxiacetona o P-glicerato—, lo que se debe a -- una disminución, o aumento, respectivamente, del nivel del sustrato fructosa-1.6-bisfosfato por efecto del translocador de fosfatos, y que es responsable del conocido efecto negativo del Pi sobre la tasa de fijación del CO₂ por cloroplastos aislados (172). En este sentido sí cabe asignarle al Pi un papel regulador en la actividad global del ciclo de Calvin. Finalmente, el nivel de Pi constituye un elemento regulador de la síntesis de almidón.

Un caso contrario es la desactivación por NADPH, siendo - el ejemplo más evidente el de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cloroplastídica NADP⁺-dependiente. Como ya había sido indicado para el enzima de procedencia animal, el enzima cloroplastídico se inactiva en presencia de NADPH, de tal forma que la razón NADPH/NADP⁺ constituye el principal factor regulador del mismo (173, 174). Otros enzimas cloroplastídicos no involucrados en el ciclo de Calvin son también desactivados por la luz, siendo quizás el caso más evidente la fosfofructokinasa del proceso glucolítico (175, 176), - impidiéndose así la existencia de un ciclo fútil con fosforilación y defosforilación sucesivas de la fructosa-6-fosfato. Vemos, pues, como a la actividad biosintética del cloroplasto en condiciones de iluminación, se opone una actividad degradativa del mismo —manifiesta en la vía glucolítica y en el ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato— que tiene lugar en la oscuridad, y sometida a una regulación paralela. Recientemente, ha sido indicada también una desactivación lumínica de la transaldolasa cloroplastídica en guisantes --

(177).

Aparte del controvertido efecto del 6-fosfogluconato, fructosa-1,6-bisfosfato y fructosa-6-fosfato sobre la actividad carboxilasa, el caso más claro de inducción de actividad por un intermedio del ciclo de Calvin es el efecto activante del fosfoglicerato sobre la ADP-glucosa pirofosforilasa (178). Diversos hechos han confirmado que el principal factor inductor de la síntesis de almidón por el cloroplasto iluminado es el aumento de la razón 3-fosfoglicerato/Pi en el mismo (179), lo que se traduce en un incremento de la actividad ADP-glucosa pirofosforilasa. Cuando dicha razón baja en la oscuridad, el enzima es inhibido y la síntesis de almidón cesa.

Entidades proteicas. Los trabajos efectuados durante los últimos 10 años por diferentes grupos, han puesto claramente de manifiesto que varios enzimas del ciclo de Calvin, experimentan bajo iluminación una activación reductora, y que dicha activación es mediada por entidades proteicas que, de esa forma, sirven de puente de enlace entre el poder reductor generado en las etapas fotoquímicas de la Fotosíntesis, y los propios sistemas enzimáticos fotoactivables. Se han postulado sistemas proteicos fotoactivantes que, si bien coincidentes en muchos aspectos, son también contradictorios en otros.

a) Sistema LEM ("light effector mediators").

Anderson y Avron (137) postularon que la activación lumínica de algunos enzimas del ciclo de Calvin tenía lugar a través de componentes ditiólicos ligados a las membranas tilakoidales. En situación de oscuridad permanecían en su forma disulfuro oxidada, mientras que bajo iluminación eran reducidos a través de la cadena de transporte electrónico, concretamente a nivel del lado reductor del Fot. I, interaccionando en tal estado con el enzima a activar. La presencia de grupos tiólicos libres en la molécula de los LEM en situación

de iluminación fué manifestada por la inhibición de su efecto por incubación de las membranas con DTNB o con arsenito, y la existencia de agrupaciones disulfuro en la oscuridad por su sensibilidad a la sulfitólisis. La aparición de agrupaciones ditiólicas vecinales en las lamelas tilakoidales había sido ya indicada por Vallej_o y Andreo (180) como consecuencia de los cambios conformacionales que en las mismas se producían al iluminar.

Aunque no se descarta la posibilidad de que exista un factor LEM por cada enzima fotoactivable, hasta ahora han sido descritos sólo dos, diferenciables por el punto de la cadena de transporte en que tiene lugar su reducción, y por los sistemas enzimáticos a que activan. El LEM_I acepta electrones del Fot. I anteriormente a la ferredoxina, como lo demuestra su insensibilidad al antagonista de ésta DSPD, y es funcional en la activación de la NADP⁺-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosforribulokinasa y NADP⁺-malato deshidrogenasa, y en la desactivación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El LEM_{II} es reducido, dada su sensibilidad al DSPD, por la ferredoxina o en un proceso mediado por ésta, y es activo frente a la fructosa-1.6-bisfosfatasa, requiriendo Mg²⁺ para expresarse (181). Varias revisiones sobre este tema han sido publicadas por Anderson y col. (132, 148).

Experiencias efectuadas con malato-deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de cloroplastos de guisante parecen indicar que los enzimas LEM-modulables presentan, al menos, un grupo tiólico libre y una agrupación disulfuro, pues tal modulación desaparece cuando los enzimas son preincubados, ya con DTNB ya con DTT (182). Resultados recientes de Ashton y Anderson (183) apuntan la necesidad de una proteína moduladora, solubilizada en el estroma y de p.m. próximo a 50.000, para la activación por la luz de la NADP⁺-malato deshidrogenasa —e inactivación de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa— por el LEM_I; esta proteína es distinta de la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa, y dada la no ne

sidad de ferredoxina y/o tiorredoxina para ejercer su efecto activante, dicha proteína recuerda a la ferraliterina descrita por Lara y col. (184) en relación con su activación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa.

La inactivación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa -- cloroplastídica por el LEM_1 (137, 185) es objeto de controversia. Como hemos ya apuntado, distintos autores postulan que el efecto - desactivante de la iluminación, no sólo sobre el enzima del cloroplasto, sino también sobre el citoplasmático, tiene lugar a través de una inhibición por el NADPH generado en el cloroplasto, y exportado al citoplasma vía translocación de triosas-fosfato. Lenzian (186) encuentra que la reducción del enzima por DTT o por el LEM_1 no tiene mayor importancia reguladora, pues ni la actividad es totalmente inhibida ni existe un fenómeno de competencia con el NADPH, cuyo efecto se superpone con total anulación de la actividad.

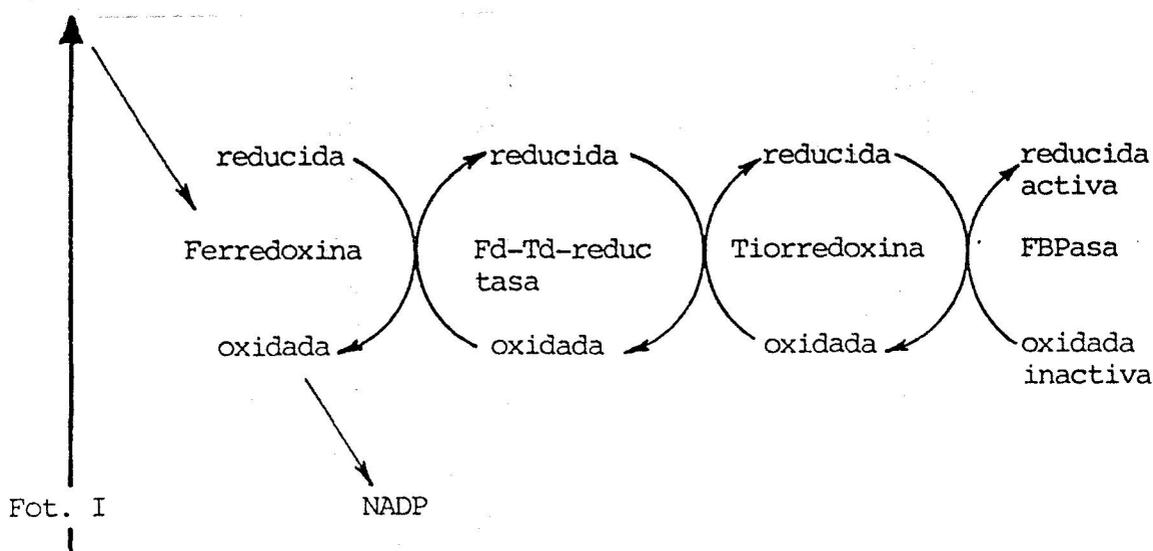
b) Sistema ferredoxina-tiorredoxina.

La necesidad de un denominado "factor proteico" para la activación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica por la ferredoxina reducida fotoquímicamente, fué pronto puesta de manifiesto en el Laboratorio de Buchanan (187); más aún, aunque este enzima experimentaba cierta activación con DTT, niveles equivalentes a los de la fotoactivación con ferredoxina sólo se conseguían cuando al medio de reacción se adicionaban preparados de dicho -- "factor proteico". Tales hechos fueron los primeros signos de que la activación reductora de algunos enzimas del ciclo de Calvin no era debida a una reducción inespecífica por ferredoxina (188), - sino que era la consecuencia de un fenómeno más complejo.

Posteriormente el "factor proteico" fué desdoblado en - dos entidades proteicas claramente diferenciadas: una de alto peso molecular, denominada ARP_a ("assimilation regulatory protein")

y otra ARP_b de peso molecular inferior, siendo ambas necesarias para la activación de la fructosa-2,6-bisfosfatasa por ferredoxina reducida (189). La primera fué más tarde definida como una nueva enzima cloroplastídica, la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa (190), mientras que la segunda fué identificada como tiorredoxina (191), una proteína de bajo peso molecular anteriormente descrita en bacterias y mamíferos. Ambas proteínas exhiben grupos tiólicos esenciales en el proceso de activación.

Bajo este planteamiento la ferredoxina, fotoquímicamente reducida vía transporte electrónico fotosintético, reduce en un proceso regulado por la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa a la tiorredoxina, que a su vez ejerce la activación reductora de los enzimas fotoactivables (190):



Además de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, son activables por el sistema ferredoxina-tiorredoxina los siguientes enzimas cloroplastídicos: sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (192), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa $NADP^+$ -dependiente (193), fosforribulokinasa (194), $NADP^+$ -malato deshidrogenasa (143, 195) y Fenilalanina-amonio liasa (196), muchos de ellos ya con anterioridad descritos como fotoactivables o DTT-inducibles. Un enzima del metabolismo de vegetales C_4 y CAM

la piruvato dikinasa, se ha indicado por algunos autores parece probable exhiba el mismo mecanismo de fotoactivación (144, 197), pues se ha observado la necesidad de un factor proteico para que pueda tener lugar. Por el contrario, Sugiyama y Hatch (198) indican que la regulación por la luz de este enzima no implica mecanismos de óxido-reducción a través de grupos sulfhidrilos, sino que está ligada a los niveles de ADP, AMP y Pi a través de procesos de adenilación-desadenilación que, ciertamente, requieren un "factor proteico" para su funcionalidad.

Un caso particular de activación por el sistema ferredoxina-tiorredoxina es el de la ATPasa ligada a las membranas tilakoidales, también estimuladas por el sistema DTT-tiorredoxina (199).

Un análisis comparado de los esquemas LEM y ferredoxina-tiorredoxina, muestra la existencia de similitudes, así como de diferencias. En ambos el poder reductor procede de la cadena de transporte electrónico previamente a la reducción del NADP^+ y, en ambos también, grupos sulfhidrilos aparecen involucrados en el mecanismo de óxido-reducción. Por el contrario, el sistema ferredoxina-tiorredoxina postula la necesidad de componentes solubles adicionales a la ferredoxina —la tiorredoxina y la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa—, cosa que no ocurre con el sistema LEM. — Quizás el LEM_{II} podría ser, en cierto modo, asimilable al esquema ferredoxina-tiorredoxina, por cuanto en ambos el punto de arranque de la cadena de transporte tiene lugar a través de la ferredoxina.

Sin embargo, el requerimiento de un factor estromático distinto a la tiorredoxina para la activación por el LEM_I de la NADP^+ -malato deshidrogenasa de cloroplastos de guisante (200), el hecho de que el 64% del sistema fotoactivante del mismo enzima de espinaca se encuentre ligado a las lamelas tilakoidales (201), la existencia de entidades tipo tiorredoxina tanto en el estroma como en las membranas cloroplastídicas (202), y la sugerencia dada por Mills y col. (203) de que la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa se encuentra

