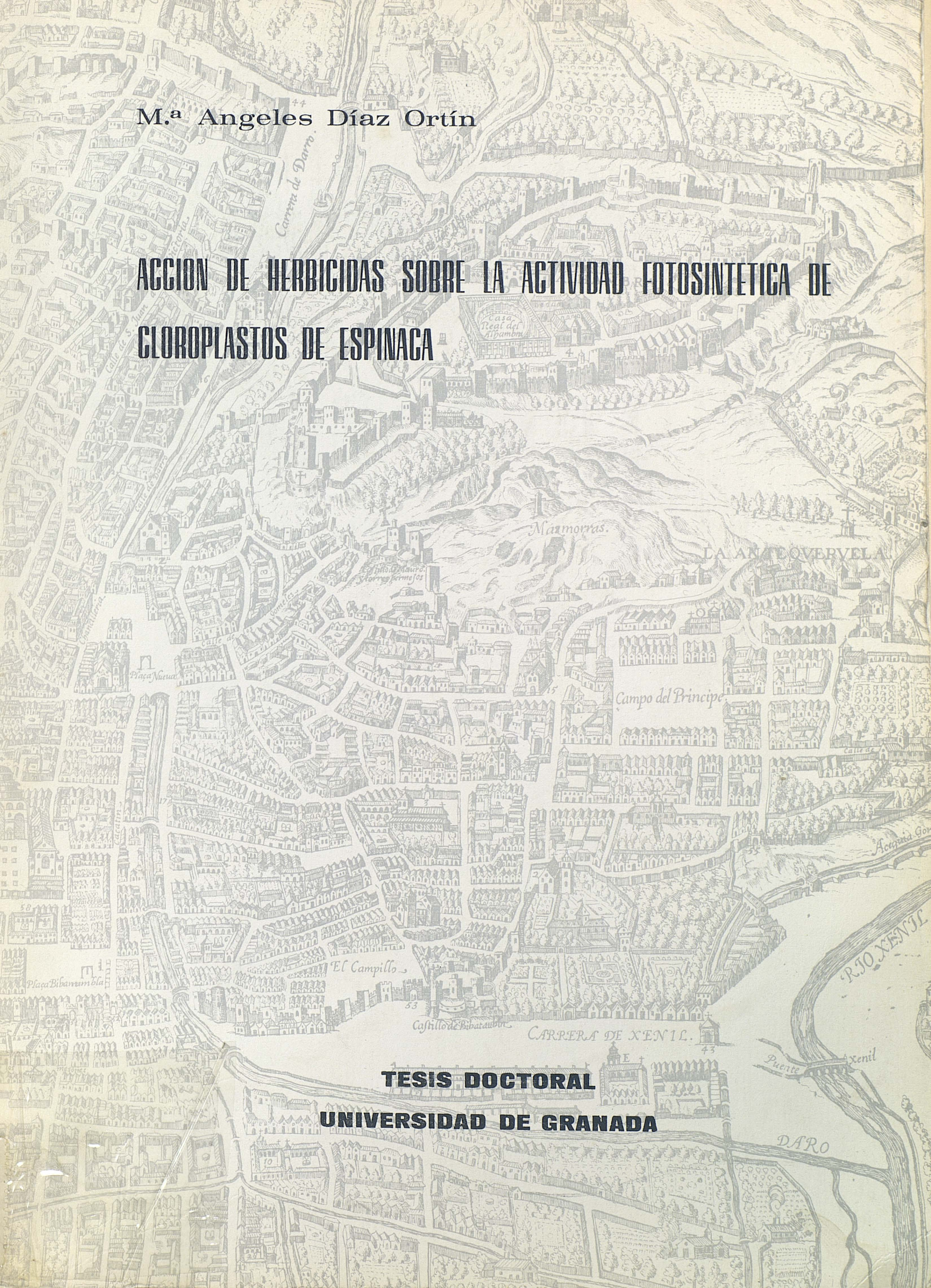


M.<sup>a</sup> Angeles Díaz Ortín

ACCION DE HERBICIDAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE  
CLOROPLASTOS DE ESPINACA

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



~~Prov. T 1-116~~

t. 3/11

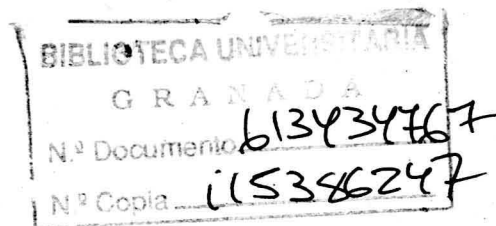


R. 48.682

FACULTAD DE CIENCIAS

ACCION DE HERBICIDAS SOBRE LA ACTIVIDAD  
FOTOSINTETICA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

M<sup>a</sup> Angeles Diaz Ortin



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1979





Tesis Doctoral dirigida por los Dres. D. Julio López-Gorgé, Investigador Científico del C.S.I.C. y Jefe de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín y D<sup>a</sup> Ana Chueca Sancho, Investigador Científico del C.S.I.C.. Fue leída el día 5 de Julio de 1979, ante el Tribunal formado por los Profesores: Recalde Martínez; Cortijo Mérida; Sánchez de Medina Contreras; García Pe<sup>u</sup>reg<sup>u</sup>ín y López-Gorgé.

Obtuvo la Calificación de Sobresaliente "cum laude".

Dep. Leg. Gr. 127.1979

La Memoria que presentamos ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, sufragada por una Beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el VII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica (Pamplona, 1977), XVII Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica (Madrid, 1978) y III Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (Granada, 1978).





En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Estación Experimental del Zaidín, por la favorable acogida dispensada.

Mi especial gratitud a los Directores de esta Tesis, Drs. D. Julio López Gorgé y D<sup>a</sup> Ana Chueca Sancho, Investigadores Científicos del C.S.I.C., por su constante --- orientación y ayuda en la realización de este trabajo.

Igualmente, quiero agradecer la inestimable colaboración recibida de la Dra. Isabel Rodríguez García, Colaborador Científico del C.S.I.C., en los trabajos de microscopía electrónica.

Mi reconocimiento al Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y a la Unidad Estructural de Fisiología Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, por las facilidades encontradas, respectivamente, en el uso de la microscopía electrónica y técnicas polarográficas.

De mis compañeros de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal, recuerdo siempre el gran apoyo que en todo momento me prestaron.

Quiero citar también a Mercedes Gómez-Moreno y a Julia Martínez, que con tanto esmero mecanografiaron este -- trabajo y a Juan Rodríguez y Manuel Martínez, que realizaron la labor fotográfica y el dibujo de gráficas.

Mi más profundo agradecimiento a Matilde Garrido de la que en todo momento recibí gran ayuda y amistad.

Finalmente, mi recuerdo para el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, de Murcia, y en especial para su Director, en donde inicié mis trabajos de investigación.



*A mis padres y hermanos*



"Cuando creció la hierba y dió fruto, entonces apareció la cizaña.... Dijeronle: ¿Quieres que vayamos y la arranquemos?. Y les dijo: No, no sea que - al querer arrancar la cizaña, arranqueis con ella el trigo".

San Mateo, cap. 13

"Parte de la simiente cayó entre espinas, y al crecer éstas la ahogaron y no dió fruto".

San Marcos, cap.14



## INDICE

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| <u>INTRODUCCION: ESTUDIO TEORICO</u> .....             | 1             |
| <u>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION</u> .....              | 115           |
| <u>PLAN DE TRABAJO</u> .....                           | 171           |
| <u>PARTE EXPERIMENTAL</u> .....                        | 177           |
| I. MATERIAL UTILIZADO .....                            | 179           |
| A. <u>Material biológico de partida</u> .....          | 179           |
| B. <u>Soluciones de herbicidas</u> .....               | 179           |
| II. ENSAYOS DE ESTRUCTURA .....                        | 185           |
| A. <u>Microscopio electrónico de transmisión</u> ..... | 185           |
| A.1. <u>Metódica</u> .....                             | 185           |
| A.2. <u>Reactivos</u> .....                            | 186           |
| III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FOTOSINTETICA .....          | 189           |
| A. <u>Transporte electrónico</u> .....                 | 189           |
| A.1. Operatividad de la cadena de transporte:          |               |
| $H_2O \rightarrow NADP^+$ (Fot. I y II) .....          | 189           |
| A.1.a. Preparación de cloroplastos .....               | 189           |
| A.1.b. Metódica .....                                  | 190           |
| A.1.c. Cálculos .....                                  | 191           |
| A.1.d. Reactivos .....                                 | 192           |
| A.2. Operatividad de la cadena de transporte:          |               |
| $H_2O \rightarrow \{Fe(CN)_6\}^{3-}$ (Fot. II) .....   | 194           |



|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| A.2.a. Preparación de cloroplastos .....                  | 194           |
| A.2.b. Metodica .....                                     | 194           |
| A.2.c. Reactivos .....                                    | 195           |
| A.3. Operatividad de la cadena de transporte:             |               |
| Ascorbato/DPIP → NADP <sup>+</sup> (Fot.I) .....          | 195           |
| A.3.a. Preparación de partículas cloroplás<br>ticas ..... | 196           |
| A.3.b. Metodica .....                                     | 197           |
| A.3.c. Reactivos .....                                    | 198           |
| i. Preparación de ferredoxina de espinaca .....           | 199           |
| ii. Reactivos .....                                       | 204           |
| iii. Test de contenido protéico y pureza .....            | 207           |
| B. <u>Fosforilación fotosintética</u> .....               | 211           |
| B.1. Fotofosforilación total .....                        | 211           |
| B.1.a, Preparación de cloroplastos lisados ..             | 212           |
| B.1.b. Metodica .....                                     | 212           |
| B.1.c. Determinación de ATP .....                         | 213           |
| B.1.d, Reactivos .....                                    | 214           |
| B.2. Fotofosforilación acíclica .....                     | 215           |
| B.2.a. Preparación de cloroplastos lisados ..             | 216           |
| B.2.b. Metodica .....                                     | 216           |
| B.2.c. Reactivos .....                                    | 216           |
| C. <u>Asimilación de CO<sub>2</sub></u> .....             | 216           |

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| C.1. Fijación neta de CO <sub>2</sub> .....                                | 216           |
| C.1.a. Preparación de cloroplastos .....                                   | 217           |
| C.1.b. Metodica .....  | 217           |
| C.1.c. Determinación de <sup>14</sup> C incorporado ...                    | 217           |
| C.1.d. Reactivos .....   | 218           |
| C.2. Productos de asimilación del CO <sub>2</sub> .....                    | 219           |
| C.2.a. Preparación de cloroplastos .....                                   | 219           |
| C.2.b. Metodica .....  | 219           |
| C.2.c. Determinación de compuestos marca-<br>dos con <sup>14</sup> C ..... | 219           |
| C.2.d. Reactivos .....   | 220           |
| D. <u>Enzimas clave del ciclo de Calvin</u> .....                          | 221           |
| D.1. Actividad carboxi-dismutásica .....                                   | 221           |
| D.1.a. Obtención de preparados purificados<br>del enzima .....             | 221           |
| - Preparación de lisados cloroplás-<br>ticos .....                         | 221           |
| - Precipitación con SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....  | 222           |
| - Centrifugación en gradiente de sa-<br>carosa .....                       | 223           |
| - Test de pureza .....   | 225           |
| - Reactivos .....  | 227           |
| D.1.b. Metodica .....  | 229           |

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| D.1.c. Reactivos .....   | 230           |
| D.2. Actividad fructosa bisfosfatásica .....   | 230           |
| D.2.a. Obtención de preparados purificados<br>del enzima .....   | 231           |
| - Preparación de extractos crudos de<br>hoja .....   | 231           |
| - Precipitación térmica .....  | 231           |
| - Fraccionamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .....   | 232           |
| - Filtración por Sephadex G-100 .....  | 233           |
| - Filtración por Sephadex G-200 .....  | 234           |
| - Cromatografía sobre DEAE-celulosa ....   | 234           |
| - Test de pureza .....   | 235           |
| - Reactivos .....  | 235           |
| D.2.b. Metódica .....  | 236           |
| D.2.c. Reactivos .....   | 240           |
| <u>RESULTADOS</u> .....  | 243           |
| A. <u>Transporte electrónico</u> .....   | 245           |
| A.1. Operatividad de la cadena de transporte:<br>$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ (Fot.I y II) .....               | 245           |
| A.2. Operatividad de la cadena de transporte:<br>$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \{\text{Fe}(\text{CN})_6\}^{3-}$ (Fot.II) ..... | 253           |
| A.3. Operatividad de la cadena de transporte:<br>Ascorbato/DPIP $\rightarrow \text{NADP}^+$ (Fot.I) .....                        | 262           |
| B. <u>Fosforilación fotosintética</u> .....  | 273           |
| B.1. Fotofosforilación total.....  | 273           |

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| B.2. Fotofosforilación acíclica .....                   | 277           |
| C. <u>Asimilación de CO<sub>2</sub></u> .....           | 277           |
| C.1. Fijación neta de CO <sub>2</sub> .....             | 277           |
| C.2. Productos de asimilación del CO <sub>2</sub> ..... | 287           |
| D. <u>Enzimas clave del ciclo de Calvin</u> .....       | 296           |
| D.1. Actividad carboxi-dismutásica .....                | 296           |
| D.2. Actividad fructosa-bisfosfatásica .....            | 308           |
| <u>DISCUSION</u> .....                                  | 313           |
| <u>CONCLUSIONES</u> .....                               | 355           |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....                               | 361           |



INTRODUCCION: ESTUDIO TEORICO



Antes de entrar en el análisis de los antecedentes y en el esquema experimental del estudio que en este trabajo se efectúa sobre herbicidas que inciden en la actividad fotosintética, conviene efectuar un planteamiento teórico del estado actual de los conocimientos sobre Fotosíntesis. Dada la amplitud del tema, nos vamos a limitar a aquellos aspectos que más o menos directamente puedan tener alguna relación con el contenido de este trabajo. Por ello, se hace especial énfasis en la estructura y tipo de preparaciones cloroplastídicas, en los procesos fotoquímicos de transporte electrónico, en el mecanismo y clases de fotofosforilación, y en la fijación de  $\text{CO}_2$  y sistemas que utiliza la planta para su regulación. Por el contrario, se eluden aquellos otros aspectos que, como la asimilación fotosintética del nitrato y sulfato, no son objeto de análisis en el presente trabajo. En cualquier caso, y para evitar un número desorbitado de citas bibliográficas, sólo se incluyen aquéllas referentes a aspectos más especializados, ignorando otras que, por incidir sobre puntos más trascendentales, son bastante conocidas. Finalmente, y como resumen de todo lo que en este capítulo se trata, se ha elaborado un esquema general del proceso fotosintético, al cual nos referiremos tácita pero de forma constante a lo largo de la presente exposición.



La Fotosíntesis en su sentido más amplio se puede definir como la conversión de la radiación lumínica en potencial energético y reductor, que posteriormente es utilizado para la reducción y asimilación de elementos biogénicos que se encuentran en alto grado de oxidación o en formas de baja reactividad. El origen del potencial reductor es una molécula más o menos oxidada que, mediante un complejo mecanismo indirecto de fotoactivación, cede equivalentes de reducción; éstos, transportados a lo largo de una cadena secuencial de intermediarios, llegan al aceptor último, liberándose o no a lo largo de estos procesos de óxido-reducción en cadena una energía que, al menos en parte, es utilizada por el organismo para la síntesis concomitante de compuestos altamente energéticos. Mientras que los organismos verdes eucariotes y prokariotes utilizan exclusivamente el  $H_2O$  como fuente de potencial reductor, con desprendimiento simultáneo de  $O_2$  como producto secundario, las bacterias fotosintéticas efectúan este proceso, en general, en condiciones anaerobias, utilizando como fuente de potencial reductor hidrógeno molecular, compuestos azufrados reducidos u otras sustancias inorgánicas, sin que exista una liberación paralela de  $O_2$ . Análogamente, aunque la Fotosíntesis se ha vinculado clásicamente con la utilización del potencial energético y reductor para la asimilación del  $CO_2$ , no es menos cierto que igualmente es empleado en la asimilación de nitratos, sulfatos y nitrógeno molecular.

Ambas fases del proceso fotosintético --síntesis de potencial energético y reductor, y asimilación reductora de compuestos oxidados-- tienen lugar de forma independiente en estructuras o subestructuras bien diferenciadas. Sin embargo, entre ambos procesos existe una íntima relación condicionada por sofis

ticados mecanismos de regulación. En las bacterias fotosintéticas las etapas de captación de la luz y su utilización para la síntesis de energía de enlace y potencial reductor tienen lugar en unas estructuras concretas denominadas "cromatóforos", mientras que en las algas prokariotes verde-azuladas el aparato fotosintético no se encuentra segregado en estructuras concretas. Por lo demás, en bacterias el proceso fotosintético depende de un solo fotoacto, frente a los dos fotoactos encadenados que tienen lugar en todos los restantes organismos; esto se concreta, además, en una distinta composición pigmentaria, fundamentalmente diferente en bacterias, y también en ciertas peculiaridades en las algas prokariotes, en relación con las algas eukariotes y plantas superiores.

#### ESTRUCTURA DEL CLOROPLASTO.

En las plantas superiores el proceso de la Fotosíntesis ocurre dentro de específicos compartimentos citoplasmáticos: los cloroplastos. Estos constituyen estructuras desarrolladas a partir de formas ancestrales primitivas, modificadas para llevar a cabo de manera óptima los complejos procesos físicos y bioquímicos que constituyen la Fotosíntesis. A pesar de este origen evolutivo conviene, no obstante, indicar que, con la posible excepción de los vegetales C<sub>4</sub>, los cloroplastos de las plantas superiores son sorprendentemente homogéneos en lo que afecta a su estructura, composición, enzimología y función.

Examinados al microscopio electrónico, los cloroplastos de plantas superiores muestran su característica sección en forma de lente, con un eje mayor de 5-10  $\mu\text{m}$ ., observándose ---

tres regiones estructurales bien definidas: las membranas o envolturas, una estructura lamelar altamente organizada, y un -- "estroma" amorfo.

La cubierta del cloroplasto consta de dos membranas. Experiencias hechas por centrifugación bajo capa de silicona muestran que la membrana externa es atravesada rápidamente por numerosos componentes de bajo peso molecular, mientras que resulta impermeable al dextrano. Por otro lado, cuando el cloroplasto se coloca en un medio hipertónico, el orgánulo aparece arrugado, observándose una patente separación entre ambas cubiertas, que delimitan un amplio "espacio intermembranal". Estos hechos indican que la membrana externa es inespecíficamente -- permeable a las pequeñas moléculas, siendo accesible libremente a los metabolitos del citoplasma, mientras que la cubierta interna constituye la auténtica barrera selectiva del cloroplasto. En general, y dado su carácter de biomembrana lípido--proteica, exhibe una baja permeabilidad hacia compuestos iónicos; resulta permeable al  $\text{CO}_2$  y ciertos ácidos monocarboxílicos (acético, glicérico, glicólico, etc.), menos permeable a aminoácidos, e impermeable a la sacarosa, adenilatos, hexosas y pentosas, fosforiladas o no, etc.

Estudios metabólicos han demostrado que el  $\text{P}_i$  y algunos -- compuestos fosforilados como el P-glicerato y las triosas-P -- son permeables a las envolturas del cloroplasto, siendo específicamente transportados a través de la envoltura interna de -- una manera competitiva entre ellos, de acuerdo con sus concentraciones respectivas. De ello se ha deducido la existencia de un transportador, al que se ha denominado "traslocador de fosfatos" (1), cuya especificidad se extiende al  $\text{P}_i$  y a las moléculas que exhiben un resto fosfórico ligado al carbono 3-termi

nal; su inhibición por mercuriales indica la existencia de grupos -SH vinculados al proceso de transporte. Otra característica interesante del proceso es el mantenimiento de un equilibrio entre los grupos fosfato traslocados, de tal forma que un igual número de grupos fosfórico serán transferidos al interior que al exterior del cloroplasto. Otro traslocador específico ha sido descrito para el transporte de los dicarboxilatos (1), con una amplia especificidad para los dicarboxilatos  $C_4$  y  $C_5$ , que compiten entre sí; sin embargo, a diferencia del traslocador de fosfatos, no existe aquí un transporte estrictamente equivalente de carboxilatos dirigido en sentido contrario.

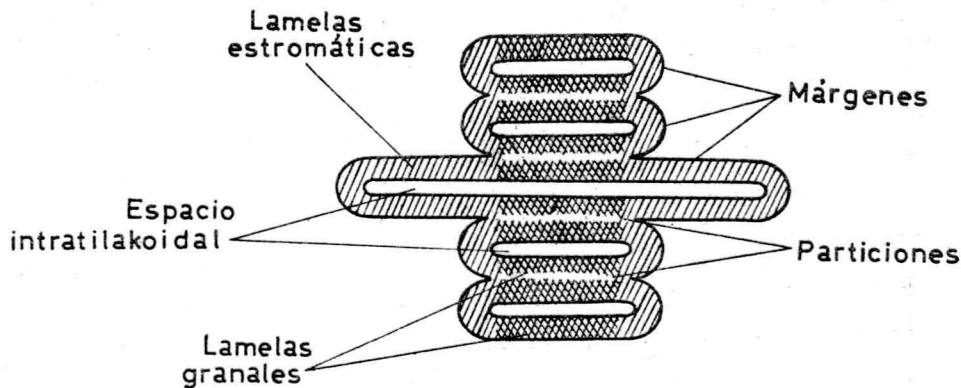
La envoltura interna del cloroplasto presenta unas pequeñas invaginaciones a las que se ha denominado "retículo periférico"; se ha pretendido ver en ellas unos precursores del sistema lamelar (2), pero su gran abundancia en los cloroplastos de las especies  $C_4$  parece mas bien identificarlas con el sistema de transporte del  $CO_2$  típico de estas plantas.

En la estructura lamelar se encuentran fundamentalmente localizados los pigmentos fotoactivos y los restantes componentes de la cadena de transporte electrónico, así como el sistema subsidiario de síntesis de compuestos energéticos. Por observación microscópica esta estructura se asemeja a pilas de discos verdes de diámetro más o menos uniforme -0.2 a 0.4  $\mu m$  de diámetro-, a los que se denomina "grana", con interconexiones membranosas entre las distintas pilas. Estos elementos discoidales o "tilakoides" están constituidos por una envoltura lamelar de unos 75 Å de espesor, que limita a un espacio interior que, si en un principio se pensó estaba completamente individualizado, actualmente se ha visto no es así. Las "lamelas"

de un disco tilakoidal -"lamelas" granales- se pueden continuar con las "lamelas" membranáceas que conectan las distintas pilas de "tilakoides" -"lamelas" estromáticas-, de tal forma que la sucesión de éstas entre "grana" y "grana" parecen llegar a formar una estructura helicoidal con sentido a la derecha (3). De esta forma los espacios intratilakoidales se encuentran conectados parcialmente, formando en la práctica un número limitado de compartimentos estanco. Más aún, las "lamelas" estromáticas llegan finalmente a contactar con la envoltura interna del cloroplasto que, en cierto modo, participa también de las características de aquéllas.

En resumen, el cloroplasto aparece así fundamentalmente -- compartimentado en dos espacios, uno el propiamente estromático, y un segundo intracisternal limitado por las capas lamelares -- granales y estromáticas (4). Bajo esta panorámica el concepto de "tilakoide" pierde su significado, y en la realidad viene a confundirse con el de "lamela", tanto referido a los componentes apilados -"lamelas" o "tilakoides" granales-, como a las membranas de interconexión -"lamelas" o "tilakoides" estromáticos o intergranales-. Las zonas de contacto entre dos "lamelas" contiguas que no delimitan espacios intratilakoidales sucesivos se denominan "particiones", mientras que la zona de "lamelas" - no anastomosadas -bordes de los sacos granales y "lamelas" estromáticas- son denominadas "márgenes"; ambas zonas exhiben una composición pigmentaria y funcionalidad claramente diferenciadas.

La composición de las "lamelas" es aproximadamente un 50% de lípidos y un 50% de proteínas, con casi una total ausencia de carbohidratos (5). Los lípidos son fundamentalmente diferentes de los de otras estructuras de la planta, con un elevado --



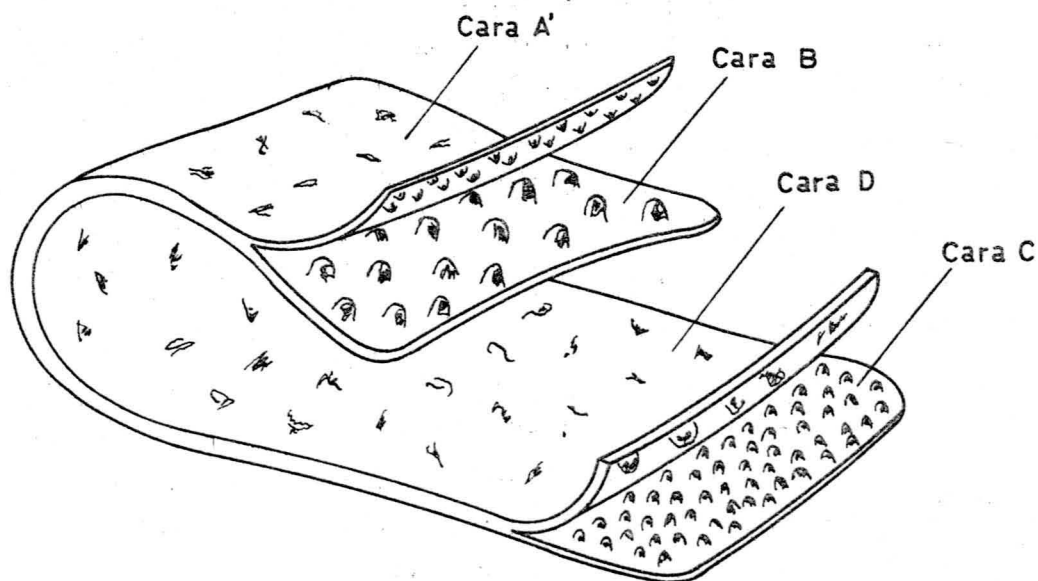
porcentaje de glicolípidos -mono y digalactosil-diglicéridos- y fosfolípidos, y un bajo contenido en triglicéridos (6); los pigmentos constituyen el 20% del contenido lipídico total. Las proteínas pueden ser estructurales -"intrínsecas de la membrana"-, o bien débilmente ligadas a ella -"extrínsecas o periféricas"-, pudiendo estas últimas ser separadas por tratamientos suaves -- sin pérdida de su funcionalidad, generalmente ligada a una actividad enzimática. Los componentes protéicos y lipídicos están íntimamente relacionados por razones de polaridad o apolaridad, constituyendo un entramado tridimensional claramente diferenciado a lo largo del espesor de la membrana lamelar -de 50 a 100 Å-, de tal forma que se advierte un incremento de agrupaciones polares hacia el exterior del "tilakoide", y una mayor densidad de grupos apolares en el espacio interior, hechos que tienen una radical importancia en la distribución pigmentaria y de elemen-

tos intermediarios de la cadena de transporte electrónico, en relación con su funcionalidad.

En cualquier caso, las membranas tilakoidales constituyen unas estructuras dinámicas, con las moléculas de lípidos en estado fluido y continuo movimiento. Efectivamente, se ha observado que el espesor de las "lamelas" decrece reversiblemente en un 25% después de iluminar (7), modificación que se considera relacionada al flujo de protones que durante la iluminación tiene lugar hacia el interior del "tilakoide", cuyo bajo pH debe ejercer una acción desorganizadora de la estructura lamelar.

Observadas al microscopio electrónico las membranas lamelares -especialmente las estromáticas- muestran una superficie externa (cara A') tapizada de partículas sobresalientes que pueden ser arrastradas fácilmente con soluciones de EDTA; su naturaleza ha sido identificada con actividad ATPasa (8). La aplicación de técnicas de microfractura en material congelado a membranas así desprovistas de actividad ATPasa, muestra que la fractura tiene lugar más fácilmente en dirección longitudinal a la membrana, siguiendo un plano determinado, con exposición de dos superficies fundamentalmente distintas, lo que define la estructura asimétrica de las "lamelas" (9). El plano de fractura más próximo al espacio intratilakoidal (cara B) exhibe sobre su superficie grandes partículas de 13-17 nm. de diámetro, pocas en número; aparecen sólo en las "particiones", y están prácticamente ausentes en los bordes de los sacos granales y en las "lamelas" estromáticas. Por el contrario, el plano de fractura más externo (cara C) muestra un tapiz de pequeñas y numerosas partículas de 9-12 nm. de diámetro tanto en las "lamelas" granales como intergranales. De acuerdo con esto, se ha observado que la lámina de fractura interior presenta un espesor mayor que la ex-

terior, en la relación 2.5:1 (10).



Material enriquecido en uno u otro tipo de partículas, - por sonicación o tratamiento con detergentes, muestra que las partículas pequeñas son liberadas más fácilmente, lo que unido a su actividad de Fot. I corrobora la localización más externa de éste dentro de las "lamelas", y la más interna del - Fot. II (11). Esta identidad de estructuras particuladas observables físicamente, con unidades funcionales capaces de - atrapar la energía radiante, parece querer resucitar el antiguo concepto de "cuantosoma" (12) que, si bien anteriormente cuestionado por su pretendida identificación con material particulado portador de proteínas estromáticas -fracción I- o lamelares con actividad ATPasa, a la luz de estos hallazgos muestra una gran similitud con los grandes corpúsculos visibles -



en la cara interna de las "lamelas" de las "particiones" (cara D), y que no son mas que la manifestación al exterior de la "lamela" de las grandes partículas visibles en la superficie interior de fracturas D, con actividad de Fot.II.

De todo lo dicho se desprende que las partículas  $CF_1$ , en las cuales radica la actividad ATPasa y la actividad fosforilante, sólo se encuentran en la superficie externa de los "tilakoides", es decir, en las "lamelas" estromáticas y en los "márgenes", jamás en las "particiones". Y puesto que las "lamelas" estromáticas poseen una superficie relativa expuesta al espacio estromático superior a la de los "márgenes" granales, uno debe esperar -y así ocurre- una mayor actividad ATPasa por  $\mu g$  de clorofila en las primeras que en las segundas - (13). Las partículas grandes con actividad de Fot.II aparecen sólo en las "lamelas" granales, concretamente en la zona de "partición", mientras que las partículas pequeñas con actividad de Fot.I se encuentran en todas las "lamelas", tanto granales como estromáticas. Esto está de acuerdo con las observaciones que, en relación con su estructura y función, se han venido haciendo en cloroplastos en desarrollo. En ellos se ha observado que la actividad del Fot.I precede en el tiempo a la del Fot.II, lo que concuerda con el mas temprano desarrollo de las "lamelas" estromáticas que las granales.

Esta distribución ha hecho concebir la existencia de dos tipos de Fot.I, con diferente función fisiológica (14): el localizado en el "estroma", físicamente separado de los centros con actividad de Fot.II, estaría fundamentalmente vinculado a la fotofosforilación cíclica, mientras que el de localización granal sería operativo, en íntima conexión con el Fot.II, en el transporte acíclico de electrones. Una proximidad física -

de los Fot. I y II en las "lamelas" granales viene exigida por la existencia de transferencias cuánticas de energía entre ambos fotosistemas, lo que sólo será posible si los pigmentos de las "antenas" de ambos fotosistemas no están excesivamente separados.

En cualquier caso se plantea la pregunta: ¿de dónde proceden los equivalentes de reducción necesarios para activar el Fot. I de las "lamelas" estromáticas?. Sane y col. (15) han postulado que éste podría estar en contacto con el Fot. II de las "lamelas" granales a través de un transportador electrónico de bajo peso molecular. Por otro lado, si, como luego veremos, la ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductasa se encuentra localizada en la superficie de las "lamelas" estromáticas y en las "márgenes" granales, nunca en las "particiones" -igual que le ocurre al CF<sub>1</sub>-, los equivalentes de reducción generados por el Fot. I de las "particiones" tendrán de alguna forma que ser transportados a los lugares de localización de la reductasa. Esto podría, igualmente, ser llevado a cabo por un transportador de electrones de pequeña magnitud molecular. Sin embargo, una posibilidad alternativa sería la antes indicada, que dicho transportador pusiese en contacto el Fot. II de las "particiones" con el Fot. I de los "márgenes" o "lamelas" estromáticas, con lo que, inversamente, el Fot. I de las "grana" podría ser el --vinculado al sistema cíclico.

El espacio exterior al limitado por las "lamelas" granales constituye el "estroma", cruzado por un encaje de "lamelas" estromáticas o intergranales. 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 carboxi

lasa-oxigenasa, que llega a constituir en las plantas  $C_3$  hasta el 50% del nivel protéico total del contenido estromático (16). Este contiene también un discreto número de partículas que, en general, representan reservas de azúcares fotosintetizados. Las más comunes de ellas son granos de almidón, que aparecen al microscopio como zonas más o menos traslúcidas; también son frecuentes los "plastoglóbulos" o "inclusiones osmiofílicas", más abundantes en cloroplastos de hojas viejas, y constituidas por acumulación de material lipídico (17). Finalmente, también se han identificado partículas ribosómicas de tipo 70 S, más pequeñas que los ribosomas citoplasmáticos de tipo 80 S; su misión es dirigir la síntesis de algunas proteínas cloroplásticas, por ejemplo la subunidad de mayor peso molecular de la fracción I (18).

#### Origen y evolución de la estructura cloroplástica.

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar el origen y la diversidad de las distintas formas de cloroplastos, aunque fundamentalmente se pueden clasificar en dos. La primera postula que el material cloroplastídico existía en cierto modo dentro de la célula de un primitivo antepasado, formando parte del equipo del mismo; un proceso subsiguiente de diferenciación, con adquisición de una mayor complejidad, condujo a la realización de una labor más especializada, con abandono progresivo de otras más genéricas (19). Sobre esta base la diversificación de los cloroplastos ha ocurrido por cambios en las sucesivas progenies de un primitivo antepasado, dando así lugar a distintos tipos de organismos, fundamentalmente algas, de los que las plantas superiores constituyen el paso más evolucionado; este concepto exige sólo la previa existencia de un prokariote, a partir del cual se habrían desarrollado todos los eukariotes.

Sin embargo, la complejidad del más elemental eukariote es tan superior a la de cualquier prokariote, que ello ha dado nueva actualidad a la segunda teoría, según la cual los cloroplastos eran organismos prokariotes fotosintéticos autónomos, que pasaron a ser simbioses de células de otro tipo (20). Según esto la evolución de este antepasado consistió en una reducción de su estructura y funciones, la mayor parte de las cuales quedaron encomendadas a la célula hospedadora, adquiriendo una alta especialización en la concreta función fotosintética. Esto conduce a una diversificación de los organismos fotosintéticos derivada de una endosimbiosis de distintos tipos de prokariotes, cada uno con un tipo particular de pigmentación. Efectivamente, estudios fósiles han puesto de manifiesto la existencia de un variado grupo de prokariotes simbióticos ancestrales, de los que las algas unicelulares verde-azuladas serían un auténtico grupo relíctico.

Dejando aparte a las bacterias fotosintéticas, cuyo especial tipo de pigmentos fotosintéticos — las distintas formas de bacterioclorofila— habla de una diversificación distinta y muy temprana en relación con los organismos fotoautótrofos oxigénicos, el hecho de que el desprendimiento de  $O_2$  tenga lugar tanto en las algas prokariotes verde-azuladas como en las plantas superiores indica que este hecho no depende de la segregación del aparato fotosintético en un verdadero cloroplasto. Mas fundamental parece ser la presencia de clorofila "a" y una serie de pigmentos anejos. En los prokariotes verde-azulados (Cyanophyta) y en algunos eukariotes (Rhodophyta) estos pigmentos son solubles en agua, del tipo de ficocianinas y ficoeritrinas, apareciendo en forma de conjugados protéicos sobre agregados granulares de tipo tilakoidal. Un paso más avanzado en la serie evolutiva implica la pérdida de este tipo de pigmentos, con la aparición de

otros de naturaleza lipídica, entre ellos las clorofilas "c" - (Cromophyta) y "b" (Clorophyta) (21). En cualquier caso, la aparición de cubiertas cloroplásticas separando todo el aparato fotosintético del contenido citoplasmático es una constante de todos los eukariotes.

En resumen, resulta posible imaginar la evolución del cloroplasto de una planta superior a partir de un prokariote ancestral verde-azulado (Cianophyta), a través de la formación de una membrana limitante, pérdida de los "ficobilisomas", y aparición de nuevos pigmentos con una disposición estructural en "lamelas". Paralelamente se desarrolló la capacidad de síntesis y almacenaje de almidón. Al mismo tiempo ocurría la progresión de una estructura unicelular al "talo", seguido de una diferenciación de células en tejidos, llegándose así a la organización en plantas superiores a través de la secuencia Briophytas, Pteridophytas, Gimnospermas, y Angiospermas. Sin embargo, a través de esta secuencia la estructura del cloroplasto permaneció esencialmente inalterada, sólo con modificaciones coyunturales derivadas de especiales circunstancias ambientales.

Efectivamente, puesto que la zona de más eficiente captación lumínica corresponde a las "particiones", por su contenido en Fot. I y II, uno puede considerar el caso de plantas que se ven sometidas a condiciones de baja iluminación. En éstas el factor limitante es la luz, por lo que el vegetal desarrolla "grana" en proporción relativamente mayor que "lamelas" estromáticas, ya que las necesidades en ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductasa y CF<sub>1</sub> -proteínas mayoritarias de éstas— son limitadas debido a las reducidas tasas de transporte electrónico (22). Hay que indicar que un incremento en el contenido en "grana" actúa decreciendo la razón clorofila a/b, lo que resulta en una ampliación

del rango cualitativo de la luz absorbida por los pigmentos y, por tanto, en una más eficiente captación de la luz.

Quizás la única excepción la constituyan los cloroplastos de las plantas  $C_4$ . El aspecto estructural más sobresaliente de los vegetales  $C_4$  es la llamada "anatomía tipo Kranz" consistente en una disposición particular del tejido fotosintético en capas concéntricas alrededor del tejido vascular (23). La capa exterior o células del mesófilo poseen cloroplastos con un contenido granal normal, muy superior al de las células más profundas del parénquima vascular, en que la "grana" está reducida, y aún ausente.

En realidad las plantas  $C_4$  constituyen un grupo heterogéneo en el que se pueden diferenciar tres subgrupos, con particularidades bioquímicas y estructurales. En el primero — "productoras de malato" — las células del parénquima vascular poseen cloroplastos con una "grana" muy escasa. En el segundo y tercer grupo — "productoras de aspartato" — existe ya una "grana" bastante desarrollada en los cloroplastos del parénquima vascular, ocupando una posición centrífuga en los del tercer grupo, mientras que en los del segundo lo es centrípeta. — Más aún, en estos últimos la "grana" aparece muy asociada con las invaginaciones de la envoltura interna o "retículo periférico" — típico de las especies  $C_4$  —, por lo que se ha asociado con la alta actividad del enzima málico  $NAD^+$ -dependiente característica de este grupo.

Por otro lado, los cloroplastos del mesófilo carecen fundamentalmente del equipo enzimático del ciclo de Calvin, que tiene lugar en los de las células del parénquima vascular, las cuales, en contra, exhiben una actividad fotoquímica reducida,

especialmente en relación con el Fot.II. Una mayor actividad - del Fot.I, debida a las "lamelas" estromáticas, cabe explicarse sobre la base de un requerimiento adicional de ATP que la fijación de  $\text{CO}_2$  por estas plantas necesita, y que obtienen vía fotofosforilación cíclica. En resumen, los vegetales  $\text{C}_4$  representan un desarrollo evolutivo relativamente reciente, con el establecimiento de dos capas de células que, posteriormente, - han sido diferenciadas por desarrollo de cloroplastos con com ti dos es pe cíf i cos y co mp le me n ta ri os.

#### Desarrollo del cloroplasto.

Cuando una plántula inicia su desarrollo, sus protoplasti-  
dios, 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 protoclorofílicos, de los que existen formas distintas con máximos de absorción a 628, 637 y 650 nm. (24). 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 -- protoclorofílicos en clorofílico "a", primero, y clorofila "a" después, proceso en que tiene lugar la sustitución del geraniol por fitol como alcohol esterificante (25). 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.

La aparición de la estructura granal implica también 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 (26). 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.

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  $CO_2$  (27).



### 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 conseguida. 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  $\text{NADP}^+$  se refiere (28).

Dejando a un lado los métodos de preparación de cloroplastos en medio no acuoso (29), solamente útiles con fines preparativos de determinados componentes, han sido efectuados numerosos esquemas de preparación y clasificación funcional. Las primeras indicaciones (30) 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 sistemáticas de preparación y nomenclatura standardizada atendiendo al número de lavados -P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, etc.-, fué establecida por Arnon y col. (31).

Todos los procedimientos de obtención de preparados cloroplásticos se basan generalmente en la preparación de homogenizados 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 muy determinante en el grado de funcionalidad de los cloroplastos — especialmente crítico en la fijación de  $\text{CO}_2$  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 mas 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 (32, 33, 34).

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 (35) 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<sub>2</sub>, en los que el ferricianuro es reducido a un bajo ritmo a nivel del Fot. I debido a dificultades de permeabilidad, y que se obtienen sólo en medios isotonicados con azúcares mediante una sola centrifugación. Los de tipo B son también cloroplastos íntegros que han perdido al menos parcialmente, su cubierta más externa, correspondiéndose fundamentalmente con los cloroplastos de Clase I antes mencionados; fijan CO<sub>2</sub>, aunque a una baja tasa, reducen el ferricianuro a un buen ritmo ya a nivel del Fot. II, pueden reducir el NADP<sup>+</sup> 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<sub>2</sub> y requieren ferredoxina exógena para reducir NADP<sup>+</sup>; no obstante, mantienen un buen ritmo de transporte electrónico y fotofosforilación. Los de tipo D son en realidad "lamelas" cloroplásticas que aun mantienen un buen control fotosintético y pueden fijar CO<sub>2</sub> 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 en-

tre 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 (36).

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 francesa". 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 "granadas" rotas, y a 150.000 g las "lamelas" estromáticas. Mediante este procedimiento Boardman y Anderson (37)

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 trata-  
miento con Triton X-100. El sedimento obtenido después de una  
corta centrifugación a 150.000 g se designa TSF-2, constitu--  
yendo partículas relativamente planas con gran actividad de -  
Fot.II. El sobrenadante suministra por centrifugación prolon-  
gada unas partículas TSF-1 en forma de agregados discoidales,  
que exhiben una clara actividad de Fot.I (38).

Una clasificación de los distintos tipos de partículas -  
subcloroplásticas ha sido también hecha (39). Las denominadas  
partículas P-I incluyen, por un lado, fragmentos granales ca-  
paces de soportar un flujo electrónico del  $H_2O$  al  $NADP^+$  y, --  
por otro partículas mas pequeñas que fotoreducen al  $NADP^+$  ---  
cuando se agrega un donador de electrones adecuado; ambas mues-  
tran 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 és  
tos los preparados que se obtienen por tratamiento ultrasónico  
o con la "prensa francesa". Aunque verdaderamente la pérdida -  
de plastocianina pueda usarse como indicativo del grado de ---  
fragmentación, otros autores sostienen que este tipo de partí-  
culas 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 (40). Las partículas ---  
P-III se caracterizan por tener dañado el mecanismo de descom-  
posición 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<sub>4</sub> 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 mas 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 (41).

#### Sistema de captación lumínica.

Se realiza mediante las llamadas "antenas", bloque de sistemas pigmentarios constituídos en los cloroplastos de plantas superiores por clorofilas "a" y "b", carotenos y xantofilas; cada "centro de reacción" correspondiente al Fot. I ó II posee su propia "antena". En condiciones de perfecta iluminación solar -- una molécula de clorofila "a" es capaz de absorber un cuanto de luz cada 100 mseg., cada 1 segundo bajo una luz difusa, y cada

10 segundos en un día nublado. Si tenemos en cuenta que un cloroplasto en perfectas condiciones puede mantener el transporte de un electrón cada 15 msec., es evidente que este flujo no podría ser mantenido ni aún en condiciones de iluminación óptima si una sola molécula de clorofila constituyese el sistema de captación lumínica de cada "centro de reacción". Ha podido comprobarse que cada "centro de reacción" posee un sistema de "antenas" constituido por unas 300 moléculas de clorofila, y que cada saco granal o disco tilakoidal soporta hasta  $10^5$  de dichas moléculas; así pues, teniendo en cuenta que cada cadena electrónica fotosintética está constituida por dos "centros de reacción" — Fot.I y Fot.II— se deduce que en cada disco operan unas 200 cadenas de transporte (42). Estas cadenas aparecen intercomunicadas a tres distintos niveles: efectúan cambios de energía a nivel de "antena", intercambian flujo electrónico especialmente a nivel del "pool" de plastoquinona, y comparten una común dotación de gradiente protónico a nivel de la membrana tilakoidal.

Las "antenas" vinculadas a los Fot. I y II exhiben una diferente composición pigmentaria. Xantofilas y clorofila "b" aparecen enriquecidas en el Fot.II, mientras que la clorofila "a" lo está en el Fot.I. Puesto que la absorción del sistema de "antenas" por arriba de 660 nm. es enteramente debida al estado físico en que en ellas se encuentra la clorofila "a", resulta evidente la desviación hacia zonas de absorción de mayor longitud de onda de la "antena" del Fot.I respecto al II; esto facilita la funcionalidad del Fot.I que, por su exclusivo contenido en clorofila "a", presenta un máximo de absorción en zonas de alta longitud de onda, y corrobora el incremento de la actividad fotosintética cuando adicionalmente se ilumina el cloroplasto con radiación del rojo lejano (efecto Emerson) (43).

Más aún, dentro de cada "antena" se agrupan, no sólo distintos tipos de pigmentos, sino diferentes tipos de una misma clorofila, diferentes uno de otro por su distinto estado físico de agregación a las "lamelas", seguramente por interacción con moléculas protéicas (44). Efectivamente, el espectro de absorción de los cloroplastos se extiende a zonas especialmente por arriba de los 670 nm.— en los que no absorben ni los carotenos, xantofilas y soluciones puras de clorofila "a" y "b", únicos tipos de pigmentos extraíbles del cloroplasto.— Esta extensión del espectro de absorción hace que el cloroplasto capte de una forma más eficiente la luz solar. Por otro lado, puesto que el máximo de absorción de ambos fotosistemas se encuentra en zonas de alta longitud de onda, una desviación hacia las mismas de la radiación absorbida la consigue el cloroplasto mediante un sistema de transferencia energética entre las diversas moléculas pigmentarias.

Un pigmento primario capta un cuanto de luz de una longitud de onda determinada, quedando en situación de excitación electrónica. Esta energía puede transferirla a un pigmento vecino siempre que las condiciones — distancia entre los mismos y orientación de los grupos cromóforos— permitan el establecimiento entre ambos de un estado dipolar de resonancia, de tal forma que la probabilidad de esta transferencia sea mayor que el gasto del estado excitado en otros procesos competitivos: emisión de fluorescencia o calor por vuelta al estado no excitado, estados metaestables, etc.. Puesto que la estabilidad del pigmento fotoexcitado es pequeña, la transferencia energética entre los mismos ha de tener lugar muy rápidamente, no siendo posible cuando la distancia entre pigmentos vecinos supera los 100 Å (45).



Sobre este punto existen dos teorías. Cuando el tiempo de transferencia del estado de excitación entre moléculas vecinas es largo en comparación con el tiempo de relajación de la molécula excitada, tiene lugar primeramente la relajación de esta última a un estado vibracional base, produciéndose después la transferencia. En estas condiciones la energía transferida es la estricta, sin que el estado excitado del aceptor acceda a un alto nivel vibracional, siendo en tales circunstancias muy improbable que pueda ocurrir una transferencia en sentido inverso. Esta hipótesis se conoce como "mecanismo Förster" (46). Por el contrario, la "teoría del excitón" es aplicable a situaciones en que la transferencia energética entre moléculas ocurre a una velocidad superior a la de relajación a un estado de excitación basal; entonces resulta posible una reacción inversa, con múltiples y mutuas transferencias de estados de excitación entre moléculas suficientemente próximas. Resulta imposible con los datos que actualmente se tienen indicar qué teoría puede ser la más apropiada. Quizás la "teoría del excitón" sea más aplicable al conjunto de moléculas pigmentarias de las "antenas", mientras que el "mecanismo Förster" lo sea a la transferencia de ésta a las moléculas de clorofila de los fotosistemas (45).

Los tiempos que transcurren desde la absorción de un  $h\nu$  por la "antena", hasta que ello aparece reflejado en el componente que actúa de aceptor primario de electrones — componente Q para el Fot.II y componente X para el Fot.I—, son de 0.3 a 1.8 nseg. para aquél y  $< 30$  pseg. para éste, y seguramente aún menos (47). Puesto que se ha calculado que alrededor de 125 pasos de transferencia ocurren dentro de una "antena" antes de que el  $h\nu$  absorbido aparezca reflejado en la trampa del aceptor primario, cabe deducir que en el Fot. I cada trans

ferencia ocurre en un tiempo  $< 2.5 \times 10^{-13}$  seg., lo que sólo es posible sobre la base de la "teoría del excitón".

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 (48). 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.

Una modificación a la teoría de sistemas de "antenas" independiente para el Fot. I y Fot. II ha sido desarrollada por Thornber (49). Este autor aisló por electroforesis en acrilamida en presencia de SDS a partir de un extracto de hoja sólo dos componentes que contienen clorofila. Uno de ellos contiene sólo clorofila "a", y corresponde al complejo proteína-clorofila del componente P-700. El segundo contiene aproximadamente cantidades equimoleculares de clorofila "a" y "b", y se identifica como el componente P-680 del Fot. II, junto con el siste-

ma de "antenas" del mismo. De acuerdo con ésto el autor propone la existencia de un solo sistema de "antenas", el correspondiente al Fot.II, del cual se enviaría la radiación absorbida, no sólo a su correspondiente "centro de reacción", sino también al "centro de reacción" del Fot.I. Dicho esquema explicaría mejor que el sistema de paquetes independientes de pigmentos captadores, una distribución equilibrada de energía, así como el hecho experimental observado que fracciones enriquecidas en Fot. II sean especialmente ricas en pigmentos de "antenas".

Prácticamente la dotación de moléculas de clorofila de un cloroplasto es la misma durante todo su período de vida. Un paso metaestable del proceso de fotoexcitación de la clorofila es la formación de un estado "triplete" que, si bien muy fugaz, la hace muy susceptible a su destrucción por el oxígeno. Este estado sobreexcitado es reducido aun más en el tiempo por transferencia del exceso de energía a las moléculas de  $\beta$ -caroteno que adquiere el estado de "triplete", y se disipa luego por interacción con oxígeno (50). Otra forma de disipación energética es la emisión de fluorescencia. En general, hay una mayor emisión de la misma a nivel de Fot.II, bien en forma de la llamada "fluorescencia muerta", o energía perdida en los procesos de transferencia a nivel de "antena", bien de "fluorescencia viva", emitida en el proceso de reducción del componente Q por el Fot.II. La primera es un factor constante, mientras que la segunda depende del estado de óxido-reducción del "quencher" Q (51), y constituye un magnífico medio de medida de la funcionalidad del fotosistema.

El rendimiento de captación lumínica por las moléculas de clorofila de las "antenas" viene dado, no sólo por la longitud de onda de la luz incidente, sino por la disposición orientada

de las moléculas de clorofila en relación al plano de la membrana tilakoidal. Y mientras que la absorción a las longitudes de onda altas — la llamada "banda Qy"— tiene lugar preferentemente cuando la luz incidente viene polarizada en el plano de la membrana (eje y de la molécula de clorofila), la banda Bx — llamada "banda de absorción de Soret"— lo hace cuando la polarización es según el eje x de la molécula. Por el contrario, las moléculas de clorofila del Fot. I no presentan una orientación particular, comportándose como un absorbente con simetría circular (52).

#### Fotosistemas.

Dos fotorreacciones operan en serie para elevar electrones desde el agua, un donador con alto potencial redox, al aceptor  $\text{NADP}^+$  de bajo potencial redox. 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 "a<sub>1</sub>", y P-680 o clorofila "a<sub>2</sub>".

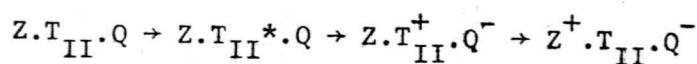
El componente P-700 — denominado así por presentar un máximo de absorción a dicha longitud de onda— origina por fotooxidación un radical catiónico cuyo electrón desapareado aparece por EPR como deslocalizado sobre dos anillos porfirínicos, lo que sugiere se trata de un dímero de dos moléculas de clorofila "a" (53) de estructura aún incierta. Su potencial redox normal es de +450 mV, produciéndose por fotoexcitación un gradiente de potencial del orden de 1800 mV — ello implica alcanzar un potencial redox del orden de -1350 mV—, de los que aproximadamente el 30% se pierden en forma de energía disipada en la reducción del aceptor primario de electrones, y otro 20% adi

cional en los procesos de transferencia que conducen a la reducción del  $\text{NADP}^+$ . En resumen, el cloroplasto sólo asimila el 50% de la energía absorbida en el fotoacto. Además del máximo de absorción a 700, exhibe otros a 682 y 438 nm, abarcando su espectro de absorción de 400 a 730 nm., siendo estos valores del rojo lejano los responsables del efecto Emerson, o incremento de la actividad fotosintética por una iluminación adicional a 700 nm. (43).

Como ya se ha indicado, el Fot. I se encuentra ligado a las "lamelas" granales — "particiones" y "márgenes"— como a las estromáticas, siendo la razón de clorofila inaccesible al flujo electrónico del Fot. II respecto a la operativa con dicho flujo, de 1/3 (54), lo que habla en favor de una localización topográfica del flujo electrónico cíclico segregada de la del acíclico. El aceptor primario de electrones del Fot. I es el componente X, de naturaleza aún incierta, mientras que el donador de los mismos parece ciertamente ser la plastocianina, a pesar de ciertas hipótesis que hablan de un acoplamiento directo del Cit. f al P-700 (40). Preparaciones cloroplásticas desprovistas de plastocianina se muestran incapaces de catalizar la reducción del  $\text{NADP}^+$  con el sistema ascorbato/DPIP — como donador de electrones (55), restaurándose la actividad — por adición de la misma.

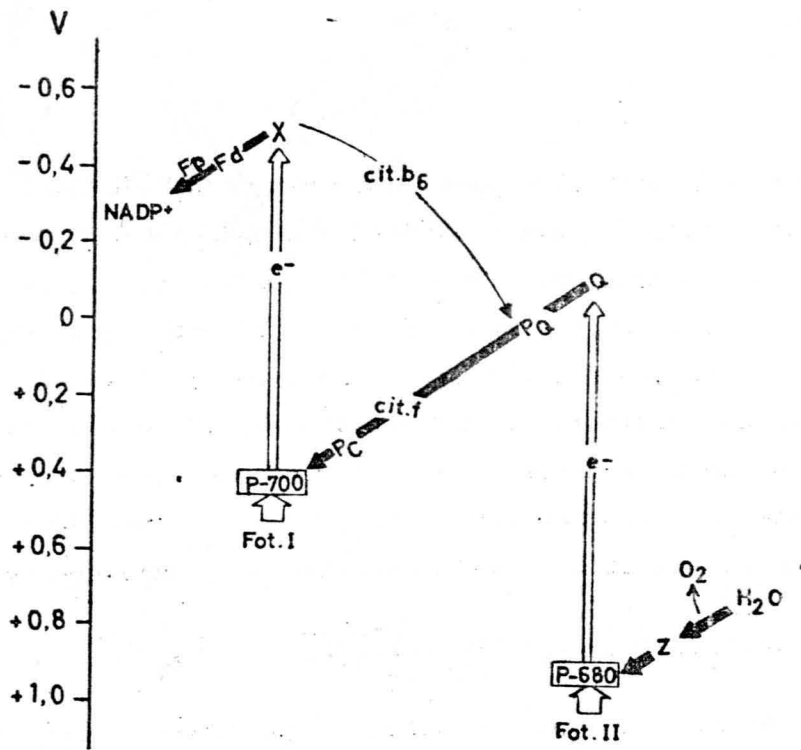
Análogamente, el componente P-680 o clorofila " $a_2$ " — llamado también  $T_{II}$  o trampa, por ser el elemento que capta de forma irreversible el estado de excitación de las "antenas"— a parece constituido por un dímero de moléculas de clorofila "a", produciéndose por fotoactivación un catión con un electrón desapareado no localizado sobre dos anillos porfirínicos. Su espectro de absorción muestra máximos a 687 y 433 nm. con un in-

tervalo de absorción aproximado entre 400 y 700 nm. (56). Tiene un potencial redox  $> + 500$  mV, llegando a alcanzar en el fotoacto alrededor de los  $-700$  mV, de los que, al igual que antes, se disipan un buen porcentaje al reducir al aceptor primario Q. Este es de naturaleza desconocida, igual que le ocurre al donador primario Z. De acuerdo con el modelo presentado por varios investigadores (57), el Fot. II en realidad puede considerarse como un complejo  $Z.T_{II}.Q$  que, a consecuencia de la captación de un fotón, evolucionaría de la siguiente forma:



Su localización se reduce a las "lamelas" granales, en la zona de las "particiones", no apareciendo en absoluto en la zona estromática.

Este planteamiento sobre la base de dos fotosistemas ha conducido al clásico esquema en Z de Hill y Bendall (58), con un requerimiento teórico de 8 cuantos de energía por cada molécula de  $O_2$  desprendido, toda vez que la transferencia de cada equivalente de reducción requiere la intervención sucesiva de dos fotoactos. Esto ha sido comprobado en la práctica mediante el empleo de iluminación por golpes muy cortos de "flash", con rendimientos entre 8 y 10 fotones por mol de oxígeno desprendido. A consecuencia del fotoacto II se consigue un tránsito del potencial redox  $+ 800$  mV del sistema  $H_2O-O_2$  al  $-35$  mV del aceptor primario Q, mientras que en el fotoacto I se consigue el tránsito de  $+450$  mV del componente P-700 al  $-340$  mV del NADPH. Así pues, el tránsito neto de potencial redox entre ambos extremos es de  $+800$  a  $-340$  mV, con un gradiente de  $1140$  mV.



La existencia de dos fotosistemas fué corroborada cuando pudieran ser separados y su funcionalidad parcial puesta de manifiesto independientemente (59). Que ambos exhiban espectros de absorción no del todo coincidentes explica el fenómeno de incremento del oxígeno desprendido — efecto Emerson—, cuando a un preparado cloroplastídico expuesto a una radiación que no sobrepasa los 700 nm., se le somete a una iluminación adicional que supera dicha longitud de onda (43), así como el incremento, no sumativo, que sobre la reducción del  $\text{NADP}^+$  ejerce una iluminación simultánea con luz roja y de rojo lejano, frente a ambas efectuada de forma independiente (60).

Mientras ambos fotosistemas son responsables del flujo acíclico de electrones, sólo el Fot. I es el responsable del flujo cíclico. Este esquema — el más ampliamente admitido—, se conoce como el de "dos reacciones lumínicas", frente a la

hipótesis de "tres reacciones lumínicas" postulada por Arnon y col. (61), según la cual la reducción del  $\text{NADP}^+$  y la evolución de  $\text{O}_2$  no muestra el incremento en el rojo lejano postulado por Emerson, deduciendo de ello que la cadena acíclica de transporte depende de dos fotoactos conducidos por el Fot.II, frente a un tercer fotoacto dependiente del Fot.I, responsable del flujo electrónico cíclico y que sí exhibe un incremento al rojo lejano.

#### Componentes no fotoquímicos de la cadena de transporte.

Aparte los componentes fotoquímicos P-700 y P-680, existen una serie de transportadores electrónicos en la cadena fotosintética que iremos analizando a continuación de forma secuencial, tal como aparecen ordenados en ella.

Sistema de escisión del  $\text{H}_2\text{O}$ . La zona de la cadena fotosintética comprendida entre la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y el Fot.II constituye la más lábil y desconocida de todo el proceso, aunque poco a poco esté siendo construido un cuerpo de doctrina sobre ello. Un requerimiento de iones  $\text{Cl}^-$  ha sido demostrado, aunque su lugar exacto de actuación y su papel están por dilucidar; una falta de efecto de los iones  $\text{Cl}^-$  sobre cloroplastos tratados que han perdido la capacidad de desprender  $\text{O}_2$ , y que utilizan  $\text{NH}_2\text{OH}$  como donador de electrones, indica que dichos iones ejercen su acción entre el lugar de lisis del  $\text{H}_2\text{O}$  y el punto de cesión de electrones por la  $\text{NH}_2\text{OH}$  (62).

La necesidad del Mn para la planta, y su vinculación con la actividad del Fot.II, fué pronto puesta de manifiesto por la observación de la existencia de distintos tipos de Mn en el cloroplasto, en general firmemente ligados. No obstante, -



extracciones con Tris,  $\text{NH}_2\text{OH}$ , agentes caotrópicos, etc., producían pérdidas parciales de Mn y una inactivación en la capacidad de lisis del  $\text{H}_2\text{O}$ , que se recuperaba por una incorporación fotoinducida de Mn exógeno. Aunque el mecanismo del proceso no se conoce aún, sí puede deducirse que 2/3 del contenido total de Mn del cloroplasto resultan esenciales para el desprendimiento de  $\text{O}_2$ , estando parte del mismo en forma paramagnética detectable al EPR, y otra en estado diamagnético no detectable (63). Por otro lado, la capacidad de desprender  $\text{O}_2$  se pierde por tratamientos térmicos moderados, lo que ha conducido a postular la existencia de un llamado "factor de Hill", termolábil, soluble en agua y de bajo peso molecular, y que también contiene Mn ligado. No obstante, la funcionalidad del transporte electrónico al componente P-700 se mantiene, como lo demuestra su operatividad con donador exógeno de electrones del tipo del ascorbato, hidroquinona,  $\text{NH}_2\text{OH}$ , difenilcarbazida, etc.

El hecho fundamental en la elucidación del mecanismo de acción del componente Z fué la observación de que cuando se iluminaba el cloroplasto con cortos y continuos golpes de "flash", el desprendimiento de  $\text{O}_2$  oscilaba con una secuencia de cuatro golpes de "flash", lo que venía a sugerir la existencia de cuatro sucesivos actos fotoquímicos vinculados al Fot. II antes de que pudiese tener lugar el desprendimiento gaseoso (64). Puesto que cada fotoacto implica la cesión de un electrón al componente P-680, ello indica que Z puede experimentar cuatro estadios sucesivos de oxidación,  $\text{S}_1\text{-S}_2\text{-S}_3\text{-S}_4$ , desde la situación base  $\text{S}_0$ , produciéndose a nivel del estadio  $\text{S}_4$  la oxidación de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , recuperándose la situación  $\text{S}_0$  con un desprendimiento concomitante de un mol de  $\text{O}_2$ . Sin embargo, si bien el estado  $\text{S}_1$  es perfectamente estable, no lo son el  $\text{S}_2$  y el  $\text{S}_3$ ,

y menos aún el  $S_4$ . Esto es lógico si tenemos en cuenta que el tránsito  $S_0-S_1$  muestra una diferencia de potencial de 0.2 V, frente a los  $3.2 \text{ V} - 0.81 \text{ V}$  por cada electrón transferido en el sistema  $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$  que conlleva la transición global  $S_0-S_4$ ; ésto representa 3.0 V adicionales en el salto  $S_1-S_4$ , lo que equivale a una media de 1 V por cada transición  $S_1-S_2$ ,  $S_2-S_3$  y  $S_3-S_4$  (65). Resulta difícil admitir que el proceso tenga lugar de una forma tan simplista; antes bien, parece que estas situaciones intermedias implican la formación de agregados del componente Z con estados intermedios de oxidación del  $\text{H}_2\text{O}$  que, dada su alta reactividad y carácter destructivo, han de permanecer estabilizados por la naturaleza misma de los agregados originados.

Los hechos analizados parecen indicar que ésto se consigue por formación de complejos con el componente Z, que contiene Mn como ión central, siendo los estados sucesivos de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$  en orden de menor a mayor grado de oxidación, correspondientes a las situaciones  $S_1$  a  $S_4$ , respectivamente. Estos complejos serían de tipo mononuclear los correspondientes al  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{OH}^\cdot$  (criptohidroxilo), y binucleares los del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (criptohidroperóxido) y  $\text{O}_2^-$  (criptosuperóxido), posibles estos últimos por enlace de dos átomos de Mn por un puente de oxígeno-O-O- (66). Puesto que el número de coordinación del Mn es 6, ésto permitirá probablemente la existencia de posiciones de coordinación aun libres para que tenga lugar la unión  $Z.T_{II}Q$  antes indicada. De esta forma la reactividad de los estados intermedios queda muy atenuada — lo que se deduce comparando la energía libre correspondiente a la forma libre y coordinada—, hasta el punto de que el estado  $S_2$  del radical  $\text{OH}^\cdot$  complejado aparece perfectamente estable, frente a la enor

me reactividad del mismo al estado libre.

El potencial redox del criptosuperóxido es del orden de -- +0.3-0.4 V, por lo que el siguiente miembro de la cadena de -- transporte debe tenerlo también de este orden de magnitud. Ello avala la propuesta candidatura de la forma "alto potencial" del cit.  $b_{559}$ , con un potencial redox de +370 mV, como el donador primario de electrones Z del Fot.II (67).

Un punto conflictivo es el estado de oxidación del Mn en -- las transiciones  $S_0-S_4$ . Desde un punto de vista de grado de coordinación son posibles las situaciones de  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$  y  $Mn^{4+}$ . En solución acuosa y en ambiente aerobio el estado de oxidación -- normal de los complejos tetradentados de manganeso es  $Mn^{3+}$ , pudiendo pasar por oxidación a consecuencia de un fotoacto a  $Mn^{4+}$ . Una disminución del pH -- como la que podría tener lugar en el -- "tilakoide" a consecuencia de la iluminación-- produce una transición a la forma  $Mn^{2+}$ , pasando por un estado transicional binucleado de  $Mn^{3+}$  (68); el paso de la forma binucleada a la mononucleada vá acompañada de un desprendimiento de  $O_2$ , hecho que concuerda con el carácter binucleado de las situaciones  $S_3$  y  $S_4$ , -- previas al desprendimiento de  $O_2$ . Una subida del pH al detenerse la iluminación podría provocar de nuevo una transición a la forma primitiva  $Mn^{3+}$ . Que el Mn se encuentra realmente en forma de complejo tetradentado es cuestionable, aunque podría ser posible; por otro lado, los cambios de pH necesarios para las transiciones apuntadas son mas drásticos que los que parece ocurren en el cloroplasto.

Citocromo  $b_{559}$ . La exacta naturaleza del donador primario de electrones Z del Fot. II es al presente desconocida. Algunos propugnan la candidatura de un componente que lleva Mn íntimamente ligado. Por otro lado, y según se apuntó antes, ha sido pro-

puesta la forma de alto potencial del Cit. b<sub>559</sub>, si bien su potencial redox de +370 mV resulta excesivamente bajo como valor previsible para el componente Z, que ha de ir a enlazar con un potencial redox del orden de >+500 mV, correspondiente al componente P-680 (67); efectivamente, una reducción del cit. b<sub>559</sub> y su subsiguiente reoxidación por el P-680 sólo se ha observado en condiciones no fisiológicas. Otros autores, por el contrario, indican la posición transportadora de la forma del cit. b<sub>559</sub> de bajo potencial —alrededor de 0 mV— entre el aceptor primario Q y el "pool" de plastoquinona (69). Finalmente, ha sido postulado un tercer papel del Cit. b<sub>559</sub> en relación con un flujo cíclico de electrones alrededor del Fot.II, lo que significaría una conexión de las dos posiciones anteriormente propuestas para dicho citocromo.

Aceptor primario de electrones Q. Exhibe un potencial redox del orden de -35 mV, aceptando un solo electrón de la carofila "a<sub>I</sub>" fotoexcitada. Su naturaleza química es aún desconocida, suponiéndosele una estructura de quinona. Su denominación deriva de su carácter de "quencher" de la fluorescencia emitida por el P-680 (70), correspondiente a la vuelta al nivel normal del electrón fotoexcitado cuando la cadena de transporte está saturada y, por tanto, el "quencher" permanece en forma reducida. La medida de esta fluorescencia constituye así un buen procedimiento de medida del estado redox del componente Q y funcionalidad del Fot.II. Ha sido identificado con el componente X-320, descrito paralelamente (71).

Componente C-550. Aunque alguna vez ha sido mencionado como aceptor primario de electrones del Fot.II, esto ha sido debido a que los cambios en su espectro de absorción van íntimamente vinculados a los de aquél. A reserva de su naturaleza --

química desconocida, Van Gorkom vincula estos cambios a una modificación de las bandas de una feofitina en respuesta al estado redox del componente X-320 (72). En consecuencia, no es un auténtico transportador, sino una especie de indicador adjunto al componente Q; como dice Junke (42) "una cortesía del cloroplasto hacia los estudiosos de la Fotosíntesis".

Plastoquinona. Constituye el componente más abundante de la cadena de transporte electrónico, constituyendo el llamado "pool" de plastoquinona o "pool" A, nombre derivado por estar fundamentalmente constituido por moléculas de plastoquinona A, una benzoquinona sustituida. Su concentración ha sido dada -- por unos como de 40 moléculas por "centro de reacción I ó II", y de 20 veces mayor que la del aceptor primario Q, por otros. Sin embargo, este contenido no es homogéneo, habiéndose diferenciado entre el "pool" A<sub>1</sub> y el A<sub>2</sub>, siendo el primero aproximadamente 1/3 del total y el único que se equilibra rápidamente con el aceptor primario Q (73). El "pool" A<sub>2</sub> parece ser ajeno a la cadena de transporte, e incluso a las mismas "lamelas", estando localizado en los "plastoglóbulos" junto con moléculas de plastoquinona B y C (17).

Lo más probable parece ser la existencia de 7 moléculas de plastoquinona por "centro de reacción", de las que en condiciones de iluminación media cuatro permanecen en estado reducido (71). Su potencial redox es de -30 mV a pH 7.0, pudiendo aceptar un electrón en la forma plastosemiquinona, o dos como plastohidroquinona, lo que implica que el "pool" de plastoquinona alberga en condiciones normales de iluminación un total de 8 equivalentes de reducción; ésto define su carácter de buffer de óxido-reducción de la cadena de transporte, y permite la interconexión a su nivel de cadenas de transporte paralelas

a fin de suplir posibles deficiencias del sistema de "antena" o del propio P-680. Puesto que entre la plastoquinona y el -- Fot.II pueden solo almacenarse tres electrones adicionales como máximo, resulta evidente que la transición plastoquinona a cit. f constituye el paso limitante de la cadena de transporte, puesto de manifiesto por el hecho de que aún en condiciones de fuerte iluminación la plastoquinona aparezca fundamentalmente al estado reducido, mientras que el cit.f aparezca en estado oxidado (74).

Recientemente, Velthuys y Amesz (75) han demostrado la existencia de un intermediario B localizado entre el aceptor primario Q y el "pool" de plastoquinona; este componente actuaría aceptando un electrón del Q y, una vez acumulados por pares, los transferiría al "pool", del que es equipotencial. Su probable naturaleza quinónica, al igual que Q, implicaría la presencia sucesiva de tres componentes quinónicos.

Citocromos f y b<sub>6</sub>. Tres distintos citocromos han sido -- identificados en el cloroplasto. Dos de ellos son de tipo b -- el cit. b<sub>559</sub> antes mencionado y el cit. b<sub>6</sub> --, y el tercero de tipo c, aunque en la práctica se le conoce con el nombre de cit. f. Los citocromos b<sub>6</sub> y f aparecen íntimamente asociados en las partículas enriquecidas en Fot.I obtenidas por tratamiento con detergentes. El cit. f es reducido por el Fot.II y oxidado por el Fot.I, por lo que su presencia en la cadena principal de transporte electrónico parece evidente. Sin embargo, se ha sugerido que sólo una parte del flujo electrónico entre ambos fotosistemas pase a través de este citocromo, por lo que se piensa puede estar en una rama lateral de dicha cadena; esta hipótesis vendría corroborada por el bajo contenido de cit.f, que está en razón 1/2 en relación con la plasto

cianina o componente P-700 (76). Su potencial redox de +360 mV favorece, sin embargo, su posición entre ambos fotosistemas; - su localización en la cadena inmediatamente antes de la plastocianina ha sido muy discutida, y en verdad resulta difícil de corroborar dada la igualdad de sus potenciales redox de oxidación.

El cit.  $b_6$ , con un potencial redox alrededor de 0 V, se encuentra presente, sin embargo, en la relación de una molécula por cadena de transporte electrónico. Por el contrario, su presencia en la cadena principal está descartada, formando parte del sistema de flujo cíclico de electrones alrededor del -- Fot. I. Es reducido por el aceptor primario X, y oxidado en la cadena principal a nivel del "pool" de plastoquinona (77).

Plastocianina. Es una cuproproteína que, en solución pura, tiene una coloración azulada debido a su contenido en cobre. - Su relativa abundancia en el cloroplasto ha sido muy discutida, siendo lo más aceptado un contenido de 1/1 en relación al componente P-700 (76); se encuentra muy débilmente ligada a la estructura lamelar, de donde se puede separar fácilmente por la acción de detergentes o tratamiento ultrasónico. Su potencial redox es de +370 mV, siendo capaz de admitir dos electrones -- por molécula. Lo más debatido ha sido su posición dentro de la cadena de transporte electrónico, siendo la hipótesis más aceptada su reducción por el cit. f y su fotooxidación por el P-700, toda vez que la fotorreducción del  $NADP^+$  y la fotooxidación del cit. f en partículas subcloroplásticas desprovistas de plastocianina se restaura por la adición de ésta (55). Otras hipótesis postulan que la plastocianina es el único componente entre la plastoquinona y el P-700, que la plastocianina reduce al -- cit. f, o que participa en un transporte electrónico que no --

vincula al Fot.I.

S-Fe proteína de alto potencial. Se encuentra ligada a las partículas del Fot.I y su alto potencial de +290 mV la sitúa en el lado oxidante del mismo (78), al tiempo que la asimila a la sulfoferroproteína tipo Rieske encontrada en mitocondrias. Su posición en la cadena de transporte electrónico está aún indeterminada.

Componente X. La identificación del aceptor primario de electrones del Fot.I ha sido una cuestión muy debatida en estos últimos años. Uno y otro compuesto han venido siendo propuestos como candidatos, y poco después relegados a aceptores secundarios, o aun más alejados del Fot.I. En este sentido la técnica de EPR está teniendo un papel relevante, especialmente usada a temperaturas criogénicas, ya que el bajo potencial redox de este componente lo hace muy inestable en forma reducida cuando se opera en condiciones ambientales. En esto ha tenido gran influencia el hecho admitido del carácter de ferrosulfoproteína no hemínica que ha de tener dicho aceptor primario, y el paramagnetismo inducido en ella por el juego de óxido-reducción. En este sentido han venido siendo propuestos como aceptores primarios del Fot.I, primero la propia ferredoxina y, posteriormente, la llamada "ferredoxin-reducing substance", con un potencial redox de -480 mV y un grupo prostético flavínico (79).

Posteriormente han sido identificadas en preparados subcloroplásticos enriquecidos en Fot. I, dos nuevas sulfoferroproteínas de potenciales redox aun mas negativos. El llamado "centro A" ó S-Fe A exhibe un potencial redox de -530 mV, --



muestra unas señales al EPR a los valores  $g = 1.86, 1.94$  y  $2.05$ , y se reduce totalmente por iluminación a temperaturas criogénicas, o parcialmente con ditionito en la oscuridad; este componente ha sido aislado y caracterizado como una ferrosulfoproteína de peso molecular 8.000 que, con una composición 4 Fe-4S, exhibe unas características espectrales próximas a las de ferredoxina bacterianas (80). El "centro B" ó S-Fe B es aun más electro negativo, con un potencial redox de  $-580$  mV; presenta al EPR señales a  $g = 1.89, 1.92$  y  $2.05$ , es parcialmente reducido por la acción conjugada del ditionito e iluminación, y en la oscuridad sólo en presencia de ditionito y MV (81).

Sin embargo, recientes experiencias de Evans y Cammack (82) muestran que ambos centros A y B no presentan una reversibilidad cuando son fotoreducidos en las condiciones antes apuntadas, faltando por lo tanto a una de las condiciones exigibles a un aceptor primario de electrones. Por el contrario, Evans y col. (83) han mostrado que partículas subcloroplásticas fotoreducidas a temperaturas criogénicas en presencia de ditionito y MV muestran una nueva señal a  $g = 1.76$ , que sí exhibe un carácter reversible fotoreduciendo al P-700 cuando se elimina la fuente de iluminación anterior, cumpliendo este requisito del aceptor primario. Aunque la señal a  $g = 1.76$  cae fuera del rango conocido de las sulfoferroproteínas, podría tratarse de una sulfoferroproteína atípica.

Ferredoxina. Constituye un miembro de la más extensa familia de sulfoferroproteínas, proteínas con hierro no hemínico y azufre lábil. Aunque presentan una gran variedad, según su procedencia, la existente en cloroplastos de algas y plantas

superiores pertenece al tipo 2 Fe-2S, siendo su peso molecular alrededor de 12.000, con un contenido de 95 a 100 aminoácidos; ésto, junto con algunas modificaciones secuenciales, - diferencia a las ferredoxinas de una u otra especie que, si - bien intercambiables en algunas reacciones ferredoxin-depen--dientes, presentan diferencias de operatividad. El centro ac--tivo y cromóforo de este grupo de ferredoxinas presenta la es--tructura  $(R-S)_2Fe = S = Fe(S-R)_2$ , 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 óxido-reducción, sien--do su potencial redox de -420 mV. A pesar de la existencia de estos 2 átomos  $Fe^{3+}$ , la molécula es diamagnética al estado - oxidado, lo que según Gibson (84) se debe a que ambos átomos de  $Fe^{3+}$  se encuentran antiferro magnéticamente acoplados, con un spin neto  $s = 0$ ; por el contrario, la reducción vuelve a - la ferredoxina paramagnética, pudiéndose detectar al EPR. Pre--sentan una coloración rojo-parduzca intensa, con máximos de - absorción alrededor de 420 y 460 nm, que decaen al 50% al re--ducirse bien química o fotoquímicamente.

Su contenido en el cloroplasto es de una molécula por ca--da 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 com--puesto en la fotofosforilación cíclica y pseudocíclica, que - proporcionan el ATP adicional que requieren aquéllas (85). Las ferredoxinas intervienen, además de en la cadena de transpor--te electrónico de la fotosíntesis, en una serie de procesos - óxido-reductores de la planta: asimilación del nitrato y sul-

fato, 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<sup>+</sup>-reductasa.

Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductasa. Es una proteína de peso molecular alrededor de 40.000, con un resto de FAD como grupo prostético; en condiciones normales admite un solo electrón, pasando al estado de semiquinona, aunque en condiciones de reducción forzada es capaz de admitir un segundo electrón, con reducción total (86). Su potencial redox es de -330 mV a pH 7.0. Aunque su real función fisiológica es la reducción del NADP<sup>+</sup> con ferredoxina como donador de electrones, también puede funcionar en sentido inverso con NADPH como cofactor, reduciendo bien al cit. f, bien al NAD<sup>+</sup> en una reacción transhidrogenásica, bien al ferricianuro o a colorantes tipo viológenos en una reacción de tipo diaforásico. Cuando actúa acoplada a la ferredoxina, este enzima forma un complejo ferredoxina-reductasa, esencial para el proceso de reducción del NADP<sup>+</sup>, el cual es desacoplado por el pirofosfato, que actúa así como un inhibidor de la síntesis de NADPH (87). Topográficamente aparece localizada sobre la superficie externa de las "lamelas", concretamente en las "lamelas" estromáticas y en las zonas de "margen" de las "lamelas" granales, ocupando el espacio existente entre las protuberancias correspondientes a la posición del CF<sub>1</sub>.

#### Carácter vectorial de la cadena de transporte electrónico.

El transporte electrónico fotosintético del H<sub>2</sub>O al NADP<sup>+</sup> sirve dos funciones: la producción de equivalentes de reducción

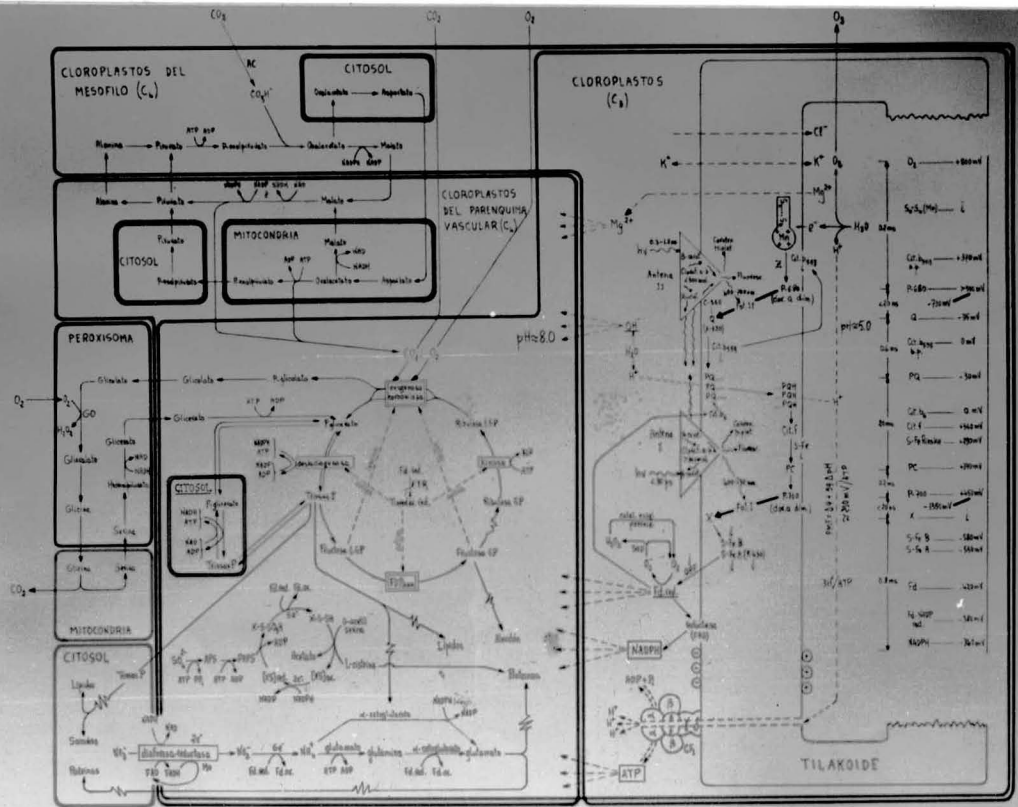
en forma de NADPH al final de la cadena, y la síntesis de ATP a través de la creación de un potencial electroquímico mediante reacciones de transferencia protónica que tienen lugar, -- por un lado, al principio de la cadena como consecuencia de -- la fotólisis del  $H_2O$  y, por otro, en una zona intermedia de -- la misma a nivel del "pool" de plastoquinona. Es decir, que -- tanto al principio, como al final, como en un punto interme-- dio de la cadena de transporte, tienen lugar acontecimientos decisivos en relación con la funcionalidad de la misma. Por -- otro lado, este flujo electrónico tiene lugar merced al bom-- beo de los electrones circulantes a un nivel de reducción más elevado, lo que ocurre dos veces a lo largo de la cadena me-- diante dos reacciones fotoquímicas dirigidas por sendos Foto-- sistemas. Esto, unido a una diferencia de potencial redox en-- tre los elementos integrantes de cada tramo de la cadena --  $H_2O$ / Fot.II, Fot.II/Fot.I y Fot.I/NADP<sup>+</sup> --, permite un flujo elec-- trónico continuo entre los extremos  $H_2O$  y NADP<sup>+</sup>.

Como se deduce de lo expuesto, una ordenación espacial -- de los elementos integrantes será necesaria para un funciona-- lismo de la cadena de transporte, ordenación que afectará a -- una secuencia topográfica de los elementos transportadores, -- a una orientación de los elementos fotoquímicos en orden a -- una adecuada captación lumínica, a una disposición de los es-- labones en que tiene lugar la liberación de  $H^+$  adecuada para un mejor tránsito de éstos, y a una localización funcional de aquellos elementos a nivel de los cuales se liberan, bien pro-- ductos de desecho, bien componentes reguladores de etapas sub-- siguientes.

Estudios de fragmentación de membrana han contribuido, -- como antes se apuntó, a dilucidar estos aspectos, a los que --

hay que unir técnicas serológicas con anticuerpos específicos, que han permitido determinar el grado de accesibilidad de cada uno de los constituyentes. De esta forma se ha visto que presentan una localización externa en la membrana tilakoidal la ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductasa ferredoxina, y CF<sub>1</sub>, mientras que vinculados a la cara interna de la misma aparece el cit. f; la plastocianina presenta una localización dudosa (83). Estos resultados coinciden con aquéllos que localizan el Fot. I vinculado a la capa externa de la membrana tilakoidal, y al Fot. II a la interna de las "lamelas" granales, de tal forma que todos los componentes de la cadena de transporte aparecen asociados con sendos complejos globulares insertos dentro de la matriz de las membranas, pudiendo separarse por las técnicas de fragmentación antes apuntadas.

En resumen (ver esquema), durante el fotoacto II la oxidación del H<sub>2</sub>O tiene lugar en la superficie interna de la membrana, liberándose H<sup>+</sup> en el espacio intratilkoidal y produciéndose oxígeno que difunde hacia el exterior de las "lamelas"; esta posición interior del lugar de desdoblamiento del H<sub>2</sub>O viene confirmada por el hecho de que los tratamientos que liberan -- parte del Mn del cloroplasto -- elemento vinculado al proceso de lisis del H<sub>2</sub>O --, lo hacen dejando dicho elemento en el espacio intratilkoidal (63). El electrón atrapado en el fotoacto II cruza la membrana hacia el exterior, y produce la reducción del aceptor primario Q localizado cerca de la superficie externa. Este reduce en ese nivel a la plastoquinona, proceso para el cual se requieren 2 H<sup>+</sup> que son captados de sendas moléculas de agua, con alcalinización simultánea del espacio exterior; -- la plastoquinona reducida vé así exacerbado su carácter lipofílico, lo que le permite cruzar el espesor lamelar hacia la cara interna del tilakoide donde es reoxidada por el cit.f aban-



Rendimientos (1 mol de nucleótido red = 3 ATP)

$$\begin{aligned}
 & \text{por } C_3 \text{ (CO}_2\text{) asimilado: } \begin{cases} C_3 - 2 \text{ NADPH} + 3 \text{ ATP} = 9 \text{ ATP} \\ C_4 - 2 \text{ NADPH} + 5 \text{ ATP} = 11 \text{ ATP} \end{cases} \\
 & \text{por N asimilado: } \begin{cases} NO_3^- - 1 \text{ NADH} + 6 \text{ Fe} \text{ red.} = 12 \text{ ATP} \\ N_2 - 3 \text{ Fe} \text{ red.} + 2 \text{ ATP} = 14 \text{ ATP} \end{cases} \\
 & \text{por S (SO}_4^{2-}\text{) asimilado: } 1 \text{ NADPH} + 6 \text{ Fe} \text{ red.} + 7 \text{ ATP} = 14 \text{ ATP}
 \end{aligned}$$



donando en el "lumen" intratrilakoidal los  $2H^+$  anteriormente aceptados. En el fotoacto 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. De esta forma los electrones atraviesan tres veces el espesor lamelar durante una cadena de transporte, dos en dirección al exterior, y una intermedia en sentido inverso; por el contrario, se produce un flujo de  $H^+$  hacia el espacio interno. En consecuencia, se establecerá un gradiente de carga —positiva en el interior— y de pH —alcalinización externa—, que conduce a la creación de un potencial de membrana, y como último fin, a una síntesis de ATP.

En las "lamelas" estromáticas la posición relativa de los distintos elementos constituyentes del Fot.I en relación con la superficie interna y externa de las membranas, es la misma de la arriba indicada para las "lamelas" granales. El cit.  $b_6$  —íntimamente vinculado al flujo cíclico dependiente del Fot.I— aparece embebido en la matriz lamelar, como corresponde a su papel de intermediario entre el lado aceptor del Fot.I y el cit.f de la cadena principal.

Punto cuestionado de este esquema es la localización interior del lado donador del Fot.II, aunque parece ser que la accesibilidad del mismo a anticuerpos específicos se debe a preparados granales fragmentados. El aceptor primario Q se sitúa en la superficie exterior, aunque parcialmente embebido en la región hidrofóbica de las "particiones", pues no sólo dona electrones a aceptores de tipo sílicomolibdato, sino también a otros de carácter lipofílico (89). Aunque la plastocianina se libera en algunas preparaciones subcloroplásticas, su localiza



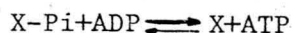
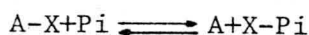
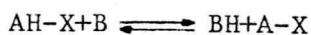
ción en la superficie interna de la "lamela" viene corroborada por no aceptar electrones en el flujo cíclico catalizado por la fenazina metasulfato sulfonada o por la plocianina sulfonada, ambas más hidrófilas que los correspondientes compuestos no sulfonados, a pesar de que presentan el mismo potencial redox (13).

Los parámetros cinéticos del flujo electrónico vienen indicados en el esquema adjunto. Como puede verse, la transferencia de cuantos entre las "antenas" y los fotosistemas es el proceso más rápido, del orden de pico-segundos. Le sigue en velocidad el salto electrónico entre ambos fotosistemas y los respectivos aceptores primarios de electrones, del orden de nanosegundos, mientras que los saltos electrónicos entre los eslabones no fotoquímicos se miden a nivel de milisegundos. Cabe destacar la oxidación de la plastoquinona por el sistema cit.f-plastocianina, que con un tiempo de 20 msec, constituye el paso más lento y, por tanto, limitante de todo el sistema, condiciones que lo definen como el punto regulador a través del cual la razón de concentraciones ATP/ADP controla la energía del cloroplasto.

#### Transporte electrónico y fosforilación.

Numerosos estudios han sido efectuados en relación con el mecanismo que acopla el transporte electrónico, inducido por la luz absorbida, y la síntesis de ATP en el cloroplasto. Tres hipótesis han sido desarrolladas para explicarlo. La llamada "hipótesis química" postula la formación de enlaces covalentes entre determinados transportadores reducidos de la cadena fotosintética, y enzimas y/o sustratos que intervienen

en la reacción de fosforilación; estos complejos serían llevados por oxidación a un estado de alta energía, que provocaría la reacción de transferencia del Pi al ADP:



donde AH es un componente reducido de la cadena de transporte, B el siguiente eslabón oxidado de dicha cadena, y X un elemento integrante de la síntesis de ATP, probablemente la ATP-sintetasa. En desacuerdo con la "teoría quimiosmótica", Williams (90) indica que el establecimiento de un gradiente  $\text{H}^+$  a través de la membrana conduce a una gran disipación de energía y que, en cualquier caso, tal gradiente representa solamente un hecho indirectamente relacionado con el auténtico mecanismo de la -- fosforilación; por otro lado, y frente a la "teoría del cambio conformacional", indica que éstos ocurren siempre en cualquier fenómeno de distribución de cargas dentro de una proteína, y -- que ello, salvo un cambio específico altamente relevante, no -- pasa de ser un hecho trivial.

La "hipótesis química" tiene un gran fallo, y es que vincula la fosforilación a un transporte actual de electrones, -- sin considerar un auténtico almacén de potencial energético -- que tiene el cloroplasto; ésto se pone de manifiesto en la fosforilación que sigue a la postiluminación, y que excede con mucho al ritmo de transporte electrónico que en esas circunstancias puede tener lugar.

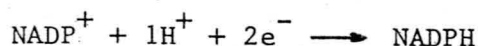
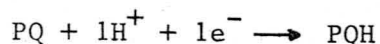
La "hipótesis conformacional" desarrollada por Boyer (91)

sugiere que la transferencia de energía de las reacciones redox a la síntesis de ATP ocurre por cambios conformacionales que provocan tensiones a nivel de enzimas de la fosforilación, o a nivel de membranas. Esta teoría puede relacionarse con el hecho observado que los cloroplastos pueden fijar en sus membranas ADP y ATP, concretamente a nivel de las vesículas  $CF_1$ , como lo demuestra el que su pérdida se correlacione con la separación del  $CF_1$  de las membranas por tratamientos apropiados. Efectivamente, una fijación experimental de ADP por el cloroplasto, seguida de una energización del mismo, provoca la aparición de ATP fijado a su superficie; e, inversamente, la fijación de ATP seguida de energización, induce la manifestación de actividad ATPasa. Estos resultados sugieren que, como consecuencia del cambio conformacional que la energización provoca en el  $CF_1$  ligado a las membranas, la subunidad  $\epsilon$  del  $CF_1$  — que, como veremos, se piensa es un inhibidor natural de éste — queda separada (92).

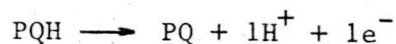
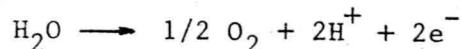
La "teoría quimiosmótica" de Mitchell (93) postula que, derivado del transporte vectorial de  $H^+$  que, como consecuencia de la cadena fotosintética de transporte electrónico se establece a través de la membrana tilakoidal, se crea en esta un potencial electroquímico que conduce a la síntesis de ATP. Puesto que las "lamelas" son impermeables a los  $H^+$  como tales, este concepto demanda la existencia de una bomba protónica vinculada a la cadena de transporte, que bombee  $H^+$  del espacio exterior a la cavidad intratilakoidal, y un mecanismo traslocador de sentido inverso acoplado al sistema de síntesis de ATP. La bomba protónica se consigue merced a un sistema alternante de transportadores de electrones y transportadores de hidrógeno, acoplado a una secuencia en zig zag dentro de la

membrana, de tal forma que el resultado global es un flujo electrónico de dentro hacia fuera, y un transporte protónico en sentido inverso.

Los puntos en que tiene lugar la captación de  $H^+$  del medio exterior son la reducción de la plastoquinona y la reducción del aceptor terminal de electrones  $NADP^+$ , con una estequiometría de  $1H^+/1e^-$  para la primera, y de  $1H^+/2e^-$  para la segunda:



mientras que los lugares en que se libera  $H^+$  en el espacio interior son la oxidación del  $H_2O$ , y la oxidación de la plastoquinona, con una estequiometría de  $1H^+/1e^-$  para ambas:



En resumen, por cada electrón transferido desde el  $H_2O$  al  $NADP^+$ , desaparecen  $1.5 H^+$  del espacio estromático, mientras que  $2H^+$  aparecen en el interior del "tilakoide". Los lugares en que ambos  $H^+$  se producen se llaman "lugares conservadores de energía" o "lugares electrogénicos", denominándose "punto II" el correspondiente a la lisis del  $H_2O$ , y "punto I" a la oxidación de la PQH. Por lo que respecta al flujo cíclico de electrones sólo existe como "lugar conservador de energía" el "punto I", por lo que sólo debe liberarse  $1H^+$  en el espacio tilakoidal por cada electrón transferido; por el contrario, se han encontrado eficiencias de  $4-5 H^+/e^-$  (94), lo que ha llevado a especular que entre el flujo electrónico y el transporte protónico no existen correlaciones de carga, sino que la energía liberada en los procesos redox es usada para transferir  $H^+$

por un determinado transportador.

Usando microelectrodos que se insertan en el espesor de las membranas tilakoidales, y electrodos selectivos que miden la distribución de determinados iones en las distintas fases del cloroplasto, se ha determinado que, en condiciones de iluminación normal, hasta 300-500  $H^+$  por cadena de transporte -- electrónico -- aproximadamente 600 moléculas de clorofila-- re presentan el gradiente que en situación de equilibrio se esta blece entre los espacios intra y extratilakoidales. Esto re-- presenta una captación protónica de 1  $\mu M/mg.$  de clorofila, y equivale a una diferencia de tres unidades de pH entre ambos puntos -- pH 5 en el interior y pH 8 en el exterior-- , que pue de llegar a 3.5 en condiciones de fuerte iluminación, y a un gradiente de potencial del orden de 100-200 mV, que en la prác tica queda reducido a 10-50 mV (95) a consecuencia de un movi miento compensador de iones de otra naturaleza.

Efectivamente, la entrada de  $H^+$  al espacio intratilakoi- dal vá acompañada de una entrada concomitante de  $Cl^-$ , y de una salida de  $Mg^{2+}$ , aunque éste puede ser sustituido por  $K^+$  y, en menor escala, por  $Ca^{2+}$ , dependiendo de la abundancia de todos estos iones en el medio exterior (96). De esta forma se produ- ce, al menos en parte, una compensación de cargas, que nunca - llega a ser total, lo que, junto con la falta de especificidad de los iones de cambio, habla en favor de la naturaleza elec- trogénica del flujo protónico. En realidad, el gradiente de po- tencial creado por éste no es mas que una consecuencia del gra- diente de carga que se crea en las reacciones fotoquímicas prima rias, con una molécula de clorofila<sup>+</sup> localizada en la parte in terna de las membranas, y un aceptor primario  $Q^-$  ó  $X^-$  localiza- do en la parte exterior.

La cinética de este flujo protónico y de la generación de un gradiente electroquímico es algo compleja. Mientras que la liberación de  $H^+$  en el espacio intratilakoidal es un proceso rápido, prácticamente coincidente en su cinética con sus respectivas reacciones redox — 200  $\mu$ seg. para los procedentes de la escisión del  $H_2O$ , y 20 mseg. para los transportados por la plastoquinona—, el proceso de captación protónica del espacio exterior por la plastoquinona y  $NADP^+$  es mas lento, lo que se interpreta como consecuencia de una barrera al flujo protónico existente en la zona externa de la membrana tilakoidal. Aunque no se conoce la exacta estructura de ésta, se especula con que la parte más externa de su espesor de 75 Å actúe como una auténtica coraza contra la pérdida de  $H^+$  por difusión, como se deduce del hecho de que la pérdida del gradiente protónico después de iluminar en condiciones no fosforilantes tarde 5 segundos; aunque esta barrera tenga un carácter unidireccional, debe retardar también algo el flujo en sentido inverso vía plastoquinona, que se alarga a 60 mseg. (97).— Este tiempo se acorta en presencia de ciertos agentes portadores de  $H^+$ , de naturaleza química afín a los componentes membranales.

La cantidad de  $H^+$  que suele pasar al espacio intratilakoidal viene limitada por tres factores. En primer lugar, el establecimiento de una situación de equilibrio, ya que junto a un fenómeno de entrada de  $H^+$  coexiste otro, mas lento como hemos visto, de salida, pero que pueden llegar a compensarse — una vez conseguida una alta concentración protónica en el espacio interior. En segundo lugar, las limitaciones impuestas por las disponibilidades de iones compensadores, ya que sin éstos se conseguirían cotas de gradientes electroquímicos intolerables para el orgánulo; resulta dudoso que una membrana



biológica pueda ser operativa con potenciales de membrana superiores a 350 mV. Finalmente, la tercera limitación es la propia capacidad tamponante del contenido lamelar, ya que los  $H^+$  que ingresan en él son rápidamente neutralizados por su propio sistema buffer, constituyéndose así un excelente almacén protónico sin llegar a alcanzar excesivos bajos valores de pH, difíciles de tolerar; este poder tamponante del contenido tilakoidal es muy manifiesto por debajo de pH 5.0, de tal forma que a partir de dicho valor el gradiente de pH no refleja el auténtico gradiente de  $H^+$  establecido. La capacidad de fijación protónica del espacio intratilkoidal constituye una prueba del poder tamponante del mismo; a un pH exterior de 6.5 aproximadamente el 70% de los  $H^+$  fijados son enmascarados por tamponamiento, siendo el gradiente de pH establecido sólo por el 30% restante (98).

Esta capacidad tamponante se establece, no sólo por elementos en solución, sino también por componentes ligados a la superficie interior de las "lamelas" tilakoidales, determinando así una acumulación de carga protónica en dicha zona en forma de una doble capa iónica de aproximadamente 20 Å de espesor, con una densidad de implantación de  $0.3 H^+$  por molécula de clorofila o por  $200 \text{ Å}^2$  de superficie de membrana. Puesto que en condiciones de oscuridad ésta exhibe una carga negativa de  $5 \times 10^{-4}$  cargas/ $\text{Å}^2$ , correspondiente a un potencial de -32 mV, la implantación de cargas positivas derivada de la iluminación conducirá a una carga positiva neta de aproximadamente  $2 \times 10^{-3}$  cargas/ $\text{Å}^2$ , con un potencial de + 58 mV (99). En consecuencia, el cambio de potencial de membrana en la transición luz-oscuridad es de 90 mV.

Como consecuencia del gradiente protónico creado a través de la membrana tilakoidal se genera una llamada "fuerza protonotriz", que desde un punto de vista mecanicista representa la tendencia a que se restaure la situación de equilibrio primitiva, y que está constituida por un componente de gradiente de pH y un segundo de gradiente electroquímico:

$$FMP = \Delta pH + \Delta \psi$$

de los que el segundo se manifiesta antes debido al poder tamponante del medio intratilakoidal, pero que se disipa también fácilmente por el antes mencionado flujo compensador de iones. Suspensiones de cloroplastos débilmente tamponadas alcanzan -- por iluminación una situación de equilibrio de gradiente de pH sólo al cabo de 1-2 minutos; en estas circunstancias la síntesis de ATP queda más efectivamente inhibida por agentes que colapsan el gradiente de pH, que por los ionóforos que afectan -- sólo al potencial de membrana.

Que ambos factores determinan la formación de ATP ha quedado confirmado por experiencias de síntesis del mismo en la oscuridad, en condiciones artificialmente inducidas de gradiente de pH. En ellas los cloroplastos se colocan en un medio ácido tamponado con un buffer adecuado, e inmediatamente después se transfieren en la oscuridad a un medio a pH 8.5, adicionado o no de componentes que refuercen la tasa de fosforilación: -- ADP, Pi y  $Mg^{2+}$  (100); una síntesis inducida de ATP se consigue totalmente en la oscuridad cuando en la primera fase los cloroplastos se equilibran en un medio de pH suficientemente bajo, entre 4 y 5, siendo necesaria una mínima diferencia de pH de 2.2-2.9 entre ambas fases para que se manifieste dicha síntesis. Bajo condiciones óptimas se han conseguido, totalmente en la oscuridad, tasas de hasta 240 nmoles de ATP/mg. de clorofi-



la, altos rendimientos que descartan cualquier relación estequiométrica con la cadena de transporte electrónico; por otro lado, su independencia de ésta se deduce de la ausencia de -- efecto sobre la síntesis de ATP de los clásicos inhibidores -- de la cadena de transporte electrónico (DCMU, O-fenantrolina, etc.). En condiciones fisiológicas la síntesis de ATP cesa -- cuando alrededor del 40% del contenido protónico del "tilakoide" abandona el espacio intralamelar, probablemente debido a que en esas circunstancias la "fuerza protonmotriz" existente ya no cumple los requisitos termodinámicos necesarios, como -- luego veremos, para dicha síntesis. La cantidad de ATP originada depende, además del gradiente de pH inducido, del pK y grado de permeabilidad del componente ácido del sistema buffer -- empleado en la fase de acidificación del espacio intralamelar. Los ácidos dicarboxílicos tipo succínico, fumárico, adípico, ftálico, etc., con un pK del primer resto en la zona 4.2-4.4, y en la 5.3-5.5 del segundo, muestran una gran efectividad -- (101), lo que se debe a la falta de protonización y, en consecuencia, gran permeabilidad frente a las membranas lamelares, al pH en que se verifica la experiencia; una alcalinización -- exterior posterior libera abundantes  $H^+$  dentro de las "lame--  
las".

La teoría de Mitchell lleva a varias consecuencias. En -- primer lugar, la inclusión en la cadena de transporte electrónico de un componente artificial de potencial redox adecuado, que sea capaz de actuar como transportador electrónico y protónico, puede producir un aumento del flujo protónico hacia el espacio intratilakoidal y, en consecuencia, inducir una mayor síntesis de ATP. Un requerimiento adicional es que tal compuesto tenga unas características de solubilidad definidas, en el sentido que en su forma reducida tenga un carácter lipofílico

suficiente que lo haga capaz de atravesar las "lamelas" tilakoidales. Efectivamente, existen varios compuestos que reúnen tales requisitos, como la fenazina metasulfonato, que acepta electrones del Fot. I, y en un proceso cíclico los transfiere directamente a la forma oxidada del componente P-700 (102), con un alto rendimiento en la síntesis de ATP. Una segunda consecuencia es que el transporte electrónico y el mecanismo de síntesis de ATP no necesitan estar espacialmente juntos, cosa no concebible en la "hipótesis química" o "conformacional". Es más, dada la estructura del espacio intratilakoidal del cloroplasto, que aparece como un continuo, hay que pensar mas bien en un gran reservorio protónico común a todo el orgánulo. De esta forma el clásico concepto de "lugar de fosforilación de la cadena de transporte" aparece completamente desdibujado.

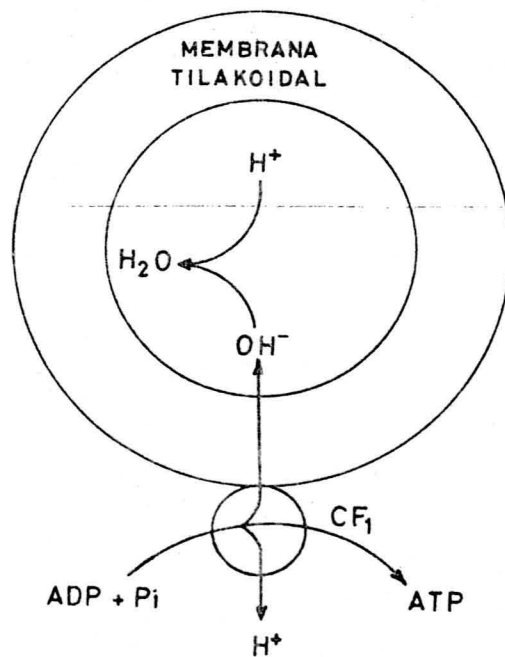
En tercer lugar, la "teoría quimiosmótica" permite predecir la existencia de un fácil mecanismo de "control fotosintético" por el cloroplasto. Puesto que la traslocación de  $H^+$  se deriva de un mecanismo de transporte electrónico, la existencia de una "fuerza protonmotriz" suficiente — elevado gradiente de pH y de potencial eléctrico— retardará dicha traslocación y, paralelamente, el ritmo de la cadena de transporte. Una síntesis de ATP hará disminuir ambos gradientes, y pondrá de nuevo en marcha un ritmo acelerado del flujo electrónico. Por supuesto, cualquier otro proceso que conlleve fuga de  $H^+$  del espacio intratilakoidal provocará también una activación de la cadena de transporte electrónico. Tal es el caso de los desacoplantes. Un grupo de éstos — amoníaco, aminas, nigericina, etc.— disipan el gradiente de pH, manteniendo el de potencial eléctrico. En el caso de las aminas y amoníaco la for

ma transportable al interior del "tilakoide" es, por razones - de solubilidad de membrana, la no protonada, justamente la exis - tente en el medio exterior a consecuencia del pK de estos com- puestos y de las condiciones de pH del mismo; una vez en el in - terior del "tilakoide", el bajo valor de pH existente en el -- mismo a consecuencia de la iluminación provoca la protonación y, en consecuencia, una disminución de la concentración de  $H^+$  libres necesarios para la síntesis de ATP (103). Otros desaco- plantes - valinomicina, dinitrofenol, etc.-- provocan una pér- dida del potencial de membrana sin necesariamente eliminar el gradiente de pH; su acción se debe a que hacen la membrana la- melar mas permeable a los iones  $-H^+$  y aquellos otros compensa - dores de carga-, con lo que la neutralización de ésta se hace mas rápida.

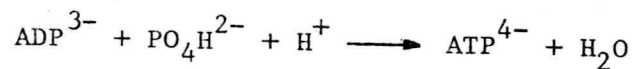
Este activo movimiento iónico a través de la membrana tila koidal induce cambios conformacionales patentes en la estructu ra de la misma que, si bien de naturaleza aun desconocida, se patentizan incluso como una disminución del grosor de la membra na, detectable por densitometría de las microfotografías elec- trónicas. Efectivamente se han observado cambios de accesibili- dad de distintos grupos funcionales de la membrana en la transi ción luz-oscuridad. Horton y Cramer (104) encontraron que los - citocromos f y b-559 presentaban una distinta accesibilidad al ferricianuro, de lo que deducen la existencia de una reagrupa- ción de estos elementos en el espesor de la membrana.

El auténtico mecanismo de acción de los  $H^+$  en la síntesis de ATP es aun desconocido. Podría inducir una deshidratación - vectorial en la reacción del ADP con el  $P_i$ , de tal forma que - la descarga de iones  $OH^-$  tuviese lugar en el espacio intratila koidal rico en  $H^+$ , con formación de  $H_2O$  y disipación de los --

mismos, mientras que los iones  $H^+$  quedarían abandonados en el espacio estromático, neutralizando la alcalinización del mismo consecuente a la iluminación.



Otra hipótesis sería una acción directa en la reacción que conduce a la síntesis de ATP que, en razón del pH del medio y del grado de ionización del ADP,  $P_i$  y ATP podría esquematizarse así:



Aunque de estas consideraciones se podría deducir que cada  $H^+$  provocaría la síntesis de una molécula de ATP, esto está muy lejos de la realidad. Midiendo las tasas iniciales de fosforilación y disipación protónica en los primeros estadios de oscuridad después de una iluminación prolongada, se han computado valores de  $H^+/ATP$  iguales a 2; otros autores han encontrado valores oscilantes entre 2 y 4. Sin embargo, cada vez pare-

ce más evidente un valor real de  $H^+/ATP = 3$  (105). Y puesto que cada electrón transferido del  $H_2O$  al  $NADP^+$  provoca una asimilación de  $2H^+$  en el "tilakoide", se deduce un valor para la razón  $ATP/e_2 = 1.33$ .

Inversamente, la teoría de Mitchell predice que la actividad ATPasa vinculada al  $CF_1$  produce, una vez activada lumínicamente, un movimiento de  $H^+$  inverso al que tiene lugar en la síntesis de ATP, y análogo, por tanto, al flujo protónico inducido por iluminación del cloroplasto; solamente se requiere una iluminación inicial, pues la propia hidrólisis del ATP suministra la energía suficiente para su autoactivación. El mecanismo por el que tiene lugar este movimiento de  $H^+$  hacia el interior del "tilakoide" debe ser distinto al derivado de la cadena de transporte, al menos que se admita la hipótesis antes apuntada de la existencia en ambos casos de un intermediario portador de protones. Se han encontrado valores de 2 y 3  $H^+$  originados por cada molécula de ATP hidrolizada, aunque una razón  $H^+/ATP = 3$  parece la más verosímil.

En resumen, la "teoría quimiosmótica" se ha manifestado como la hipótesis más coherente para explicar los hechos relacionados con la síntesis de ATP, gran parte de los cuales no encuentran una sustentación teórica válida a la luz de las "hipótesis química y conformacional". No obstante, algunos puntos de esta última son necesarios para explicar el fenómeno en su integridad.

### Tipos de fotofosforilación.

A diferencia de lo que ocurre en la mitocondria, la fosforilación fotosintética va ligada a un sistema de transporte electrónico en el que existen pasos de activación lumínica del electrón transferido, que se ve de esa forma elevado en su potencial reductor, pudiendo reemprender de nuevo los pasos del flujo electrónico anterior. En consecuencia, además de la cadena acíclica de transporte electrónico, puede existir un flujo electrónico cíclico y, dependiendo de que éste englobe o no uno o mas "lugares de conservación energética", podrá existir una concomitante fotofosforilación cíclica que, como se comprende, será independiente de la existencia de un sustrato donador y aceptor de electrones. En cualquier caso, la fotofosforilación es un fenómeno dependiente de la energía liberada en una serie de procesos de óxido-reducción, y necesita para su buen funcionalismo un perfecto "acoplamiento" a éstos. 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 de "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 es-

tablece cuando dicho ADP se ha agotado.

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 representan 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 aísla 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  $\text{CO}_2$  y de otras reacciones que consumen ATP; — una pérdida de componentes solubles, ferredoxina y  $\text{NADP}^+$ , de la cadena de transporte electrónico, que se vé así alterada en su ritmo, además de verse totalmente afectada la fotofos-

forilación cíclica, estrictamente dependiente de la existencia de ferredoxina; una alteración del llamado "potencial -- fosforilante", definido como la razón  $(ATP)/(ADP)(Pi)$ , y que constituye un factor importante de regulación de la fotofosforilación "in vivo"; 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 -- aquélla 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  $\mu M/mg$  de clorofila/hora (106). 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. El más utilizado es la medida de la incorporación, inducida por la luz, del  $^{32}Pi$  en material orgánico, -- previa equilibración con una fuente exógena de aquél; el método, por requerir un aporte externo de uno de los componentes del "pool" de fosforilación, se aparta algo de la definición de fotofosforilación "in vivo", no obstante ser muy baja la tasa de permeabilidad de las cubiertas cloroplásticas al  $Pi$  y, en consecuencia, ser dicho test de una sensibilidad limitada. Este método, junto con la medida de la fluorescencia ATP-dependiente emitida por el sistema luciferina-luciferasa, constituye también el más extensamente utilizado en la determinación de la fotofosforilación "in vitro" con cloroplastos rotos o con cloroplastos intactos colocados en un me



dio que exacerba el nivel fisiológico de fosforilación.

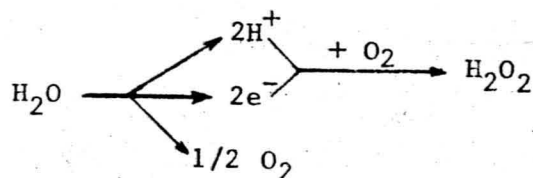
Fotofosforilación acíclica.— Es la que tiene lugar a lo largo de la cadena acíclica de transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$ , participando por tanto en ella los dos clásicos "lugares de conservación energética": a nivel del sistema de rotura de la molécula de  $H_2O$ , y a nivel de la plastoquinona. En ella se encuentran involucrados ambos Fotosistemas II y I, como se demuestra por su inhibición con inhibidores específicos DCMU para el primero y DSPP (disalicilidenpropanodiamina), un antagonista específico de la ferredoxina, para el segundo --- (107); ésto se deduce también de su espectro de acción y de las condiciones de saturación lumínica, que son muy similares a las de la fijación de  $CO_2$ , exhibiendo también el clásico efecto Emerson. Su misión consiste en proporcionar ATP necesario para la asimilación de  $CO_2$  y, puesto que la razón ATP/NADPH obtenida en la cadena acíclica de transporte electrónico se estima aun baja para atender a este menester, resulta improbable que el ATP producido en la fotofosforilación acíclica se derive a otros menesteres.

Efectivamente, la razón  $P/e_2$  ó ATP/NADPH calculada en experiencias "in vitro" da como valor mas probable 1.33, que no llega al 1.5 necesario para el proceso de asimilación fotosintética del carbónico. Aunque Reeves y Hall (108) han encontrado estequiometrías que se acercan al valor 2, lo cierto es que ésto crearía no menos problemas supuesta una tasa de actividad que mantuviese dicha razón constante. En realidad una estequiometría flexible de la razón ATP/NADPH, impuesta por las necesidades de asimilación de  $CO_2$ , evitará acúmulos bien de NADPH, bien de ATP.

La tasa absoluta de actividad de la fotofosforilación --

acíclica se ha estimado alrededor de 200  $\mu\text{M}$  de ATP/mg. de clorofila/hora, valor que empieza a entrar en el margen - de 150-600, deducidos de los 50-200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CO}_2$  fijados/mg. de clorofila/hora, y sobre la base de un requerimiento de 3 ATP por mol de  $\text{CO}_2$  asimilado. No obstante, hay que indicar la dificultad que existe en diferenciar la fotofosforilación acíclica de la pseudocíclica, ya que no existen ni inhibidores, ni cualidades lumínicas, ni otras condi-ciones experimentales que permitan distinguir de forma absoluta ambas; aún en atmósfera anaerobia de  $\text{N}_2 + \text{CO}_2$  puede tener lugar algo del proceso pseudocíclico, a causa del -  $\text{O}_2$  desprendido en la lisis del agua.

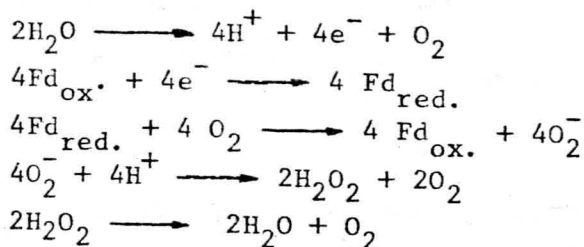
Fotofosforilación pseudocíclica.- El transporte elec-trónico pseudocíclico puede definirse como un transporte acíclico en el que el oxígeno, en vez del  $\text{NADP}^+$ , actúa en una reacción de Mehler como el acceptor terminal de elec--trones, con formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Puesto que por cada dos --electrones transferidos se consume un mol de  $\text{O}_2$ , frente a medio mol liberado en la lisis del  $\text{H}_2\text{O}$ , el proceso pseudo-cíclico de transporte electrónico, efectuado "in vitro" - en ausencia de sistemas enzimáticos acoplados adicionales, vá acompañado de un consumo de  $\text{O}_2$ , y no podrá tener lugar en anaerobiosis:



No obstante, y como ya se apuntó, el  $\text{O}_2$  liberado en - la rotura del agua impide excluir totalmente el transporte pseudocíclico y la fotofosforilación acoplada; ello condu-

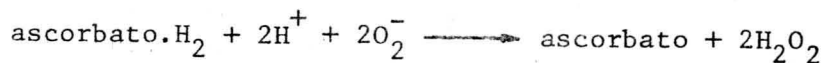
ce a una dificultad en su medida, que se puede hacer determinando el  $^{18}\text{O}_2$  consumido, y ésto aun con limitaciones debido a la existencia de una fotorespiración paralela. Como en la fotofosforilación acíclica, en la pseudocíclica intervienen ambos fotosistemas y los mismos "lugares de conservación energética", presentando el mismo espectro de acción y análoga sensibilidad a los inhibidores.

El punto de desviación hacia el  $\text{O}_2$  del flujo electrónico parece estar a nivel de la ferredoxina, mediante un proceso - quizás catalizado por un "factor reductor del oxígeno", localizado en la vecindad de la  $\text{NADP}^+$ -ferredoxin-reductasa (109). No obstante, otros aceptores de electrones de potencial redox análogo al de la ferredoxina, como los viológenos, pueden primero sufrir una reducción, y después una reoxidación por  $\text{O}_2$  en una reacción de Mehler que conduce también a la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En cualquier caso, el carácter tóxico de ésta obliga a su rápida eliminación merced a las peroxidasas cloroplastídicas; la existencia de catalasa en el cloroplasto ha sido -- muy discutida, y generalmente puesta en duda. En realidad el proceso es mas complejo, y conduce a la formación intermedia del radical superóxido  $\text{O}_2^-$ , altamente reactivo y tóxico para - el cloroplasto, que rápidamente es dismutado a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por una superóxido-dismutasa de tipo Cu-Zn que existe en el mismo:



condiciones que establecen una situación de equilibrio entre el  $\text{O}_2$  desprendido y el consumido.

Otra forma de eliminación del radical superóxido usada por el cloroplasto es su reducción por la alta concentración de ascorbato existente en él, proceso que conduce también a la formación de  $H_2O_2$ , eliminable igualmente como arriba se indicó:



Se han medido niveles de fosforilación debidos al proceso pseudocíclico de 20  $\mu M$  de ATP/mg. de clorofila/hora. Su función radica en suministrar ATP a aquellos procesos del cloroplasto que lo requieran y, aunque al principio muy discutido, parece desempeñar un papel fundamental en el suministro del ATP adicional requerido para alcanzar la razón ATP/NADPH de 1.5 necesaria en el proceso de asimilación del  $CO_2$  (110).

Fotofosforilación cíclica. Está vinculada a un flujo cíclico de electrones que no requiere ni un donador primario ni un aceptor terminal de los mismos; el electrón, una vez caído al nivel de mayor potencial redox, es excitado a una situación de alto poder reductor mediante una reacción fotoquímica promovida por el Fot.I. Constituye la fuente esencial de ATP en bacterias fotosintéticas — que carecen del Fot.II— y, su existencia en organismos eucariotes — algas y plantas superiores—, aunque inicialmente sometida a gran controversia, está actualmente admitida. En un plano filogenético la fotofosforilación cíclica, y el flujo electrónico vinculado al Fot.I, constituyen un hecho muy anterior a aquellos otros en que aparece la participación del Fot.II, debiendo considerarse su existencia en los eucariotes como una presencia relictica (111). Su implantación en la planta precede a las fotofosforilaciones acíclica y pseudocíclica, cumpliéndose el

hecho tantas veces observado en Biología que el desarrollo individual de los organismos constituye una recapitulación de su desarrollo filogenético.

El electrón, elevado a un nivel superior de excitación por el Fot. I, es transferido sucesivamente al componente X y ferredoxina, retornando a la cadena principal a nivel de la plastoquinona; entre ésta y la ferredoxina sólo se ha lo grado identificar como eslabón intermedio al cit.  $b_6$ . Su independencia del Fot. II se pone de manifiesto por su insensibilidad al DCMU y espectro de acción — experimenta un amento por iluminación al rojo lejano—, siendo por el contrario inhibida por la DBMIB (dibromotimoquinona) y por el ---DSPD, antagonistas específicos, respectivamente, de la plastoquinona y ferredoxina. Una especial característica es su inhibición total a bajas concentraciones de antimicina A, — que junto a una acción bloqueadora del transporte electrónico cíclico entre el cit.  $b_6$  y la plastoquinona (112), une un carácter desacoplante de la fosforilación; esta inhibición específica de la antimicina A se usa en la práctica para determinar la capacidad fosforilante vinculada al flujo electrónico acíclico. La existencia de uno o dos "lugares de --conservación energética" para la fotofosforilación cíclica es aún objeto de discusión; uno de ellos está situado, como en el flujo acíclico, a nivel de la plastoquinona, mientras que el segundo, en el caso de existir, estaría localizado — entre el Fot. I y el cit.  $b_6$ . En cualquier caso, se ha determinado la necesidad de dos cuantos de luz por molécula — de ATP sintetizada, lo que en el caso de existir un solo --"lugar de conservación energética" implicaría una relación  $H^+/ATP = 2$ , que podría ser ya igual a 3 si se admitiese la existencia de ambos "lugares". Por depender estrictamente —

del Fot.I la fotofosforilación cíclica exhibe "in vivo" una baja saturación lumínica, que contrasta con su alta saturación cuando se opera "in vitro".

Clásicamente se ha pensado que la ausencia de aceptores del potencial reductor fotosintético —  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , P-glicerato,  $\text{O}_2$ , etc.— generado vía transporte electrónico acíclico o pseudocíclico, favorecería el flujo cíclico y su fotofosforilación paralela, razón por la que su potencialidad se ha venido testando en ausencia de aquéllos y en anaerobiosis. Sin embargo, ésto que puede ser cierto bajo determinadas condiciones, no tiene un soporte fisiológico por cuanto "in vivo" el oxígeno no se encuentra jamás estrictamente excluido del entorno lamelar en que dicho proceso ocurre. Efectivamente, experiencias efectuadas en cloroplastos iluminados al rojo lejano muestran una mayor síntesis de ATP en aerobiosis que en anaerobiosis (113); y aún operando a esta -- longitud de onda se detecta un flujo electrónico acíclico a partir del  $\text{H}_2\text{O}$ , lo que se interpreta como dirigido a cebar -- el proceso cíclico y reponer los electrones que hayan podido escaparse del mismo, como se deduce de la total cesación de la capacidad fotofosforilante al adicionar DCMU.

El proceso cíclico muestra una alta capacidad fosforilante, con 250  $\mu\text{M}$  de ATP sintetizado/ $\mu\text{g}$ . de clorofila/hora en -- condiciones anaerobias, y 80  $\mu\text{M}$  en aerobiosis, bajo una iluminación de luz blanca en condiciones saturantes. A la vista de ello cabe preguntarse cuál es el papel de la fotofosforilación cíclica. Desde luego, no parece ser, como al principio se pensó, el proporcionar al cloroplasto el ATP adicional necesario para la asimilación del  $\text{CO}_2$ ; los tratamientos que inhiben esta fosforilación no afectan significativamente la tasa de fijación

de carbónico, aunque sí modifiquen el equilibrio de intermedios cuando se opera con  $^{14}\text{CO}_2$  (114). Como mucho se ha sugerido que pueda suministrar parte del extra-ATP necesario durante el período de inducción de la asimilación de  $\text{CO}_2$ . Mas bien parece actuar en otros procesos ATP-dependientes: fotocinesis, fijación de  $\text{N}_2$ , síntesis protéica, etc..

#### Control de la fotofosforilación.

La reducción de un mol de  $\text{CO}_2$  en el ciclo reductivo de las pentosas-P conlleva un consumo de 2 ATP y 2 NADPH en la reducción de los dos moles de P-glicerato a triosas-P, más un ATP en el tránsito de ribulosa-5-P a ribulosa-1,5-P en el proceso de regeneración de éste; en resumen, una relación ATP/NADPH de 3/2, que pasa a ser de 5/2 en las plantas tipo  $\text{C}_4$  debido al consumo adicional de 2 ATP que tiene lugar en la regeneración del P-enolpiruvato, sobre el que tiene lugar la fijación primaria del carbónico.

La incidencia que las distintas formas de fosforilación puedan tener en este proceso es aún una incógnita, dadas las dificultades experimentales que existen en la determinación real "in vivo" del valor  $P/e_2$  en el transporte acíclico de electrones y, por tanto, en conocer con exactitud el valor de la razón ATP/NADPH de dicho proceso; estas dificultades radican, sobre todo, en determinar el nivel de "transporte electrónico basal", a través del cual no tiene lugar síntesis alguna de ATP. A medida que han ido mejorando las técnicas de preparación de cloroplastos se ha conseguido incrementar la primitiva razón  $P/e_2$  del valor 1.0 hasta valores de 1.2-1.3, y aun cercanos a 2.0 (108). Se plantea, pues,

el problema de conocer si el proceso acíclico suministra una razón de concentraciones ATP/NADPH adecuada. Que es inferior al valor límite 1.5 se dedujo del hecho de que el requerimiento cuántico para la reducción de un mol de P-glicerato era de 4 hv, mientras que era de 12 hv para la asimilación de un mol de CO<sub>2</sub>; puesto que la reducción de los dos moles de P-glicerato derivados de la fijación de un mol de CO<sub>2</sub> requerirían 2 NADPH y, en consecuencia, un gasto de 8 hv, es evidente que los cuatro fotones adicionales se utilizan en producir el ATP adicional necesario para la misma, con toda seguridad vía fotofosforilación pseudocíclica, según se indicó.

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 nM/mg. de clorofila, mientras -- que un cloroplasto en perfecto funcionalismo puede fijar entre 100 y 200 µM de CO<sub>2</sub>/mg. de clorofila/hora.

Como ya se apuntó, el control de la fotofosforilación descansa fundamentalmente en dos parámetros: el "potencial fosforilante" (ATP)/(ADP)(Pi) y la razón ATP/NADPH, factores ambos que definen el llamado "control fotosintético", o incremento que experimenta la fotofosforilación basal cuando se adiciona al medio un exceso de ADP. En realidad la concentración de Pi es usualmente en el cloroplasto bastante alta, por lo que no cambia apreciablemente a consecuencia de la fosforilación; en consecuencia, la razón ATP/ADP constituye la medida más adecuada del poder fosforilante del cloroplasto, aumentando su valor entre 2 y 4 veces en la transición oscuridad-luz (115). Una disminución del potencial fosforilante por consumo de ATP incrementará la tasa de fosforila--



ción debido al control que el sistema adenílico ejerce sobre la cadena de transporte electrónico. En esta última los puntos cruciales son 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<sub>6</sub> vía flujo cíclico, y la segunda constituye el punto de entrada de este último en la cadena principal.

Por otro lado, el estado redox de la ferredoxina depende a su vez del "turnover" de la pareja  $NADP^+$ -NADPH (113); -- si no hay aporte de  $CO_2$  la mayor parte del  $NADP^+$  estará en forma reducida, mientras que 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 flujo pseudocíclico, o aun cíclico si la presión de  $O_2$  es limitada. 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 acíclica a él acoplada no suministra -- ATP suficiente para atender a las demandas del ciclo de Calvin, parte del flujo electrónico se desviará a nivel de ferredoxina reducida hacia la síntesis adicional de ATP vía fotofosforilación pseudocíclica (106). Esto viene corroborado por el hecho de que una mayor formación de  $H_2O_2$  se observa -- cuando el cloroplasto usa  $CO_2$  que cuando emplea P-glicerato -- como aceptor de potencial energético y reductor; en el primer caso la relación ATP/NADPH necesaria es 1.5, pasando a -- ser 1.0 en el segundo. Un defecto en el sistema eliminador -- de  $H_2O_2$  acaba, dado su carácter tóxico, por detener el flujo electrónico en cloroplastos sometidos a fijación de  $CO_2$ .

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  $\text{CO}_2$ . 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); - éstos, unidos a los 3 ó 5 moles de ATP utilizados en la asimilación del  $\text{CO}_2$  - según se trate de vegetales  $\text{C}_3$  ó  $\text{C}_4$  - 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. 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).

#### Bioenergética de la fotofosforilación.

Un punto crucial de la "teoría quimiosmótica" es si la "fuerza protonmotriz" derivada del gradiente protónico resulta suficiente, desde un plano termodinámico, para permitir la síntesis de ATP a partir de ADP y  $\text{P}_i$  bajo las condiciones actuales de pH, fuerza iónica y concentración de reactan

tes existentes en el cloroplasto. La energía requerida para la síntesis de una molécula de ATP en tales circunstancias viene dada por la expresión:

$$\Delta G = \Delta G_0 + 1.36 \log \frac{(\text{ATP})}{(\text{ADP})(\text{Pi})}$$

supuesta una concentración de  $\text{H}_2\text{O}$  tan elevada que se considere constante. En ella  $\Delta G_0$  representa la energía libre standard de la reacción  $\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$  y, al igual que el potencial de fosfato  $\Delta G$ , es un valor que depende del pH, temperatura, etc.; para él se han dado en la literatura valores que oscilan entre los límites 6.3 y 8.9 Kcal./mol (118). Las concentraciones de ATP, ADP y Pi se determinan en el momento en que se ha alcanzado una situación de equilibrio, habiendo cesado la síntesis de ATP; los valores aparecidos en la literatura para los mismos son también muy diversos pero tomando como concentraciones medias de ATP, ADP y Pi los de 40 nM, 12 nM y 1.5  $\mu\text{M}/\text{mg}$ . de clorofila, respectivamente, y sobre la base de un volumen osmótico de 26  $\mu\text{l}/\text{mg}$ . de clorofila para los cloroplastos "tipo A", se obtienen valores de  $\Delta G$  que oscilan entre 8.6 Kcal./mol -- para un  $\Delta G_0$  de 6.3 Kcal./mol -- y 11.2 Kcal./mol -- para un  $\Delta G_0$  de 8.9 Kcal./mol -- (119). La transformación de estos valores en términos de potencial redox se efectúa aplicando la expresión:

$$\Delta G = nFAE$$

en la que n es el número de electrones transferidos, y F la constante de Faraday (23 Kcal./eV), obteniéndose valores de 187 y 243 mV para los correspondientes de 8.6 y 11.2 Kcal./mol.

Ellos habrán de conseguirse a expensas del gradiente de pH y de potencial de membrana originados a consecuencia del flujo de  $H^+$ , y que constituye el concepto de "fuerza -- protonmotriz":

$$PMF = \Delta\psi + 59\Delta pH$$

De esta expresión se deduce que, con gradiente de potencial nulo, serán necesarios gradientes de pH comprendidos entre 3.17 y 4.12. Sin embargo, en la práctica no se han conseguido gradientes de pH superiores a 3.5 y potenciales de membrana mayores de 100 mV en cloroplastos sometidos a intensa iluminación; con este último potencial, gradientes de pH entre 1.47 y 2.92 serán suficientes para inducir la síntesis de ATP. De acuerdo con los resultados expresados anteriormente en relación con la síntesis de ATP en la oscuridad, previa transición ácido-base, en cloroplastos iluminados no se ha conseguido observar síntesis de ATP con gradientes de pH inferiores a 2.7.

#### Eficiencia fotosintética.

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. Efectivamente, el proceso de transporte electrónico  $H_2O \rightarrow MV$ , en el que participan ambos fotoactos, requiere 2.6 fotones cuando se utiliza radiación mono

cromática de 650 nm., siendo 14.5 fotones si se emplea una iluminación a 710 nm.; esta gran diferencia de eficacia entre ambas radiaciones se debe, no sólo a los distintos espectros de absorción de ambos fotosistemas, sino sobre todo a una transferencia fotónica que puede tener lugar entre ambos, pero que siempre tiene lugar en el sentido de la menor a mayor longitud de onda. La energía almacenada por cada fotón a 680 nm. es de 40 Kcal., y puesto que el rendimiento cuántico por mol de O<sub>2</sub> liberado es de 10 hv - 8 sería el valor teórico derivado de la transferencia de 4 electrones, con dos fotoactos cada uno-, se deduce que la fijación de un mol de CO<sub>2</sub> consume 400 Kcal., lo que representa una eficacia fotosintética de alrededor del 30%.

En condiciones de baja iluminación solar este rendimiento puede bajar al 20% como consecuencia de una mayor absorción atmosférica de la radiación de alta longitud de onda, viéndose entonces la planta obligada a usar una radiación de mayor frecuencia y, en consecuencia, con mayor energía por cuanto de luz. Más aún, aproximadamente sólo el 50% de la radiación solar puede ser utilizada por el aparato fotosintético del vegetal, 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, ésta no suele exceder del 2%, con una mayor frecuencia de valores entre el 0.5 y el 1.5% (120). Efectivamente, 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. Ello - parece indicar, además, que el aparato fotosintético está - diseñado para operar a bajas condiciones de iluminación.

Por otro lado, la concentración atmosférica 0.03% de --  $\text{CO}_2$  - aproximadamente  $10 \mu\text{M}$ - es insuficiente para saturar el sistema fijador de  $\text{CO}_2$  de la carboxi-dismutasa, cuya  $K_m$  "in vivo" es de  $46 \mu\text{M}$  y, por tanto, con una capacidad de sa turación cerca de diez veces la concentración ambiental de  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, un aumento indefinido del  $\text{CO}_2$  atmosférico no logra sobrepasar una cantidad doble de  $\text{CO}_2$  asimilado, lo que indica la existencia de otro factor limitante, probableme nte el arriba mencionado del transporte electrónico entre ambos fotosistemas.

#### $\text{CF}_1$ y actividad ATPasa del cloroplasto.

La existencia del "factor de acoplamiento"  $\text{CF}_1$  en el - cloroplasto fué puesta de manifiesto por Avron (121), demos trando que su capacidad fotofosforilante, perdida después - de extracción con EDTA en un medio de baja fuerza iónica, - se restauraba cuando este extracto se adicionaba a los clo roplastos tratados; mas tarde se consiguió la purificación del  $\text{CF}_1$ , mostrándose como una proteína que, en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , restauraba también la actividad fotofosforilante y la capacidad de establecimiento de un gradiente protónico de - los cloroplastos tratados con EDTA. Posteriormente se com-- probó que, junto a la actividad fosforilante, el  $\text{CF}_1$  mante-- nía una potencial actividad ATPasa, manifestable sólo des--

pués de un previo proceso de desenmascaramiento.

Desde un punto de vista morfológico el  $CF_1$  puede ser visualizado al microscopio electrónico, en tinción negativa, como estructuras vesiculares de unos 90 Å de diámetro dispuestas sobre la superficie de las membranas tilakoidales, concretamente en los "márgenes" de las "lamelas" granales y a lo largo de las "lamelas" estromáticas. La facilidad con que se desprenden por tratamientos con EDTA corrobora su disposición superficial, obteniéndose así una estructura protéica globular del tamaño antes indicado y de un p.m. de 325.000 (122). No obstante, bajo dicho tratamiento quedan aun retenidas considerables cantidades de  $CF_1$  sobre la superficie de las membranas, por lo que hay que tomar precauciones en la interpretación de los resultados obtenidos en las experiencias de reconstitución de la actividad fosforilante en cloroplastos tratados; un arrastre prácticamente cuantitativo del  $CF_1$  se consigue tratando las membranas lamelares con sílicotungstato, pero muestra el inconveniente de una mala reconstitución por quedar afectado el mecanismo de transporte electrónico a consecuencia del tratamiento.

La imposibilidad de establecerse un gradiente de  $H^+$  en los cloroplastos desprovistos de  $CF_1$  no es achacable a una restricción del flujo acíclico de electrones ni, por tanto, a una falta de bombeo protónico al interior del "tilakoide"; mas bien parece que la concentración protónica de éste no pueda mantenerse por tener lugar una salida de  $H^+$  al espacio estromático a través de "agujeros" que, en el cloroplasto no tratado, están taponados por el  $CF_1$ . En realidad la hipótesis resulta algo simplista, pues esa fu-

ga protónica podría tener lugar por otras razones derivadas del tratamiento con EDTA a baja fuerza iónica; efectivamente, éste provoca fuertes cambios estructurales en el "tilakoide", entre ellos una demolición de la disposición apiñada de las "lamelas" granales. Mas bien parece que el  $CF_1$  actúe como un traslocador de  $H^+$ , en dirección del espacio estromático cuando se sintetiza ATP, y hacia el espacio intratilakoidal cuando actúa como ATPasa; esto implicaría que la implantación del  $CF_1$  debería ocupar todo el espesor de la membrana, y no tener la localización superficial que exhibe cuando se observa por microscopía electrónica. En mitocondrias se han evidenciado proteínas altamente hidrofóbicas formando parte de las membranas mitocondriales precisamente en los lugares en que tiene lugar el proceso de fosforilación (123); aunque componentes equivalentes no se han encontrado aún en los sistemas fotosintéticos ésta podría ser una hipótesis futura. Esta relación entre una proteína soluble tipo enzimático y la estructura membranal, en la que las propiedades de ésta vienen influenciadas por aquélla y en la que, inversamente, el tipo de actividad de aquélla, fosforilante o desfosforilante, viene condicionada por ésta, constituye un fenómeno particular de interrelación llamado "alotopía".

Por lo que respecta al mecanismo intrínseco de la acción fosforilante, hay que pensar que ésta sólo será posible si una serie de procesos previos no conducen a una situación en que, la deshidratación vinculada a la reacción  $ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$ , y que es inducida por la "fuerza protonmotriz" derivada del gradiente protónico, puede tener lugar de forma exorgónica. La función del sistema del  $CF_1$  será, pues, permi



tir primero la fijación de los sustratos ADP y Pi, creando luego un microambiente local en el que puede tener lugar el hecho arriba expuesto. Esto sólo es concebible sobre la base de un cambio conformacional, de acuerdo con la teoría de Boyer (91), como se deduce de una serie de hechos experimentales: reacciones de cambio entre átomos de H de proteínas membranales y átomos de tritio suministrados por  $^3\text{H}_2\text{O}$  ocurren sólo en condiciones de iluminación; análogamente, la N-etilmaleimida un inhibidor de la actividad fosforilante del  $\text{CF}_1$ , sólo se liga a éste en la forma activada derivada de la iluminación.

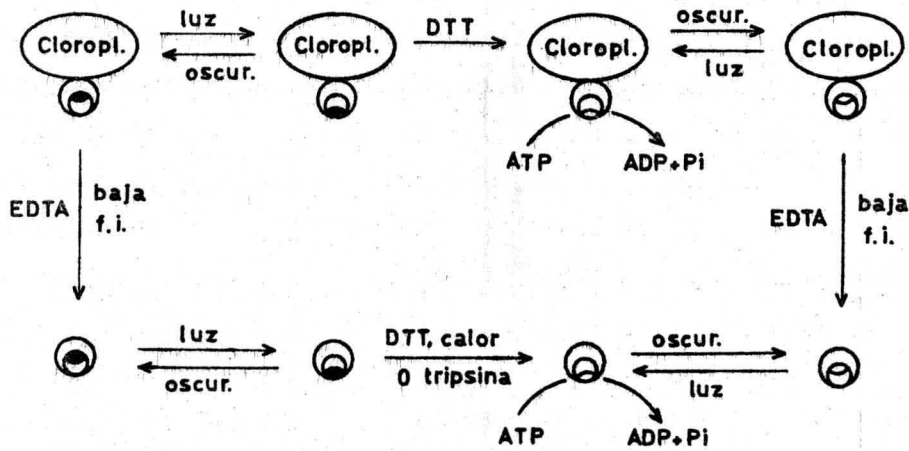
Finalmente, la capacidad de  $\text{CF}_1$  de ligar nucleótidos -- también aparece vinculada a la existencia de un estado de alta energía. Entre los nucleótidos el ADP es el más eficazmente ligado, mientras que el GDP lo hace ya con una efectividad mitad; el Pi es, por supuesto, el anión normalmente utilizado, aunque el arsenato actúa como un potente inhibidor competitivo. Una especificidad análoga en relación con los nucleótidos trifosforilados se ha comprobado en el proceso inverso, de hidrólisis debida a la actividad ATPasa, lo que demuestra que el mismo centro activo se usa en los procesos de hidratación y deshidratación. Por el contrario, Roy y Moudrianakis(124) han observado una baja tasa de incorporación de ADP al  $\text{CF}_1$ , experimentando además el ADP incorporado una transfosforilación a ATP y AMP; este último es el que bajo iluminación sufre, en presencia de Pi, la reacción de deshidratación a ADP, siendo por tanto el aceptor primario, y no el ADP, del Pi.

La existencia de una actividad ATPasa ligada al  $\text{CF}_1$  fué puesta de manifiesto por Petrack y Lippman cuando cloroplas-

tos aislados eran iluminados en presencia de  $Mg^{2+}$  y altas - concentraciones de compuestos ricos en grupos -SH, como el DTT (125). El proceso tenía un carácter secuencial, teniendo lugar en un primer paso inducido por la luz un cambio -- conformacional reversible que hacía accesibles el centro activo y el punto regulador de la actividad ATPasa; en un segundo paso el DTT actuaba irreversiblemente sobre el centro regulador, seguramente interfiriendo la acción de un componente inhibidor vinculado al propio  $CF_1$ , haciendo posible -- la actividad ATPasa,  $Mg^{2+}$ -dependiente. El estado energizado, promovido por la luz, necesario para que se manifieste la -- actividad ATPasa puede a partir de ahora ser inducido, en -- la oscuridad, por la propia energía liberada en el proceso de hidrólisis del ATP; el agotamiento de éste provoca la -- vuelta a una situación parecida a la original en el sentido de que los centros activo y regulador ya no son accesibles, pero en la que ya no existe el componente inhibidor estructural.

Esta actividad ATPasa se pone también de manifiesto en el  $CF_1$  aislado por extracción con EDTA, siendo igualmente -- dependiente de una activación previa por iluminación, de un desenmascaramiento del componente inhibidor, y de un catión divalente. El DTT sigue siendo tan efectivo como antes, pero puede ser sustituido por tripsina o por tratamiento térmico (126); en estos casos se obtiene un grado de operatividad inferior, e incluso el tratamiento requiere la presencia del sustrato ATP como previsor de posibles desnaturalizaciones. Por otro lado, el  $Ca^{2+}$  se muestra ahora mucho más efectivo que el  $Mg^{2+}$ , que sólo exhibe una operatividad del mismo orden en presencia de ácidos carboxílicos, siendo el

maleato el más efectivo.



La naturaleza del inhibidor intrínseco de la actividad ATPasa del  $CF_1$ , fué puesta de manifiesto al dilucidarse la estructura de éste. Consta de 5 tipos de subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , con pesos moleculares respectivos de 59.000, 56.000, 37.000, 17.500 y 13.000, estructura muy similar a la encontrada en el "factor de acoplamiento" de otros sistemas fosforilantes. Sin embargo, a diferencia de éstos, el contenido relativo de las distintas subunidades del  $CF_1$  es de  $2\alpha$ ,  $2\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$  y  $2\epsilon$ , como se deduce de la densitometría de las bandas obtenidas por electroforesis en acrilamida en presencia de SDS, y del análisis de aminoácidos de las mismas (127). La topografía y funcionalidad de cada subunidad -

se ha comprobado en experiencias de inhibición con anticuerpos específicos (ver esquema general). Sólo los anticuerpos frente a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son capaces de aglutinar los cloroplastos, lo que indica que son las únicas localizadas en la parte exterior del  $CF_1$ ; por otro lado, la eliminación de las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  por tratamientos adecuados no reduce significativamente la actividad ATPasa, lo que viene a indicar que sólo los componentes  $\alpha$  y  $\beta$  son esenciales para la misma, siendo sobre la subunidad  $\alpha$  donde recae la alta afinidad del  $CF_1$  por el ATP. Anticuerpos frente al componente  $\gamma$  provocan la pérdida de la capacidad fosforilante ligada a los flujos cíclico y acíclico de electrones, habiéndose comprobado que constituye el punto de unión del  $CF_1$  a la membrana tilakoidal. La subunidad  $\epsilon$  es quizás la más estudiada y de función más esclarecida (92), radicando en ella la función inhibidora de la actividad ATPasa, gracias a la cual ejerce su función reguladora "in vivo" de la actividad ATPasa vinculada al  $CF_1$ . Se encuentra unida a la subunidad  $\gamma$  en el interior del  $CF_1$ , siendo la activación conjunta por la luz y DTT derivada de su exposición al exterior por el primero, y a un cambio conformacional con pérdida de poder inhibidor por el segundo; la tripsina actúa simplemente digiriendo la subunidad  $\epsilon$ .

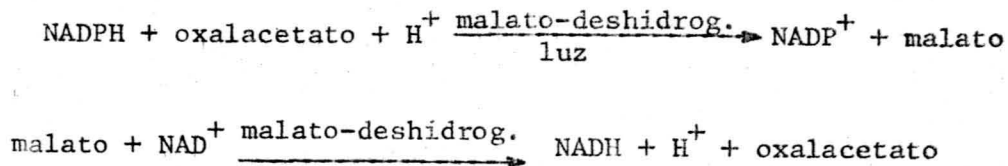
De lo dicho se deduce que, si bien la "teoría quimiosmótica" de Mitchell, y ciertos aspectos de la "teoría conformacional" de Boyer, parecen explicar correctamente el mecanismo del  $CF_1$ , existen aun muchos aspectos por dilucidar. Uno de ellos sería el mecanismo de acción del efecto alostérico del ATP y ADP controlando el ritmo de la cadena de transporte electrónico, de los que el primero actúa inhibiéndola, y el segundo acelerándola.

Transferencia energética entre el cloroplasto y citoplasma.

Cuando a cloroplastos intactos iluminados se les adiciona  $\text{NADP}^+$ , ADP y Pi —o sus formas energizadas NADPH y ATP—, no se observa prácticamente ningún incremento en la tasa de desprendimiento de  $\text{O}_2$ , en contraste de lo que ocurre cuando dichos componentes se agregan a cloroplastos rotos. Esto indica una impermeabilidad de la envoltura cloroplástica a dichos nucleótidos, lo que plantea el problema de cómo podrá tener lugar la exportación al citoplasma del potencial energético y reductor —necesario, por ejemplo, para la síntesis de sacarosa— sintetizado durante la fotosíntesis en el cloroplasto, y cómo podrá éste importar la energía necesaria durante las fases de oscuridad.

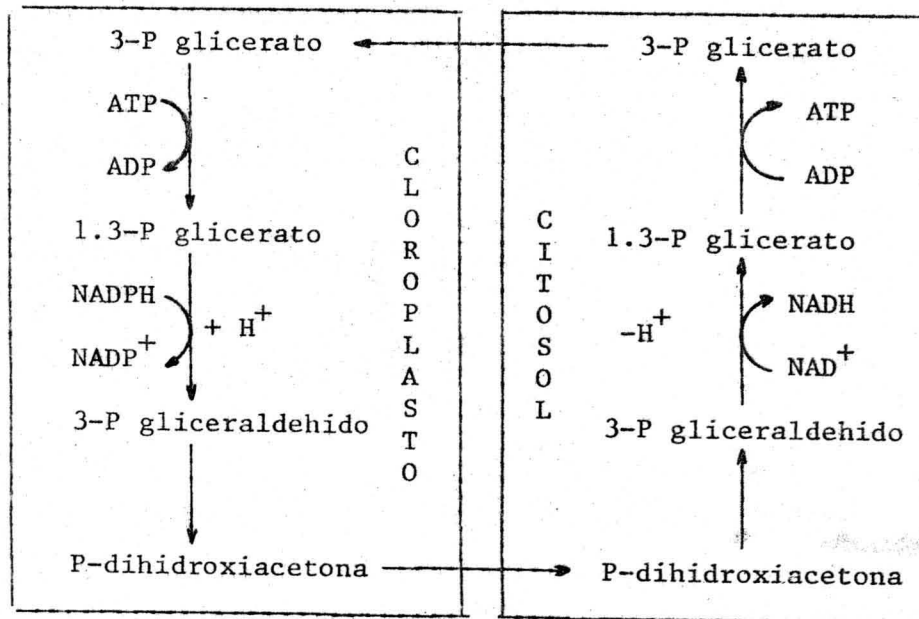
Por otro lado, el cloroplasto posee un "pool" más o menos fijo de adenilatos ( $\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}$ ) y de piridín-nucleótidos ( $\text{NADP}^+$  y  $\text{NAD}^+$ , mas sus respectivas formas reducidas), cuyo tamaño se ha determinado aislando cloroplastos en disolventes no acuosos, o utilizando disolventes acuosos en condiciones que impidan la rotura de los mismos, siendo en espinaca 1-3 mM la concentración del primero, y 0.5-1.5 mM la de piridín-nucleótidos (106). Utilizando técnicas similares se ha comprobado que el nivel de adenilatos del citoplasma es muy similar al del cloroplasto, aunque varía la razón ATP/ADP. Por el contrario, los niveles de ambos piridín-nucleótidos son superiores en el citoplasma, en el que sorprendentemente la mayor parte del  $\text{NADP}^+$  se encuentra en forma reducida, mientras que el  $\text{NAD}^+$  se encuentra en la oxidada, no modificándose prácticamente nada —la razón entre ambas formas a consecuencia de la transición luz-oscuridad. En el cloroplasto tanto el  $\text{NADP}^+$  como el  $\text{NAD}^+$  —

se encuentran fundamentalmente en forma oxidada en la oscuridad, pero con la iluminación la mayor parte del primero y una considerable proporción del segundo pasan a forma reducida (106); aunque la cadena de transporte electrónico fotosintético es sólo responsable de la reducción del  $\text{NADP}^+$ , -- una reacción transhidrogenásica del  $\text{NADPH}$  al  $\text{NAD}^+$  tiene lugar merced a gliceraldehído 3-P deshidrogenasas y malato -- deshidrogenasas específicas  $\text{NADP}^+$ - y  $\text{NAD}^+$ -dependientes existentes en el cloroplasto. Más aún, ambas presentan una activación por la luz, siendo la secuencia de reacciones la siguiente:



El incremento de la razón ATP/ADP que tiene lugar en el cloroplasto a consecuencia de la iluminación va seguido de un incremento aun mayor en el citoplasma; ésto indica la existencia de un mecanismo de transporte de ATP que, incluso, tiene lugar contra un gradiente de concentración. Aunque se ha descrito un "traslocador" específico que contrabalancea ATP, ADP y AMP entre el cloroplasto y citoplasma, tiene tan baja capacidad que en la práctica se puede considerar que las cubiertas cloroplásticas son impermeables a los adenilatos (128). - El transporte tiene lugar mediante un mecanismo indirecto basado en que la envoltura cloroplástica es permeable al sistema 3-P glicerato-triosas P, y en la existencia de gliceraldehído 3-P deshidrogenasas específicas en el citoplasma y cloroplasto (129). Bajo iluminación el 3-P glicerato es reducido,

consumiendo ATP y NADPH, a gliceraldehido 3-P el cual, isomerizado a dihidroxiacetón-P, es transferido al citoplasma; - allí es, previa reconversión en 3-P gliceraldehido, oxidado de nuevo a 3-P glicerato con producción de NADH y ATP, siendo como tal bombeado al cloroplasto para un nuevo ciclo:



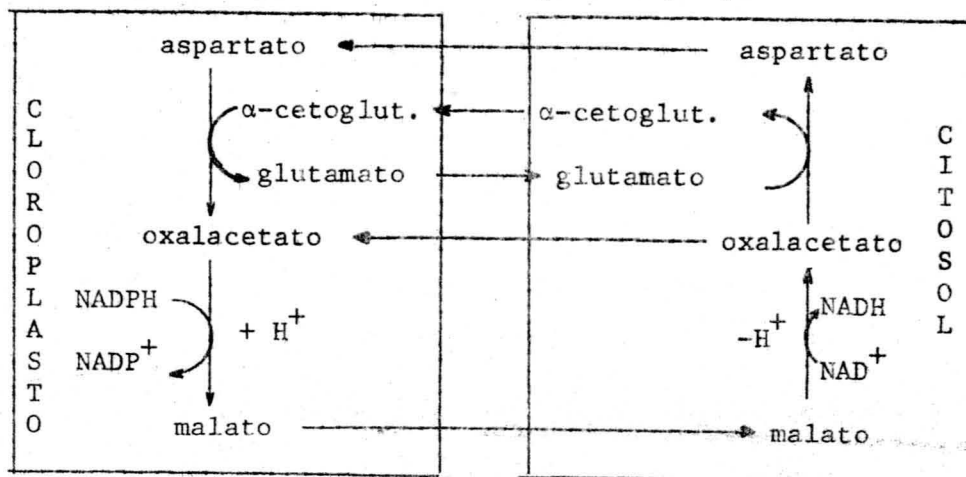
La situación de equilibrio se establecerá cuando se cumpla:

$$\frac{(3\text{-P glicerato})(\text{ATP})(\text{NADPH})(\text{H}^+)}{(\text{P-dihidroxiacetona})(\text{ADP})(\text{Pi})(\text{NADP}^+)} = \frac{(3\text{-P glicerato})(\text{ATP})(\text{NADH})(\text{H}^+)}{(\text{P-dihidroxiacetona})(\text{ADP})(\text{Pi})(\text{NAD}^+)} \quad (*)$$

El proceso representa, pués, una exportación al citoplasma de ATP y potencial reductor. Por el contrario, en condiciones de oscuridad el proceso puede tener un sentido inverso, -- sirviendo como aporte de NADPH y ATP al cloroplasto. No obstante, éste puede tener también una abundante fuente de NADPH a - expensas de la glucosa 6-P originada en la hidrólisis del almidón almacenado, merced a sus potentes glucosa 6-P y P-glucona

to deshidrogenasas del ciclo oxidativo de la pentosa-P; precisamente, se ha visto que la glucosa 6-P deshidrogenasa se inactiva en presencia de la luz a través de la síntesis lumínica de compuestos fuertemente reductores que actuarían - sobre la proteína enzimática (130).

Otro mecanismo indirecto de cambio de potencial reductor entre el cloroplasto y el citoplasma lo constituye el sistema malato-oxalacetato, ambos permeables a las cubiertas del cloroplasto por el "traslocador de dicarboxilatos". En condiciones de alto potencial reductor del cloroplasto, una malato deshidrogenasa NADP<sup>+</sup>-dependiente reduciría el oxalacetato a malato, el cual sería exportado al citoplasma; allí la malato-deshidrogenasa citoplasmática pasaría el malato a oxalacetato, con síntesis paralela de NADH, siendo el oxalacetato exportado al cloroplasto (131):



El equilibrio se establecerá ahora en las circunstancias de la siguiente expresión:

$$\frac{(\text{oxalacetato})(\text{NADPH})(\text{H}^+)}{(\text{malato})(\text{NADP}^+)} = \frac{(\text{oxalacetato})(\text{NADH})(\text{H}^+)}{(\text{malato})(\text{NAD}^+)} \quad (**)$$



Este sistema tiene en su contra la baja tasa de transporte del oxalacetato. Por ello no parece improbable sostener - que el mecanismo de transporte incluya el sistema transaminásico glutamato-oxalacetato, existente tanto en el cloroplasto como en el citoplasma. Ello implica un transporte no sólo de aspartato, sino también de glutamato y  $\alpha$ -cetoglutarato, - que tiene lugar a un buen ritmo por el "traslocador de dicarboxilatos".

Como ya se apuntó anteriormente, el flujo de ATP y de piridin-nucleótidos reducidos, tiene lugar, al menos en los primeros momentos de iluminación, contra un gradiente de concentración. La fuerza que hace posible este transporte se supone, de los datos actualmente existentes, radica en el gradiente iónico, especialmente de  $H^+$ , que se establece como consecuencia de la iluminación, y que lleva a una alcalinización del espacio estromático en relación con el medio externo del cloroplasto. Esto puede ocurrir gracias a la escasa permeabilidad de la envoltura cloroplástica a los  $H^+$ , que hace que una fuga protónica al espacio exterior, o viceversa, no llegue al 10% del flujo protónico dirigido hacia el interior de las membranas tilakoidales.

Bajo la actuación simultánea de los dos mecanismos de traslocación indicados, y puesto que el "pool" de piridin-nucleótidos existente en el cloroplasto y citoplasma será común para ambos, se obtendrá por división de las expresiones (\*) y (\*\*):

$$\frac{(3\text{-P glicerato})(ATP)(\text{malato})}{(P\text{-dihidroxiacetona})(ADP)(Pi)(\text{oxalacetato})} =$$

$$= \frac{(3\text{-P glicerato})(ATP)(\text{malato})}{(P\text{-dihidroxiacetona})(ADP)(Pi)(\text{oxalacetato})}$$

En ella el primer miembro corresponde a la situación en el cloroplasto, mientras que el segundo a la del citosol. Es to nos viene a indicar que el potencial fosforilante (ATP)/(ADP)(Pi) del cloroplasto y citoplasma depende de las concentraciones relativas de P-glicerato, P-dihidroxiacetona, oxalacetato y malato, en uno y otro espacio. Se ha comprobado -- que la traslocación del par malato-oxalacetato es poco efectiva, por lo que la razón de concentraciones (P-glicerato)/(P-dihidroxiacetona) en el cloroplasto y citoplasma será el principal factor que regula el potencial energético de ambos compartimentos. El mecanismo por el que el traslocador de -- fosfatos conduce, en combinación con el gradiente protónico, a una desigual distribución del P-glicerato y P-dihidroxiacetona en el cloroplasto y citoplasma no es aun conocido (132).

En cualquier caso, este mecanismo de cambio de potencial energético y reductor entre el cloroplasto y citoplasma constituye un mecanismo adicional de ajuste de la razón ATP/NADPH a las auténticas necesidad de ambos.

#### Regulación de la asimilación de CO<sub>2</sub>. Proceso de inducción.

Cuando se ilumina una hoja fuertemente después de mantenida durante un período en la oscuridad, el desprendimiento - fotosintético de O<sub>2</sub> y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> no alcanzan un valor máximo estable hasta que transcurren varios minutos. Este período inicial se llama "fase de inducción". Su evolución en función del tiempo es muy análoga con el proceso de - apertura de estomas que tiene lugar en la hoja, y por eso fué vinculado al principio con este fenómeno; sin embargo, el hecho de que el fenómeno de inducción se manifieste también en

cloroplastos aislados, así como en algas unicelulares y plantas acuáticas, que carecen de estomas, llevó a investigar un origen distinto para el mismo.

El hecho de que el transporte electrónico fotosintético, y la fotofosforilación concomitante, no presenten "fase de inducción" cuando se analizan desacoplados del proceso de fijación de  $\text{CO}_2$ , hizo sospechar que dicho fenómeno se encontraba vinculado a la llamada "fase oscura" de la asimilación fotosintética, como se deduce también de la inalterabilidad del tiempo de inducción a intensidades de iluminación diferentes; por otro lado, la duración del período de inducción puede ser acortada, y aun prácticamente anulada, cuando una fuerte iluminación es interrumpida por un breve intervalo de oscuridad. Actualmente el fenómeno de inducción se explica admitiendo que existe una desactivación en la oscuridad de algunos enzimas que intervienen en la asimilación del  $\text{CO}_2$ , lo que conduce a un defecto del nivel de intermediarios y, fundamentalmente, del aceptor primario de  $\text{CO}_2$ ; la activación lumínica de dichos enzimas, y el aumento de la concentración de estos intermediarios hasta alcanzar el nivel necesario para mantener el proceso de asimilación de  $\text{CO}_2$  a las tasas exigidas por la cantidad de luz incidente, constituye el objeto del período de inducción.

El proceso de asimilación del  $\text{CO}_2$  tiene lugar en los cloroplastos de los vegetales  $\text{C}_3$  y en los de las células del parénquima vascular de los  $\text{C}_4$ , mediante el llamado ciclo reductivo de las pentosas-P, o ciclo de Benson-Calvin. La incorporación del  $\text{CO}_2$  en él tiene lugar a nivel de la ribulosa-1.5-difosfato carboxilasa, un enzima que en experiencias "in vitro" manifestaba una baja afinidad por el  $\text{CO}_2$  y que, a pesar

de su gran abundancia en el cloroplasto — hasta el punto de constituir el 50% del contenido protéico total del mismo— no era capaz, dada la baja (0.03%) concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, de justificar las elevadas tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> que la hoja puede alcanzar bajo condiciones favorables (133). Bajo las condiciones usadas, y supuesta la no existencia de un mecanismo de activación o de aumento de la concentración local de CO<sub>2</sub>, hubiesen hecho falta concentraciones de enzima alrededor de 500 veces mayores y, consecuentemente, la fotosíntesis no hubiese sido posible. Esto sin tener en cuenta que este enzima muestra una paralela actividad oxigenásica que, como hemos visto, minimiza su eficacia en condiciones normales. Actualmente se admite que el elevado contenido de este enzima en el cloroplasto se debe a una adecuación del vegetal a atmósferas cada vez más empobrecidas en CO<sub>2</sub>.

A la resolución de tales discrepancias contribuyeron — las mejoras introducidas en el proceso de extracción del enzima y el empleo de tests de ensayos mas perfeccionados, pero sobre todo el descubrimiento de que el enzima era activado por la luz dando una forma de mucha mayor afinidad por el CO<sub>2</sub> (134), con una Km 45 µM, frente al primitivo valor — 11 mM. Este caso de activación lumínica pertenece al llamado tipo "directo", en el que una modificación del centro activo está asociada a una transferencia al mismo de un cuanto de luz absorbido por el sistema pigmentario de las "lamelas".

Un mecanismo adicional de activación por el Mg<sup>2+</sup> ha sido comprobado y debe vincularse al proceso de activación — por la luz merced al aumento — de 3 a 15 mM— que la concen

tración estromática de  $Mg^{2+}$  experimenta con la misma. Sin embargo, el hecho de que este enzima pase a una forma inactiva cuando "in vitro" es incubado con ribulosa-1.5-fosfato en ausencia de  $Mg^{2+}$ , y aunque su actividad se vea muy disminuída cuando este ión se adiciona a la mezcla de reacción con posterioridad al sustrato, indica la existencia de cambios conformacionales complejos al activarse el enzima por la luz. Una activación también dependiente de la iluminación es el efecto positivo que sobre la actividad carboxilante ejerce la alcalinización del espacio estromático del cloroplasto -- (135); dicha alcalinización aumentará la cantidad de  $CO_2$  fijada como  $CO_3H^-$ , y puesto que el verdadero sustrato de la carboxilasa es el  $CO_2$ , resulta obligada la existencia de una potente anhidrasa carbónica cloroplastídica.

Un sistema de regulación adicional propuesto para la carboxi-dismutasa es su activación por la fructosa-6-P y su inhibición por la fructosa-1.6-difosfato (136); análogamente, un efecto activador del NADPH y una acción inhibidora del 6-P-gluconato han sido también puestos de manifiesto, aunque todos ellos están actualmente siendo cuestionados y achacados a distintas formas de preparación y determinación de la actividad enzimática.

Esta compleja regulación de la ribulosa-1.5-fosfato carboxilasa es lógica si pensamos en su papel clave en el ciclo de asimilación del  $CO_2$ , y a ello hay que vincular la compleja estructura de este enzima, una proteína de p.m. 560.000 constituída por ocho subunidades análogas de alto p.m., y por otras ocho también similares, de p.m. reducido; las primeras se sintetizan en los ribosomas 70S del propio cloroplasto, siendo responsables de la acción catalítica, mientras que las

segundas lo hacen en los ribosomas 80 S nucleares, y en ellas recae la función reguladora (137). El mecanismo por el que -- tiene lugar el transporte de la subunidad pequeña --y, en general, el resto de las proteínas cloroplastídicas que se sintetizan en el núcleo-- al interior del cloroplasto, es por ahora desconocido.

El segundo enzima clave del ciclo de Benson-Calvin es la fructosa-1.6-bisfosfatasa. Presenta también una regulación -- muy compleja, en la que un proceso de activación lumínica de tipo "indirecto" constituye el factor determinante. Al igual que la carboxi-dismutasa, su actividad se potencia con la alcalinización y el aumento de la concentración de  $Mg^{2+}$  que tiene lugar en el "estroma", pero además presenta un mecanismo de activación derivado del incremento del poder reductor que tiene lugar a consecuencia de la luz. Un "factor protéico" encontrado en el cloroplasto como agente activante de la FDPasa, se ha podido resolver en tioredoxina -- una proteína de pequeño p.m. y bajo potencial redox, descrita anteriormente en bacterias y tejidos animales-- , y en la enzima ferredoxin-tioredoxin reductasa. La ferredoxina reducida originada fotoquímicamente transferiría electrones mediante dicha reductasa a la tioredoxina, la cual actuaría activando la FDPasa, quizás a través de una reducción de los abundantes grupos -S-S- que se ha comprobado presenta este enzima (138); aunque se ha visto que la razón GSH/GSSG es muy alta en el cloroplasto tanto en la luz como en la oscuridad, la desactivación del enzima al cesar la iluminación ocurriría vía una glutathion reductasa cloroplastídica, con reoxidación de los restos -SH del enzima. No obstante, la FDPasa muestra una total operatividad en condiciones no fisiológicas, en la oscuridad, en ausencia de los

componentes del "factor protéico", en presencia de una concentración de  $Mg^{2+}$  5 mM, condiciones de las que habitualmente se hace uso para determinado tipo de ensayos.

Otro factor regulador de la FDPasa está vinculado a su naturaleza de enzima polimérico constituido por 4, según unos -- (139), ó 16, según otros (140), subunidades, que dan un p.m. -- alrededor de 130.000 para el enzima nativo. En cualquier caso esta forma experimenta a pH alcalino un parcial desdoblamiento en dos formas iguales de p.m. mitad (141) que, sorprendentemente, muestran actividad Sedoheptulosa-1.7-difosfatásica -- una acción enzimática también vinculada al ciclo de Calvin-- supuesto el proceso de activación descrito arriba para la FDPasa.

El tercer enzima altamente regulador del ciclo de Benson-Calvin es la gliceraldehído-3P-deshidrogenasa. Se trata de -- una proteína de un p.m. aproximado de 100.000, que es dependiente de NADPH en la reducción del 1.3-difosfoglicerato a 3-P gliceraldehído; no obstante, en presencia de NADH el enzima se convierte en un complejo oligomérico de p.m. 600.000, pudiendo funcionar en la reducción del 1.3-difosfoglicerato asociado a este coenzima (142). Aunque en experiencias "in vitro" se ha visto que la forma  $NADP^+$ -dependiente experimenta también una activación lumínica por el sistema de la ferredoxina-tioredoxin-reductasa, ensayos de activación efectuados con cloroplastos íntegros señalan la participación en la misma de compuestos con grupos tiólicos vecinos, ligados a las estructuras membranales del "tilakoide". Un sistema de activación análogo ha sido descrito para la P-ribuloquinasa, y para los sistemas no vinculados al ciclo de fijación del  $CO_2$  malato deshidrogenasa  $NADP^+$ -dependiente y ATPasa, con lo que parece generalizarse bastante -- dicho mecanismo como sistema de regulación de enzimas cloroplas

tídicos en la transición luz-oscuridad; más aún, ha sido descrita la existencia en el cloroplasto de dos tioredoxinas distintas, con diferente efectividad en la activación de los sistemas enzimáticos mencionados (143).

A la vista de lo expuesto hay que pensar que en la transición luz-oscuridad tiene lugar una detención de la dinámica del ciclo, no sólo por cesar el aporte de ATP y NADPH, sino también por desactivación de bastantes sistemas enzimáticos del mismo. Los niveles y el equilibrio de intermediarios se alterarán entonces progresivamente a causa de la permeabilidad del cloroplasto a algunos de ellos, y a una probable degradación metabólica de todos, con la consecuencia de que una nueva fase de iluminación no permitirá tasas elevadas y estables de fotosíntesis hasta que el equilibrio perdido se restituya. -- Que ésto es así se demuestra porque cloroplastos obtenidos rápidamente de hojas sometidas a intensa iluminación muestran un período de inducción reducido; por otro lado, el tiempo de inducción se acorta cuando al medio se agregan aquellos intermediarios del ciclo de Calvin permeables a las paredes del cloroplasto, mientras que se alarga cuando se adiciona Pi que, por el equilibrio impuesto por el "traslocador de fosfatos", fuerza la salida de ésteres fosfóricos intermediarios. En este cambio radica precisamente el principal factor de regulación del período de inducción y de la situación de equilibrio siguiente. Una concentración adecuada de Pi en el cloroplasto impedirá la salida de ésteres intermediarios, permitirá la síntesis del ATP necesario y, una vez superado el período de inducción, conducirá a la acumulación de almidón en el cloroplasto y a la exportación del P-glicerato y triosas-P excedentarios.



Cuando hojas o cloroplastos aislados se someten a iluminación, tiene lugar una producción inmediata de ATP y NADPH, sin período alguno de inducción. De ambos es el ATP el de mas perentoria necesidad, ya que el NADPH no podrá ser objeto de uso hasta que el P-glicerato haya subido hasta un nivel suficiente, lo que a su vez depende de una previa síntesis de ribulosa-1.5-P, el sustrato sobre el que tiene lugar la fijación del  $\text{CO}_2$ . La síntesis de ribulosa-1.5-P tiene lugar con gasto de ATP, y la preferencia de este paso frente a la reducción del P-glicerato en relación con el consumo de ATP viene manifestada por la mayor afinidad del ATP en aquél que en éste, constituyendo la fosforilación de la ribulosa 5-P un verdadero sumidero por el que se canaliza todo el ATP originado en esta fase inicial de iluminación (144). Como ya hemos mencionado, este gasto suplementario de ATP parece proceder vía fotofosforilación cíclica, como se demuestra por el hecho de -- que cloroplastos tratados con antimicina A, un reconocido inhibidor de la misma, exhiban un cuadro distorsionado de niveles de intermediarios del ciclo de Calvin, a lo que también contribuye el efecto estimulante que la antimicina A ejerce sobre la actividad FDPasa (145): un aumento de los niveles de ribulosa-1.5-P y de P-glicerato, y una disminución de triosa-P, fructosa-1.6-P y sedoheptulosa-1.7-P, indicando que el escaso ATP originado en la cadena acíclica de electrones es absorbido por el sistema de la P-ribuloquinasa.

Analizando todo lo expuesto, no puede perderse de vista el carácter poco fisiológico de las experiencias efectuadas con cloroplastos aislados, en los que el espacio citoplasmático viene sustituido por un medio de reacción que guarda, en relación con el volumen cloroplastídico, una razón del orden

de 500:1 a 1.000:1, mientras que en el tejido foliar esa relación se encuentra próxima a la mitad. La consecuencia -- práctica de ello es que los metabolitos que pasan del cloroplasto al medio quedan enormemente diluïdos en éste. Lo mismo cabe decir en las experiencias efectuadas con cloroplastos reconstituïdos, en las que cloroplastos rotos se suplementan con su contenido estromático; la concentración de los compuestos del "estroma" queda muy diluïda en relación con las condiciones originales, y solamente pueden reconstituirse situaciones al menos próximas a aquéllas, cuando el contenido estromático quede a una concentración final no excesivamente distante de la reinante en el cloroplasto (146).

#### Regulación de la síntesis de proteínas, grasas y azúcares.

De los intermediarios del ciclo de Calvin el vegetal -- puede sustraer, cuando lo requiera, los componentes necesarios para sus distintas vías metabólicas de biosíntesis de carbohidratos, grasas y proteínas. Un rápido análisis del ciclo -- (ver esquema general) nos pone de manifiesto que los compuestos de arranque para la biosíntesis de grasas y proteínas -- triosas-P y ácido fosfoglicérico -- aparecen dentro del ciclo después de la reacción de carboxilación y antes de la actuación de la FDPasa. Por otro lado, el material de partida para la biosíntesis de carbohidratos -- la fructosa 6-P -- se origina como consecuencia de la actividad FDPasa, antes de -- que tenga lugar la fijación del CO<sub>2</sub>.

De lo expuesto se deduce que cambios en la razón de

actividades de estos dos sistemas enzimáticos clave, llevará aparejada una acumulación de unos u otros de los intermedios mencionados, de acuerdo con las necesidades biosintéticas del vegetal. Efectivamente, se ha comprobado que en los períodos de crecimiento de la planta la razón de actividades carboxidismutasa/FDPasa es mayor que en el vegetal maduro -- (147). La razón es que en aquella situación el vegetal necesita para su desarrollo un aporte constante de precursores -- de la síntesis protéica, así como de la biosíntesis de ácidos grasos y otros componentes constituyentes de las membranas celulares. Esto supone, por supuesto, la existencia paralela de un aporte de suficiente nitrógeno asimilable. Por el contrario, en la célula madura el crecimiento cesa, y su misión consiste en sintetizar material hidrocarbonado, principalmente sacarosa y almidón, como fuente energética de reserva. La señal que reciben las células para tal cambio debe proceder de estímulos hormonales.

Puesto que resulta, al menos teóricamente, posible alterar artificialmente el equilibrio entre los dos sistemas enzimáticos mencionados, mediante el empleo de inhibidores específicos, la desviación de la capacidad fotosintética hacia una mayor síntesis de proteínas puede constituir un hecho de enormes posibilidades en nutrición. No obstante, serán antes necesarios más estudios sobre la naturaleza de estos sistemas enzimáticos, sus características estructurales y cinéticas, su mecanismo de acción y los factores que lo regulan.

#### Fotorespiración.

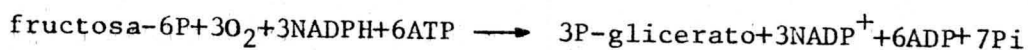
Cuando cloroplastos aislados se someten a iluminación en

un medio confinado que, como el atmosférico, sea rico en  $O_2$  y muy limitado en  $CO_2$ , al cabo de cierto tiempo, a medida - que se agota el  $CO_2$ , se observa una disminución del contenido en intermediarios del ciclo reductivo de las pentosas-P, mientras que se produce un aumento de glicolato, que acaba por ser el único producto de la asimilación del  $CO_2$ . Esta - acumulación no se produce, ni el descenso del nivel de intermediarios es tan aparente, cuando la experiencia se efectúa en hojas completas, lo que viene a indicar que el glicolato es degradado en estructuras ajenas al cloroplasto en otros - productos que, posteriormente, pueden reingresar en él e incorporarse a la ruta metabólica del ciclo de Calvin.

Al principio se consideró que la formación de glicolato tenía lugar a nivel de intermediarios del ciclo de Calvin, - concretamente del aldehído glicólico vinculado a la reacción transketolásica, mediante una oxidación por el  $H_2O_2$ , originado en una reacción de Mehler entre la ferredoxina reducida y el  $O_2$ . Aunque parte del glicolato puede originarse por este mecanismo - y así explicar la presencia del mismo en condiciones de inhibición total de la actividad oxigenásica-, la explicación del fenómeno vino cuando se descubrió esta actividad adicional de la ribulosa-1.5-P carboxilasa (148), en la cual el  $O_2$  compite con el  $CO_2$  como sustrato en condiciones - francamente favorables para aquél, ya que, supuesta la no -- existencia de algún mecanismo de concentración local del  $CO_2$  - como ocurre en los vegetales  $C_4$ -, la concentración del  $O_2$  atmosférico es del 20%, frente al 0.03% de  $CO_2$ . Y mientras que por cada mol de  $CO_2$  fijado en la reacción carboxilásica se producen dos moles de P-glicerato, en la reacción oxigenásica se originan por mol de  $O_2$  asimilado un mol de P-glicera

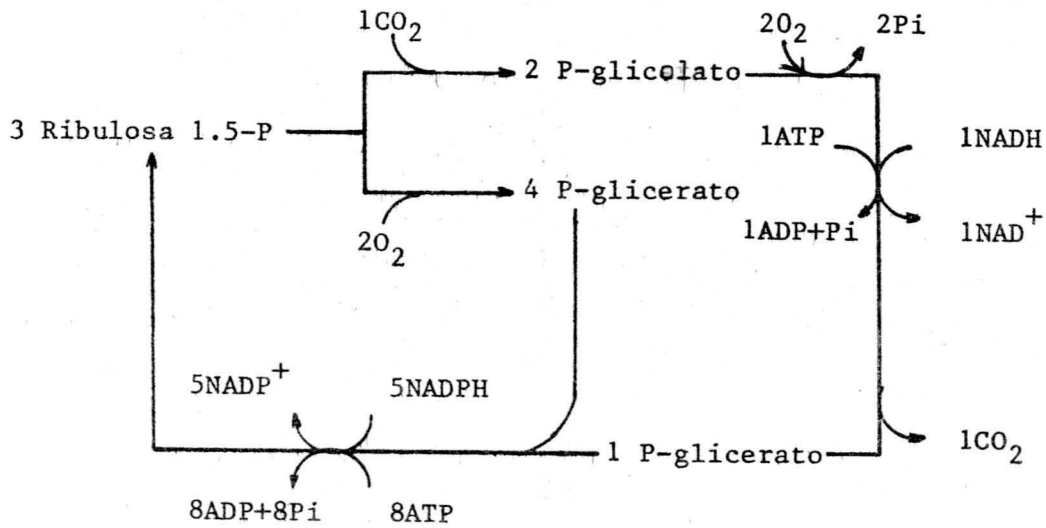
to y un mol de P-glicolato que, una vez desfosforilado por una fosfatasa específica, abandona el cloroplasto. En los peroxisomas es oxidado por la glicolato oxidasa — enzima — marcador de la actividad fotorespiratoria—, con toma de  $O_2$  y producción de peróxido, a glioxalato que, posteriormente, es aminado a glicina; ya en la mitocrondria, dos moléculas de glicina forman, con desprendimiento de  $CO_2$ , una — de serina que, vía hidroxí piruvato y glicerato, retorna — al cloroplasto para ser fosforilada a P-glicerato e incorporarse de nuevo al ciclo.

Este tránsito consume energía, de tal forma que si — consideramos el rendimiento neto de la síntesis de glicolato por oxidación de una molécula de hexosa-P nos encontramos, en primer lugar, con una razón  $ATP/NADPH = 2$  y, en segundo lugar, con el hecho paradójico, inusual en el metabolismo, de que la oxidación de un azúcar no produzca, antes bien, consuma energía:



Esta fuerte dependencia de NADPH y ATP en la formación de glicolato se manifiesta en el hecho de que su síntesis — quede suprimida en presencia de inhibidores del transporte electrónico y de desacoplantes de la fotofosforilación. La fotorespiración puede llegar a producir pérdidas de hasta — el 50% del  $CO_2$  asimilado, y se muestra así como un mal inevitable, consecuencia perjudicial de una fotosíntesis que — ha de realizarse en una atmósfera con limitada concentración de  $CO_2$  la cual, si artificialmente se hace descender a niveles aun mas bajos, puede llegar a una situación — "punto de compensación de  $CO_2$ " — en la que el carbónico eliminado por

fotorespiración se contrabalancee con el asimilado de fotosíntesis, en una situación sin pérdidas ni ganancias de materia orgánica. Desde un punto de vista estequiométrico esto se cumplirá cuando por cada tres moléculas de ribulosa-1.5-P, dos sigan la ruta oxigenásica y uno la vía carboxilásica, tal como se indica en el esquema adjunto.



Cabe preguntarse si esta pérdida de energía a consecuencia de la fotorespiración tiene alguna significación fisiológica, y comporta en contrapartida algún beneficio para la planta. Independientemente de la hipótesis que la considera como una inútil reliquia evolutiva que la planta tiene que soportar, parece más plausible la idea de que se trata de una forma de disipación de la energía atrapada por el aparato fo

tosintético, en unas condiciones en que la fotosíntesis normal no es posible — por ejemplo, en una situación de carencia de agua, en que los estomas se cierran e impiden la difusión del  $\text{CO}_2$ — protegiendo así a la planta de un posible daño por fotooxidación. En estas circunstancias el  $\text{CO}_2$  asimilado fotosintéticamente es desprendido por fotorespiración, nuevamente asimilado, y así sucesivamente, sin que deje de funcionar la maquinaria fotosintética. Efectivamente, una detención forzada de la misma por ausencia total de  $\text{CO}_2$  o un fuerte incremento en la concentración de  $\text{O}_2$ , produce por iluminación un deterioro del mecanismo fotosintético, como se demuestra por el encogimiento del cloroplasto y por la baja tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  que se produce al restaurarse los niveles normales de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ .

Si la fotorespiración representa un mecanismo de protección, debería esperarse su presencia generalizada en las plantas; efectivamente, aunque a un nivel mucho más bajo, se ha comprobado que los vegetales  $\text{C}_4$  también muestran indicios de fotofosforilación, que pueden incrementarse en condiciones ambientales forzadas. La diferente respuesta de los vegetales  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  hay que buscarla en el particular mecanismo de captación del  $\text{CO}_2$  atmosférico que exhiben las plantas  $\text{C}_4$ , en que el acceso del  $\text{O}_2$  atmosférico a la ribulosa-1.5-P carboxilasa es muy precario, mientras que la reasimilación del  $\text{CO}_2$  desprendido en la fotorespiración es casi total (149). Aunque se han hecho intentos, y algunos con éxito, de reducir la tasa fotorespiratoria de vegetales  $\text{C}_3$  a fin de acercar su productividad a la de las plantas  $\text{C}_4$ , no conviene olvidar nunca el desastroso efecto que una disminución inducida de la fotorespiración podría tener en una planta que se colocase

en condiciones que reclamaran la fotorespiración como mecanismo de defensa frente a su destrucción.

Varios son los procedimientos por los que se está intentando reducir la tasa fotorespiratoria de cultivos de vegetales  $C_3$ , con vistas a un incremento de productividad. Si la fotorespiración es una consecuencia derivada de la alta concentración atmosférica de  $O_2$  frente a la de  $CO_2$ , es evidente que un aumento artificial del nivel de  $CO_2$  — y disminución paralela del de  $O_2$  — ambiental en cultivos en invernaderos, actuará favoreciendo la asimilación fotosintética de  $CO_2$  y disminuyendo la fotorespiración. Se ha comprobado que inhibidores de la glicolato oxidasa, como la hidroxilamina, al cortar la cadena metabólica de la fotorespiración provocan un acúmulo de glicolato y, en definitiva, una inhibición de la misma; por otro lado, aunque un aumento de la fotosíntesis neta con la temperatura es mucho menos patente en las plantas  $C_3$  que en las  $C_4$ , se ha comprobado en hojas de tabaco — que el empleo de inhibidores de la oxidación del glicolato, junto con el uso de temperaturas del orden de  $35^\circ$ , llega a triplicar la fotosíntesis neta, efecto que no se observa a  $25^\circ$  (150). El carácter inhibitor selectivo que sobre la actividad oxigenásica de la ribulosa-1,5 -difosfato carboxilasa-oxigenasa se ha dicho ejercía el glicidato (151), no ha podido ser puesto de manifiesto en cultivos; no obstante, continúan haciéndose esfuerzos en esta dirección. Finalmente, la obtención por cruzamientos de variedades de baja tasa de fotorespiración está dando resultados prometedores; Zelitch (150) ha conseguido plantas de tabaco de la variedad Havana-Seed con fotorespiración disminuída y fotosíntesis neta superior en un 38% a la normal.



#### Vegetales tipo C<sub>4</sub>.

Los términos "planta C<sub>3</sub>" y "planta C<sub>4</sub>" tienen su origen en el número de átomos de C que tienen los primeros productos que aparecen marcados cuando especies de uno u otro tipo se iluminan en una atmósfera que contiene <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>: P-glicerato en las C<sub>3</sub>, y oxalacetato, seguido de malato o aspartato, en las C<sub>4</sub>. En estas últimas el <sup>14</sup>C aparece en la molécula de P-glicerato, con una disminución paralela de la radioactividad asociada a los ácidos C<sub>4</sub>, sólo al cabo de cierto tiempo, lo que indica la procedencia a partir de éstos del <sup>14</sup>C vinculado a aquél. Sin embargo, la diferencia no se limita a este punto, antes bien los vegetales C<sub>4</sub> tienen una serie de peculiaridades anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que los diferencian, constituyendo el llamado "síndrome C<sub>4</sub>". Un hecho muy destacado -- del mismo es una alta eficiencia en la asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico, y una resistencia a su inhibición por el elevado contenido de O<sub>2</sub> que hay en la atmósfera, lo que se traduce en un bajo valor del "punto de compensación de CO<sub>2</sub>", inferior a 10 ppm, frente a valores de 20-100 ppm registrados en vegetales C<sub>3</sub> (152). Análogamente, el "punto de compensación lumínica" -- nivel de iluminación al cual se compensa el CO<sub>2</sub> asimilado con el que se elimina-- es mas bajo en las plantas C<sub>4</sub>, con valores de unas 10 candelas, frente a las 100-500 candelas de los C<sub>3</sub>.

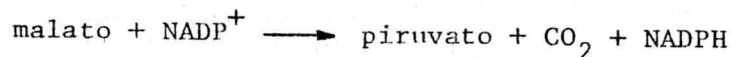
Esto se traduce en altas tasas de "fotosíntesis neta" -- valor de CO<sub>2</sub> asimilado fotosintéticamente, menos el eliminado conjuntamente por la respiración oscura y por la fotorespiración-- y en una producción de materia seca que oscilan, res

pectivamente, alrededor de 60 mg de  $\text{CO}_2$  asimilado/ $\text{dm}^2$  de hoja/hora y 50 g. de peso seco sintetizado/ $\text{m}^2$  de terreno cultivado/día, para los vegetales  $\text{C}_4$  y alrededor de 20 mg. de  $\text{CO}_2$ / $\text{dm}^2$ /hora y 30 g. de peso seco/ $\text{m}^2$ /día, para los  $\text{C}_3$ , diferencias que pueden ser mucho más acentuadas en algunas especies concretas. Esto explica el alto interés económico que encierra el problema, potenciado por el hecho de que algunas de las especies de mayor cultivo mundial —maíz, caña de azúcar, etc.— son del tipo  $\text{C}_4$ .

Otra diferencia entre los vegetales  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  radica en el mayor carácter discriminante frente al  $^{13}\text{CO}_2$  que, en relación al  $^{12}\text{CO}_2$ , tienen los primeros, lo que conduciría a un enriquecimiento progresivo en  $^{13}\text{C}$  de los mismos; esta característica ha llegado a usarse en la práctica como método de identificación de uno y otro tipo de especies. Pero la diferencia más importante, pues de ella derivan las restantes, radica en la especial disposición del aparato fotosintético en los vegetales  $\text{C}_4$ , en capas concéntricas alrededor del tejido vascular, constituyendo la llamada "estructura - tipo Kranz": una capa exterior, superficial, de células de mesófilo, y otra interior de células adosadas al parénquima vascular, con cloroplastos diferenciados cuyas características morfológicas y bioquímicas fueron ya anteriormente apuntadas. En todas las especies  $\text{C}_4$  la fijación de  $\text{CO}_2$  produce primariamente oxalacetato, y tiene lugar a nivel de P-enol piruvato mediante el sistema de la P-enol piruvato carboxilasa, una enzima de las células del mesófilo que, si bien originalmente se pensó radicaba en el cloroplasto, nuevos datos parecen indicar localización citoplasmática; no obstante, se le considera un enzima fotosintético, con un nivel inducido por el grado de iluminación a través de su activación por  $\text{Mg}^{2+}$

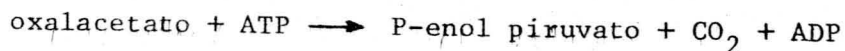
(153). Exhibe un fuerte carácter regulador de características alostéricas, siendo activado por algunos ésteres fosfóricos de azúcares, especialmente la glucosa 6-P, e inhibido por ácidos orgánicos tipo oxalacetato o malato; su sustrato natural, al contrario que la carboxi-dismutasa, es el  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , existiendo una anhidrasa carbónica que facilita el paso del  $\text{CO}_2$  gas a  $\text{CO}_3\text{H}^-$ . El destino posterior del oxalacetato puede ser vario, y ello configura la existencia de tres grupos - dentro de las especies  $\text{C}_4$ .

En el grupo I, las llamadas "formadoras de malato" (maíz, sorgo, caña de azúcar, etc.), el oxalacetato es reducido a malato por una malato-deshidrogenasa  $\text{NADP}^+$ -dependiente, que es activada en presencia de la luz por el mecanismo de la ferredoxina-tiorredoxina arriba descrito; en los grupos II (mijo, algunas Atriplex y Amaranthus, etc.) y III (algunos Panicum y Sporobolus, etc.), las "formadoras de aspartato", el oxalacetato se transforma en aspartato por la acción de una glutamato-oxalacetato transaminasa de localización citoplasmática. En cualquier caso, malato o aspartato son transferidos a las células del parénquima vascular, donde son descarboxiladas por enzimas específicos: el malato por un enzima málico  $\text{NADP}^+$ -dependiente de tipo cloroplastídico:



y el aspartato por un complejo mecanismo, diferente en los grupos II y III, que implica en ambos una previa reconversión en oxalacetato por otra glutamato-oxalacetato transaminasa - de localización mitocondrial. En las especies del grupo II - el oxalacetato es reducido a malato por una málico-deshidrogenasa mitocondrial  $\text{NAD}^+$ -dependiente y, una vez translocado al cloroplasto, descarboxilado por un enzima málico  $\text{NAD}^+$ -dependiente. En las del grupo III el oxalacetato se descarboxi

la directamente en la mitocondria por una P-enol piruvato - carboxiquinasa, en un proceso que consume ATP:



siendo el P-enol piruvato transferido al citosol, y allí -- desfosforilado a piruvato. En los tres grupos aparece, pués, piruvato en las células del parénquima vascular, desde donde es directamente transferido a los cloroplastos del mesófilo, o bien transaminado en las propias células del parénquima por una glutamato-piruvato transaminasa, y la alanina resultante transferida a las células mesofílicas donde, por un proceso inverso, sería de nuevo transaminada a piruvato; finalmente, éste es fosforilado a P-enol piruvato en un proceso que consume 2 ATP y que está catalizado por la piruvato diquinasa.

De todo lo expuesto se deduce, y así se ha comprobado en experiencias con  $^{14}\text{CO}_2$ , que los mismos átomos de carbono que son fijados como  $\text{CO}_3\text{H}^-$  a nivel de mesófilo, son los que luego aparecen en forma de  $\text{CO}_2$  en el parénquima vascular, y posteriormente pasan a constituir el grupo carboxilo del P-glicerato. El  $\text{CO}_2$  abandonado por estos mecanismos en las células del parénquima vascular constituye un procedimiento - de concentración local de carbónico equivalente a 540 nM/g. de peso fresco de planta, frente a unos 50 nM de  $\text{CO}_2$  gaseoso/g. de peso fresco que existen en el microambiente del tejido mesofílico de las plantas tanto  $\text{C}_3$  como  $\text{C}_4$ , en equilibrio con el  $\text{CO}_2$  atmosférico (154). En estas condiciones la ribulosa-1.5-difosfato carboxilasa de los cloroplastos del parénquima vascular puede fijar  $\text{CO}_2$  de forma más eficiente, e introducirlo en la ruta metabólica del ciclo de Calvin; -

aunque se ha indicado la existencia de niveles de relativa - importancia de carboxi-dismutasa en los cloroplastos del mesófilo, los enzimas del ciclo de Benson-Calvin se hayan confinados en los cloroplastos del parénquima vascular, mostrando unas características cinéticas y de regulación en todo -- asimilables a los respectivos enzimas de las plantas  $C_3$ . En lo que respecta al suministro de ATP y NADPH necesario al -- ciclo, hay que diferenciar entre las especies "formadoras de malato" y "formadoras de aspartato".

En realidad un dimorfismo marcado entre los cloroplastos del mesófilo y del parénquima vascular sólo se dá en las "formadoras de malato", de tal forma que una fijación de  $CO_2$  con producción estequiométrica simultánea de  $O_2$  no ha podido demostrarse conjuntamente en uno u otro tipo de cloroplastos individualizados. Más aún, cuando plantas de este grupo se someten durante una noche a temperaturas por debajo de  $4^\circ C$ , aparecen signos de clorosis foliar que se han asociado a una deficiencia de clorofila en los cloroplastos del mesófilo, - los cuáles por otro lado exhiben otras anomalías derivadas - de una inactivación, debida al frío, de los enzimas piruvato diquinasa y  $NADP^+$ -malato deshidrogenasa (155); por el contrario, los cloroplastos del parénquima vascular no presentan - irregularidad alguna. Como ya se ha apuntado con anteriori-- dad, en estas especies los cloroplastos del parénquima vascular presentan una "grana" muy rudimentaria, con una razón de clorofila a/b entre 6-7, frente a una razón próxima a 3 en - los cloroplastos mesofílicos, lo que se relaciona con una ma yoritaria existencia de Fot.I; ésto implica un flujo acíclico de electrones casi nulo, y la posibilidad de un flujo cíclico muy activo, condiciones que llevan a un bajísimo aporte

de NADPH y a una síntesis de ATP suficiente. Parte del P-glicerato es reducido a triosa-P utilizando el NADPH originado en la reacción descarboxilante del enzima málico, mientras - que el resto es traslocado a los cloroplastos del mesófilo - allí reducidos a triosas-P utilizando el NADPH originado fotoquímicamente, y de nuevo traslocado a las células del parénquima vascular, donde contribuye a la síntesis de hexosas-P. Esta, traslocada o no al mesófilo, puede dar origen en ambos tipos de cloroplastos a almidón almacenable como reserva, servir de precursor de la síntesis de sacarosa en el citosol, o ser utilizada directamente en procesos de degradación metabólica. Este esquema implica la existencia, como así se ha comprobado, de una gliceraldehído 3-P deshidrogenasa en los cloroplastos del mesófilo.

Un dimorfismo de este tipo no existe en los vegetales - "formadores de aspartato", en los que los cloroplastos del parénquima vascular tienen una "grana" muy desarrollada, siendo prácticamente asimilables a los cloroplastos normales de las plantas  $C_3$ , aunque no a los cloroplastos mesofílicos de las  $C_4$ , que carecen del sistema enzimático del ciclo de Calvin. En ellos no habrá problemas de disponibilidad del NADPH y ATP necesarios; no obstante, puesto que la no utilización del NADPH originado en los cloroplastos del mesófilo podría acarrear perjuicios a éstos, se admite que, al igual que antes, parte del P-glicerato se trasloca a ellos para allí ser reducido a triosas-P.

Como conclusión se puede decir que, si bien la especial estructura anatómica foliar de las especies  $C_4$  parece estar dirigida a proveer un mecanismo de bombeo del  $CO_2$  atmosférico, aumentando su concentración local en el entorno de la -

carboxi-dismutasa, es posible que su principal función consista, primero, evitar la llegada del  $O_2$  atmosférico a dicho entorno y, en segundo lugar, constituir una trampa que impida la salida del  $CO_2$  desprendido en la respiración; en una palabra, evitar los negativos efectos de la fotorespiración. Aunque se han hecho intentos mediante hibridaciones de conseguir variedades de plantas  $C_3$  que desvíen su mecanismo de fijación de  $CO_2$  hacia el que exhiben las  $C_4$ , los resultados -- han sido totalmente negativos, pues si bien se han conseguido ejemplares con un alto nivel de P-enol piruvato carboxilasa, y otras características individuales que recuerdan al ascendiente  $C_4$ , la fotosíntesis neta no se incrementa, lo que demuestra que no sólo se requieren modificaciones de factores bioquímicos, sino una adecuada coordinación de éstos con una conveniente estructuración anatómica.

#### Resumen.

De todo lo dicho se deduce la excepcionalidad del cloroplasto como orgánulo de características muy particulares, más aun que la mitocondria. Aunque el "cociente respiratorio" ---  $CO_2/O_2$  en la combustión mitocondrial de azúcares, y el "cociente fotosintético"  $O_2/CO_2$  del cloroplasto coinciden, la mitocondria usa el cambio en la energía libre producida en la oxidación del NADH para la síntesis endorgónica de ATP. Por el contrario, el cloroplasto, que carece de actividad respiratoria, efectúa la síntesis de ATP -- y a una tasa que en condiciones óptimas puede ser hasta 30 veces mayor que en la respiración-- al mismo tiempo que lleva a cabo la reducción endorgónica del  $NADP^+$ . Pero si esa síntesis acoplada de ATP es in-

suficiente, el cloroplasto posee mecanismos adicionales de formación del mismo mediante un procedimiento desvinculado de la generación de potencial reductor; inversamente, si el ATP no es requerido, puede también sintetizar aisladamente NADPH sin formación concomitante de ATP. Todo ésto puede - llevarlo a cabo merced a finos mecanismos reguladores. Más aún, un exceso de producción de ATP y NADPH puede ser diversificado, sin que llegue a pararse la maquinaria fotosintética, merced al mecanismo de la fotorespiración, obviando así los inconvenientes derivados de aquel exceso y de esta parada. Finalmente, las envolturas del cloroplasto tienen tales características de permeabilidad que, sin llegar a - permitir que se escapen aquellos cofactores y elementos necesarios para la buena marcha del proceso fotosintético, - toleran la salida y entrada de algunos intermediarios como elementos transportadores del potencial energético y reductor sintetizado.





ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION



### Herbicidas: Consideraciones generales.

El uso de herbicidas en Agricultura data sólo de este siglo, y la proliferación de su empleo fue con posterioridad a la segunda guerra mundial. Anteriormente, la erradicación de las malas hierbas se efectuaba por procedimientos primitivos, y aun hoy en las zonas poco desarrolladas la eliminación manual de las mismas constituye una práctica común, junto con la rotación de cultivos y la inspección ocular de las semillas utilizadas en la siembra. Estos métodos no evitan el crecimiento simultáneo de una mala hierba que haya logrado implantarse, lo que, unido al continuo incremento del precio de la mano de obra, obligó a la búsqueda de una solución al problema. La lucha biológica como arma alternativa ha sido también objeto de consideración, desde el rudimentario procedimiento de hacer pastar ganado que muestre especial apetencia por las especies no deseadas, hasta el uso de insectos fitófagos, hongos, bacterias y virus contra las mismas. No obstante, estos métodos tienen muy limitadas aplicaciones y, como biológicos, proporcionan resultados muy desiguales.

Aunque la sal común y algunos productos de desecho de la agricultura e industria se aplicaban desde antiguo a los lados de los caminos para evitar el nacimiento de vegetación, la pri

mera indicación del efecto tóxico de agentes químicos sobre plantas no deseadas vino en 1896 cuando un agricultor francés observó el ennegrecimiento que las hojas de mostaza común (*Sinapis arvensis*) experimentaban al tratar las vides con caldo bordelés, un agente usado contra el "mildiu".

Sin embargo, el primer herbicida usado expresamente para controlar malas hierbas fué el DNOC en 1932, siendo el descubrimiento unos años mas tarde de análogos químicos de las hormonas vegetales lo que contribuyó decisivamente a la extensión del uso de estos agentes. Hitos ya posteriores fueron el desarrollo de las fenilureas sustituidas y de los derivados triazínicos y, mas recientemente, el del paraquat. A lo largo de este tiempo se han ido ensayando nuevas y nuevas estructuras, hasta el punto que hoy aparecen catalogados como herbicidas mas de 200 compuestos de características químicas y físicas muy variadas. No obstante, a pesar que la extensión del uso de herbicidas está solucionando muchos problemas, paralelamente están brotando en el plano agronómico otros nuevos, con la aparición de estirpes y variedades cada vez mas resistentes. Esto, derivado fundamentalmente de un desarrollo y empleo empírico de los herbicidas, está obligando a un estudio básico de los mismos a nivel bioquímico, fisiológico y estructural, de tal forma que un incremento en el conocimiento de los mismos conduzca a una mejora de su eficacia en el terreno agrario, y a minimizar los efectos perjudiciales que en el ámbito de la ecología, sanidad, etc., puedan introducir.

Estos estudios se están efectuando fundamentalmente en soja, guisante, cebada, etc., especies todas ellas fáciles de controlar en el laboratorio; ello no deja de ser una visión -

parcial del asunto, por cuanto ignora otras muchas de interés económico, y margina la efectividad sobre aquellas malas hierbas endémicas de la región, que se desean combatir. Motivo de atención está siendo la incidencia de los herbicidas sobre la composición química de la planta, sus intercambios gaseosos con el medio ambiente, balance hídrico, regulación hormonal del crecimiento, abscisión de flor, fruto y hoja, períodos de latencia, asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$ , metabolismo intermediario, etc.; un punto de especial atención lo constituye el efecto sobre la estructura tisular, celular y de los orgánulos subcelulares de los distintos órganos del vegetal, a lo cual está prestando una decisiva ayuda la técnica de microscopía electrónica. Paralelamente, se están estudiando los procesos de absorción y transporte de los herbicidas, su degradación metabólica, así como las relaciones estructural-actividad. Magníficas revisiones sobre todos estos aspectos han sido publicadas por Moreland (156), Frear y col. (157), Ashton y Crafts (158), Anderson y Thomson (159), Corbett (160), Dodge (161), Geissbuhler y col. (162) y Audus (163).

El establecer criterios para una clasificación de los herbicidas actualmente descritos constituye una labor ardua, dada la diversidad de los mismos. Dejando a un lado conceptos de tipo empírico — como aquéllos que los dividen en herbicidas de "pre- y post-emergencia", en herbicidas de "contacto" y "sistémicos", etc.—, dos criterios aparecen como los más lógicos, según atiendan a su mecanismo de acción o a su naturaleza química. Aunque para la mayor parte de los herbicidas se han observado efectos morfológicos y fisiológicos, no puede resultar extraño que, dada la complejidad del sistema sobre el que el herbicida vá a actuar, sólo se conozca el meca-

nismo concreto de actuación en muy pocos casos. Por otro lado, existe la dificultad de discernir entre efectos primarios o -- directos, y aquellos otros indirectos, además de la existencia de herbicidas de efecto múltiple de acuerdo con su concentra-- ción. Así, Moreland y col. (164) observaron que la mayor parte de los herbicidas que inhiben la síntesis protéica y de RNA, -- lo hacen por interferir el metabolismo energético, impidiendo la síntesis de ATP necesario para aquélla; por otro lado el -- diuron, un clásico bloqueador de la cadena fotosintética de -- transporte electrónico, exhibe a concentraciones mayores un -- efecto destructor del "pool" de carotenoides del cloroplasto, lo que subsidiariamente conduce a una pérdida de clorofila --- (165).

En realidad esta dificultad deriva de la pretensión de es tudiar una situación anormal en un contexto cuya situación nor mal sólo se conoce parcialmente. Van Overbeek (166) divide a -- los herbicidas en aquéllos que interfieren el metabolismo hor-- monal de la planta, causando anormalidades en su crecimiento, y los que inhiben de alguna forma el proceso fotosintético, ba sándose en que en estos dos grupos se pueden incluir la mayor parte de los herbicidas en la época descritos. Por el contra-- rio, Moreland (156) los agrupa en modificadores de la activi-- dad respiratoria mitocondrial, inhibidores fotosintéticos y -- aquéllos que interfieren el metabolismo de los ácidos nucléi-- cos y la síntesis protéica.

No menos dificultades entraña el establecimiento de una -- clasificación química, pues si se utiliza la agrupación quími-- ca fundamental -- en la que probablemente radique el efecto fi-- totóxico-- como criterio clasificador, no es menos cierto que

grupos funcionales secundarios pueden modificar básicamente - las características de solubilidad, volatilidad, etc., y a -- través de un cambio en la capacidad de absorción modificar ra -- dicalmente la susceptibilidad de la planta al herbicida en -- cuestión. Sin embargo, en el estado actual de nuestros conoci -- mientos, la estructura química constituye la única base racio -- nal de agrupación de la extensa variedad de herbicidas exis -- tentes. La clasificación de Brian (167) distingue primeramen -- te entre compuestos inorgánicos y orgánicos, dividiendo estos últimos en grandes familias: nitrofenoles y anilinas, ácidos fenoxialquil carboxílicos de tipo hormonal, derivados de los ácidos benzoico y fenilacético, ácidos haloalifáticos, amidas, nitrilos, alquil- y aril-carbamatos, ureas sustituidas, tio -- carbamatos, compuestos heterocíclicos (diferenciando derivados del bupiridilo, piridinas, piridazinas, uracilos, triazinas y de otra naturaleza --, tiocarbonatos, glicin-derivados, organo -- arsenicales, aceites y un último grupo de tipo misceláneo; en la Tabla adjunta se hace una relación de los herbicidas más -- frecuentemente utilizados, con indicación de su estructura quí -- mica.

#### TABLA

#### Clasificación de herbicidas atendiendo a su estructura química.

##### A) Compuestos inorgánicos.

Sulfato cúprico

Arsenito sódico

Clorato sódico

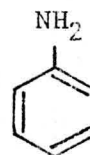
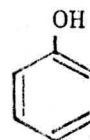
etc.



B) Compuestos orgánicos.

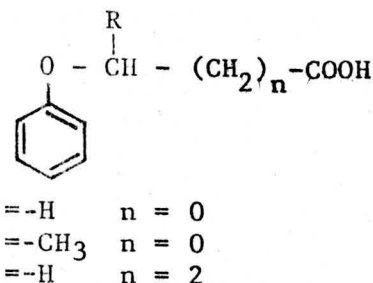
1) Nitrofenoles y anilinas.

DNOC 2-metil-4,6-dinitrofenol  
 Dinoseb 4,6-dinitro-2 sec.-butilfenol  
 Dinoterb 4,6-dinitro-2 ter.-butilfenol  
 Trifuralina 2,6-dinitro-NN-dipropil-4-trifluoro-metilanilina  
 Nitalina 4-(metilsulfonyl)-2,6-dinitro-NN-dipropilanilina  
 etc.



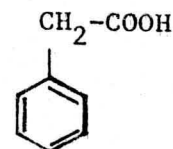
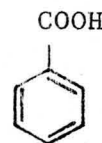
2) Acidos fenoxialquil carboxílicos.

2,4-D ác. 2,4-diclorofenoxiacético  
 MCPA ác. 4-cloro-2-metilfenoxiacético  
 2,4-DP ác. α-(2,4-diclorofenoxi) propiónico  
 2,4-DB ác. γ-(2,4-diclorofenoxi) butírico  
 etc.



3) Derivados de los ácidos benzoico y fenilacético.

2,3,6-TBA ác. 2,3,6-triclorobenzoico  
 Dicamba ác. 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico  
 Fenac ác. 2,3,6-triclorofenilacético  
 etc.

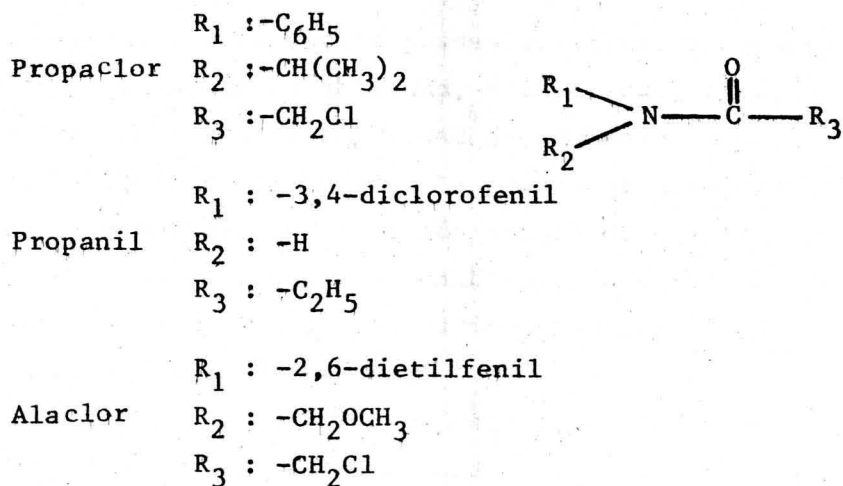


4) Acidos haloalifáticos.

Dalapón á. 2,2-dicloropropiónico  
 etc.

5) Amidas.

R<sub>1</sub> : -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>  
 Alidoclor R<sub>2</sub> : -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>  
 R<sub>3</sub> ; -CH<sub>2</sub>Cl

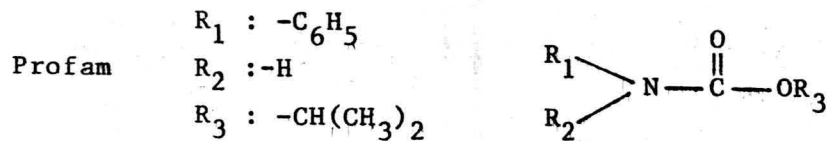
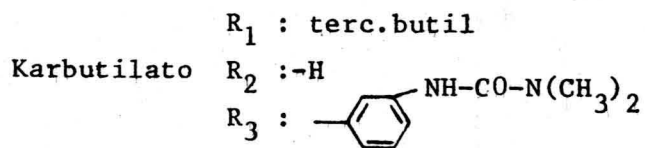


etc.

6) Nitrilos.

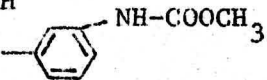
|              |                                   |  |
|--------------|-----------------------------------|--|
| Diclorobenil | 2,6-diclorobenzonitrilo           |  |
| Bromoxinil   | 4-hidroxi-3,5-dibromobenzonitrilo |  |
| Ioxinil      | 4-hidroxi-3,5-diiodobenzonitrilo  |  |
| etc.         |                                   |  |

7) Alquil- y aril-carbamatos.



|            |                             |
|------------|-----------------------------|
|            | $R_1 : 3\text{-clorofenil}$ |
| Clorprofam | $R_2 : H$                   |
|            | $R_3 : -CH(CH_3)_2$         |

Barbán  
 $R_1$  : 3-clorofenil  
 $R_2$  : -H  
 $R_3$  :  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Fenmedifán  
 $R_1$  : 3-metilfenil  
 $R_2$  : -H  
 $R_3$  : 

SWEP  
 $R_1$  : 3,4-diclorofenil  
 $R_2$  : -H  
 $R_3$  :  $-\text{CH}_3$

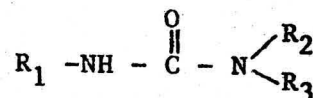
etc.

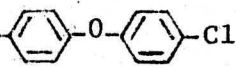
8) Ureas sustituidas.

Monurón  
 $R_1$  : 4-clorofenil  
 $R_2$  :  $-\text{CH}_3$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_3$

Diurón  
 $R_1$  : 3,4-diclorofenil  
 $R_2$  :  $-\text{CH}_3$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_3$

Metoxurón  
 $R_1$  : 3-cloro-4-metoxifenil  
 $R_2$  :  $-\text{CH}_3$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_3$



Cloroxurón  
 $R_1$  :   
 $R_2$  :  $-\text{CH}_3$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_3$

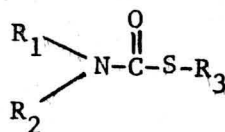
Linurón  $R_1$  : 3,4-diclorofenil  
 $R_2$  :  $-\text{CH}_3$   
 $R_3$  :  $-\text{OCH}_3$

etc.

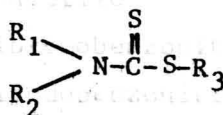
9) Tiocarbamatos y ditiocarbamatos.

EPTC  $R_1$  :  $-\text{C}_3\text{H}_7$   
 $R_2$  :  $-\text{C}_3\text{H}_7$   
 $R_3$  :  $-\text{C}_2\text{H}_5$

Dialato  $R_1$  :  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
 $R_2$  :  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_2-\text{CCl}=\text{CHCl}$



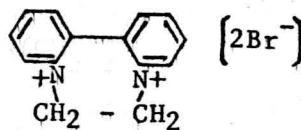
Sulfalato  $R_1$  :  $-\text{C}_2\text{H}_5$   
 $R_2$  :  $-\text{C}_2\text{H}_5$   
 $R_3$  :  $-\text{CH}_2-\text{CCl}=\text{CH}_2$



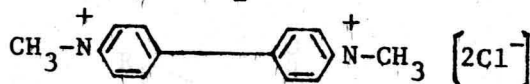
etc.

10) Heterociclosbipiridílicos.

Diquat (dibromuro)



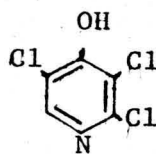
Paraquat (dicloruro)



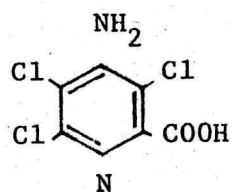
etc.

11) Heterocidos piridínicos.

Piriclor



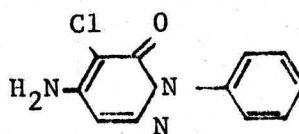
Picloram



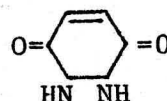
etc.

12) Heterociclos piridazínicos

Pirazón



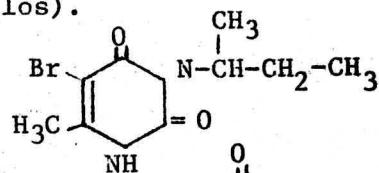
Hidrazida maleica



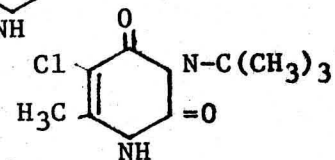
etc.

13) Heterociclos pirimidínicos (uracilos).

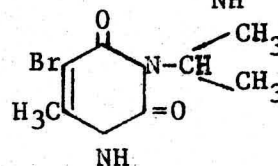
Bromacil



Terbacil



Isocil



etc.

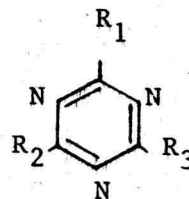
14) Heterociclos triazínicos.

Simazina  $R_1$  :-Cl  
 $R_2$  : -NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
 $R_3$  : -NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

Atrazina  $R_1 : -Cl$   
 $R_2 : -NH-C_2H_5$   
 $R_3 : -NH-CH(CH_3)_2$

Propazina  $R_1 : -Cl$   
 $R_2 : -NH-CH(CH_3)_2$   
 $R_3 : -NH-CH(CH_3)_2$

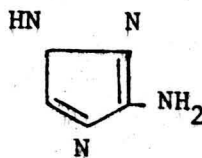
Simetón  $R_1 : -OCH_3$   
 $R_2 : -NH-C_2H_5$   
 $R_3 : -NH-C_2H_5$



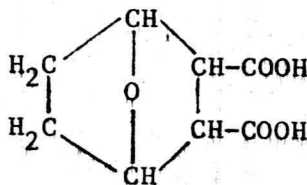
etc.

15) Heterociclos (misceláneo).

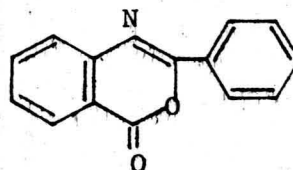
Amitrol



Endotal



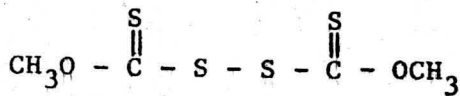
Bentranil



etc.

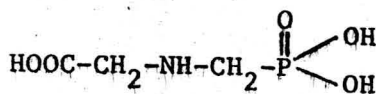
16) Tiocarbonatos.

Dimexan



17) Glicin-derivados.

Glisofato



18) Organo-arsenicales.

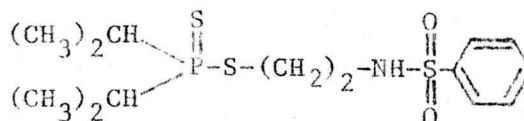
Acido cacodílico



19) Aceites.

20) Misceláneo.

Bensulida



Cuando un herbicida es aplicado a las partes aéreas de la planta, las hojas y, en menor grado, el tallo, constituyen el punto de entrada en la misma. Análogamente, y salvo casos de tratamientos de pre-emergencia en que la semilla y la plántula que de ella brota pueden verse afectadas, la raíz es la vía normal de penetración cuando el herbicida se adiciona al suelo. - Aunque entre ambos casos pueden existir marcadas diferencias - según el grado de desarrollo de la planta y el tiempo de tratamiento, existen grandes similitudes en relación con las barreras que el herbicida ha de vencer antes de incorporarse a la intimidad del vegetal. Estas barreras derivan de la propia morfología de la raíz y hoja - grado de desarrollo y orientación de la superficie foliar, profundidad y división de los pelos radiculares, etc.-, de la existencia de un epitelio cuticular en ambos, y de la presencia de estructuras especiales tanto en la hoja (estomas, tricomas, nerviaciones) como en la raíz (capa suberificada). El epitelio cuticular constituye la barrera principal, estando formada por una cutícula superficial o "cutina" de naturaleza cérea, que recubre una capa de células epidérmicas; entre ambas aparece frecuentemente una región rica en pectinas. Las ceras cuticulares son ésteres de ácidos grasos hidroxilados

o no, con alcoholes de peso molecular elevado, constituyendo -- una malla tridimensional que sustenta agrupaciones polares y -- apolares y que, en consecuencia, exhibe propiedades hidro y li -- pofílicas, comportándose paralelamente como un cambiador catión -- nico de naturaleza ácida debil (168).

El proceso de penetración de un herbicida sigue la siguiente secuencia de acontecimientos: absorción por la cutícula, -- progresión a través de ella, desabsorción, y penetración en la capa celular subyacente. Esto tiene lugar, en herbicidas aplicados en solución pulverizada, a una tasa inicialmente rápida que decrece con el tiempo, lo que se debe no tanto a una disminución de la concentración externa como a una evaporación del disolvente (169). Por supuesto que la naturaleza del herbicida influye en la cinética, de tal forma que un carácter higroscópico, humectante o tensioactivo acelerará el proceso de absorción; la adición de agentes tensioactivos a las formulaciones de herbicidas persigue aumentar la superficie de contacto de éstos con la zona de aplicación, además de un probable efecto solubilizador de las ceras cuticulares (170). En el caso de la absorción radicular el problema se complica por la existencia de una capa exterior más o menos suberificada; no obstante, la zona más próxima a la cofia muestra un xilema suficientemente diferenciado para ser funcional, existiendo entre las células epiteliales un -- llamado "espacio libre" al cual difunden en un primer estadio -- las moléculas que van a ser absorbidas. El pase final a través del "plasmalema", y el subsiguiente acúmulo celular, es un proceso que requiere energía y que está aún poco dilucidado.

La concentración de herbicidas lógicamente aumenta la tasa de absorción, siempre que no se sobrepasen aquéllas en que ya --



se manifieste un efecto fitotóxico local sobre la planta. Factores ambientales, como la temperatura, grado de humedad, pH del medio, etc., ejercen también una patente influencia; la iluminación favorece generalmente la absorción foliar de un herbicida, salvo casos en que tenga lugar una fotodegradación (171). Esto se debe a una mayor apertura de los estomas y constituye la causa de que el envés de la hoja muestre, por contener mayor número de ellos, una superior tasa de absorción; por otro lado, las células que rodean los estomas poseen una capa cuticular más ténue, constituyendo así puntos de fácil permeabilidad.

Desde un punto de vista de la efectividad, la traslocación de un herbicida desde la hoja, vía floema, o desde la raíz, vía xilema, a los restantes lugares de la planta constituye un punto crucial que, en lo posible, interesa potenciar. Salvo un potente efecto de "contacto", la aplicación de un herbicida afecta sólo a una parte reducida del vegetal, y difícilmente cabe esperar de ello una acción definitiva sobre su viabilidad. Puesto que el transporte de un herbicida se efectúa por la misma corriente que el de otros solutos metabólicos de la planta, conviene atemperar los tratamientos con las etapas fisiológicas más adecuadas de la misma. Así, las hojas jóvenes constituyen una zona de demanda de asimilados, mientras que las maduras son ya exportadoras de los mismos (172); en consecuencia, la diseminación de un herbicida administrado por vía foliar será mucho más efectiva aplicado a éstas que a aquéllas. Por otro lado, las hojas cercanas a la base de la planta exportan asimilados fundamentalmente a la raíz, mientras que las de la mitad superior lo hacen a las partes aéreas del vegetal.

La mayor parte de los estudios de traslocación de herbicidas se han hecho utilizando moléculas marcadas, especialmente  $^{14}\text{C}$ , seguido de un análisis autorradiográfico o una medida --- cuantitativa del material traslocado, con o sin previo aislamiento. Sin embargo, el seguimiento de la suerte de un herbicida a través de la radiactividad emitida por uno o más átomos de su molécula exige una interpretación cuidadosa, por la posibilidad de una degradación metabólica del mismo o conjugación con otros compuestos. En estos casos un análisis químico paralelo será ineludible.

Evidentemente todas las implicaciones derivadas del proceso de absorción y traslocación desaparecen cuando se analiza el efecto de herbicidas a nivel de células u orgánulos subcelulares, y más aun cuando se trata de experiencias con preparados enzimáticos purificados, pues en aquellos casos aún existen las barreras de la pared celular y/o envoltura del orgánulo en cuestión. Este distanciamiento del contexto mas real de la planta completa, puede verse compensado cuando se trata de analizar el mecanismo de acción en unas condiciones en que el manejo de concentraciones definidas de herbicida — la llamada "concentración actual"—, y la ausencia de productos colaterales de degradación puedan ser críticas. La existencia de un límite superior de la "concentración actual" para herbicidas que poseen un mecanismo específico de actuación ha sido objeto de amplia controversia, habiéndose indicado que efectos que aparecen sólo con una "concentración actual" muy por encima de ---  $10\ \mu\text{M}$ , resulta dudoso que puedan deberse a un solo mecanismo --- primario de acción (173).

La degradación de un herbicida hay que contemplarla en una

doble vertiente: fuera y dentro de la planta. En el primer caso puede tener un origen no biológico, como la fotodegradación antes mencionada, y la que puede tener en el suelo como consecuencia de la acción catalítica que las partículas de arcilla pueden ejercer sobre las moléculas a ellas absorbidas (174). - Una degradación biológica ajena al vegetal procede fundamentalmente de la fauna y flora microbianas del suelo, las cuales, - en contrapartida pueden verse seriamente afectadas por el tratamiento, con las implicaciones que ello puede tener en el plano del equilibrio ecológico del suelo y en las condiciones de fertilidad del mismo (175, 176).

Sin embargo, tiene mucha mayor incidencia la degradación por la propia planta, siendo muy rudimentaria la información - que actualmente se tiene sobre la historia metabólica de la mayor parte de los herbicidas en uso. La enzimología de la degradación puede decirse que se encuentra en su infancia, a pesar de la enorme importancia que este problema puede tener, no sólo a nivel de mecanismo de acción, sino también de la perdurabilidad de estos residuos en la cadena alimenticia del hombre. Los escasos estudios metabólicos hasta ahora efectuados - generalmente utilizando moléculas marcadas con  $^{14}\text{C}$ -, muestran que las rutas habituales son: una conjugación con otros componentes de la planta, bien directa o con productos de descomposición del herbicida, o una degradación parcial o total mediante reacciones hidrolíticas y de óxido-reducción.

Dentro de una misma planta los distintos órganos, tejidos, células y aún orgánulos subcelulares no reaccionan de una forma análoga a un tratamiento por un mismo herbicida, y aun la susceptibilidad dependerá de la época de aplicación. No debe -

resultar entonces sorprendente que distintas especies puedan exhibir un comportamiento básicamente diferente, como consecuencia de distinto comportamiento respecto a la absorción, transporte, metabolismo o mecanismo de acción del herbicida empleado. Así, la simazina resulta tolerante para el algodón y maíz, y tóxica para el trigo, a pesar de que los tres presentan niveles de absorción paralelos; sin embargo, ha podido comprobarse que el algodón acumula los derivados triazínicos en las glándulas oleaginosas de la hoja, mientras que el maíz exhibe particulares rutas de degradación metabólica de los mismos, que de esa forma no pueden alcanzar su lugar de actuación en el cloroplasto (177).

Por otro lado, pequeñas modificaciones, a primera vista triviales, en la estructura química de herbicidas son a veces básicas en lo que a su selectividad frente a distintas especies se refiere. El 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) se usa para proteger cosechas de cereales frente a malas hierbas del grupo de las dicotiledóneas; por el contrario, el 2,4-DB (ácido  $\gamma$ -2,4-diclorofenoxibutírico), un homólogo superior del anterior, presenta una acción más selectiva frente a las dicotiledóneas, pudiendo usarse en cultivos de leguminosas. Estudios metabólicos demostraron que la acción herbicida hormonal reside en el 2,4-D, y que el efecto del 2,4-DB y otros homólogos de un número par de átomos de carbono en la cadena lateral, sólo se manifiesta en aquellas especies que poseen un mecanismo de  $\beta$ -oxidación de la misma, que conduce a la liberación final de 2,4-D (178); esto quedó corroborado por la atoxicidad de los homólogos con una cadena normal, no ramificada, de un número impar de átomos de carbono.

De lo dicho se desprende que el poder fitotóxico está vinculado fundamentalmente a la particular estructura química de cada herbicida, mientras que la resistencia al mismo depende de circunstancias inherentes a la propia planta, siendo ambos factores los que deciden la idoneidad de un herbicida frente a un cultivo determinado con su cohorte de malas hierbas.

Un caso particular de selectividad es el ya comentado de resistencia de determinados biotipos de una especie considerada susceptible. Este fenómeno ha sido descrito con herbicidas de estructura tan diferente como el dalapón (ácido haloalifático), 2,4-D (ácido fenoxialquil carboxílico), sidurón (urea sustituida), barbán (aril-carbamato) y atrazina (heterociclo triazínico), y en la mayor parte de los casos se vincula a modificaciones de la tasa de absorción, transporte o metabolismo, de tal forma que puede quedar muy disminuida la concentración que alcanza el lugar de actuación. Se considera que es un fenómeno de resistencia derivado del uso repetido de un mismo herbicida frente a un mismo cultivo (179), y como solución al mismo se ha sugerido la rotación de cultivos, cambio del herbicida, o ambas cosas a la vez. No obstante, en algunos casos se han encontrado niveles análogos de herbicida en el propio lugar de actuación del mismo, por lo que la resistencia de algún biotipo resulta ineludible vincularla a una modificación del proceso bioquímico interferido; así, la resistencia de algunas estirpes de *Chenopodium album* a la atrazina y diurón parece residir en un cambio en algunos constituyentes del Fotosistema II de la cadena de transporte fotosintético, como se ha comprobado en experiencias "in vitro" con cloroplastos aislados (180).

Además de su empleo en la práctica agronómica, los herbicidas encuentran aplicación en la eliminación de vegetación en

suelos destinados a usos no agrarios, mantenimiento de lindes de carreteras en zonas tropicales, etc.. Como defoliantes, se emplean en tratamientos previos a la recolección mecánica de algunas cosechas, como el algodón, en que una abundante población foliar puede dificultar dicha operación. También es frecuente someter en los viveros forestales a un tratamiento defoliante plantones de árboles que van a sufrir un almacenaje o transporte prolongado, como medio de evitar grandes pérdidas de humedad y la implantación de plagas foliares (181). Desde un punto de vista sanitario la defoliación ayuda a la erradicación de insectos que, como la mosca tsé-tsé, encuentran en los hábitats húmedos y umbríos de los bosques tropicales un lugar idóneo de vida. Finalmente, la defoliación se ha convertido en una práctica común en las operaciones bélicas en las regiones tropicales, aunque en estos casos los tratamientos acostumbran a ser tan enérgicos que lo que se consigue es mas bien una erradicación de la vegetación. En contrapartida a los defoliantes, que provocan la abscisión de la hoja, los desecantes son herbicidas de contacto cuya aplicación produce una rápida pérdida de humedad de la misma, seguida de su desaparición y, frecuentemente, la muerte de la planta completa.

La contaminación alimentaria derivada del uso cada vez más extendido de los herbicidas, y de los pesticidas en general, está alcanzando una dimensión preocupante, y en tal sentido las legislaciones de los distintos países están fijando límites de tolerancia a su presencia en los alimentos de origen vegetal. Por otro lado, la contaminación ambiental, especialmente de las aguas fluviales y marinas, por pesticidas sigue un ritmo creciente, y puesto que muchos herbicidas son también activos frente a las algas, y acumulados por ellas, -

no resulta aventurado prever un posible desequilibrio del fitoplankton marino. En tal sentido es demostrativo que en las costas atlánticas de Estados Unidos el nivel de algunos pesticidas haya alcanzado concentraciones de 0.05 ppb, y sea ya de 40 ppb en el propio fitoplankton (182). De ahí la importancia del conocimiento de la biodegradabilidad de los herbicidas dentro y fuera de la planta, y a la vista de ello determinar su mayor o menor inocuidad respecto a la contaminación ecológica.

De todo lo expuesto se deduce la necesidad de búsqueda de nuevos herbicidas que, en la medida de lo posible, mejoren su efectividad y selectividad, eviten el problema de la aparición de biotipos resistentes, y reduzcan al mínimo los problemas sanitarios y ecológicos derivados de la contaminación ambiental. El desarrollo de nuevos compuestos es una operación muy tediosa y costosa, lo que se comprende si contemplamos que en las pasadas cuatro décadas un mínimo de un millón de posibles candidatos a pesticidas han sido testados, de los que sólo unos 600 han gozado de tratamiento comercial (183), relación que se vá haciendo cada vez mas desfavorable a consecuencia de unas exigencias legislativas mas y mas rigurosas; este incremento en costes ha derivado a que sólo se atiendan las necesidades de mejora de cultivos de gran mercado, y se hayan abandonado la protección de los que sólo afectan a áreas reducidas.

Tres distintos métodos pueden seguirse para el desarrollo de nuevos herbicidas. En el llamado "método empírico" nuevos compuestos de propiedades imprevisibles son ensayados frente a determinados cultivos; a pesar de su total ausencia de base científica, está muy extendido en la industria y a él se debe el descubrimiento en el pasado de los herbicidas mas significa

dos. El "método imitativo" intenta conseguir compuestos más -- efectivos o de nuevas características introduciendo modifica-- ciones, generalmente secundarias, a estructuras químicas básic-- cas de cuya efectividad se tiene ya constancia; aunque actual-- mente este procedimiento sigue ya unas bases científicas, en -- el pasado ha constituido una especie de "ruleta molecular" con -- la que, además, se obviaba la existencia de patentes ya regis-- tradas. Finalmente, el "método racional" conlleva un estudio -- previo de la fisiología y bioquímica vegetal, a fin de estable-- cer diferencias entre los procesos metabólicos que tienen lu-- gar en la planta objeto de cultivo y las malas hierbas que con -- ella puedan convivir y, sobre esta base, hacer un diseño de la -- estructura molecular adecuada (184). De acuerdo con este últi-- mo método los ensayos de efectividad de un nuevo herbicida de-- berán iniciarse con experiencias "in vitro" frente a prepara-- dos enzimáticos purificados, orgánulos subcelulares y/o teji-- dos u órganos aislados. Posteriormente, las experiencias habrán -- de extenderse a plantas completas, seleccionando especies sig-- nificadas de acuerdo con las claves ya establecidas de posibles -- coexistencias. Esta conjunción de ensayos "in vitro" e "in vi-- vo" evitará rechazar estructuras que siendo efectivas en éstos -- no lo son en aquéllos por razones de absorción, traslocación, -- etc., a lo mejor subsanables con modificaciones secundarias. -- Finalmente, en los herbicidas de pre-emergencia habrá que tes-- tar su retención y degradabilidad en el suelo, utilizando para -- ello una gama variada de éstos.

#### Herbicidas que actúan sobre la actividad fotosintética.

Los primeros antecedentes del empleo de compuestos que ac-



túan sobre el proceso de la Fotosíntesis datan de 1919, en que Warburg hizo uso del fenil-uretano como inhibidor del desarrollo de microorganismos fotosintéticos (185). Sin embargo, la descripción de la acción selectiva de los N-fenilcarbanatos, y su empleo como herbicidas, no fué efectuada hasta 1945 por Templeman y Sexton (186), que en ese sentido pueden considerarse como los introductores de este tipo de herbicidas en la práctica agronómica, y no fué hasta 1956 cuando se apuntó la acción inhibidora de los derivados de la urea a nivel de la cadena de transporte electrónico de la Fotosíntesis (187).

La década de los años 1960-1970 fue decisiva para el desarrollo de la amplia gama descrita de herbicidas fotosintéticos, ritmo que aun continua, de tal forma que bien puede decirse que mas de la mitad de los herbicidas actualmente en uso, inciden de una u otra forma sobre el proceso de la Fotosíntesis. A ello ha contribuído, por un lado, la extraordinaria sutileza de la maquinaria fotosintética, que la hace especialmente sensible, de forma selectiva, a la acción de factores extraños y, por otro, a que por ser la Fotosíntesis un proceso estrictamente vinculado a la vida vegetal, el riesgo para la vida animal aparece minimizado. Sin embargo, con excepción de los herbicidas derivados de la fenil-urea y algunos casos más, no se habían efectuado con anterioridad a esta década unos estudios bioquímicos y fisiológicos en profundidad que aclarasen el mecanismo y lugar exacto de actuación de este grupo de herbicidas. Revisiones muy completas sobre estos aspectos han sido efectuadas por Losada y Arnon (188), Avron y Sharit (189), Izawa y Good (190), Good e Izawa (191), y Moreland y Hilton (192).

Dada la complejidad del proceso fotosintético, no debe resultar extraño que las posibilidades de actuación de los herbicidas sobre el mismo sean muy heterogéneas. En este sentido se pueden dividir en aquéllos que actúan de forma directa sobre sus distintas etapas — cadena de transporte electrónico, síntesis de ATP, y asimilación de  $\text{CO}_2$ —, y los que lo hacen indirectamente, bien induciendo la destrucción de los pigmentos fotosintéticos, bien interfiriendo la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, bien distorsionando los cambios gaseosos de carbónico y oxígeno entre la planta y el medio ambiente. Otro criterio de clasificación (192) es en tres grandes grupos: herbicidas que interfieren en la estructura, integridad y desarrollo del cloroplasto, que inhiben los procesos metabólicos que conducen a la síntesis de productos de asimilación, y que alteran los procesos fotoquímicos y de transporte que intervienen en la transformación de la energía radiante en potencial energético y reductor.

Una de las funciones atribuidas a los pigmentos carotenoides de los sistemas fotosintéticos — fundamentalmente  $\beta$ -caroteno en los cloroplastos— es, como ya se indicó, la de servir de agentes protectores contra la oxidación por el  $\text{O}_2$  de las moléculas de clorofila fotoexcitadas. En este proceso el  $\beta$ -caroteno capta el oxígeno pasando a una forma epóxido, teniendo lugar en una fase oscura posterior la deepoxidación a  $\beta$ -caroteno por una reacción enzimática que, junto con la anterior, completa el ciclo de protección de la clorofila (193). Ciertos herbicidas, no precisamente significados por su acción frente al proceso fotosintético propiamente dicho — especialmente heterociclos piridínicos o de otro tipo, como el amitrol y el pirclor— inhiben la síntesis de carotenoides y, en consecuencia,

el mantenimiento del "pool" de clorofila del aparato fotosintético (194). La acción es similar a la demostrada posteriormente (195) para los antibióticos cloramfenicol y actinomicina D, que inhiben la síntesis de  $\beta$ -caroteno, y en menor grado de xantofilas, en hojas de guisante, lo que indica que esta síntesis depende de los ribosomas 70S cloroplastídicos.

Aunque habitualmente la inhibición que algunos herbicidas producen en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas es una acción secundaria derivada de un efecto primario sobre la actividad fotosintética, con una limitación en la producción del ATP necesario para aquéllas (164), en algunas ocasiones ocurre lo contrario. Algunos herbicidas, sobre todo los de efecto auxínico, son capaces de alterar el proceso normal de transcripción, es decir, de síntesis de RNA dirigida por DNA; cuando esto ocurre con el genoma propio del cloroplasto, se altera la síntesis de las proteínas del mismo con inhibición de la actividad fotosintética.

La inhibición de la "fotosíntesis neta" por una amplia gama de herbicidas se atribuye usualmente a un efecto directo sobre las propias reacciones fotosintéticas; sin embargo, indirectamente aquélla puede verse afectada de forma simultánea -- por un cambio en la apertura de los estomas. Un incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$  en el interior de las hojas, consecuencia de una disminución en la capacidad de asimilación del mismo por defecto en la síntesis de NADPH y ATP, conduce a un cierre inducido de los estomas, quedando de esa forma dificultados los cambios gaseosos con el medio exterior. En estos casos, sin embargo, el efecto del cierre de los estomas sobre la capacidad fotosintética de la planta queda minimizado frente al mucho mayor derivado de la acción primaria (196). Sin embargo, -

e imitando la acción de las hormonas naturales tipo auxina y ácido abscísico, los herbicidas del grupo de los ácidos fenoxialquil carboxílicos provocan un cierre de estomas y una reducción de la tasa de transpiración, lo que podría explicar su inhibición de la "fotosíntesis neta" (197); un hecho paralelo ha sido observado con el empleo de antitranspirantes a fin de reducir las pérdidas excesivas de agua en los lugares de clima seco.

Los herbicidas que actúan directamente sobre las reacciones fotosintéticas propiamente dichas constituyen el grupo más importante y numeroso, siendo los más interesantes de entre ellos los que inciden sobre el proceso de transporte electrónico, bien porque inhiban algún paso del mismo, bien porque actúan secuestrando los electrones transportados. Como consecuencia de ello interfieren la producción de NADPH, ATP, o de ambos a la vez, lo que repercute en una asimilación normal de  $\text{CO}_2$ ; por esta razón, muchos herbicidas citados como inhibidores de la síntesis de ATP o de la fijación de  $\text{CO}_2$  lo son, en realidad, de la cadena de transporte electrónico. La elucidación del punto de actuación dentro de ésta es un problema que se encuentra en estado incipiente, derivado de las grandes lagunas que actualmente existen sobre la secuencia e interrelaciones de los componentes de dicha cadena. Precisamente, gran parte del conocimiento adquirido sobre el lugar de actuación de distintos compuestos deriva de estudios básicos sobre la cadena de transporte, en los que aquéllos se han utilizado como armas de trabajo; por esta razón, la mayor parte de los compuestos utilizados en los mismos sólo tienen un interés teórico ya que, por su compleja síntesis, por no haber salido de las experiencias "in vitro" sobre cloroplastos o fracciones subcloro-

plásticas o, por encontrarse aún en fase experimental, no han saltado al terreno aplicado. En contrapartida, compuestos de ya dilatado historial práctico, han venido siendo postergados en su estudio básico, con lo que su utilización en razón de factores tales como selectividad, degradación, efectividad, forma de aplicación, etc., no pasa del terreno empírico.

En cualquier caso, el análisis del punto de actuación de un herbicida que incide en la cadena de transporte electrónico de la Fotosíntesis se encuentra ineludiblemente vinculado al empleo de los llamados "donadores" y "aceptores" artificiales de electrones, por lo que no está de más que hagamos una rápida revisión del estado actual de esta cuestión.

El uso de "donadores" y "aceptores" artificiales de electrones ha constituido el método más utilizado para dilucidar las complejas cadenas de transporte de las membranas biológicas. Su empleo en Fotosíntesis data de la clásica experiencia en que Hill demostró que las sales férricas inducían, bajo --iluminación, un desprendimiento de  $O_2$  por preparados subcelulares de hojas; desde entonces, esta herramienta de trabajo --ha suministrado amplia información sobre la secuencia de los elementos integrantes de la cadena de transporte fotosintético, sus potenciales redox, posición topográfica de los mismos dentro de las membranas lamelares, "lugares de conservación --energética", etc. Revisiones sobre el particular han sido publicadas por Kandler (198), Avron y Neumann (199), Trebst (200) y Hauska (201).

El uso de estos compuestos tiene que venir regulado por una serie de principios básicos. En primer lugar, han de exhibir potenciales redox encuadrados por los límites máximo y mí-

nimo en que se desarrolla el proceso de transporte electrónico entre el  $H_2O$  y el  $NADP^+$ , y que son  $> +500$  mV para el componente P-680 del Fot.II, y  $< -600$  mV para el aceptor primario de electrones X del Fot.I; por otro lado, de acuerdo con el punto en que se les quiera hacer incidir, no conviene olvidar que el aceptor primario de electrones Q del Fot.II tiene un potencial redox de  $-35$  mV, siendo de  $+450$  mV el del componente P-700 del Fot.I. Esto nos viene a decir que, sobre una base termodinámica, el Fot.I podrá reducir a cualquier compuesto con un potencial redox mas positivo que  $-600$  mV, y oxidará a todo aquél -- que lo tenga mas negativo de  $+450$  mV; análogamente el Fot. II reducirá compuestos con una positividad superior a  $-35$  mV, y -- podrá oxidar a los que exhiban un potencial redox mas negativo que  $+1000$  mV. De ésto se deduce que algunos compuestos -- los -- que tengan un potencial redox mas positivo que  $-35$  mV-- podrían aceptar electrones de ambos fotosistemas, mientras que otros -- -- mas negativos que  $+450$  mV-- podrían donarlos a los mismos; -- más aún, un mismo compuesto podría actuar como aceptor o como donador dentro de un mismo fotosistema, según las circunstancias, o como aceptor en uno y donador en otro, catalizando entonces un flujo electrónico cíclico. En consecuencia, y en ausencia de otros factores de selectividad, la utilización de -- uno de estos compuestos con una función determinada, en un punto concreto, tendrá que venir acompañada del empleo de inhibidores que bloqueen el lugar de actuación no deseado.

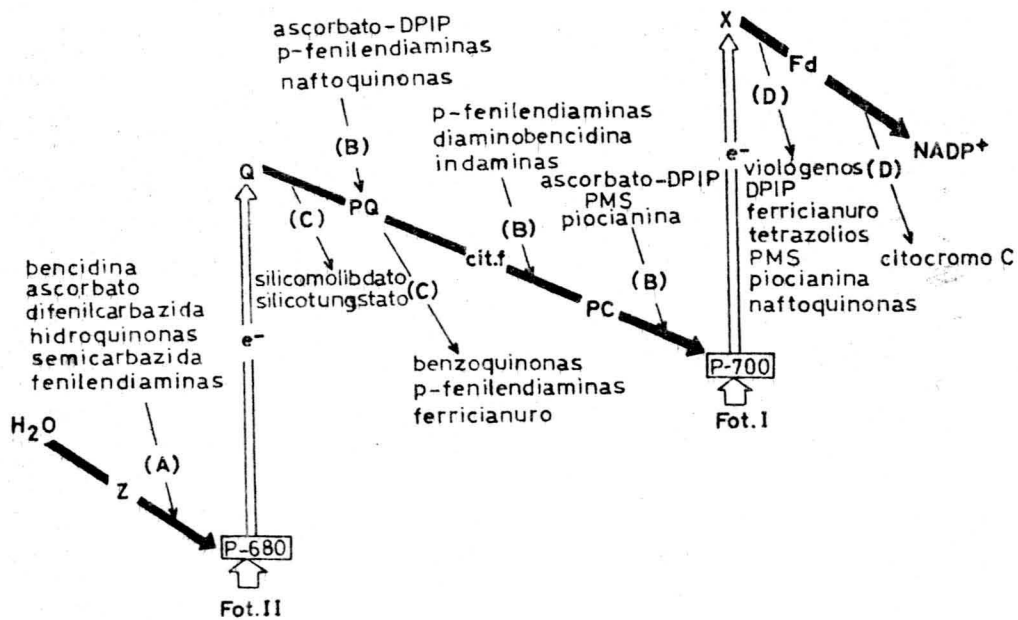
Otro procedimiento de dirigir selectivamente un proceso -- de donación o captación electrónica hacia un fotosistema u otro, es el empleo de una iluminación selectiva. Una radiación por -- encima de  $700$  nm pondrá en funcionamiento sólo el Fot.I, mientras que por debajo de la misma serán operativos ambos sistemas;

un margen amplio de longitud de onda, que se extienda hasta el rojo lejano, provocará la aparición del fenómeno de "intensificación" del transporte electrónico anterior (43).

Sin embargo, tan importante como las consideraciones termodinámicas, son las derivadas de la accesibilidad de los candidatos a "donadores" o "aceptores" de electrones, a los puntos en que han de actuar. Cuando se trata de cloroplastos íntegros se plantea primeramente la permeabilidad del compuesto en cuestión a las envolturas cloroplastídicas. Mas complejo aún, y esto afecta tanto a cloroplastos íntegros como a cloroplastos rotos y fracciones subcloroplásticas, es la accesibilidad a la intimidad de las membranas tilakoidales, donde tienen lugar -- las reacciones de transporte. En un sistema polifásico, como el que aquí se discute, las solubilidades relativas de los compuestos redox en las fases acuosa y lipídica juega un papel decisivo.

Fundamentalmente, y tal como muestra el siguiente esquema, cuatro son las zonas de entrada o salida de equivalentes de reducción dentro de la cadena de transporte electrónico fotosintético: donación de electrones al Fot.II (A), donación de electrones al Fot.I (B), aceptación de electrones del Fot.II (C), y aceptación de electrones del Fot.I (D).

El uso de "donadores" de electrones a nivel del Fot.II -- (A) obliga a la destrucción previa de la capacidad de cesión de electrones del donador natural  $H_2O$ . Como veremos, esto se puede conseguir con varios compuestos, de los que la hidroxilamina es el más adecuado por la ausencia de efectos secundarios; un calentamiento moderado del cloroplasto a 40-50°C destruye selectivamente su capacidad de escisión del  $H_2O$  sin necesidad



de introducir agentes químicos adicionales (202). Como donadores se han utilizado la bencidina, ascorbato, difenilcarbazida, hidroquinonas, semicarbazida, fenilendiaminas, etc., algunos de los cuales presentan problemas de inespecificidad porque, dado su bajo potencial redox, son capaces de actuar también como donadores electrónicos del Fot. I. Otros, por el contrario, no permiten analizar la fosforilación concomitante con el proceso de transporte, ya que ellos, o sus productos de reacción, interfieren en la síntesis de ATP. En este sentido la bencidina constituye un donador ideal ya que, por un lado, su alto potencial redox de +600 mV lo hace muy específico del Fot. II, y por otro, el transporte electrónico al NADP<sup>+</sup> transcurre con una estequiometría de fotofosforilación similar a la de la oxidación del H<sub>2</sub>O (203), lo que se debe a su capacidad de liberar H<sup>+</sup> al oxidarse.



Aunque para estos compuestos se han descrito distintos lugares de cesión electrónica en el intervalo  $H_2O$ -Fot.II, lo cierto es que las diferencias observadas en efectividad deben mas bien vincularse a una accesibilidad distinta a un mismo punto de acción. La operatividad de las cadenas de transporte inducidas por donadores de electrones del Fot.II se analizan generalmente a nivel del Fot.I, hacia el cual se dirige el flujo electrónico, tal como más adelante se indica. Sólo se han descrito dos sistemas con intervención exclusiva del Fot.II, siendo en uno la difenilcarbazida el donador y el diclorofenol indofenol (DPIP) el aceptor de electrones (204), y en el otro la semicarbazida y el ferricianuro (205), respectivamente; en ambos casos el seguimiento de la reacción se hace colorimétricamente viendo el ferricianuro desaparecido o el DPIP reducido originado. La aplicabilidad de ambos a cloroplastos intactos es, por razones de permeabilidad, limitada.

El empleo de donadores de electrones al Fot.I (B) se asocia siempre a una detención del flujo electrónico procedente del Fot.II mediante un inhibidor del mismo, por ejemplo, como luego veremos, el DCMU. Como donadores a este nivel se han descrito diversas p-feniléndiaminas sustituidas, diaminobencidina, indaminas y, sobre todo, la mezcla ascorbato-DPIP, en la que el auténtico donador es el indofenol, mientras que el ascorbato se usa para mantener en forma reducida cantidades catalíticas de aquél. Todos ellos son válidos cuando se utilizan cloroplastos rotos, pero con éstos intactos sólo son operativos las p-fenilendiaminas y el ascorbato-DPIP. El punto exacto de inserción en la cadena de transporte puede variar de uno a otro donador, y de acuerdo con ello tener o no lugar una fosforilación acoplada, con la plastoquinona como "lugar de --

conservador de energía". Parte de la reacción con el sistema - ascorbato-DPIP resulta insensible al CNK (206), como ya veremos un inhibidor de la plastocianina, de lo que se deduce una interacción directa, no fosforilante, con el fotocentro; por el contrario, parte resulta sensible al CNK y a la dibromotim<sub>o</sub> quinona (DBMIB) que, como más adelante se describe, es un anta<sub>g</sub>onista de la plastoquinona, observándose entonces una fotofos<sub>o</sub>forilación acoplada. Análogamente, la reducción con las p-fe--nilendiaminas sustituidas tiene lugar fundamentalmente a nivel de plastocianina, y sólo en muy pequeña proporción es inhibida por la DBMIB, por lo que la fosforilación asociada es despre--ciable (207). No obstante, si bien ésto es cierto para las p-fe--nilendiaminas N-sustituidas, por ejemplo la N,N,N',N'-tetrame--til-p-fenilendiamina (TMPD), no lo es con las C-sustituidas, - como la 2,3,5,6-tetrametil-p-fenilendiamina, que exhiben una - patente fosforilación paralela con una estequiometría mitad de la que se obtiene en la cadena completa  $H_2O \longrightarrow NADP^+$  (200); ésto se debe a que, a diferencia de las N-sustituidas, las C-sustituidas ceden por oxidación, al igual que la plastoquinona, electrones y  $H^+$ , creándose así un "lugar de conservación ener--gética" adicional.

Cuando se utilizan cloroplastos intactos, la mejor forma de medir el nivel de transporte electrónico es observando, al electrodo de Clark, la toma de  $O_2$  que tiene lugar cuando se -- emplea como aceptor de electrones del Fot.I un compuesto auto--oxidable de bajo potencial redox, como el metilviológeno. En - este caso conviene tomar precauciones para que el radical su--peróxido  $O_2^-$ , que se forma en el proceso de autooxidación (208), no evolucione por una reacción de dismutación hacia la forma--ción de  $O_2 + H_2O_2$  y, a una última descomposición de éste en --

$H_2O$  y  $O_2$ , en cuyo caso el  $O_2$  tomado en la reacción de autooxidación se vería disminuído en sus 3/4 partes por el desprendido en este proceso. La dismutación del radical  $O_2^-$  puede tener lugar espontáneamente en medio ácido, pero es también catalizada por una superóxido-dismutasa cloroplastídica que contiene Cu y Zn. Con cloroplastos rotos una forma adicional de medida de la reacción es observar espectrofotométricamente la reducción del  $NADP^+$ , para lo cual resultará necesaria la adición de ferredoxina exógena.

El desprendimiento de  $O_2$  que tiene lugar en el cloroplasto a expensas de un "acceptor" artificial de electrones, vía -- Fot. II o Fot. I, se conoce como "reacción de Hill". La medida de su actividad se hace generalmente por determinación polarográfica del  $O_2$  desprendido. No obstante, como dijimos más arriba, si el acceptor es autooxidable tiene lugar por una reacción de Mehler (209) la formación del radical superóxido  $O_2^-$ , que se dismuta posteriormente a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , con un consumo neto de  $O_2$ ; en experiencias con cloroplastos rotos la adición de catalasa provocará la descomposición del peróxido, y entonces el oxígeno desprendido se contrabalanceará exactamente con el tomado del medio. Alternativamente, si el acceptor de electrones experimenta un cambio en su espectro de absorción a consecuencia de la reducción, el ritmo del transporte electrónico podrá ser susceptible de ser seguido colorimétricamente.

Como "acceptores" de electrones a nivel del Fot. II (C) se utilizan preferentemente compuestos de carácter lipofílico de alto potencial redox; los más usados son distintas benzoquinonas y p-fenilendiaminas que, por sus efectos secundarios, han de emplearse en cantidades catalíticas que se mantienen en --

forma oxidada con un exceso de ferricianuro (89). Por lo que respecta a este último su lugar concreto de actuación ha sido objeto de una gran controversia. Actualmente se admite --- que el ferricianuro es impermeable a las cubiertas cloroplastídicas, hasta el punto que su grado de reducción en la reacción de Hill se utiliza como índice determinante de la integridad de la preparación; por otro lado, su carácter hidrofílico lo haría más apto para reducirse a nivel de los centros de reacción Fot.I, mas superficiales, de las "lamelas" estromáticas. Sin embargo, el porcentaje en verdad pequeño de cloroplastos rotos que ineludiblemente acompañan a la preparación mas cuidadosa de cloroplastos intactos, conlleva la suficiente desorganización granal para que tenga lugar una activa reacción de Hill a nivel del Fot.II con el ferricianuro como "aceptor" de electrones (207), especialmente intensa debido al exceso en que, como arriba dijimos, éste se utiliza; esta reducción del ferricianuro por el Fot.II se vé optimizada, a diferencia de su reducción por el Fot.I, cuando se opera por debajo de pH 8.0 (89).

El lugar de captación electrónica de estos "aceptores" es a nivel de la plastoquinona, como lo prueba el que el proceso sea insensible a la DBMIB; en consecuencia, el acoplamiento fotofosforilante tiene lugar con una estequiometría limitada, derivada de la transferencia protónica procedente del  $H_2O$  (200). Por el contrario, el proceso resulta inhibido por el DCMU, que actúa entre los aceptores primario y secundario del Fot.II. Una reacción insensible al DCMU es la que tiene lugar cuando los ácidos silicomolibdico o silicotúngstico son utilizados como aceptores, lo que se debe a que con ellos la admisión de electrones ocurre directamente del acep

tor primario Q; inexplicablemente, sin embargo, con estos compuestos no se observa síntesis alguna de ATP (210).

Dejando a un lado el caso ya discutido del ferricianuro, ideal como "acceptor" de electrones del Fot.I (D) en circuns--tancias de cloroplastos rotos sin que se haya dañado su estruc--tura granal, otros compuestos como el DPIP, sales de tetrazo--lio y quinonas lipofílicas -- tipo antraquinonas y naftoquino--nas alquiladas-- pueden usarse como tales; las quinonas, no -- obstante, tienen el inconveniente de ser autooxidables y de catalizar un proceso de flujo electrónico cíclico (211). Otro buen acceptor es el citocromo c, aunque necesita la adición de ferredoxina para compensar su pérdida por rotura del cloroplas--to. Finalmente, las sales de bipyridilium como el MV (paraquat) y el diquat son unos magníficos aceptores de electrones a ni--vel de ferredoxina, con la que compiten, sufriendo una inmedia--ta reacción de Mehler subsiguientemente a su reducción (212). Si exceptuamos los indofenoles, que tienen un efecto secunda--rio desacoplante, todos estos compuestos producen una activa fotofosforilación concomitante con una estequiometría  $ATP/2e^-$  superior a la unidad, lo que indica la participación de los -- dos lugares naturales de conservación energética (200).

Un párrafo adicional merecen los compuestos que actúan -- simultáneamente como "aceptores" y "donadores" de electrones, por su capacidad de poder catalizar un flujo cíclico de los -- mismos. Teóricamente puede esperarse tres tipos de flujo cí--clico: uno alrededor del Fot.I mediante un compuesto que ac--túe como donador electrónico a nivel (B) y acceptor a nivel -- (D), un segundo alrededor del Fot.II con puntos de actuación respectivos a los niveles (A) y (C), y uno último alrededor -- de ambos fotosistemas, con un lugar de donación a nivel (A) y

de captación a nivel (D). En cualquier caso, el flujo electrónico no podrá jamás ser medido directamente, y sólo a través de los datos que suministre la fotofosforilación acoplada, si la hay, podremos tener noticias de su operatividad.

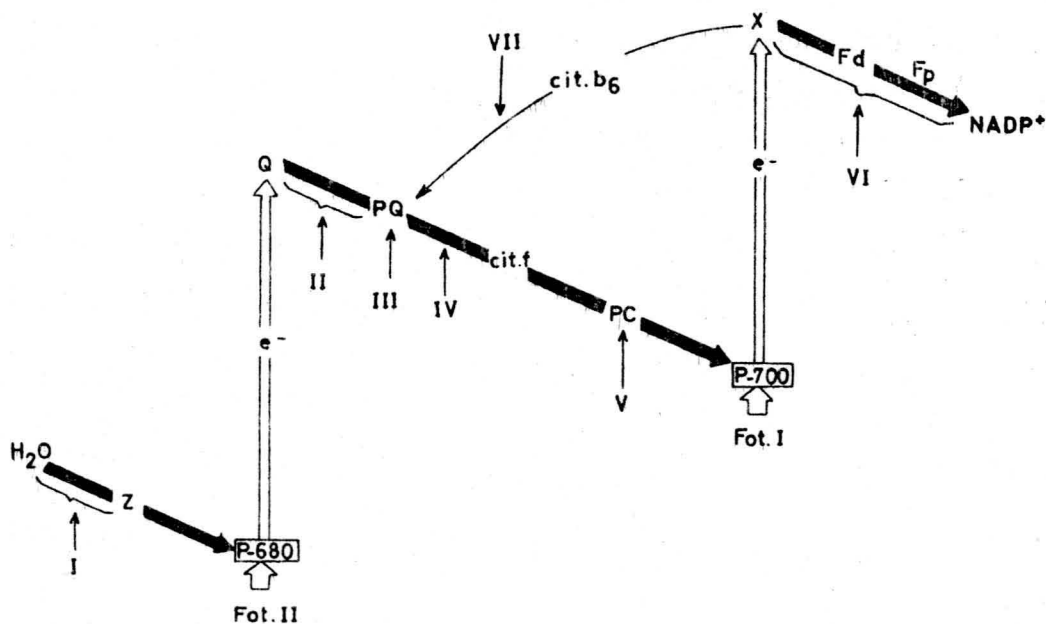
Algunas naftoquinonas, como la menadiona, que tienen un potencial redox inferior a los 0 V son capaces de inducir un activo flujo electrónico alrededor del Fot.I (211); ésto implica que la plastoquinona constituye el punto de entrada de los electrones en la cadena principal, como se deduce de su inhibición por la DBMIB. Otros compuestos como el diaminodureno, catalizan un flujo cíclico que no es sensible a la DBMIB, pero lo es al CNK, lo que indica una inserción a nivel de plastocianina. Finalmente, la fenazina metasulfato (PMS) y la piocianina son insensibles a la DBMIB y al CNK (206), conectando por tanto directamente el aceptor primario de electrones X con su oxidante P-700; en estas circunstancias el potencial redox alcanzado por la PMS y la piocianina reducidas es lo suficientemente bajo como para que pueda ocurrir una oxidación por el  $O_2$ , por lo que la reacción hay que efectuarla en anaerobiosis. En el primer caso existe una fosforilación acoplada con la participación de un "lugar nativo de conservación de energía", el correspondiente a la plastoquinona. Esto no ocurre con los otros dos, en los que la existencia de una fotofosforilación concomitante ha de venir forzosamente vinculada a la propia naturaleza del aceptor-donador de electrones y, por tanto, a la creación de un "lugar artificial de conservación energética" (200); ésto ocurrirá cuando dicho compuesto ceda  $H^+$ , además de electrones, en el proceso de oxidación, --siendo de ellos la PMS y la piocianina los que dan una mayor tasa de fotofosforilación. En cualquier caso, la individuali-

zación de un flujo cíclico alrededor del Fot. I habrá de hacerse impidiendo el flujo electrónico acíclico procedente del Fot. II, por ejemplo, con DCMU.

La existencia de un flujo electrónico cíclico inducido al rededor del Fot. II, o conjuntamente alrededor de ambos fotosistemas, es una cuestión mucho menos estudiada. Dejando a un lado algunas insinuaciones en tal sentido, recientemente Yocum - (213) ha encontrado que cloroplastos inhibidos con CNK y  $\text{NH}_2\text{OH}$  —para evitar el flujo de electrones hacia el Fot. I e inhibir el aporte de electrones del  $\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente— exhiben en presencia de p-fenilendiamina oxidada una fotofosforilación cíclica que, ineludiblemente, ha de derivarse de un flujo electrónico cíclico alrededor del Fot. II; la transferencia electrónica a la diamina debe tener lugar desde la plastoquinona, pues el proceso es inhibido por la DBMIB.

Izawa (214) describe hasta seis posibles lugares de actuación para algunos compuestos reseñados como inhibidores de la cadena de transporte fotosintético, y que se indican en el siguiente "esquema en Z" de la misma; a ellos agregamos nosotros un séptimo correspondiente al flujo electrónico cíclico.

La hidroxilamina,  $\text{NH}_3$ , metilamina y Tris, todos ellos desacoplantes de la síntesis de ATP a bajas concentraciones, han sido descritos a concentraciones mayores como inhibidores del transporte electrónico a nivel del punto I, concretamente interfiriendo con el sistema que desdobla la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ ; parecen actuar sobre los átomos de Mn, pero mientras los tres primeros provocan una pérdida del mismo al medio, esto no ocu-



re con el Tris (215). Todos muestran actividad sólo a pH superior al pK del correspondiente compuesto, lo que indica que la forma no protonada es la activa. Los cloroplastos así tratados son capaces de oxidar vía Fot. II a una serie de donadores de electrones (ascorbato, bencidina, etc.), cosa que no le ocurre a los cloroplastos tratados con la m-clorofenilhidrazona del cianuro de carbono (CCCP), que actúa también en I pero en este caso a nivel del donador primario de electrones del Fot. II, o en un punto muy directamente vinculado a éste (62).

El punto II constituye la zona donde se piensa actúan la mayor parte y, desde luego, los más significados herbicidas, inhibidores de la cadena de transporte fotosintético. El ejemplo más significativo de ellos lo constituye el diuron o DCMU, un derivado clorado de la fenil-urea que, junto



con su análogo CMU o monurón, fueron introducidos en 1956 por Wessels y Van der Veen (187) como potentes inhibidores del -- transporte electrónico de la Fotosíntesis. La identificación de su punto exacto de actuación ha sido objeto de numerosos -- estudios, y aún así no ha sido resuelto a satisfacción de todos. En presencia de diurón queda inhibida la fotoreducción -- de plastoquinona, cit. f y plastocianina, al mismo tiempo que se incrementa la fluorescencia debida al aceptor primario Q -- del Fot. II, lo que indica su estado de total reducción; por otro lado, no se afecta la fotofosforilación cíclica, siendo operativa la fotoreducción del  $\text{NADP}^+$  en presencia de la mez--cla ascorbato-DPIP como donador artificial de electrones. Todos estos hechos llevaron a Duysens y Ames (216) a proponer que el DCMU bloquea la transferencia electrónica entre el aceptor primario Q y el "pool" de plastoquinona. No obstante, Renger ha propuesto un punto adicional de actuación a nivel del lado oxidante del Fot. II, desactivando el sistema de rotura del  $\text{H}_2\text{O}$  (217).

Aunque la acción de diferentes compuestos de estructura diversa se supone análoga a la del diurón, su lugar exacto de actuación en relación al Fot. II no está del todo confirmado. Entre ellos se incluyen otros muchos derivados de la fenil-urea (metoxurón, cloroxurón, etc.), triazinas (simazina, atrazina, prometrina, etc.), aril-carbamatos (profam, fenmedifán, SWEP, etc.), acilcloroanilidas (propanil, cipromid, etc.), derivados del uracilo (bromacil, terbacil, etc.), tiocarbamatos (EPTC, dialato, etc.), y algunos otros más. Como puede verse, en este grupo aparecen herbicidas de uso común, con los que -- resulta patente un descenso de la "fotosíntesis neta" de las plantas tratadas. Esta diversidad estructural, unido a la in-

cidencia en una zona común de la cadena de transporte electrónico, ha promovido la búsqueda de relaciones estructurales entre todos estos inhibidores de la reacción de Hill; coeficientes de partición, características de polaridad, factores estéricos, densidad electrónica, y otras circunstancias, han sido recogidas por Büchel (218) en la elaboración de ecuaciones y análisis de coeficientes de regresión, en un intento de encontrar la contribución de estas propiedades a la expresión del carácter inhibitor.

Un buen inhibidor de Hill ha de tener una amplia zona molecular de naturaleza lipofílica, junto con una función polar que permita el anclaje de la molécula al punto de actuación -- considerado como un enlace amídico-CO-NH- de una proteína estratégicamente situada. Por otro lado, todos los inhibidores de Hill se caracterizan por poseer un grupo NH unido a un átomo de C deficiente electrónico; en estas circunstancias la --- unión podría tener lugar mediante una transferencia de carga -- que ocurriría cuando el par electrónico  $2s^2$  del N del herbicida interaccionara con el grupo CO del enlace amídico de la proteína, lo que adicionalmente podría también tener lugar entre el N de este enlace con el C deficiente electrónico del herbicida. Otra hipótesis (219) supone que, dada la reversibilidad de estos inhibidores, la unión ha de ser débil, probablemente por puentes de hidrógeno; sustituyentes favorables al establecimiento de estos puentes son los hidrógenos amida e imino, el oxígeno de los grupos éster y carbonilo, el nitrógeno de los anillos triazínicos, etc.

Un caso especial lo constituye la inhibición por la o-fenantrolina. El carácter quelante de este compuesto sobre el --



$\text{Fe}^{2+}$  hizo pensar en un efecto a nivel del cit. f. Sin embargo, su actuación aparentemente similar a la del diurón y los otros compuestos reseñados, y la desaparición del efecto inhibitor —por simple lavado de los cloroplastos —cosa impensable en un proceso de quelación, que conduciría a un arrastre del metal —complejado— ha hecho abandonar esta hipótesis (220). En la actualidad existen grandes discrepancias sobre su lugar de actuación.

Una inhibición a nivel del punto III es sólo ejercida por la dibromotimoquinona (DBMIB), y algunas otras quinonas, introducidas por Trebst y col. (221) como antagonistas de la plastoquinona. De ello se deduce una imposibilidad de la transferencia electrónica de la zona del Fot. II a la del Fot. I, demostrada por la total operatividad de las reacciones que dependen sólo del primero —reducción del ferricianuro por cloroplastos rotos— o del segundo —reducción del metilviológeno con el sistema ascorbato-DPIP como donador de electrones—, y la inhibición de los que dependen de ambos —reacción de Hill con  $\text{NADP}^+$  como aceptor electrónico—. El punto exacto de actuación parece ser la salida de electrones de la plastohidroquinona hacia el cit.f, y no la propia reducción de aquélla, como se deduce del aumento gradual de la fluorescencia del "quencher" Q por la acción de este inhibidor (207); ello se explicaría como una admisión inicial de electrones por el "pool" de plastoquinona, que se vería rápidamente disminuída a medida que éste se —redujese, sin posibilidad de reoxidarse. La inhibición por la DBMIB es revertida por las p-fenilendiaminas oxidadas —forma diimina— y algunas quinonas, lo que se debe a que estos compuestos pueden penetrar la membrana tilakoidal, ser allí reducidos por la plastohidroquinona, y continuar ellos la transfe-

rencia electrónica al cit.f (222). Bering y Loach (223) han descrito recientemente un segundo lugar de actuación para la DBMIB cuando se usa a altas concentraciones, a nivel de competencia con una quinona ligada que se ha sugerido, como ya se apuntó anteriormente, pueda ser el aceptor primario Q de electrones del Fot. II.

El punto IV de inhibición es totalmente nebuloso, y ha sido descrito sólo para justificar el lugar de actuación de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC). Al igual que la dibromotimoquinona, esta carbodiimida suprime el flujo electrónico entre los Fot. II y I, siendo también inócua en las reacciones de transporte que dependen sólo del primero; sin embargo, y a diferencia de la DBMIB, sí queda inhibida la fotooxidación por el Fot. I del diaminodureno. Este comportamiento recuerda mucho el efecto del CNK sobre la plastocianina, pero la ausencia de interacciones químicas entre ésta y el EDAC parece sugerir mas bien una acción sobre un hipotético componente existente entre la plastoquinona y el cit.f (224).

Más interesante es la inhibición a nivel del punto V. La poli-L-lisina, un polímero de elevado p.m. de este aminoácido, es capaz de formar agregados con polianiones, entre ellos la plastocianina fotosintética. En este contexto, si cloroplastos colocados en un medio de baja fuerza iónica --necesaria para que las estructuras lamelares se disocien y se haga accesible la plastocianina-- se someten a la acción de la poli-L-lisina, los cloroplastos hinchados recuperan su aspecto normal, pero pierden la capacidad de fotoreducir el  $\text{NADP}^+$  a causa de estar cortada la transferencia electrónica

entre el cit.f y el P-700 (225). El efecto secundario que la poli-L-lisina ejerce como desacoplante de la síntesis de ATP no se manifiesta con el CNK, otro conocido inhibidor del transporte electrónico fotosintético a nivel de la plastocianina, con la cual interacciona dejando Cu soluble en el medio (226). El mismo punto de actuación tienen algunas sales mercuricas, aunque en este caso se observan a mayores concentraciones claros efectos secundarios a nivel de ambos fotosistemas (227).

Como punto VI de inhibición hay que entender el lado reductor del Fot.I. En esta zona se sitúa el punto de actuación de la 1,3-disalicilidenpropanodiamina (DSPD), un agente quelante del hierro, que como tal es capaz de interferir con las reacciones dependientes de ferredoxina (107), y el pirofosfato, un inhibidor de la transferencia electrónica, en uno u otro sentido, entre ferredoxina y  $\text{NADP}^+$ , seguramente por impedir la formación del complejo ferredoxina-ferredoxin  $\text{NADP}^+$ -reductasa necesario para la misma (87).

Un carácter singular, por pertenecer al flujo electrónico cíclico, tiene el punto VII de inhibición, siendo la antimicina A el compuesto que mas claramente incide sobre él. Su lugar de actuación es aún indeterminado, pero existen fuertes argumentos para situarlo entre el cit. $b_6$  y la plastoquinona; en este sentido constituye un inhibidor específico de la fotofosforilación cíclica, y como tal ha prestado magníficos servicios en la elucidación del papel de ésta en el suministro de ATP al vegetal (112). No obstante, no conviene perder de vista que por debajo de la neutralidad empieza a manifestarse en este compuesto su clásico carácter desacoplante de la síntesis de ATP.

Un segundo grupo de herbicidas que inciden sobre la cadena de transporte electrónico de la Fotosíntesis son los que actúan secuestrando los electrones que fluyen desde el  $H_2O$  hasta el  $NADP^+$ ; con ellos, a diferencia de los inhibidores anteriores, - el flujo electrónico continúa, a veces incluso con mayor intensidad, como se puede demostrar por el ritmo de la fosforilación acoplada o por el  $O_2$  desprendido, cuando circunstancias anejas no impidan o enmascaren uno u otro. En este sentido estos herbicidas son auténticos aceptores de electrones en el sentido anteriormente expuesto, pero presentan como carácter adicional el - de su fitotoxicidad. De ellos los más interesantes son las sales de bupiridilo, derivados bicuaternarios cuya fitotoxicidad está asociada a la presencia de átomos de N en las posiciones - 2.2'- (diquat), 4.4'- (paraquat) o 2.4'-, a que posean un potencial redox comprendido entre -300 y -500 mV -pero no inferior para evitar la imposibilidad de su reducción-, y a la existencia de grupos químicos adicionales que impidan, como ocurre con el bencil-viológeno, la absorción por la planta y su traslocación al cloroplasto, donde son reducidos por el Fot.I.

Constituyen el grupo de herbicidas cuyo mecanismo de acción está más exhaustivamente estudiado (228, 229), presentando unas características tan particulares que se piensa pueden hacer cambiar profundamente las técnicas de protección de cosechas. En solución se encuentran completamente disociados en iones negativos e iones bupiridilium positivos, siendo estos últimos los -- que por captación de un electrón se transforman en radicales libres relativamente estables; en presencia de  $O_2$  éstos regeneran el ión original, produciéndose primero el radical superóxido  $O_2^-$ , y  $H_2O_2$  después. Un hecho puesto pronto de manifiesto fué que estos herbicidas sólo mostraban toxicidad en presencia de la luz,

lo que se explica en función del mecanismo expuesto, hasta el punto que los efectos del diquat quedan diferidos por un pretratamiento de la planta con un inhibidor de Hill (230). En cuanto a la especie tóxica se ha comprobado que no es ni el radical libre primeramente formado, extremadamente estable en ausencia de  $O_2$ , ni el radical superóxido, que tiene una vida extraordinariamente corta sino el  $H_2O_2$  últimamente formado, que es lo suficientemente estable para alcanzar el tonoplasto, lugar donde se inicia el efecto destructor. La destrucción de las envolturas celulares y subcelulares tiene lugar por una peroxidación de los lípidos membranales, con aumento de la concentración de dialdehído malónico en las zonas afectadas (231).

La inhibición de la formación de ATP en la Fotosíntesis puede tener tres distintos orígenes: un bloqueo del transporte electrónico, un desacoplamiento de éste con el mecanismo de síntesis, o una inhibición del propio proceso biosintético. Los compuestos que actúan sobre el primer factor ya han sido analizados, quedando los del segundo y tercero a los que se denomina, respectivamente, "desacoplantes" e "inhibidores de la transferencia energética". Estudiar la incidencia de éstos en la Fotosíntesis resulta una labor muy compleja cuando se trabaja en plantas completas, órganos o tejidos, pues el mecanismo de síntesis de ATP en este proceso resulta prácticamente similar al que ocurre en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Puesto que el cloroplasto carece de actividad respiratoria su estudio en él será mas simple, aunque siempre agravado por la posibilidad de confusión de los tres efectos mencionados y por el hecho, habitual, de que un mismo compuesto pueda actuar a mas de un nivel; especialmente resulta esto paten

te en la acción desacoplante e inhibidora de la transferencia energética, hasta el punto de haberse creado un grupo adicional de "inhibidores desacoplantes" (232).

Aunque en principio se juzgó el mecanismo de acción de los desacoplantes como una rotura de un intermediario altamente energético, a la luz de la teoría de Mitchell hay que considerarlo como una modificación de la permeabilidad de las membranas tilakoidales, que facilita el flujo iónico a través de las mismas. Los "desacoplantes" no sólo no suprimen el transporte electrónico fotosintético, sino que pueden llegar a incrementarlo en aquellos casos en que la fuga protónica hacia el exterior del "tilakoide" supere al proceso contrario de transporte hacia el interior del mismo (191); en este sentido se pueden diferenciar de los inhibidores del transporte electrónico y de los "inhibidores de la transferencia energética", que sí lo suprimen. Independientemente del amoniaco, aminas, etc., utilizados frecuentemente en experiencias "in vitro" como desacoplantes —cuando en realidad tienen otros efectos secundarios que inciden también en la síntesis de ATP; y dejando también aparte otros, como los antibióticos gramicina y valinomicina, de nulo interés agronómico, el único compuesto específicamente desacoplante que podría tener interés como herbicida es la perfluidona, una sulfonamida aromática fluorurada activa a pH por encima de la neutralidad (232).

Los "inhibidores de la transferencia energética" actúan en el proceso específico de síntesis de ATP, seguramente por interferir la formación de intermediarios altamente energéticos; esto explica la acción inhibidora que también muestran frente a la actividad ATPasa del  $CF_1$  (232). Al igual que los inhibidores del transporte electrónico, exhiben una acción



bloqueante del mismo, por lo que podrían ser objeto de confusión con ellos; no obstante, se pueden diferenciar porque en presencia de un agente que tenga actividad desacoplante, como la metil-amina, tiene lugar, al igual que ocurre con los desacoplantes específicos, una reactivación del transporte electrónico, cosa que no ocurre cuando se trata de un típico inhibidor de la cadena de transporte. Aunque operando con cloroplastos aislados un glucósido, la floridzina, y un antibiótico, el Dio-9, se comportan como típicos "inhibidores de la transferencia energética" (191), no se ha descrito hasta el presente ningún compuesto que manifieste un efecto fitotóxico a este nivel frente a plantas completas.

Los compuestos clasificados como "inhibidores desacoplantes" presentan un doble punto de actuación: al igual que los inhibidores del transporte electrónico provocan el bloqueo de éste y, concomitantemente la fotofosforilación asociada, la cual a su vez se encuentra inhibida por la acción desacoplante. Presentan como particularidad que la zona de actuación en la cadena de transporte electrónico es la vinculada al lado reductor del Fot.II, por lo que reducirán desacopladamente al  $\text{NADP}^+$  en presencia de ascorbato-DPIP como sistema donador de electrones (192); en ello se pueden diferenciar de los clásicos inhibidores del transporte electrónico a nivel del Fot.II, tipo diurón, que en estas condiciones reducen el  $\text{NADP}^+$  con síntesis paralela de ATP, y que muestran también una activa fotofosforilación cíclica en presencia de PMS.

A este grupo deben pertenecer gran número de herbicidas dados hasta ahora como desacoplantes puros, correspondientes al grupo de los nitrofenoles (DNOC, dinoseb, dinoterb, etc.)

y nitroanilinas (trifuralina, nitralina, etc.), nitrilos (bromoxinil, ioxinil, etc.), y derivados del bencimidazol (clorflurazól); a ellos hay que agregar algunos herbicidas tipo arilcarbamatos y acilcloroanilidas, ya citados como inhibidores del transporte electrónico fotosintético, pero que a altas concentraciones exhiben un adicional efecto desacoplante (192).

Todos los compuestos hasta ahora analizados que actúan directamente sobre la actividad fotosintética limitan de una u otra forma la síntesis de ATP, lo cual es importante en relación a su fitotoxicidad dado el papel dominante que el ATP ejerce sobre el metabolismo celular. Gran número de componentes celulares, estructurales o no, se sintetizan continuamente con un "turnover" rápido a través de reacciones que consumen ATP, el cual, por otra parte, ejerce una fuerte función reguladora; muchos procesos de permeabilidad y transporte son también ATP-dependientes. Por supuesto que el primer lugar donde se detectan cambios estructurales es en el propio cloroplasto; los "tilakoides" granales se hinchan, y la estructura lamelar apilada se desorganiza. Subsiguientemente se rompen las envolturas cloroplásticas y del tonoplasto, mezclándose sus respectivos contenidos con el del citoplasma. La aparición de síntomas externos no tiene lugar hasta varios días después del tratamiento, cuando ya ha tenido lugar una destrucción avanzada de la estructura interna de la hoja. Llegado ese momento, cesa el crecimiento, se detienen las funciones celulares, y se pierde la integridad morfológica y estructural de la célula, signos todos ellos asimilables a los de una senescencia prematura.

Por otro lado, los inhibidores del transporte electrónico

limitan también las disponibilidades de NADPH necesario para los procesos metabólicos de reducción. A la vista de ello cabe preguntarse si la acción fitotóxica de estos herbicidas se debe a una falta de carbohidratos sintetizados, que conduciría a un progresivo empobrecimiento de la planta análogo al que tiene lugar cuando ésta se mantiene prolongadamente en la oscuridad, o si existe algún efecto adicional. Verdaderamente, un suministro exógeno de carbohidratos a plantas tratadas retrasa los efectos tóxicos debidos al diurón (233). Sin embargo, que existen otros factores en juego viene indicado por la progresiva desorganización del sistema lamelar, rotura de las cubiertas, y desintegración final del cloroplasto.

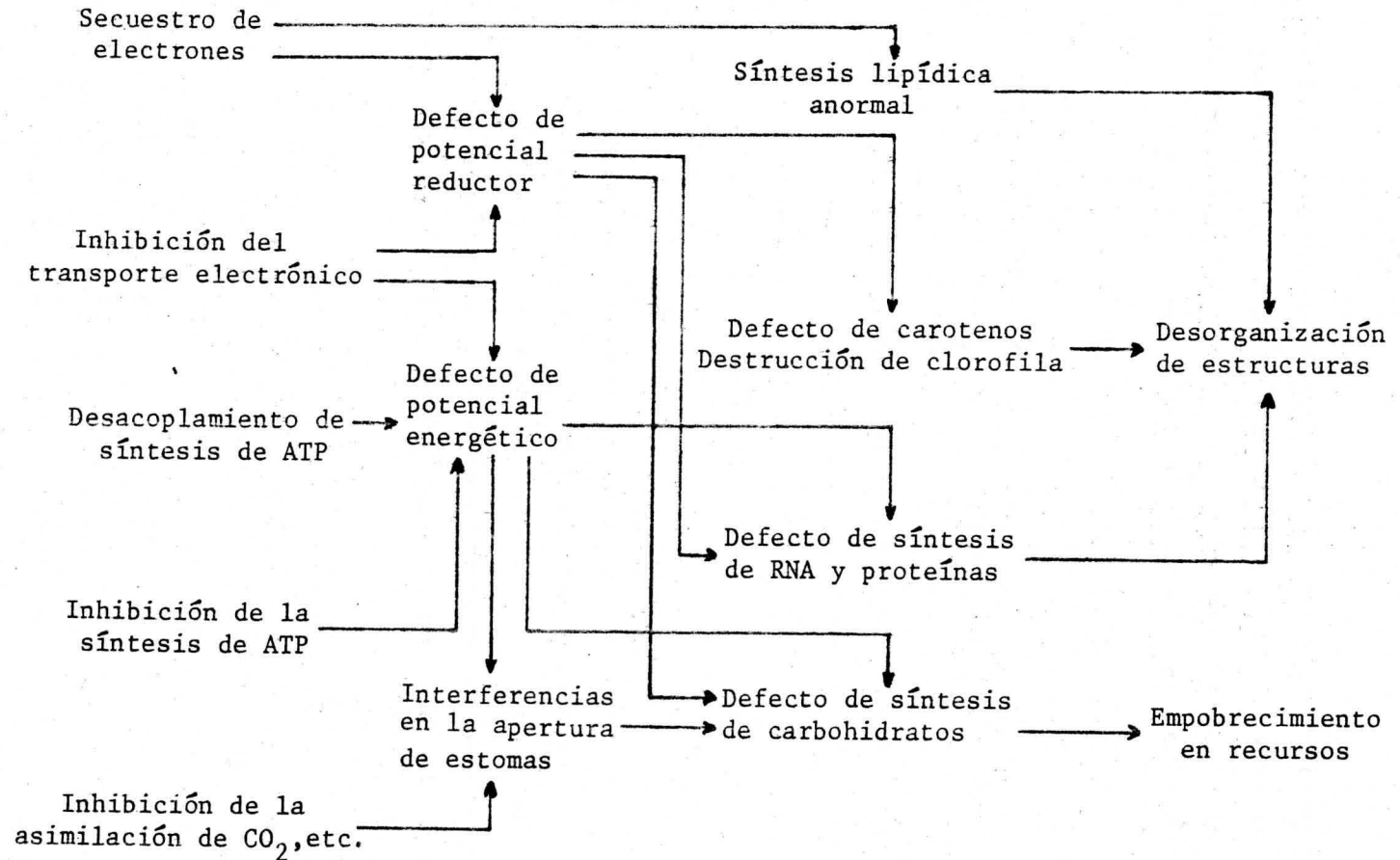
El grado de toxicidad de muchos de estos herbicidas resulta una función directa de la intensidad de iluminación (234). Esto dió pie a la hipótesis, posteriormente comprobada, que la falta de NADPH impide mantener los pigmentos carotenoides del cloroplasto en forma reducida, los cuales se sabe tienen la misión de proteger las moléculas de clorofila frente a una fotooxidación (165). Resumiendo, parece razonable concluir que la acción fitotóxica bien puede deberse conjuntamente a un daño en el aparato fotosintético y a una escasez progresiva de material de reserva.

Hasta el momento no existe evidencia de la existencia de compuestos que inhiban más o menos específicamente pasos metabólicos de la llamada "fase oscura" de la Fotosíntesis, en relación con la fijación del  $\text{CO}_2$ . El desarrollo de tales inhibidores está empezando a ser ahora objeto de estudios detallados por la importancia que podrían tener en relación con nuevas -- fuentes de proteínas; como ya se ha indicado anteriormente, la

desviación de la capacidad biosintética de la planta hacia un mayor acúmulo de proteínas mediante la inhibición selectiva -- de algún paso del ciclo de Calvin, podría tener grandes repercusiones en la nutrición del futuro.

Aunque no se trate de un proceso fotosintético propiamente dicho, por su íntima conexión con la fijación del  $\text{CO}_2$  y -- por su influencia en la "Fotosíntesis neta" cabe aquí hablar de los inhibidores de la fotorespiración. Algunos clásicos inhibidores del transporte electrónico fotosintético, como el -- diuron, inhiben también la tasa fotorespiratoria (235), lo -- cual puede ser un efecto indirecto si tenemos en cuenta que -- la fotorespiración tiene por objeto disipar el potencial re-- ductor originado en condiciones en que una fijación normal de  $\text{CO}_2$  no es posible; y es evidente que en presencia de estos -- herbicidas dicho potencial reductor no se genera. No obstante, Gibbs no descarta un efecto directo de los mismos en la síntesis de glicolato por cloroplastos de espinaca (236). La pérdida de productividad que experimentan los vegetales  $\text{C}_3$  a consecuencia de la fotorespiración está potenciando mucho la búsqueda de inhibidores específicos de la misma. Zelitch (237) -- ha observado una inhibición en la formación de glicolato por la hidrazida del ácido isonicotínico, así como un efecto inhibidor del  $\alpha$ -hidroxi-2-piridinmetanosulfonato en la oxidación del mismo por la glicolato-oxidasa. Mas prometedores parecen ser los ensayos efectuados, con el glicidato, que se ha descrito como un inhibidor específico de la actividad oxigenásica -- de la ribulosa-1.5-difosfato carboxilasa-oxigenasa (151).

El esquema adjunto intenta resumir e interrelacionar las diferentes formas de actuación de los herbicidas fotosintéticos,



con una integración en las dos grandes incidencias finales - mencionadas.

Todo lo dicho anteriormente respecto a la complementa-- riedad de los estudios "in vitro" e "in vivo" resulta del to do aplicable a los herbicidas fotosintéticos. Diferencias en la inhibición de la "fotosíntesis neta" entre distintas espe cies debe reflejar una tolerancia inherente a un herbicida - particular. En estos casos los tests "in vitro" indicarán el grado de susceptibilidad que cabría esperar si el herbicida alcanzase el cloroplasto de forma inalterada, mientras que - las experiencias "in vivo" mostrarán la existencia o no de - factores que impiden dicha accesibilidad al cloroplasto. En este sentido, la cinética de la disminución de la actividad fotosintética y el ritmo de recuperación, si tiene lugar, de la misma en plantas tratadas cuando se elimina la fuente de herbicida, puede ser muy demostrativo (238). No obstante, no hay que olvidar que los resultados obtenidos en las experien cias "in vitro" - expresados normalmente como  $I_{50}$ , o concen tración necesaria para obtener un 50% de inhibición del pará metro medido- pueden aún no reflejar una estimación cierta de la concentración actual de herbicida existente en el lugar de actuación del mismo. Como ha sido indicado por Izawa y -- Good (239) los valores de  $I_{50}$  obtenidos dependen del coefi-- ciente de partición del herbicida entre el cloroplasto y el medio que lo rodea, así como de la posible existencia en el interior del cloroplasto de puntos de unión no asociados al proceso de inhibición, a veces con una afinidad por el herbi cida mayor que la exhibida por el centro de actuación.

De lo expuesto se deduce la necesidad de estudios bási-

cos previos, efectuados "in vitro" a nivel de cloroplastos, - partículas subcloroplásticas o preparados enzimáticos purificados, cuando se desee analizar la eficacia que como posible herbicida pueda tener un supuesto inhibidor fotosintético. -- Aunque existen intentos de standardización de las condiciones en que dichos estudios deberían efectuarse, a fin de obtener resultados comparables, lo cierto es que cada investigador ha utilizado métodos propios que se inician ya en una falta de - homogeneidad en las especies vegetales usadas para preparar - el material cloroplastídico. Moreland y Hill (240) encuentran actividades fotosintéticas muy distintas cuando cada uno de - una serie de cuatro herbicidas fueron testados frente a cloro- plastos procedentes de tres especies diferentes. Si a ésto se une una heterogeneidad en los métodos de preparación de los - cloroplastos, y en la propia metodología del test utilizado - (diferencia en la naturaleza y concentración de los aceptores y/o donadores de electrones, de la intensidad y longitud de - onda de la luz utilizada, etc.), se comprende la disparidad - de valores aparecidos en la bibliografía.

Con el presente trabajo se pretende la standardización - de una metodología de trabajo que permita estudiar el efecto de herbicidas sobre la capacidad fotosintética de cloroplas- - tos aislados, a través del análisis de una serie de paráme- - tros fotosintéticos representativos de la maquinaria fotosin- - tética de la planta. Esto no es obstáculo para que en el futu- - ro, y a la vista de los resultados obtenidos, se pueda corre- - gir y ampliar el espectro de tales parámetros y, por supuesto, extender éstos a otros representativos de la actividad foto- - sintética del vegetal en su integridad. Como material biológi-

co se han utilizado diferentes preparaciones de cloroplastos de espinaca, adecuadas a la naturaleza específica de cada ensayo. Se ha seleccionado esta especie por ser la mas frecuentemente utilizada en este tipo de estudios y, en consecuencia, más adecuada en términos de comparación de resultados; no obstante, somos conscientes de la necesidad de extender - estos ensayos a otras especies representativas de los grandes grupos botánicos, y a aquellas otras de mayor incidencia económica, al menos local. Finalmente, hemos ensayado una serie de compuestos representativos de las grandes familias químicas hasta ahora descritas con acción herbicida; la ausencia de algunos miembros importantes, o la falta de idoneidad de algunos de los representantes, debe achacarse a su ausencia en el mercado como compuesto puro a nivel bioquímico.





PLAN DE TRABAJO



Dada la complejidad del mecanismo de asimilación fotosintética del carbono, se han seleccionado dentro de él los --- acontecimientos que hemos considerado mas significativos. Algunos de ellos --los vinculados a la "fase lumínica" del proceso, y que conducen a la obtención de potenciales energético y reductor por la planta-- tienen carácter genérico, siendo comunes a la asimilación fotosintética del carbónico, nitrato y sulfato, así como a otros procesos metabólicos del vegetal; se trata de procesos complejos, en los que se termina midiendo el grado de funcionalidad de una secuencia de --- acontecimientos íntimamente relacionados. Otros --no relacionados a la "fase lumínica", al menos de una manera directa-- son ya específicos de la asimilación de  $\text{CO}_2$ , aunque su grado de funcionalidad depende en muchos aspectos de un normal desarrollo de los procesos lumínicos; algunos son también procesos complejos, compendio de una serie de acontecimientos, aunque otros se trata de reacciones enzimáticas concretas.

Según se puede observar en el esquema adjunto, entre los primeros se ha seleccionado la funcionalidad de las cadenas de transporte electrónico  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NADP}^+$ ;  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{F}_e\{(\text{CN})_6\}^{3-}$  y ascorbato/DPIP  $\longrightarrow \text{NADP}^+$ ; la primera de ellas fisiológica y afectando a los Fotosistemas I y II, y no fisiológicos, -- con un aceptor o donador artificial de electrones-- los otros

dos, involucrando al Fot. II la primera y al Fot. I la segunda.

La operatividad del sistema de síntesis de ATP, estrictamente dependiente del buen funcionalismo de las cadenas de transporte anteriores, se ha determinado viendo la tasa de formación global de ATP, por un lado, y la que persiste en presencia de antimicina A, un inhibidor específico del transporte cíclico de electrones y, por tanto, de la fosforilación a él acoplada.

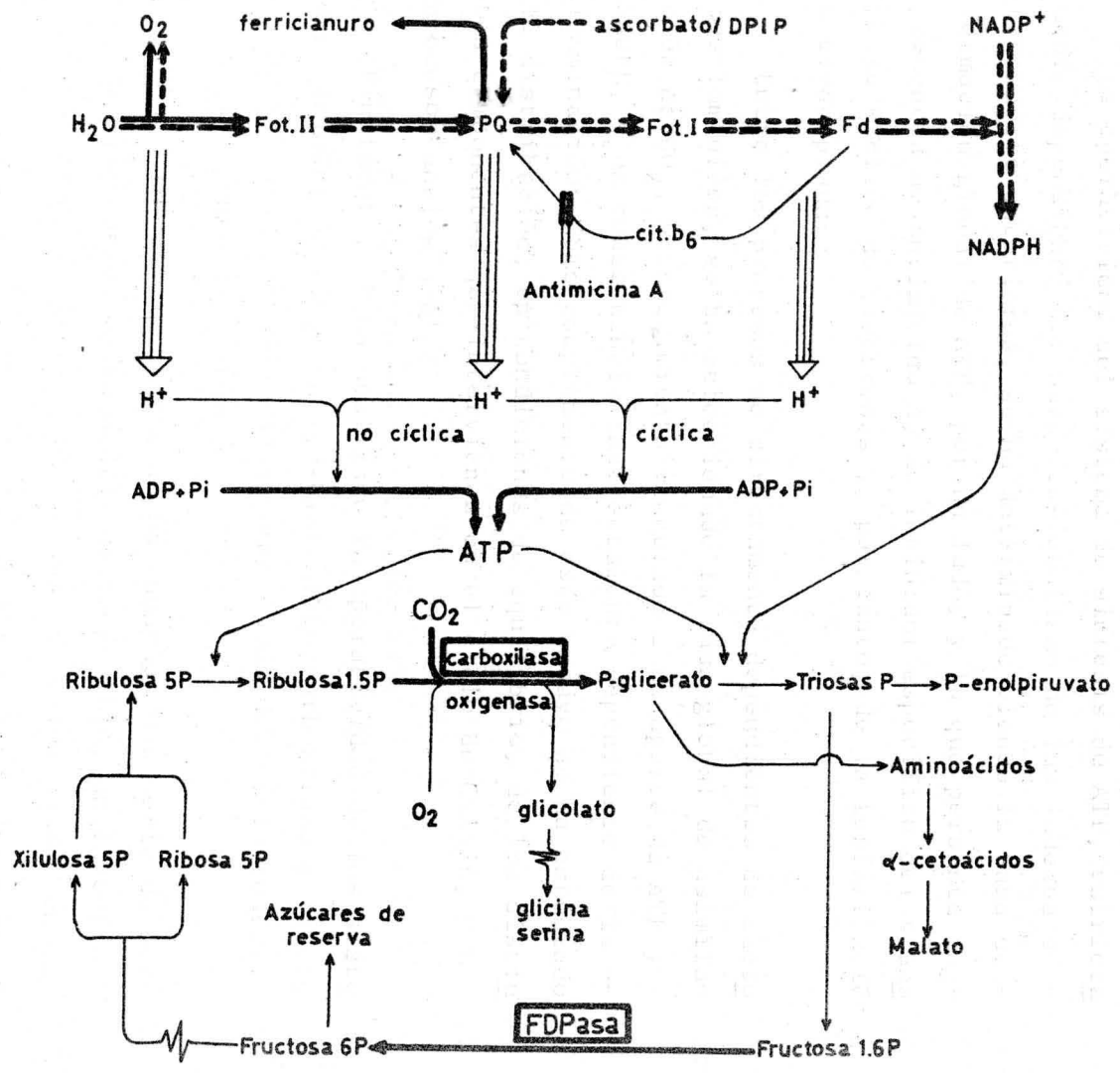
Entre los procesos no directamente dependientes de factores lumínicos, se ha seleccionado la tasa global de asimilación de  $\text{CO}_2$ , acontecimiento vinculado a un aporte de ATP y NADPH, y en consecuencia indirectamente dependiente de la iluminación. Como complemento de este ensayo se ha estudiado la distribución, en condiciones de equilibrio, de los distintos componentes que intervienen en el ciclo de Calvin, y en procesos anejos a él.

Finalmente, se ha analizado la operatividad de los sistemas enzimáticos ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa y fructosa bisfosfatasa, consideradas como claves del ciclo reductor de las pentosas-fosfato.

Como ya se ha apuntado, se ha ensayado una serie de herbicidas que cubren en la medida de lo posible, un espectro bastante completo de la gran cantidad de ellos usados en la práctica agrícola. Para cada uno de ellos se han utilizado varias concentraciones, forzosamente distintas de unos a otros debido a su diferente grado de actividad, por un lado, y a las limitaciones de solubilidad de algunos herbicidas, por otro. Todo ello implicaba un número tal de determinacio-

nes que, a fin de operar con el mismo lote de cloroplastos en cada serie de experiencias, y dado el tiempo limitado - de vida de éstos con una actividad alta y constante, ha si do necesario limitar el número de repeticiones. A ello ha contribuído también la tediosidad de las técnicas de deter minación, que en las medidas polarográficas de la cinética de desprendimiento de oxígeno obligaba a efectuarlas una a una, y que en la dosificación de los niveles de intermedia rios implicaba una duración de 2-3 días por determinación.

Finalmente, en la última fase de la elaboración de este trabajo hemos tenido la oportunidad de contar con la -- técnica de microscopía electrónica de transmisión. Por esta razón no ha podido utilizarse sistemáticamente para ana lizar el posible efecto que los herbicidas pudieran ejer-- cer sobre la estructura del cloroplasto. En este sentido - ha sido utilizado solamente para constatar el estado de in tegridad de las distintas preparaciones cloroplastídicas - empleadas, y sólo excepcionalmente ha sido usada en expe-- riencias con herbicidas.



PARTE EXPERIMENTAL

---





## I. MATERIAL UTILIZADO

### A.- Material biológico de partida

Se utilizaron espinacas frescas procedentes del mercado de la localidad. Una vez eliminados los peciolos, se lavaron abundantemente las hojas con agua corriente, primero, y agua destilada después; se secaron entre papeles de filtro y se quitaron las nerviaciones principales. A continuación, se introdujeron en bolsas de plástico y se mantuvieron a 4°C hasta que adquirieron turgencia.

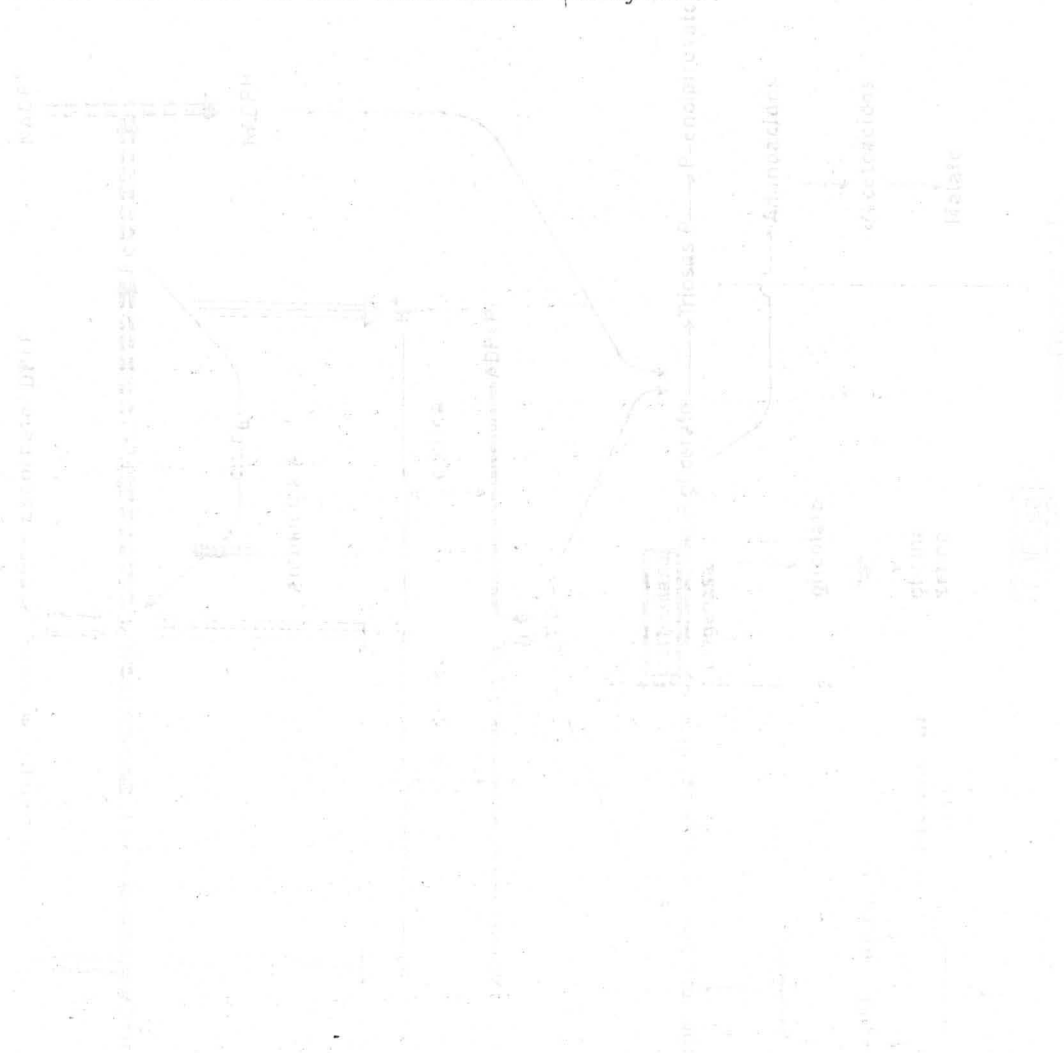
### B.- Soluciones de herbicidas

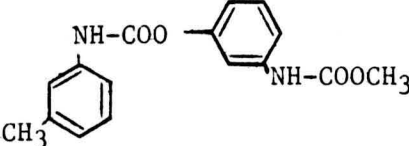
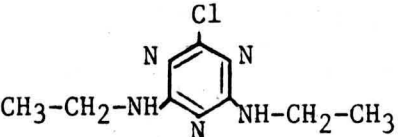
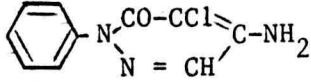
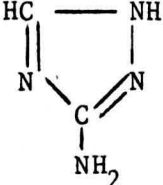
Se han ensayado doce herbicidas orgánicos suministrados por Serva de grado analítico, a excepción de Paraquat, Dinoseb y 2,4-D que procedían del National Physical Laboratory (Teddington, Middlesex).

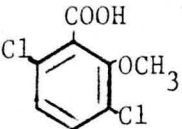
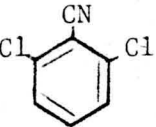
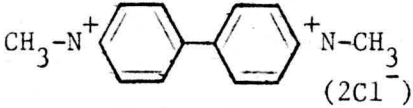
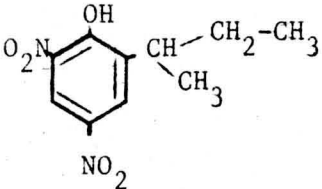
Fueron usados a distintas concentraciones y dada la escasa solubilidad de la mayoría de ellos en agua, hubo que disolverlos en diferentes solventes orgánicos o en sus sales sódicas. No obstante, se hicieron pruebas de la inocuidad de los volúmenes máximos utilizados de cada disolvente en los ensayos correspondientes.

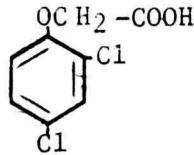
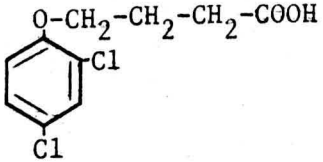
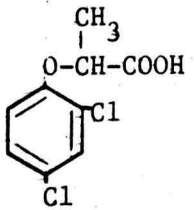
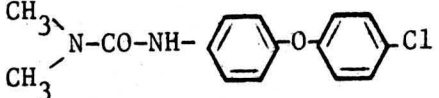
Todos se guardaron a 4°C y en la obscuridad.

A continuación se citan nombre común y sistemático, grupo o familia a que pertenecen y disolvente empleado para solubilizar cada uno de los herbicidas ensayados.



| <u>Nombre Común</u> | <u>Nombre Sistemático</u>                                 | <u>Fórmula</u>  | <u>Grupo</u>       | <u>Solubilidad</u> |
|---------------------|---|---|--------------------|--------------------|
| Fenmedifam          | Metil 3(3-metil)<br>fenil carbamoiloxi)<br>fenilcarbamato |    | Fenil<br>carbamato | Acetona            |
| Simazina            | 2,4-bis(etilamino)<br>6 cloro 1, 3, 5<br>triazina         |    | Triazina           | Metilcelosolve     |
| Pirazon             | 1 fenil-4 amino<br>5 cloro<br>piridazinona(6)             |   | Heterocíclico      | Agua               |
| Amitrol             | 3 amino,<br>1H-1, 2, 4 triazol                            |  | Heterocíclico      | Agua               |

|            |  |   |              |                               |
|------------|--|---|--------------|-------------------------------|
| Dicamba    | ác. 2 metoxi-<br>3,6 dicloro benzoico            |    | Benzoico     | Sales sódicas                 |
| Diclobenil | 2,6 dicloro<br>benzonitrilo                      |    | Benzonitrilo | Dimetil forma-<br>mida - agua |
| Paraquat   | 1,1'dimetil-<br>4,4'bipiridilo(Cl <sup>-</sup> ) |    | Bipiridilo   | Agua                          |
| Dinoseb    | 2(s-butil)-<br>4,6 dinitrofenol                  |  | Nitrofenol   | Agua                          |

|            |  |   |                               |                  |
|------------|--|---|-------------------------------|------------------|
| 2,4-D      | ác.2,4 dicloro<br>fenoxiacético                      |    | Fenoxialquílico<br>(Hormonal) | Sales sódicas    |
| 2,4-DB     | ác.2,4 dicloro<br>fenoxibutírico                     |    | Fenoxialquílico<br>(Hormonal) | Acetona          |
| 2,4-DP     | ác.2(2,4 dicloro-<br>fenoxi) propiónico              |   | Fenoxialquílico<br>(Hormonal) | Sales sódicas    |
| Cloroxuron | 3-{4-(4-cloro-<br>fenoxi) fenil}-<br>1,1-dimetilurea |  | Ureico                        | Dimetilformamida |



## II. ENSAYOS DE ESTRUCTURA

### A.- Microscopio electrónico de transmisión

#### A.1.- Metódica.

Con el microscopio electrónico de transmisión hemos estudiado la estructura e integridad de los cloroplastos normales, así como las alteraciones morfológicas presentes derivadas del tratamiento con los diferentes herbicidas utilizados.

Los cloroplastos una vez aislados se sometieron a los procesos convencionales de fijación, deshidratación e inclusión, con lo que se logra mantener la subestructura celular y una deshidratación necesaria para posteriormente impregnarse del medio hidrófobo que es la resina, en la que se les incluye para facilitar su corte.

La fijación se llevó a cabo agitando dulcemente los cloroplastos aislados con el fijador, glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato sódico 0.05 M pH 6.7 a temperatura ambiente, durante dos horas. Después de lavar con el mismo buffer y durante el mismo tiempo, se postfijaron con tetróxido de osmio ( $Os O_4$ ) al 1% en el buffer anterior una hora, volviéndose a lavar bien, varias veces con el mismo buffer cacodilato a lo largo de dos horas, agitando al agregarles el buffer y centrifugando a 500 xg para quitar el sobrenadante en cada lavado.

El sedimento obtenido se mezcla con agar líquido (previamente calentado al baño maría), dejándolo enfriar y una vez solidificados se cortan en pequeños trocitos de unos 2 mm., los cuales serán postfijados, deshidratados e incluidos.

La deshidratación se hizo en una serie de alcoholes de riqueza gradual 30, 50, 70, 90 y 100% para terminar con óxido de propileno.



Como medio de inclusión se utilizó el Epon, que es una resina de tipo epoxi similar al Araldit. Para facilitar la penetración de la resina las muestras se tuvieron algunas horas en mezcla de óxido de propileno-Epon, a las que gradualmente se vá eliminando el óxido de propileno para terminar impregnando las piezas durante dos horas con Epon puro. Posteriormente se incluyen en cápsulas individuales y se dejan polimerizar en estufa a 60°C durante una noche.

Los cortes ultrafinos de unos 600-800 Å de espesor, se realizaron en un ultramicrotomo LKB III, fueron recogidos en rejillas de cobre, y se sometieron a una doble tinción de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Finalmente las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 B.

#### A.2.- Reactivos.

##### - Fijación y postfijación

- Sol. de Glutaraldehido al 3 %

glutaraldehido 50%, calidad Fluka ..... 6 ml.

cacodilato sódico 0.05 M pH 6.7 ..... hasta 1000 ml.

- Buffer cacodilato sódico 0.05 M pH 6.7

10.7 g de cacodilato sódico ..... hasta 1000 ml.

ajustar antes a pH 6.7 con ácido clorhídrico.

- Tetraóxido de osmio al 1%

1 g ..... hasta 100 ml. con el buffer cacodilato.

##### - Deshidratación

- Serie de alcoholes 30, 50, 70 y 90%

en cada uno de ellos, la cantidad que se indica y hasta 100 con H<sub>2</sub>O

- Inclusión

- EPON calidad Fluka, formado por:

Solución A

Epikote 812 ..... 62 ml.

Anhídrido del ácido dodecenil succínico .... 100 ml.

Solución B

Epikote 812 ..... 100 ml.

Anhídrido del ácido metil nádico (MNA) ..... 89 ml.

se mezclan ambas soluciones y se les agrega 1.8 ml. de Dimetil ftalato (DMP 30).

- Post-tinción

- Acetato de uranilo 5%

0.25 g. de acetato de uranilo calidad Merck ..... 5 ml. con H<sub>2</sub>O

- Sol. de Citrato de plomo formada:

Nitrato de plomo ..... 1.33 g.

Citrato trisódico. 2H<sub>2</sub>O ..... 1.76 g.

agitar, reposar 30 minutos y añadir 8 ml. NaOH 1N (40 g/1000 ml.)

completar a 50 ml. con H<sub>2</sub>O.

con ayuda de una varilla de vidrio cuyo extremo estaba resguardado con algodón para no dañar la estructura del cloroplasto. La suspensión de cloroplastos así obtenida se conservó a 0°C.

El contenido de clorofila de la misma se determinó siguiendo la metódica de Arnon (242). En una probeta de 10 ml provista de tapón esmerilado, se colocaron 0.2 ml de la suspensión de cloroplastos y se extrajo la clorofila por agitación con 8 ml de acetona (calidad Merck p.a.) y 1.8 ml de agua. Se filtró rápidamente la solución y se midió la absorción del filtrado a 652 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod. 124, frente a un blanco de acetona al 80%.

El contenido de clorofila de la suspensión de cloroplastos se obtuvo a partir de la expresión:

$$\text{mg clorofila/ml} = \frac{A_{652 \text{ nm}} \times \text{Dil.} - 50}{34.5}$$

calculada sobre la base de un coeficiente de absorción específica (1 g/ml en cubeta de 10 mm de paso óptico) a 652 nm -- punto de intersección de los espectros de las clorofilas a y b -- de  $34.5 \times 10^3$  (242).

#### A.1.b.- Metódica.

La medida del desprendimiento de oxígeno por los cloroplastos se llevó a cabo en un oxígrafo tipo Gilson, modelo KM (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wis.), equipado de un registrador. El cátodo de oxígeno era un microelectrodo de Clark YSI 4004 (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio), compuesto de un cátodo de Pt y un ánodo de Ag, ambos bañados en una solución de ClK, y recubierto por una membrana de Teflón -- que le separa de la célula y permite la difusión de oxígeno. El

potencial aplicado fué de 0.8 V. La célula tiene una capacidad de 3.1 ml y está provista de un agitador magnético y termostatizada a 20°C con agua que circula por doble camisa. La carta registradora utiliza hojas de 20 x 30 cm y su velocidad era de 0.1 mm/seg.

En la célula de reacción a 20°C, se adicionaron 3 ml - del medio Sorbitol-Hepes, pH 7.6 saturado de aire, conectándose el agitador magnético. Después de equilibrado el aparato durante unos pocos minutos, se ajustó el cero eléctrico del oxígrafo y la sensibilidad se llevó al 100% de la escala completa, de modo que la distancia en el papel, entre el cero eléctrico y la deflexión total fuese de 185 mm. A continuación, se hizo burbujear una corriente de nitrógeno a través del medio en la célula de reacción mediante una punta de nylon conectada a un regulador de presión gaseosa el trazo del registrador cayó rápidamente indicando que el oxígeno disuelto en la célula estaba siendo desplazado por el nitrógeno. Una vez eliminado el oxígeno se cerró rápidamente la célula con un tapón esmerilado -- provisto de un capilar lleno de buffer por el que se añadió la suspensión de cloroplastos, con una concentración de clorofila de 100 µg/ml. Se iluminó mediante 4 lámparas incandescentes -- que suministraban 20.000 lux y el oxígeno desprendido por los cloroplastos se puso de manifiesto por la curva registrada.

Los herbicidas, en cada caso, se adicionaron a la célula de reacción por el capilar del tapón mediante una microjeringa y después de transcurrido un tiempo suficiente que -- permitía calcular el oxígeno desprendido por el cloroplasto testigo.

A.l.c.- Cálculos.

En las representaciones gráficas, tanto de la actividad fotosintética del cloroplasto testigo, como de los cloroplastos incubados con los diferentes herbicidas, las desviaciones de la aguja se pasaron a concentración de oxígeno sobre la base de que el buffer de reacción saturado de aire tiene una concentración de oxígeno de 0.28  $\mu$ moles por ml a 20°C. Teniendo ésto en cuenta y considerando un volumen final de 3.10 ml, cada mm de ancho de carta representa 0.00419  $\mu$ moles de oxígeno. Dado que en cada experiencia se usaron cloroplastos equivalentes a 0.3 mg de clorofila y que la velocidad de la carta registradora fué de 0.1 mm/seg., todos los resultados se obtuvieron a partir de la expresión:

$$\mu\text{moles de O}_2/\text{mg clorofila/hora} = \frac{0.00419 \times 3600 \text{ seg.} \times A}{0.3 \text{ mg} \times B}$$

A = milímetros de ancho de carta

B = segundos transcurridos.

Todos los valores correspondientes a los ensayos con herbicidas se refieren a % del obtenido para el testigo en idénticas condiciones.

A.l.d, Reactivos

Medio de homogeneización sorbitol-pirofosfato pH 6.5

- Sol. de Sorbitol 0.4 M

7.2868 g/100 ml de Sorbitol, calidad Merck, p.a.

- Sol. de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . 5 mM

0.10165 g/100 ml de  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  calidad Merck, p.a.

- Sol. de  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_4$ . 10 mM

0.4461 g/100 ml de  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck, p.a.

- Sol. de ascorbato sódico 2 mM

0.0396 g/100 ml de ascorbato sódico, calidad Sigma.

Se disuelve el sorbitol, pirofosfato sódico y cloruro magnésico en un volumen de agua destilada próximo al requerido. La solución resultante se lleva a pH 6.5 a 0°C con ClH -- concentrado en pHmetro (Beckman, Expandomatic SS-2). A continuación, se añade el ascorbato sódico y se completa el volumen con agua destilada también a 0°C. Este medio se prepara inmediatamente antes de usarse.

Medio de suspensión Sorbitol-HEPES pH 6.7

- Sol. de Sorbitol 0.4 M

7.2870 g/100 ml de Sorbitol, calidad Merck, p.a.

- Sol. madre de Cl<sub>2</sub>Mg y Cl<sub>2</sub>Mn, 50 mM

0.5083 g de Cl<sub>2</sub>Mg.6H<sub>2</sub>O }  
0.4948 g de Cl<sub>2</sub>Mn.4H<sub>2</sub>O } → 50 ml

- Sol. de Cl<sub>2</sub>Mg y Cl<sub>2</sub>Mn 1 mM

2 ml de sol. madre/100 ml

- Sol. de EDTA 2mM

74.448 mg/100 ml de EDTA.2H<sub>2</sub>O, calidad Merck, p.a.

- Sol. de HEPES 50 mM

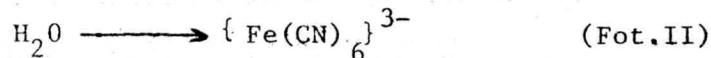
1.1915 g/100 ml de HEPES, calidad Sigma, p.a.

2 ml de la solución de cloruros 50 mM se diluyen con agua destilada hasta un volumen próximo a 100 ml, disolviéndose en él los restantes reactivos. Se ajusta la solución a pH 6.7 con NaOH concentrada (2M) a 20°C y se completa el volumen con agua destilada.

### Medio de reacción Sorbitol-HEPES pH 7.6

Se prepara del mismo modo que el medio de suspensión, ajustándolo en este caso a pH 7.6 con NaOH concentrada (2M) a 20°C, agregándole  $\text{CO}_3\text{Na}$  hasta hacerlo 10 mM (84.01 mg calidad Merck).

#### A.2.- Operatividad de la cadena de transporte:



Este ensayo cuenta como donador de electrones igualmente el agua, y como aceptor final no fisiológico el ferricianuro; de esta forma únicamente puede estudiarse la integridad de la cadena hasta el punto de acción del ferricianuro situado a nivel de la plastoquinona.

Se basa, al igual que el ensayo anterior, en la medida del oxígeno desprendido por el cloroplasto al producirse en la fotólisis de la molécula de agua.

##### A.2.a.- Preparación de cloroplastos.

La solución de cloroplastos tipo B de Hall (35) se preparó del mismo modo que en el epígrafe A.1.a., únicamente se mantuvieron a 0°C durante 5 horas para lograr la ruptura de su membrana exterior a la vez que cierta desorganización interior y permitir el acceso del ferricianuro al Fot. II, aceptando -- electrones a nivel de plastoquinona y no de Fot. I.

##### A.2.b.- Metodica.

Se siguió la misma técnica que en A.1.b., adicionando  $\{\text{Fe}(\text{CN})_6\}^{3-}$  a la concentración de 625  $\mu\text{M}$  (30  $\mu\text{l}$ , 0.1 M), al medio Sorbitol-HEPES pH 7.6, en la célula de reacción.

El oxígeno desprendido por estos cloroplastos se midió y calculó de igual forma que en los epígrafes A.1.b. y A.1.c.

A.2.c.- Reactivos.

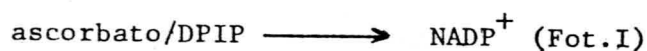
- Medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato pH 6.5
- Medio de suspensión Sorbitol-HEPES pH 6.7
- Medio de reacción Sorbitol-HEPES pH 7.6

Los tres se prepararon como en el apígrafe A.1.d.

- Sol. de  $\{Fe(CN)_6\}K_3$ , 0.1 M

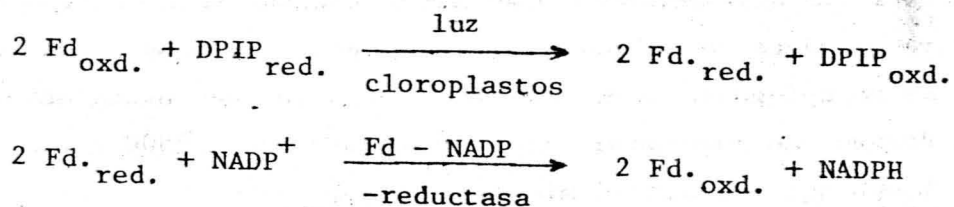
32.93 mg/ml de  $\{Fe(CN)_6\}K_3$ , calidad Merck, p.a.

A.3. Operatividad de la cadena de transporte:



La operatividad de la cadena de transporte electrónico en cuanto al Fotosistema I se refiere, se determinó con ascorbato-DPIP como donador de electrones, siendo el aceptor final  $\text{NADP}^+$ .

El ensayo se basa en la reducción del  $\text{NADP}^+$  con la intervención de la ferredoxina reducida por la ferredoxin-NADP-reductasa, según el esquema (243):



En la primera reacción, dependiente de la luz, la ferredoxina se reduce gracias al sistema fotoquímico del cloroplasto, pero actuando el par ascorbato-2,6-diclorofenol-indofenol como donador de electrones. La ferredoxina reducida actúa en -



la segunda reacción como donador de hidrógeno en la reducción del  $\text{NADP}^+$ . Esta reacción es independiente de la luz y está catalizada por la ferredoxin-NADP-reductasa ligada al estroma del cloroplasto.

#### A.3.a.- Preparación de partículas cloroplásticas.

Corresponde a la suspensión de partículas cloroplásticas  $\text{C}_1\text{S}_2$  preparadas según Whatley y col. (244).

100 g de hojas fragmentadas se homogeneizaron con 200 ml de solución isotónica de  $\text{ClNa}$  a la que previamente se agregaron 20 ml de buffer Tris- $\text{ClH}$  0.2M pH 8.0 y ascorbato sódico como protector. Se efectuó en homogeneizador (Sorvall, Omnimixer) a velocidad tope durante 1-2 minutos. El homogenado obtenido se filtró a través de una doble capa de gasa de nylon, centrifugándose luego a 1100 r.p.m. (200 xg) durante 2 minutos a  $4^\circ\text{C}$  (Sorvall Superspeed, RC2-B), a fin de separar restos celulares.

El sobrenadante se centrifugó ahora a 2500 r.p.m. (1000 xg) durante 7 minutos en las mismas condiciones, suspendiéndose el sedimento de cloroplastos en 10 ml de solución isotónica de  $\text{ClNa}$  adicionada de ascorbato; esta operación se facilita arrastrando el sedimento con una varilla de vidrio resguardada con algodón en su extremo. A la suspensión obtenida se agregaron 90 ml más de la solución de lavado anterior y, después de interponer bien, se centrifugó a 2500 r.p.m. (1000 xg) durante 10 minutos.

El sedimento de cloroplastos lavados se interpuso del mismo modo en 20 ml de solución hipotónica de  $\text{ClNa}$  adicionados de ascorbato. Se agregaron 60 ml más de la misma solución de lisis, y se centrifugó a 12000 r.p.m. (18000 xg) durante 10 -

minutos desechándose el sobrenadante. El sedimento de cloroplastos rotos se interpuso en otros 20 ml de solución de lisis y, una vez adicionados 60 ml de la misma solución, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores de velocidad y tiempo.

Finalmente, el sedimento se interpuso en 20 ml de solución hipotónica, diluyéndose después con la misma solución a la concentración requerida de clorofila, una vez determinada ésta por el método de Arnon (242).

#### A.3.b.- Metódica.

La reacción se lleva a cabo en cubetas espectrofotométricas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, termostalizadas a 25°C mediante un portacubetas de dos plazas provisto de camisa de agua circulante mantenida a dicha temperatura; de esta forma se impide a la vez el calentamiento provocado por el sistema de iluminación. Esta se efectúa con dos lámparas incandescentes de 100 W que suministran una iluminación de 10.000 lux y que están mantenidas a ambos lados del portacubetas a una distancia de 5 cm.

La mezcla de reacción contiene:

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Buffer Tris-ClH 1M pH 7.8 .....    | 0.1 ml                                       |
| 2,6-diclorofenolindofenol 2 mM ... | 0.1 ml                                       |
| Ascorbató sódico 0.2 M .....       | 0.1 ml                                       |
| NADP <sup>+</sup> 10 mM .....      | 0.1 ml                                       |
| Solución de ferredoxina 1 mg/ml .. | 0.1 ml                                       |
| Suspensión de cloroplastos .....   | 0.1 ml (equivalente a 0.05 mg de clorofila). |

Todo en un volumen final de 3 ml con agua.

La reacción se inicia suministrando iluminación al -- tiempo cero. La tasa de reducción de  $\text{NADP}^+$  se determinó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm, efectuando lecturas a intervalos de iluminación de 3 min. en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer, mod. 124. Como blanco se utilizó - una cubeta que contiene la mezcla de reacción completa, pero mantenida en la obscuridad.

En estas condiciones, la reducción del  $\text{NADP}^+$  sigue una función lineal durante los primeros intervalos de medida, decreciendo después y siendo la pendiente inicial proporcional a la concentración de NADPH formado. Un incremento en la extinción de 0.1 equivale a la reducción de 0.048  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NADP}^+$  - (coeficiente de extinción molar =  $6.22 \times 10^3$ ) independientemente del pH (245).

#### A.3.c.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.2 M pH 8.0 .

Tris 0.4 M (48.456 g/l de Tris, calidad Merck, p.a.) .... 500 ml  
ClH aprox. 0.4 M (32.2 ml/l de ClH fumante  $d = 1.19$   
calidad Merck, p.a.) ..... 292 ml  
Se ajusta a pH 8.0 con la solución clorhídrica y se lleva a 1 litro con agua destilada.

- Sol. isotónica de homogeneización

Sol. isotónica 0.35 M de ClNa (20.47 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.) ..... 200 ml

- Buffer Tris-ClH 0.2 M pH 8.0 ..... 20 ml

Hacer esta solución 0.01 M en ascorbato (200 mg/100 ml de ascorbato sódico, calidad Sigma).

- Sol. isotónica de lavado

Ascorbato 0.01 M (200 mg/100 ml de ascorbato sódico, calidad Sig

ma) en sol. isotónica 0.35M de ClNa (20.47 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.).

- Sol. hipotónica de lisis y lavado.

Ascorbato 0.01M (200 mg/100 ml de ascorbato sódico, calidad Sigma) en sol. hipotónica 0.035M de ClNa (2.047 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.).

- Buffer Tris-ClH 1M pH 7.8

Tris 2M (24.228 g/100 ml de Tris, calidad Merck, p.a.).

ClH aprox. 2M (16.6 ml/100 ml de ClH fumante  $d = 1.19$ , calidad Merck, p.a.).

Se ajusta al pH indicado un volumen de sol. de Tris con la solución clorhídrica y se lleva a un volumen doble de la sol. de Tris con agua destilada.

- Sol. 2 mM de 2,6-diclorofenolindofenol.

5.8 mg/10 ml de 2.6-diclorofenolindofenol, calidad Sigma.

- Sol. de ascorbato sódico 0.2M.

39.6 mg/ml de ascorbato sódico, calidad Sigma. Es de preparación extemporánea.

- Sol. de  $\text{NADP}^+$  10 mM.

7.4 mg/ml de  $\text{NADP}^+$  oxidado, sal disódica, calidad Boehringer.

- Sol. de Ferredoxina de espinaca: i

-----

↓  
i.- Preparación de ferredoxina de espinaca.

Material biológico de partida

Como anteriormente, se utilizaron espinacas frescas -- procedentes del mercado de la localidad. Los lotes fueron de -- aproximadamente 3 Kg. A las hojas se les eliminaron los pecio-

los y las nerviaciones mas prominentes. Se lavaron abundantemente con agua de grifo primero y destilada después, y se secaron entre papeles de filtro. Una vez introducidas en bolsas de plástico se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta congelación.

#### Preparación de extractos crudos.

Las hojas congeladas, una vez troceadas, se homogeneizaron en frío en homogeneizador durante 3 minutos a velocidad tope, previa adición de buffer Tris-ClH 0.1 M pH 7.3 en relación 1:1 (p/v) adicionado de Tritón X-100.

Se filtró el homogenado a través de una triple capa de gasa de nylon y se sometió a centrifugación a 11.000 r.p.m. (20.000 xg) durante 30 minutos en centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante decantado —aproximadamente 1,100 ml— se utilizó como material de partida en el proceso de purificación de la ferredoxina.

#### Proceso de purificación.

Se siguió el método de Tagawa y Chain (243) con las modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio por De La Torre y col. (246).

Salvo la precipitación acetónica, efectuada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , todas las operaciones se realizaron en frío entre 0 y  $4^{\circ}\text{C}$ , en cámara refrigerada unas, y en baño de hielo otras. Por la misma razón todas las operaciones de centrifugación se efectuaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , en centrífuga Sorvall Superspeed, mod. RC2-B, en las condiciones que en cada caso se indican. Dada la inestabilidad de la ferredoxina, durante todo el proceso el pH se mantuvo constante en el valor 7.3, empleando siempre el sistema buffer Tris-ClH.

### Precipitación acetónica del extracto crudo.

El extracto crudo obtenido se puso en un vaso de precipitado mantenido en mezcla frigorífica de hielo y sal y se sometió a agitación para evitar congelaciones. A continuación, y con agitación continua, se fué añadiendo a un flujo aproximado de 10-15 ml/min. acetona (calidad Merck, p.a.), previamente enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta conseguir una concentración final del 35%. La suspensión obtenida después de la agitación se centrifugó a 3.500 r.p.m. (2.000 xg) durante 10 minutos.

Se midió el volumen total de la solución sobrenadante, pasándose a otro recipiente también preenfriado y se siguió añadiendo acetona en condiciones análogas hasta alcanzar una concentración del 80%. Se detuvo la agitación y se dejó sedimentar el precipitado durante 1 hora. El sobrenadante se desechó por decantación seguida de centrifugación a 3.500 r.p.m. (2.000 xg) durante 10 minutos; se procedió a eliminar la acetona embebida en el sedimento agitándolo en el mismo tubo de centrífuga con una varilla de vidrio y haciéndole llegar una corriente de aire frío mediante un secador de pelo.

Ya libre de acetona el material se extrajo con 50 ml de buffer Tris-ClH 0.01 M, con agitación constante, durante 30 minutos. El material no soluble se eliminó por centrifugación a 15.000 r.p.m. (23.000 xg) durante 20 minutos y el sobrenadante se dializó en membrana de celofán frente a buffer Tris-ClH 0.005 M durante 15 horas con agitación y flujo continuo de buffer.

El precipitado obtenido se eliminó por centrifugación a 15.000 r.p.m. (23.000 xg), durante 20 minutos. Se obtuvieron 68.5 ml de solución de color rojo intenso.

Adsorción sobre DEAE-celulosa.

A la solución anterior se agregó ClNa 5 M hasta conseguir una concentración final 0.2 M en cloruros y se pasó a través de una columna (3 x 5 cm) de DEAE 23-celulosa, previamente equilibrada con buffer Tris-ClH 0.15 M hecho 0.08 M en ClNa, - que corresponde a una concentración final 0.2 M en cloruros. - El flujo era de 0.5 ml/min.

La ferredoxina quedó junto con otros pigmentos fijada cuantitativamente por el cambiador en la parte superior de la columna en forma de una franja ancha de color pardo oscuro. Se eliminó el material no fijado haciendo pasar a un flujo de 1 - ml/min., buffer de equilibración hasta registro en el eluido - de una absorción a 280 nm del orden de 0,1.

Después de este lavado, la banda roja que contiene la ferredoxina apareció por debajo de otra más oscura situada en la parte superior de la columna.

Se hizo un segundo lavado con el mismo buffer hecho -- 0.14 M en ClNa (0.26 M en cloruros). El flujo fue de 0.5 ml/min.

La banda roja de ferredoxina se desplazó, en estas condiciones, a la zona inferior. Finalmente se eluyó con 100 ml - de buffer Tris-ClH 0.3 M, 0.55 M en ClNa (0.8 M en cloruros). Este aumento en la fuerza iónica provoca la elución inmediata de la ferredoxina.

Cromatografía sobre DEAE-52.

El eluido del paso anterior --aproximadamente 30 ml-- se diluyó con 2.5 veces su volumen de agua destilada y se hizo pasar por una columna de DEAE-52 (2.4 x 20 cm) equilibrada con

buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7.3 adicionado de ClNa hasta 0.2 M en cloruros. La ferredoxina quedó fijada en el extremo superior de la columna, como en el caso anterior.

Se estableció un gradiente continuo y lineal de cloruros en buffer Tris-ClH 0.15 M entre las condiciones de equilibración 0.08 M en ClNa (0.2 M en cloruros) y una concentración final de 0.25 M (0.37 M en cloruros). Para establecer dicho gradiente se utilizaron 300 ml de cada una de las soluciones, continuándose luego la elución con la solución mas concentrada 0,25 M hasta que la banda correspondiente a la ferredoxina emergía de la columna. La elución se hizo a un flujo de 0.5 ml/min. y las lecturas a 422 y 274 nm para cada muestra. Se reunieron aquéllas con razón de absorciones  $A_{422}/A_{274}$  superior a 0.2,

Concentración sobre DEAE-celulosa.

El eluido anterior se diluyó con dos veces su volumen de agua destilada y se pasó a flujo de 0.5 ml/min. por una pequeña columna (1 x 3 cm) de DEAE-52 previamente equilibrada - como las anteriores en buffer Tris-ClH 0.15 M, 0.08 M en ClNa.

La ferredoxina quedó fijada en la zona más alta de la columna, de donde se eluyó al mismo flujo con Tris-ClH 0.3 M, 0.55 M en ClNa, recogiénose así en un pequeño volumen, entre 5 y 10 ml.

Filtración por Sephadex G-75.

La solución concentrada así obtenida se filtró a un - flujo de 0.3 ml/min. por una columna (2.5 x 80 cm) de Sepha-- dex G-75 equilibrada con buffer Tris-ClH 0.01 M pH 7.3. La -- elución fue con el mismo buffer y flujo anteriores, recogién-



dose el eluido en fracciones de 10 ml. Se reunieron aquéllas - cuya razón de absorciones  $A_{422}/A_{274}$  era superior a 0.4.

Se concentró de nuevo sobre una columna de DEAE-52 (1 x 3 cm) como anteriormente, dializándose frente a buffer Tris-ClH 0.005 M durante toda la noche. Esta preparación con una razón - de absorción visible/ultravioleta (422/274) de 0.48 es la que se considera pura y la que usamos como fuente de ferredoxina -- para el ensayo; se conserva congelada o bajo atmósfera de nitrógeno.

## ii. Reactivos

- Buffer Tris-ClH 0.1 M pH 7.3, 0.1% en Tritón X-100.  
Tris 0.2 M (24,228 g/l. de Tris, calidad Merck, p.a.) .... 500 ml  
ClH aprox. 0.2 M (16.6 ml/l. de ClH fumante d = 1.19,  
calidad Merck, p.a.) ..... 370 ml

Se ajusta al pH indicado con la solución clorhídrica y se enrasa a 1 l. con agua destilada. Después se lleva al 0.1% (v/v) con Tritón X-100, calidad Sigma.

Como se ha dicho todos los sistemas buffers empleados a lo largo del proceso de purificación son Tris-ClH pH 7.3 de molaridad variable, y adicionados o no de ClNa hasta la concentración final en cloruros adecuada. Se prepararon por dilución de una solución madre Tris-ClH 0.3 M, haciendo luego, si es necesario, un ajuste a pH 7.3 con solución de Tris o clorhídrica. Para los ajustes posteriores en cloruro hay que tener en cuenta - que esta solución 0.3 M es 0.24 M en cloruros.

- Buffer Tris-ClH 0.3 M pH 7.3  
Tris 0.6 M (72.648 g/l. de Tris, calidad Merck, p.a.) .. 500 ml  
ClH aprox. 0.6 M (49.8 ml/l. de ClH fumante d = 1.19,  
calidad Merck, p.a.) ..... 370 ml

Se ajusta el pH con la solución clorhídrica, y se lleva a 1 l. con agua destilada.

- Buffer Tris-ClH 0.01 M pH 7.3

Se prepara por dilución al 1/30 del buffer 0.3 M.

- Buffer Tris-ClH, 0.005 M pH 7.3

Se prepara diluyendo al 1/60 el buffer 0.3 M.

- Sol. 5 M de ClNa.

292.5 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7.3, 0.2 M en cloruros.

Diluir al 1/2 el buffer 0.3 M y disolver 4.68 g/l. de ClNa, calidad Merck, p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7.3, 0.26 M en cloruros.

Diluir al 1/2 el buffer 0.3 M y disolver 8.190 g/l. de ClNa, - calidad Merck, p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.3 M pH 7.3, 0.8 M en cloruros.

32.76 g/l. de ClNa, calidad Merck, p.a., en el buffer indicado.

- Buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7.3, 0.37 M en cloruros.

14.6 g/l. de ClNa, calidad Merck, p.a., en el buffer indicado.

- Preparación de DEAE-celulosa (23 y 52) equilibradas en buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7,3, 0.08 M en ClNa (0.2 M en cloruros).

Se utilizó DEAE-23 celulosa fibrosa y exenta de "fines", calidad Whatman. La cantidad a tratar se dedujo sobre la base - de que por cada ml de lecho se necesitan, aproximadamente, 0.15 g de cambiador seco.

La cantidad necesaria se suspendió en 15 partes (p/v) - de ClH 0.5 N, manteniendo el conjunto bien mezclado con agitador

magnético durante 1 hora a la temperatura ambiente. Esta suspensión se pasó a un filtro Büchner preparado con papel Schleicher-Süßl 2043b, se escurrió a vacío y se lavó con agua destilada abundante hasta que los filtrados dieron un pH alrededor de 4. A continuación, se suspendió el cambiador en 15 partes (p/v) de NaOH 0.5 N y se mantuvo con agitación durante 30 minutos; se decantó el sobrenadante y se suspendió de nuevo, en condiciones análogas, con otras 15 partes de álcali. Se pasó la suspensión a un filtro Büchner igual al anterior, se escurrió a vacío y se lavó abundantemente con agua destilada hasta pH próximo a la neutralidad.

El equilibrado se inició suspendiendo la DEAE-celulosa así tratada en volumen suficiente de buffer Tris-ClH 0.15 M pH 7.3, 0.08 M en ClNa, con agitación durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se repitió el tratamiento varias veces hasta que el sobrenadante tuvo el mismo pH que el buffer de equilibración. Normalmente, son suficientes cinco tratamientos de este tipo, mientras que las sucesivas decantaciones permiten eliminar, además, los "fines" que se hayan podido originar durante las fases de agitación. Finalmente, se hizo un desgasado a vacío, con agitación, hasta que no se desprendieron burbujas, quedando así la suspensión del cambiador lista para proceder al llenado de las columnas. Este cambiador se usó una sola vez, ya que al tratarse de uno de los primeros pasos del proceso de purificación, quedaba muy contaminado con material orgánico difícilmente lavable.

La DEAE-52 celulosa empleada era microgranular y prehumedecida, calidad Whatman, y al no haber sufrido ningún proceso de secado durante su elaboración estaba exenta de "fines"

y no necesitó tratamiento previo de reciclado. La cantidad a emplear en cada caso viene definida porque 1 ml de lecho necesita, aproximadamente, 0.7 g de cambiador. El proceso de equilibrado se llevó a cabo de igual forma que el descrito para la DEAE-23. Este cambiador se usó repetidas veces, sometiéndolo, una vez evacuado de la columna, a un proceso de reciclado y equilibrado.

- Preparación de Sephadex G-75 equilibrado en buffer Tris-ClH 0.01 M pH 7.3.

Se utilizó Sephadex G-75 normal, calidad Pharmacia --- (Uppsala), 1 g del cual suministra, una vez hinchado, de 12 a 15 ml de lecho. Para el hinchado y equilibrado se suspendió la cantidad necesaria de Sephadex en 10-12 veces (p/v) del buffer indicado, y se mantuvo a baño maría con agitación durante 3 horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar, se desgasó a vacío - hasta que no se desprendieron burbujas y se procedió al llenado de la columna.

### iii.- Test de contenido protéico y pureza

Método de Lowry y col. (247).

Es un método espectrofotométrico para determinar el -- contenido protéico basado en las reacciones del biuret --carac--  
terística del enlace peptídico-- y de Folin--específica de los  
núcleos aromáticos de naturaleza fenólica-- . Es aplicable a to--  
dos los estadios de purificación, teniendo un carácter inespe--  
cífico.

1.- Curva standard de albúmina sérica bovina.

Dado el carácter genérico de la reacción, resulta ine-

ludible referir los resultados a una proteína de calibración. Como tal se utilizó albúmina sérica bovina, a partir de la --cual se preparó una solución madre en agua destilada a la concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ , y por dilución al 1/10 de la misma --una solución hija con 50  $\mu\text{g/ml}$  de proteína.

Diluciones sucesivas al 4/5, 3/5, 2/5, 1/5 y 1/10 de ambas nos dan una gama de concentraciones de 5, 10, 20, 30, --40, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{g/ml}$ . De cada una de las cuales se dispuso 1 ml en sendos tubos de ensayo, y un último tubo --con 1 ml de agua destilada sirvió de blanco.

## 2.- Metódica.

A tiempo cero se agrega a cada uno de los tubos anteriores 5 ml de solución alcalina de cobre --reacción de biu--ret-- y al cabo de 15 minutos se añaden 0.5 ml del reactivo --de Folin-Ciocalteu. Pasados 20 minutos se efectúa la lectura espectrofotométrica a 630 nm.

Los valores de absorción obtenidos se llevan al eje --de ordenadas de un sistema coordinado, situándose en abscisas los correspondientes valores de cantidad de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ). Sobre ellas se llevan los valores de D.O. de los problemas, --deduciéndose por interpolación, y una vez tenidas en cuenta --las diluciones previas, la concentración protéica final (Fig. 1).

## 3.- Reactivos.

- Sol. madre (500  $\mu\text{g/ml}$ ) de albúmina sérica bovina, cali--dad Calbiochem.

- Sol. hija (50  $\mu\text{g/ml}$ ) de albúmina sérica bovina, calidad Calbiochem.

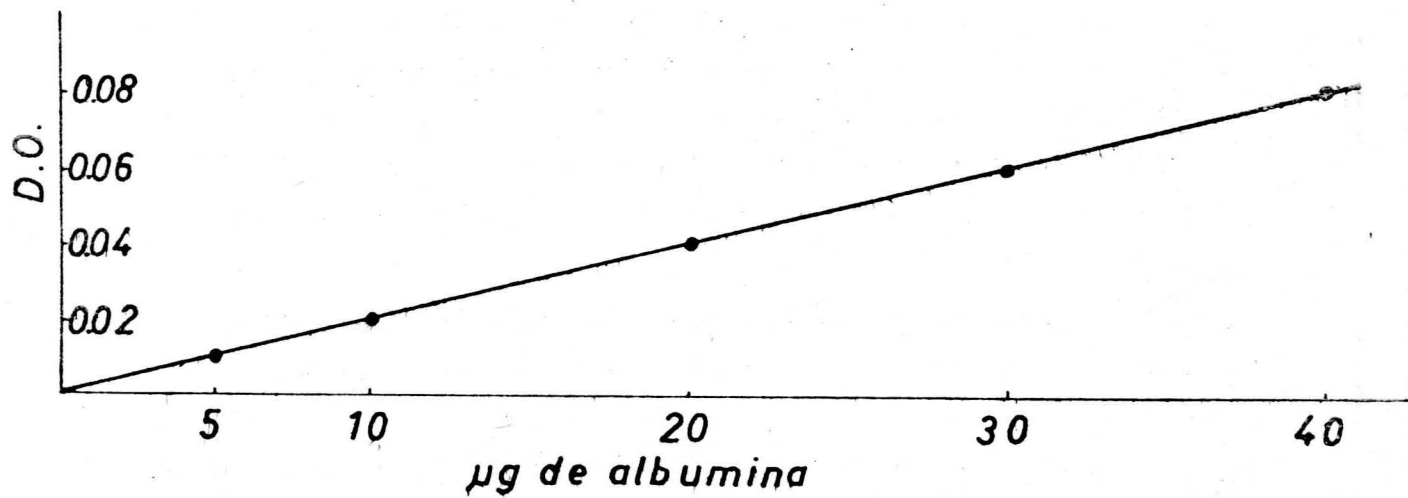
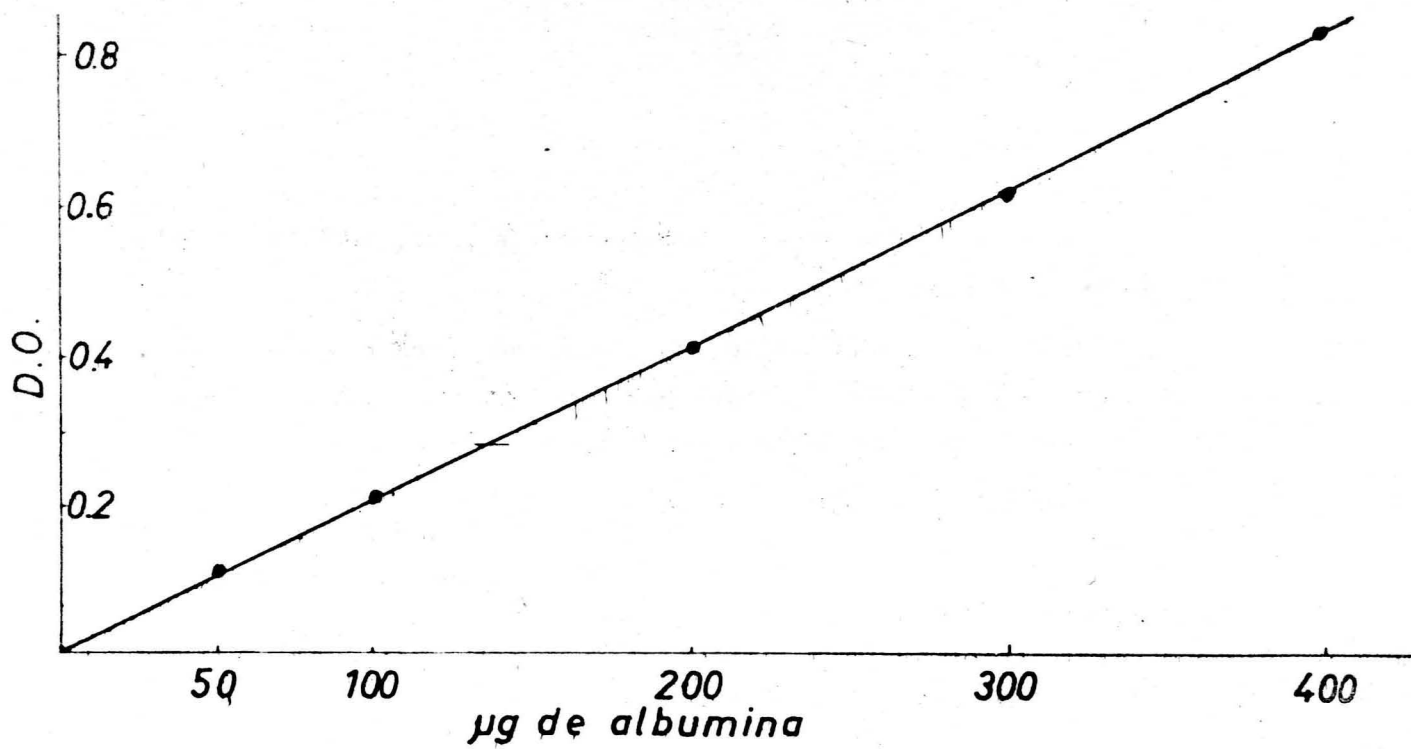


Fig. 1

- Sol. alcalina de cobre.
  - Sol. al 2% de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ , calidad Merck p.a., en NaOH al 0.4%, calidad Merck p.a. .... 50 ml y
  - Sol. al 0.5% de  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a., en tartrato sódico  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1%, calidad Merck p.a. .... 1 ml
- Es de preparación extemporánea.
- Reactivo de Folin-Ciocalteau

Se utilizó el de calidad Analema, que en el momento de su uso se diluía al 1:1 con agua destilada.

Absorción específica a 422 nm.

Se basa en que el espectro de absorción de la ferredoxina presenta un máximo de absorción en el visible a 422 nm. - De esta forma, conociendo el coeficiente de absorción molar a dicha longitud de onda y suponiendo que no existe ningún otro componente que absorba en la misma, será posible calcular la concentración de ferredoxina a partir de una simple lectura espectrofotométrica.

De lo dicho se desprende que el método no será válido en los estadios primarios del proceso de purificación, ni aún en aquéllos de purificación avanzada, dado el fuerte contenido de los extractos vegetales en pigmentos de diferente naturaleza. Nosotros lo hemos empleado exclusivamente a nivel de ferredoxina pura, como procedimiento habitual de determinar la concentración de ésta para ensayos ulteriores.

Test de pureza por razón de absorbancias visible/ultravioleta.

Un primer índice de pureza de los preparados de ferre-

doxina se obtuvo por cálculo de los cocientes de absorción visible a 422 nm y ultravioleta a 274 nm.

La selección de estas longitudes de onda viene dada -- por el hecho de que el espectro de la ferredoxina oxidada de - cloroplastos de hojas de espinaca presenta, entre otros, sen-- dos máximos a 422 nm y 274 nm, con una razón de absorbancias -  $A_{422}/A_{274}$  de 0.49 para la ferredoxina totalmente purificada y de operatividad máxima (243). La presencia de proteínas extra-- ñas implicaría, por la absorción genérica de éstas al UV, una disminución de dicho cociente, y tanto mas cuanto menor sea el grado de pureza del preparado de ferredoxina. En la práctica, y debido a la fácil desnaturalización de la ferredoxina, se -- considera suficiente a efectos bioquímicos una relación de ab-- sorción de 0.40.

La determinación de absorciones se efectuó después de cada fase del proceso de purificación, estando la ferredoxina disuelta en el buffer determinado por cada paso --siempre bu-- ffer Tris-ClH pH 7.3, de fuerza iónica variable y, en cualquier caso, constantemente exento de absorción a las longitudes de onda indicadas-- y utilizándose como blanco el mismo buffer de dilución de la muestra. Se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod. 124, de doble haz, y cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico.

## B.- Fosforilación fotosintética

### B.1.- Fotofosforilación total.

En estas experiencias consideramos la fotofosforilación acoplada al transporte electrónico acíclico, pseudocíclico y cí-- clico, que llamamos total. Por ser baja la tasa de formación de



ATP en cloroplastos íntegros, se usan lisados con aporte exógeno de ADP, Pi, NADP<sup>+</sup> y ferredoxina.

B.1.a.- Preparación de cloroplastos lisados.

25 g de hojas turgentes se homogeneizaron en frío con 100 ml de medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato pH 6.5, en un homogeneizador (Sorvall-Omnimixer) a velocidad tope durante 5 segundos.

El homogenado obtenido se filtró a través de 8 capas de gasa de nylon y se sometió a centrifugación desde 0 a 6000 r.p.m. (4000 xg) volviendo de nuevo a 0 en 90 segundos, en centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall-Superspeed, RC2-B). Decantando el sobrenadante el residuo sólido se suspendió en 50 ml de HEPES 50 mM pH 7.6, sometiendo así a los cloroplastos a un shock osmótico.

Una vez lisados, se volvieron a centrifugar como antes hasta 6000 r.p.m. (4000 xg) y el residuo sólido se resuspendió en 2 ml de la misma solución de HEPES 50 mM pH 7.6. A continuación, se determinó la cantidad de clorofila siguiendo el método de Arnon (242).

B.1.b.- Metodica.

El método original de Arnon y Chain (113) se basa en la formación de ATP y posterior síntesis de glucosa 6-P, en la presencia de ADP, Pi, hexoquinasa y glucosa. La reacción se lleva a cabo a 20°C en tubos que contenían, en un volumen total de 1 ml:

|  |       |      |        |       |     |    |
|--|-------|------|--------|-------|-----|----|
| HEPES 85 mM, pH 7.6                          | ..... | 42.5 | µmoles | ..... | 500 | µl |
| Cl <sub>2</sub> Mg.6H <sub>2</sub> O, 120 mM | ..... | 3    | "      | ..... | 25  | "  |
| ADP 750 mM                                   | ..... | 7.5  | "      | ..... | 10  | "  |
| NADP <sup>+</sup> 250 mM                     | ..... | 2.5  | "      | ..... | 10  | "  |

|   |   |            |
|---|---|------------|
| Ferredoxina 0.5 mM .....  | 0.01 $\mu$ moles .....                    | 20 $\mu$ l |
| Hexoquinasa (0.4 mg/100 $\mu$ l de HEPES 50 mM) .....               |   | 10 "       |
| Glucosa 800 mM .....  | 20 $\mu$ moles .....                      | 25 "       |
| $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 300 mM (70 $\mu$ Ci/ml). ..... | 7.5 " (1.75 $\mu$ Ci)                     | 25 "       |
| Herbicida .....   | a la concentración indicada en cada caso. |            |
| Suspensión de cloroplastos . equivalentes a 0.3 mg de clorofila     |   |            |
| $\text{H}_2\text{O}$ .....  | hasta 1000 $\mu$ l.                       |            |

Se inició la reacción con la suspensión de cloroplastos, suministrando una iluminación de 20.000 lux al tiempo cero mediante dos lámparas incandescentes de 100 W y con agitación constante mediante un agitador Gallenkamp.

Pasados 15 minutos se paró la reacción con 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 22%, centrifugándose a 17000 r.p.m. - (34800 xg) durante 5 minutos en centrífuga refrigerada y recoigiéndose finalmente el sobrenadante.

#### B.l.c.- Determinación de ATP.

Mide indirectamente el ATP formado, basándose en la --cuantificación de la radioactividad incorporada por la glucosa 6-P, aislada por electroforesis, proveniente del ATP.

Una alícuota de 10  $\mu$ l de este sobrenadante acidificado se depositaba cuidadosamente con microjeringa sobre cromatopla ca preparada con polvo de celulosa (sin indicador fluorescente, Merck) de 20 x 20 cm y 0.10 mm de espesor de capa, empapándose con el buffer de electroforesis piridina: acético: agua (5:50: 945) pH 3.6, teniendo mucho cuidado no difunda la muestra depo sitada. Las placas se desarrollan unidimensionalmente por elec troforesis durante 1 hora 30 minutos a 740 V, manteniéndolas -

frías a lo largo de todo el proceso.

Una vez terminado el desarrollo, se elimina la mezcla de piridina-acético secando la placa con un secador de pelo, localizándose los compuestos marcados con  $^{32}\text{P}$  autorradiográficamente por comparación con las manchas observadas en la película fotográfica después de una exposición de 48 horas.

Las zonas así marcadas se raspan (el polvo de celulosa no tenía efecto en la eficiencia de contaje) interponiéndose en viales con 0.5 ml de agua y 10 ml de mezcla de centelleo, contando su radioactividad en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb, mod. 2425.

#### B.l.d.- Reactivos.

- Medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato, pH 6.5 ya descrito en el apartado A.l.d.

- Sol. HEPES 50 mM, pH 7.6.

4.1702 g/350 ml de HEPES, calidad Merck, p.a.; ajustando a pH 7.6 con NaOH conc., calidad Merck, p.a.

- Sol. HEPES 85 mM, pH 7.6

1.0128 g/50 ml de HEPES, calidad Merck, p.a.; ajustando a pH 7.6 con NaOH conc., calidad Merck, p.a.

- Sol.  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  120 mM

0.2439 g/10 ml de  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck, p.a.

- Sol. ADP 750 mM

347.4 mg/ml de ADP, calidad Sigma.

- Sol.  $\text{NADP}^+$  250 mM

196.85 mg/ml de  $\text{NADP}^+$ , oxidado, sal disódica, calidad Boehringer.

- Sol. Glucosa 800 mM ..... 0.01 moles ..... 20 µl  
144,13 mg/ml de Glucosa, calidad Merck, p.a. .... 10 "

- Sol. de Ferredoxina 0.5 mM

Se prepara como en el apígrafe A.3.c.

- Sol. de Hexoquinasa

0.4 mg/100 µl de Hexoquinasa, calidad Sigma en HEPES 50 mM

- Sol. de  $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  300 mM 70 µCi/ml

Al ser el  $^{32}\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  libre de portador y tener el  $^{32}\text{P}$  un período de vida media de 15 días, hubo que preparar diariamente esta solución, adicionando  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  calidad Merck, p.a. hasta hacerla - 300 mM y 70 µCi/ml.

- Sol. de ác. Tricloroacético al 22%.

2.2 g/10 ml de ác. Tricloroacético, calidad Merck, p.a.

- Buffer de electroforesis piridina-acético-agua pH 3.6

Piridina ..... 5 ml

Ac. acético ..... 50 ml

H<sub>2</sub>O ..... 945 ml

- Sol. de centelleo

PPO, calidad BDH ..... 7 g

(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-POPOP, calidad BDH ..... 0.3 g

Naftaleno, calidad Merck ..... 100 g

Dioxano, calidad Carlo Erba .... c.s.p. 1000 ml

## B.2.- Fotofosforilación acíclica.

Se estudia aquella formación de ATP ligada unicamente al transporte electrónico acíclico. No obstante y dado un punto de vista riguroso, esta determinación abarca la fotofosforilación acíclica y pseudocíclica.

B.2.a.- Preparación de cloroplastos lisados.

El lisado de cloroplastos se preparó del mismo modo - que para la fotofosforilación total (epígrafe B.1.a.).

B.2.b.7 Metódica.

La reacción se desarrolló igual que en la fotofosforilación total (epígrafe B.1.b.), con la única diferencia de que los cloroplastos se incubaron previamente, en presencia de Antimicina 15  $\mu$ M durante 2 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente, para inhibir la fotofosforilación cíclica (113).

B.2.c.- Reactivos.

Los reactivos empleados fueron los mismos que en el -- epígrafe B.1.d. más el de:

- Sol. de Antimicina 0.6 mM
- 3.2916 mg/10 ml de Antimicina, calidad Sigma, disuelta en alcohol.

C.- Asimilación de CO<sub>2</sub>

C.1.- Fijación neta de CO<sub>2</sub>.

En esta experiencia se determina la tasa de fijación en dógena de CO<sub>2</sub> al ciclo de las pentosas-P a nivel de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa. Se incubaron cloroplastos íntegros tipo A de Hall, en el mismo medio que el usado para medir la -- operatividad de la cadena de transporte electrónico, con la sola adición a este medio de reacción de bicarbonato radioactivo. Se usó el método de Walker y col. (248), con las modificaciones

en el medio de reacción ya indicadas en el epígrafe A.1.a.

C.1.a.- Preparación de cloroplastos.

Se partió de 25 g de hojas de espinaca tratados como se indica en el epígrafe A, se aislaron cloroplastos y se suspendieron en medio de suspensión como en A.1.a.

Así mismo se determinó el contenido de clorofila según la metódica de Arnon (242) ya citada.

C.1.b.- Metódica.

A un medio de reacción Sorbitol-HEPES pH 7.6 adicionado de 10  $\mu$ moles de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}$  (25  $\mu\text{Ci}$ ) se agrega una suspensión de cloroplastos equivalentes a 100  $\mu\text{g}$  de clorofila. Se incuban a 20°C con agitación y 30 segundos después de añadir los cloroplastos, para lograr su estabilización, comienza la reacción al iluminarlos con 20.000 lux.

La progresiva fijación de carbónico en la misma mezcla de reacción, se siguió retirando alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  mediante microjeringa automática a los 3, 6, 9 y 12 minutos añadiéndolas a viales de conteo que contenían 80  $\mu\text{l}$  de  $\text{ClH}$  0.3 N.

En todos los casos junto a un tubo considerado como blanco o testigo se llevaron otros conteniendo los distintos herbicidas a las diferentes concentraciones estudiadas, pero siempre en el mismo volumen final de 1 ml.

C.1.c.- Determinación de  $^{14}\text{C}$  incorporado.

El  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  agregado al medio de reacción proporciona el  $^{14}\text{CO}_2$  que fija el cloroplasto, asimilándolo para dar compuestos marcados estables, siendo éstos, los que se miden para de-

terminar el carbónico fijado y por lo tanto la actividad fotosintética del cloroplasto. El  $^{14}\text{CO}_2$  no fijado se elimina calentando en medio ácido.

Por todo ello, los viales de contaje conteniendo la -- alícuota de 20  $\mu\text{l}$  en medio clorhídrico, se ponen a desecar bajo lámpara de infrarrojo que proporciona una temperatura de 90 a  $100^\circ\text{C}$ . Una vez desecados se añadió 0.4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  para solubilizar el residuo seguido de 10 ml de mezcla de centelleo. Se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido -- Packard Tricarb.

Todos los cálculos se refieren en c.p.m. a % del valor obtenido para el testigo a los tiempos dados en que se retiraron las alícuotas.

#### C.l.d. Reactivos.

- Medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato, pH 6.5
  - Medio de suspensión Sorbitol-HEPES, pH 6.7
  - Medio de reacción Sorbitol-HEPES, pH 7.6
- Todos se prepararon como en el epígrafe A.l.d.

- Sol. de  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  200 mM, 25  $\mu\text{Ci}$

formada por:

Sol. de  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  100 mM, 1 mCi/ml ..... 25  $\mu\text{l}$

Sol. de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  300 mM ..... 25  $\mu\text{l}$

- Sol. de ClH 0.3 N

25 ml de ClH  $d = 1.19$ , calidad Merck, p.a. por litro.

- Mezcla de centelleo

Ver epígrafe B.l.d.

## C.2.- Productos de asimilación del CO<sub>2</sub>.

### C.2.a.- Preparación de cloroplastos.

Partiendo de 25 g de hojas de espinaca se aislaron cloroplastos y se suspendieron como en A.1.a., determinándose clorofila como se describe anteriormente.

### C.2.b.- Metódica.

Se llevó a cabo de igual forma que en el epígrafe C.1.b., parando la reacción en este caso a los 12 minutos con 100  $\mu$ l de ClH 1 N.

### C.2.c.- Determinación de compuestos marcados con <sup>14</sup>C.

Se siguió el método original de P. Schürman (249). La mezcla de reacción acidificada se centrifuga a 17000 r.p.m. - (34000 xg) durante 5 minutos en centrífuga refrigerada Sorvall.

Una alícuota de 10  $\mu$ l de este sobrenadante se deposita con microjeringa cuidadosamente sobre cromatoplaca preparada con polvo de celulosa (sin indicador fluorescente, Merck) de 20 x 20 cm y 0.1 mm de espesor de capa, empapándose con buffer de electroforesis, piridina: acético: agua (10:35:955), pH 4.0, teniendo mucho cuidado no difunda la muestra deposita. Las placas enfriadas durante todo el proceso se desarrollaron unidimensionalmente por electroforesis a 700 V, durante una hora, secándose y pudiéndose guardar a 4°C durante toda la noche. Seguidamente se cromatografiaron en isobutanol: fórmico: agua (180:30:60) durante 3 horas y media, se secaron con aire frío con la ayuda de un secador de pelo, recromatografiándose de nuevo en las mismas condiciones durante 5 horas.



Una vez terminado el desarrollo, se secan otra vez - de la misma forma para eliminar el disolvente. Los compues--tos marcados con  $^{14}\text{C}$  se localizaron autorradiográficamente - por comparación con las manchas observadas en la película fo--tográfica (Valca, Rápida 90", 24 x 30 cm) después de una ex--posición de 6 días.

Las zonas así marcadas se raspan mediante espátula - (como anteriormente se dijo el polvo de celulosa no tenía -- efecto en la eficiencia de contaje) y se interponen en via--les con 0.5 ml de agua y 10 ml de mezcla de centelleo, contan do su radioactividad en un contador de centelleo líquido ya citado.

#### C.2.d. Reactivos.

- Medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato, pH 6.5
- Medio de suspensión Sorbitol-HEPES, pH 6.7
- Medio de reacción Sorbitol-HEPES, pH 7.6
- Sol. de  $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$  200 mM, 25  $\mu\text{Ci}$
- Mezcla de centelleo

Ya descritos en epígrafes anteriores.

- Sol. de  $\text{ClH}$  0.1 N

8.3 ml/l de  $\text{ClH}$   $d = 1.19$ , calidad Merck, p.a.

- Buffer de electroforesis piridina-acético-agua, pH 4.0
  - Piridina ..... 10 ml
  - Ac. acético ..... 35 ml
  - $\text{H}_2\text{O}$  ..... 955 ml
- Buffer de cromatografía isobutanol-fórmico-agua

Isobutanol ..... 180 ml  
Ac. fórmico ..... 30 ml  
H<sub>2</sub>O ..... 60 ml.

D.- Enzimas clave del ciclo de Calvin

D.1.- Actividad carboxi-dismutásica

La RuBP-carboxilasa responsable de la fijación de CO<sub>2</sub> está presente en concentraciones muy altas en los cloroplastos, aproximadamente representa la mitad de su proteína soluble. Basándonos en esta propiedad partimos de cloroplastos íntegros para su obtención y purificación.

D.1.a.- Obtención de preparados purificados del enzima.

Se siguió el método de purificación de Takabe, Nishimura y Akazawa para la RuBP-carboxilasa de algas verde-azuladas *Plectonema boryanum* y *Anabaena variabilis* (250) sometido a algunas modificaciones. En primer lugar se obtiene el extracto crudo de cloroplastos íntegros de espinaca, con una metodología propia diferente necesariamente de la seguida por los autores que parten de células de algas. Por otra parte, el gradiente de solución de densidad de sacarosa se realizó en 5 ml y entre los límites 0.2 y 1 M, en lugar de 0.2 y 0.8 M del método original.

Preparación de lisados cloroplásticos.

Se partió de 300 g de hojas de espinaca limpias (6 lotes de 50 g cada uno).

Se aislaron cloroplastos íntegros tipo A de Hall (35)

del mismo modo que en el epígrafe A.l.a. y sin suspenderlos, se procedió al lisado de los mismos con 15 ml, por cada lote, de buffer Tris-ClH 25 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y  $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM. Se centrifugaron durante una hora a 40.000 r.p.m. -- (97000 xg) en ultracentrífuga Beckman L-65 rotor 60Ti, obteniéndose un sobrenadante que es utilizado como extracto enzimático en las operaciones subsiguientes.

#### Precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

El sobrenadante anterior se sometió a una precipitación salina con sulfato amónico entre el 25 y el 80% de saturación, ya que entre estos límites precipita la fracción activa.

Sulfato amónico, calidad Merck, finamente pulverizado en mortero se adicionó lentamente y con agitación constante - en baño de hielo (134 g/l) para llevar el extracto al 25% de saturación. Una vez disuelto en su totalidad se dejó en reposo media hora y se centrifugó en centrífuga Sorvall durante - 30 minutos a 15000 r.p.m. (27000 xg). Se midió el volumen del nuevo sobrenadante y se añadió más sulfato amónico (355 g/l) hasta una concentración del 80% de saturación, procediéndose como en el caso anterior.

El precipitado obtenido se recogió suspendiéndolo en la menor cantidad posible de buffer Tris-ClH 25 mM pH 7.0, - EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM (aprox. 6 ml). A continuación, se dializó frente al mismo buffer, durante una noche, en saco de celofán y a una temperatura de 4°C, desalinizando así la solución enzimática. El dializado se centrifugó a 17000 r.p.m. (34000 xg) durante 30 minutos recogiendo el sobrenadante o fracción activa.

### Centrifugación en gradiente de sacarosa.

El método se basa en que al depositar la solución enzimática sobre la superficie de un gradiente lineal de sacarosa creado entre los límites prefijados en el interior de un tubo de centrífuga, alcanza después de un tiempo de centrifugación suficiente, una posición de equilibrio definida por su peso molecular.

Comprende tres momentos bien diferenciados: formación del gradiente, centrifugación y elución.

Para la formación del gradiente se utilizaron tubos de centrífuga de 5 ml de capacidad útil, estableciéndose el mismo entre concentraciones de sacarosa de 0.2 M (6.8%) y 1 M -- (34.2%), disuelta en el mismo buffer Tris-ClH 25 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $Cl_2Mg$  1 mM en que se disuelve el preparado enzimático. Un gradiente lineal entre ambas concentraciones se consiguió disponiendo en sendos recipientes cilíndricos de 1 cm de diámetro interior, 2.4 ml de ambas soluciones límite de sacarosa. El recipiente que contiene la solución -- densa presenta una tubuladura lateral, por la cual penetra al flujo constante de 0.2 ml/min suministrado por una bomba peristáltica, el contenido del recipiente que alberga la solución ligera.

Ambas soluciones se van mezclando continuamente mediante un pequeño agitador, constituido por un motor regulable a cuyo eje se adaptó un alambre de platino que penetra hasta el fondo del tubo de la mezcla. El drenado de éste se inicia simultáneamente al momento de llegada de la solución ligera a la densa, efectuándose por la parte inferior del tubo de mezcla a una velocidad constante y flujo doble del de aporte de

la solución ligera, lo que se consigue con una segunda bomba peristáltica perfectamente calibrada.

Una vez constituido el gradiente, se procedió a la - centrifugación, para ello los tubos llenos, junto con el rotor de la centrífuga se llevaron a estabilización térmica en cámara frigorífica a 4°C, depositándose cuidadosamente las - muestras sobre la superficie de los gradientes y siendo los volúmenes de sobrenadante depositados siempre de 0.2 ml en - cada tubo.

Los tubos se montaron en el rotor tipo swinging-bucket (SW 65Ti) de una ultracentrífuga Beckman L65, sometién dose a 4°C a una centrifugación de 40000 r.p.m. (78700 xg) durante 24 horas. Se puso especial cuidado en conseguir aceleración y desaceleración gradual, que evitase distorsiones del gradiente y material sedimentado.

A continuación, se paso a la fase de elución, para -- ello se sacaron cuidadosamente los tubos del rotor, colocá ndo se en el interior del dispositivo apropiado para su elución - mantenido en posición rigurosamente vertical. Como procedi--- miento de evacuación entre los distintos posibles, se usó el de drenado a partir de la zona de mayor densidad, a través de un capilar de acero introducido verticalmente y cerrado, por la parte superior del tubo de centrífuga.

La idoneidad de este método en relación con el mante- nimiento del gradiente se comprobó en una de las centrifuga-- ciones, adicionando una cantidad mínima de negro de amido a - la solución densa, y comprobación ulterior del mantenimiento de la linealidad por elución y registro continuo a 620 nm.

El flujo de drenaje fué de 0.4 ml/min controlado por

una bomba peristáltica, siendo monitorizado a 280 nm en célula de flujo continuo de 3 mm de paso óptico (LKB, Uvicord II) y registrado en registrador potenciométrico (Perkin-Elmer) de 10 mV, velocidad de carta 5 mm/min. Se recogió una fracción - cada minuto, lo que representa un total de 14 fracciones. Alí cuotas de cada una de ellas se ensayaron para la actividad ribulosa bisfosfato carboxilasa según el procedimiento indicado por Takabe y Akazawa (251), a la vez que se determinó su contenido protéico por el método de Lowry (247) ya descrito anteriormente.

Se reunieron y guardaron las fracciones que presentaban mayor actividad y se comprobó su homogeneidad por el test de pureza, utilizándolas como fuente enzimática a ensayar con los distintos herbicidas.

#### Test de pureza.

Para ver el grado de pureza del enzima, se realizó un ensayo de homogeneidad por electroforesis "en disco" en gel - de poliacrilamida. Se siguió el sistema de buffer discontinuo y la metódica de Ornstein y Davis (252) y (253).

Se utilizó gel tipo "Cyanogum 41" (relación acrilamida:bis de 19/1) con un 7.5% de acrilamida y 0.375% de bisacrilamida. Para su preparación se disuelven en buffer Tris-ClH - 377 mM pH 8.9, 1.786 g de acrilamida y 0.094 g de N-N'-metilén-bis-acrilamida hasta un volumen final de 25 ml. A esta solución se le añaden 75  $\mu$ l de 3-dimetilaminopropionitrilo y en el momento de gelificar 1 ml de una solución recién preparada de riboflavina al 0.013% en el mismo buffer anterior. Antes - de efectuar la gelificación es conveniente filtrar y desgasar la solución de acrilamida-bis. El tiempo de gelificación en -

estas condiciones es de 20 minutos, no obstante, es aconsejable realizar estas operaciones en cámara fría.

La preparación de los geles se llevó a cabo en tubos de vidrio de 7.5 x 0.5 cm que, una vez colocados verticalmente sobre un soporte adecuado, se llenaron de solución, lo -- mas rápidamente posible, hasta una altura de 8 mm del borde; se utilizó para ello un estirón de vidrio. Para evitar la -- formación de un menisco cóncavo en la superficie del gel, se dejaron resbalar por las paredes de los tubos unas gotas del mismo buffer utilizado en su preparación. De esta forma, los geles quedan con una longitud útil de 6.5 cm. Conseguida la gelificación, se desechó la capa de buffer superior y se mon taron los tubos en la cubeta de electroforesis, cuyos compar timentos anódico y catódico, se llenaron con el buffer de -- electrodos: glicocola-Tris-ClH pH 8.2. En estas condiciones de pH, la casi totalidad de las fracciones protéicas se cargan negativamente y emigran hacia el ánodo que se situó en - el tanque inferior.

Las muestras se llevaron al 10% de sacarosa con obje to de aumentar su densidad y se depositaron sobre la superfi cie del gel con ayuda de una microjeringa de cromatografía - gaseosa. Los volúmenes eran variables, de 5 a 50  $\mu$ l, según - la concentración protéica. Normalmente, uno de los 8 tubos - que puede albergar el aparato se reserva para fijar el fren te electroforético, usando para ello azul de bromofenol.

Los desarrollos se llevaron a cabo a 4°C, con un pre rrecorrido a 1 mA por gel -8 mA en total- durante 15 minu- tos. Posteriormente, se aumenta a 5 mA por gel -40 mA en to tal- durante 1 hora 15 minutos, tiempo que aproximadamente tarda el frente en situarse a 1 cm del extremo anódico.

Pasado este tiempo, se desconectan los electrodos y - los geles se sacan de los tubos con ayuda de una aguja de microjeringa, que al inyectarles una pequeña cantidad de agua - por las paredes de vidrio les ayuda a desprenderse de ellas.

Para la tinción se sumergieron los geles durante me-- dia hora en solución de Negro de amido 10B (Analema) al 0.2%, en ácido acético al 7%, decolorándose luego el fondo por lavo do con agitación y flujo continuo de esta solución acética.

#### Reactivos

- Medio de homogeneización Sorbitol-pirofosfato pH 6.5  
Se prepara como en el apartado A.1.d.

- Buffer Tris-ClH 25 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y  $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM

Tris 50 mM (6.0570 g/l de Tris, calidad Merck, p.a.) ... 500 ml  
ClH 50 mM (4.13 ml/l de ClH fumante  $d=1.19$ , calidad Merck)

Ajustar al pH indicado y llevar a 1000 ml con agua destilada.  
Antes de enrasar añadir 0.3722 g de EDTA, 0.1543 g de DTT y 4.2 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ .

- Buffer Tris-ClH 25 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM.

Se prepara igual que el anterior, pero antes de enrasar añadir 0.3722 g de EDTA, 0.1543 g de DTT y 0.2033 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .

- Sol. de Sacarosa 0.2 M (6.8%)  
0.6846 g/10 ml de sacarosa, calidad Merck, para centrifugación en gradiente, en buffer Tris-ClH 25 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM.

- Sol. de Sacarosa 1 M (34.2%)  
3.4230 g/10 ml de sacarosa, calidad Merck, para centrifugación



en gradiente, en buffer Tris-ClH 25 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $Cl_2Mg$  1 mM.

- Buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9

11.4137 g/250 ml de Tris, calidad Merck, p.a., ajustando a pH 8.9 con ClH conc., calidad Merck.

- Sol. de gelificación

Acrilamida, calidad BDH ..... 1.7860 g  
N,N'-metilén-bis-acrilamida, calidad BDH ..... 0.0940 g  
3-dimetilaminopropionitrilo, calidad BDH ..... 75  $\mu$ l  
Buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9 ..... c.s.p. 25 ml  
Se filtra por papel y desgasa a vacío antes de usar.

- Sol. catalítica de Riboflavina

Riboflavina, calidad Sigma, al 0.013% en buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9 ..... 1 ml

Es de preparación extemporánea.

- Buffer de electrodos, Glicocola-Tris-ClH pH 8.2

1.425 g/500 ml de Glicocola, calidad Merck, p.a. Esta solución 38 mM de glicocola antes de enrasar se ajusta a pH 8.2 con buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9.

- Sol. trazadora de azul de bromofenol.

Azul de bromofenol, calidad Spinco-Beckman, al 0.01% en solución al 10% de sacarosa, calidad Merck, p.a.

- Sol. de Negro de amido.

Negro de amido, calidad Analema, a saturación —aproximadamente 0.2%— en acético al 7%.

- Sol. de decoloración

Acido acético glacial, calidad Merck, p.a., al 7% (v/v).

D.1.b.- Metódica.

La determinación de la actividad carboxi-dismutásica se realizó siguiendo el método de Takabe y Akazawa (251). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 0.5 ml:

|  |       |                 |      |             |
|--|-------|-----------------|------|-------------|
| Buffer Tris-ClH 1 M pH 7.8                           | ..... | 100 $\mu$ moles | .... | 100 $\mu$ l |
| Glutation 0.1 M                                      | ..... | 2.5             | "    | .... 25 "   |
| Cl <sub>2</sub> Mg 0.5 M                             | ..... | 5               | "    | .... 10 "   |
| EDTA Na 0.6 mM                                       | ..... | 0.03            | "    | .... 50 "   |
| <sup>14</sup> CO <sub>3</sub> HNa 1 M (2.5 $\mu$ Ci) | ..... | 25              | "    | .... 25 "   |
| Enzima 20 $\mu$ g de proteína                        | ..... |                 |      | .... 50 "   |
| H <sub>2</sub> O                                     | ..... |                 |      | .... 190 "  |
| RuBP 7 mM  | ..... | 0.35            | "    | .... 50 "   |

El ensayo se llevó a cabo en baño termostatzado a 25°C, incubando previamente el enzima con <sup>14</sup>CO<sub>3</sub>HNa y demás componentes de la mezcla para su estabilización y activación (254) --- (255) durante 10 minutos, al cabo de los cuales se inicia la reacción con RuBP. Transcurrido un período de tiempo igual al anterior se para la actividad enzimática por adición de 50  $\mu$ l de ácido acético glacial.

Paralelamente y en idénticas condiciones se llevaron a cabo los ensayos con los diferentes herbicidas, agregando éstos a la mezcla de reacción antes de la incubación con <sup>14</sup>CO<sub>3</sub>HNa. Aunque variaron las concentraciones a las que se añadieron, -- siempre se respetó el volumen final de reacción de 0.5 ml.

Alícuotas de 100  $\mu$ l se pusieron a desecar en viales bajo lámpara de infrarrojo, y una vez desecadas, se añadió a cada vial 0.4 ml de agua destilada para solubilizar, seguidos de 10 ml de mezcla de centelleo. Las medidas de radioactividad se hicieron en un espectrofotómetro de centelleo líquido para emisores  $\beta$ , tipo Packard Tricarb, Modelo 2425. Todos los valores

obtenidos se expresan como % del enzima testigo.

#### D.1.c. Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 1 M pH 7.8

Tris 2 M (242.28 g/l de Tris, calidad Merck, p.a. .... 500 ml

ClH 2 N (16.56 ml/l de ClH fumante  $d=1.19$ , calidad Merck, p.a.)

Ajustar al pH indicado y llevar a 1000 ml con agua destilada.

- Sol. de glutation red. 0.1 M

30.73 mg/ml de glutation reducido, calidad Sigma.

- Sol. de  $Cl_2Mg$  0.5 M

1.0165 g/10 ml de  $Cl_2Mg \cdot 6H_2O$ , calidad Merck, p.a.

- Sol. de EDTA 0.6 mM

2.2 mg/10 ml de EDTA disódico dihidratado, calidad Merck, p.a.

- Sol. de ribulosa-1,5-bisfosfato 7 mM

3.04 mg/ml de ribulosa-1,5-bisfosfato sal tetrasódica dihidra  
to, calidad Sigma.

- Sol. de  $^{14}CO_3HNa$  1000 mM (1 mCi) ..... 10 ml

Sol. de  $^{14}CO_3HNa$  (J.E.N.) 100 mM (1 mCi).. 1 ml

Sol. de  $CO_3HNa$  1100 mM (92.4 mg/ml) ..... 9 ml

- Mezcla de centelleo

Ver epígrafe B.1.d.

#### D.2. Actividad fructosa bisfosfatásica.

En este ensayo se estudia indirectamente, a la par que con el de la RuBP carboxilasa, la influencia de los distintos herbicidas en la formación de azúcares, dado el carácter llave y regulador de ambos enzimas en el ciclo reductivo de las pentosas-P.

#### D.2.a.- Obtención de preparados purificados del enzima.

Hemos utilizado el método desarrollado en nuestro laboratorio por Lázaro y col. (141). Como en casos anteriores, todas las operaciones se efectuaron a 4°C, siguiéndose el contenido de los procesos cromatográficos a 280 nm en célula de flujo continuo de 3 mm de paso óptico (LKB, Uvicord II). Estos se llevaron a cabo en columnas cromatográficas Jobling de doble pistón, a un flujo de 0.5 ml/min en técnica descendente, mediante impulsión con bomba peristáltica (LKB, Recychrom). Las centrifugaciones se realizaron también a 4°C en centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed, mod. RC-2-B.

En cada paso se siguió un control de contenido proteico por el método de Lowry —descrito con anterioridad— y de actividad FDPasa de acuerdo con la técnica que se detalla.

La purificación consta de los siguientes pasos:

##### Preparación de extractos crudos de hoja.

Se partió de 5 Kg de hojas de espinaca y se trataron como siempre. Los fragmentos de hoja se homogeneizaron en buffer Tris-ClH 0.025 M pH 7.5 Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM. La trituración se llevó a cabo en frío en homogeneizador Sorvall-Omnimixer en la proporción 1:1 (p/v) durante 1 minuto y a velocidad tope. El triturado se filtró por triple gasa de nylon y se sometió a centrifugación a 13000 r.p.m. (20000 xg) durante 30 minutos. Una vez decantado el sobrenadante (extracto crudo) se utilizó como material de partida.

##### Precipitación térmica.

El extracto crudo obtenido (2870 ml) se repartió en tubos de ensayo y se sometió a precipitación térmica en baño ter

mostatizado a 60°C. Cuando la temperatura del extracto fue - la deseada (60°C), se empezó a contar el tiempo y al cabo de media hora se introdujeron los tubos en un baño de hielo. Al alcanzar el extracto 4°C se procedió a centrifugar a 7000 -- r.p.m. (6000 xg) durante 10 minutos. De esta forma gran cantidad de proteínas floculan, quedando la actividad en el sobrenadante inalterada. El volumen resultante fué de 2.530 ml.

Fraccionamiento en sulfato amónico.

Con el sobrenadante anterior se procedió a una precipitación con sulfato amónico entre el 30 y el 70% de saturación.

Antes de la precipitación se adicionó EDTA (2.3823 g/l) y cisteína (1.2120 g/l) lo que corresponde a concentraciones 6.4 mM y 10 mM, respectivamente.

Sulfato amónico (calidad Merck) finamente pulverizado en mortero (164 g/l) para llevar el extracto al 30% de saturación, se adicionó lentamente y con agitación constante en baño de hielo. Una vez disuelto en su totalidad se dejó en reposo durante media hora y se centrifugó a 7000 r.p.m. (6000 xg) durante 20 minutos. Se midió el volumen del nuevo sobrenadante y se agregó más sulfato amónico (249 g/l) hasta una concentración del 70% de saturación, procediéndose como antes.

El precipitado obtenido se recogió disolviéndolo en un volumen 60 veces menor del inicial (44 ml) de buffer acético-acetato 0.05 M pH 5.5 y se mantuvo en maceración con agitación constante durante una noche. Después se centrifugó a 13000 r.p.m. (20000 xg) durante 30 minutos, recogiendo -

el sobrenadante para continuar el proceso de purificación. - Se ha visto que la mayor parte de la actividad permanecía en este sobrenadante.

#### Filtración por Sephadex G-100.

Se utilizó Sephadex G-100 (40-120  $\mu$  de diámetro de partícula), calidad Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia), 1 g del cual suministra, una vez hinchado, un volumen de cama de 15 a 20 ml.

Para el hinchado y equilibrado se suspende la cantidad necesaria de Sephadex en 10-12 veces (p/v) del buffer indicado, y se lleva a baño maría con agitación durante 3 horas. Pasado este tiempo se deja enfriar, se desgasa a vacío hasta que no desprenda burbujas, para evitar empaquetamientos y -- flujos desiguales, y se procede al llenado de la columna.

Se emplearon columnas (2.5 x 65 cm) equipadas en sus terminales con sendos émbolos provistos de placas porosas de teflón, que pueden regular la altura útil de la columna. Cada extremo del émbolo lleva conectado un tubo también de teflón que canaliza la entrada y salida del eluyente.

Tanto la preparación de la columna como el proceso cromatográfico completo se llevan a cabo en cámara fría a 4°C. Se estabiliza la columna haciendo pasar 500 ml de buffer al flujo de 0.5 ml/min, pasando a continuación la muestra (aprox. 30 ml), que se eluye con el mismo buffer, y recogiénose las distintas fracciones eluidas mediante un colector de fracciones automático (LKB, Ultrorac). Utiliza un sistema de volumen fijo por contaje del número de gotas, recogiénose, en estas condiciones, fracciones de 10 ml también al flujo de 0.5 ml/min.

El cambio de fracción queda indicado en el registro, efectuándose en transmitancias a 280 nm a lo largo del proceso de elución.

Poco después del volumen de exclusión, eluía el enzima, reuniéndose todas las fracciones que presentaban actividad.

Filtración por Sephadex G-200.

El material activo obtenido en el pase por G-100, se pasó en varios lotes (máximo 60 ml) por una columna (3.8 x 56.5 cm) de Sephadex G-200 (40-120  $\mu$  de diámetro de partícula) previamente equilibrada y eluída en las mismas condiciones anteriores. En este caso el enzima eluía al final del material protéico total. Se reunieron las fracciones activas.

Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

Se utilizó DEAE-52 celulosa (Whatman), tipo microgranular. Esta celulosa se suministra en forma de polvo húmedo y, antes de preparar la columna, hay que proceder a su estabilización. Para ello, la cantidad adecuada de polvo se suspende en un exceso de buffer acético-acetato 0.5 M pH 5.5 -- (10 veces mas concentrado que el que se emplea luego en la estabilización de la columna), se deja sedimentar durante 1 hora y se desecha por decantación el sobrenadante, que lleva en suspensión un polvo muy fino (fines). Con este mismo buffer se hacen varios tratamientos análogos durante un tiempo aproximado de 6 horas. Suspendida ahora en acético-acetato 0.05 M pH 5.5 unas 3-4 veces, por último se desgasa y queda ya preparada para el montaje de la columna (2 x 10 cm), lo que se hace de la forma acostumbrada, así como la aplicación

de la muestra. Como tal se emplea la reunión de fracciones -  
activas de G-200, recogién<sup>do</sup>se un volumen similar de material  
no fijado,

La FBPasa quedaba fijada cuantitativamente, procediénd<sup>ose</sup>  
dise a su elución con 100 ml de buffer acético-acetato 0.05 M  
pH 5.5 hecho 0.25 M en ClNa, y luego con el mismo buffer aumen<sup>tando</sup>  
tando la concentración en ClNa hasta 1 M. La velocidad de elu<sup>ción</sup>  
ción fué de 0.5 ml/min.

A continuación, todas las fracciones activas eluidas  
se reunieron y se dializaron frente a buffer acético-acetato  
0.05 M pH 5.5 durante 22 horas, en saco de celofán y con flu<sup>jo</sup>  
jo continuo. Una vez dializadas las fracciones activas se con<sup>servaron</sup>  
servaron a 4°C, utilizándose como fuente de enzima en los en<sup>sayos</sup>  
sayos con herbicidas, una vez comprobada su homogeneidad por  
el test de pureza.

#### Test de pureza.

Se efectuó un ensayo de homogeneidad por electrofore<sup>sis</sup>  
sis "en disco" en gel de poliacrilamida, utilizando el siste<sup>ma</sup>  
ma de buffer discontinuo y metódica de Ornstein y Davis (252)  
(253) ya descrita en el apígrafe D.l.a.

#### Reactivos.

- Buffer Tris-ClH. 0.025 M pH 7.5, Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM  
Tris 0.1 M (12.114 g/l de Tris, calidad Merck, p.a.).... 500 ml  
ClH 0.1 N (8.3 ml/l de ClH fumante d = 1.19, calidad Merck, p.a.)  
..... 403 ml

Se ajusta al pH indicado en pHmetro (Beckman, Expandoma<sup>tic</sup>  
tic SS-2) con la solución clorhídrica, y se enrasa a 2 l con agua  
destilada. Antes de enrasar se adicionan 2.0331 g de Cl<sub>2</sub>Mg.6H<sub>2</sub>O,  
calidad Merck.



- Buffer acético-acetato 0.05 M pH 5.5  
 Acetato sódico 0.05 M (6.805 g/l de acetato sódico,  
 calidad Merck, p.a.) ..... 885 ml  
 Acido acético 0.05 M (2.85 ml/l de ácido acético  
 glacial, calidad Merck, p.a.) c.s.p. ....1000 ml

Hacer el ajuste al pHmetro, añadiendo solución de áci  
 do acético 0.05 M, hasta alcanzar el pH indicado.

- Buffer acético-acetato 0.05 M pH 5.5, ClNa 0.25 M

Se prepara del mismo modo que el anterior, pero añá  
 diendo antes de enrasar 14.62 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.

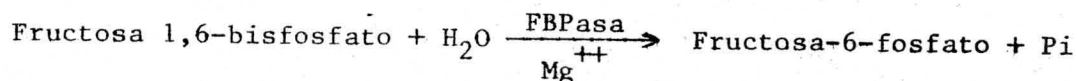
- Buffer acético-acetato 0.05 M pH 5.5., ClNa 1 M

La misma preparación que los anteriores, pero añadien  
 do antes de enrasar 58.5 g/l de ClNa, calidad Merck, p.a.

#### D.2.b.- Metodica.

Determinación de la actividad enzimática.

Para determinar la actividad fructosa 1,6-bisfosfatá  
 sica se empleó el método basado en la medida del ortofosfato  
 liberado en la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato, ha  
 ciendo uso de la propiedad de este enzima de mostrar activi  
 dad en presencia de altas concentraciones de Mg<sup>++</sup> (256) (257)  
 (258), según:



Determinación de fósforo inorgánico.

Se empleó una modificación del método original de Fiske  
 y Subbarow (259) basado en la medida del ortofosfato liberado

en la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato. El ortofosfato con el reactivo sulfomolibdico dá un fosfomolibdato, - que por reducción con sulfito sódico e hidroquinona, forma un azul de molibdeno medible espectrofotométricamente con - máximo de absorción a 640 nm. La fructosa-1,6-bisfosfato no hidrolizada no da la reacción indicada, por lo tanto, el color producido dependerá exclusivamente del ortofosfato liberado.

Curva patrón de fosfatos.

A 10 tubos de ensayo se les adicionó, al primero 1 ml de agua destilada y a los siguientes 1 ml de solución -- conteniendo cantidades de fosfato monopotásico de 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu$ g de fósforo, sucesivamente, se les fué añadiendo a cada uno 1 ml de reactivo sulfomolibdico, 1 ml de solución de sulfito sódico al 20% y 1 ml de hidroquinona al 1%. A los 10 min de la última adición se hace la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 640 nm tomando como blanco el primer tubo,

Los valores de absorción obtenidos se llevaron a ordenadas en un sistema coordinado, representándose en abscisas las correspondientes concentraciones de fósforo (fig.2).

Método.

En tubos de 5 ml se dispusieron:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Buffer Tris-ClH 0.2 M pH 8.8 .....  | 0.5 ml |
| EDTA 16 mM .....                    | 0.2 "  |
| Cl <sub>2</sub> Mg 50 mM .....      | 0.2 "  |
| Cisteína 50 mM .....                | 0.2 "  |
| Fructosa 1.6-bisfosfato 20 mM ..... | 0.4 "  |

Herbicida ..... 0.02 ml  
 FBPasa, 25 µg de proteína ..... 0.5 "

Los herbicidas en cada caso, se añadieron a concentraciones diferentes pero siempre en igual volumen, adicionando esta misma cantidad de disolvente correspondiente o agua destilada, en el tubo con actividad enzimática considerado como testigo y en el blanco.

Una vez estabilizados a 28°C los tubos con la mezcla de reacción anterior, se adicionó a cada uno, a tiempo 0,0.5 ml de la solución enzimática. La incubación se mantuvo a 28°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción añadiendo 1 ml de solución al 5% de ácido tricloroacético.

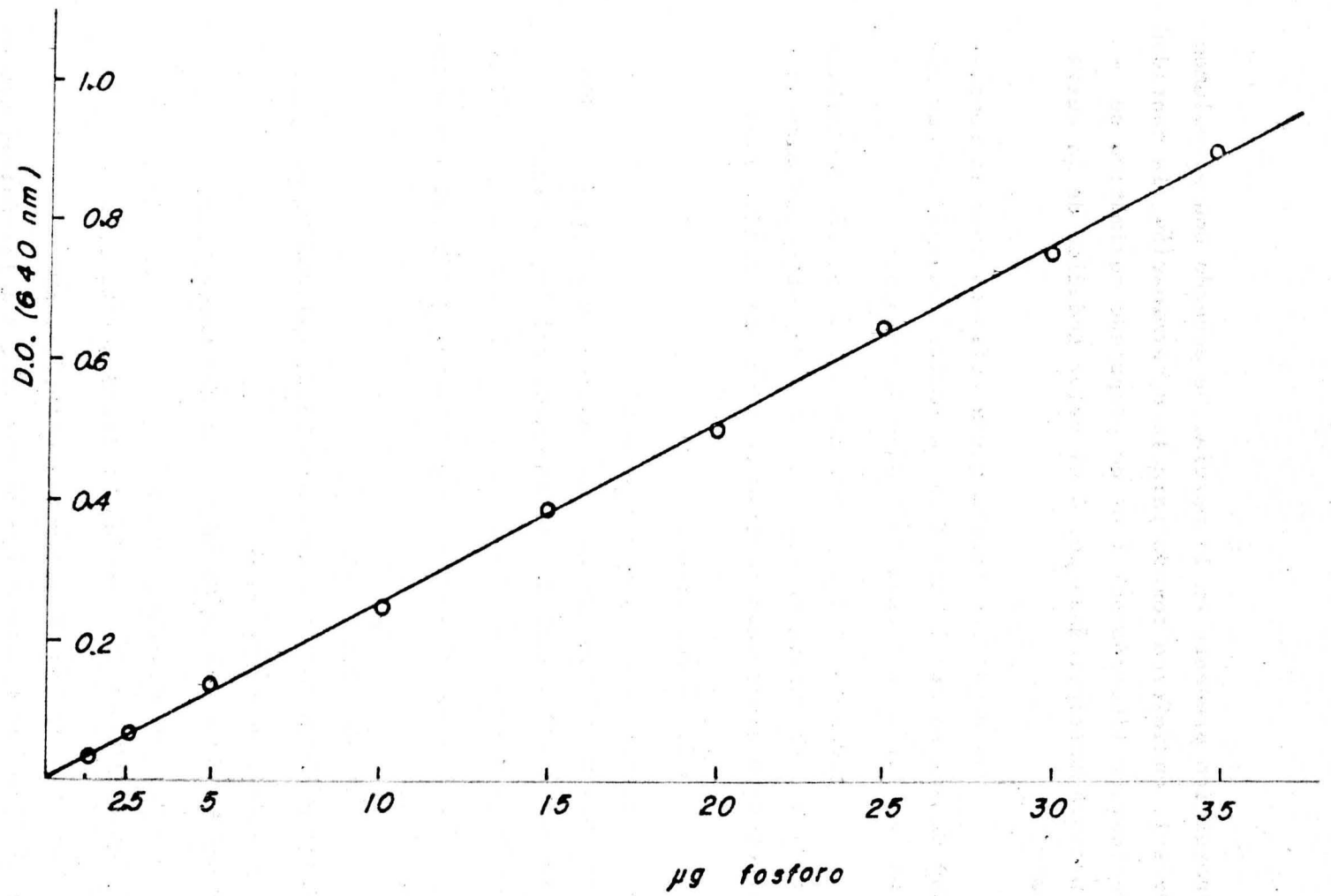
Otro tubo —el considerado como blanco— preparado de forma análoga pero sin añadirle solución enzimática, se incubaba parando la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y luego 0.5 ml de la solución enzimática.

Después de centrifugar a 5000 r.p.m. (2800 xg) durante 10 min, se determina sobre una alícuota de 1 ml de sobrenadante la cantidad de fosfato inorgánico liberado:

Sobrenadante ..... 1 ml  
 Reactivo sulfomolibdico ..... 1 "  
 Solución de sulfito sódico ..... 1 "  
 Solución de hidroquinona ..... 1 "

A los 10 min de esta última adición se hizo la lectura a 640 nm.

El valor de absorción leído se lleva a la curva patrón y se determina por interpolación la cantidad de fósforo



239

Fig 2

inorgánico presente en la mezcla. De acuerdo con el volumen de sol. enzimática tomada para la determinación, la cantidad de fosfato liberado por 1 ml de preparado enzimático se - obtendrá multiplicando por 6 el valor deducido de la curva patrón.

Una unidad de FBPasa queda definida como la canti-- dad de enzima que libera 1  $\mu$ M de fosfato inorgánico por mi-- nuto en las condiciones indicadas de ensayo.

Todos los valores deducidos de la acción de herbici-- das sobre el enzima se expresan en % del obtenido para la - fructosa bisfosfatasa testigo en idénticas condiciones.

#### D.2.c.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.2 M pH 8.8  
Tris 0.4 M (48.456 g/l de Tris, calidad Merck, p.a.).. 500 ml  
ClH 0.4 N (32.4 ml/l de ClH fumante, d=1.19, calidad Merck, p.a.) .....≈85 ml

Ajustar al pH indicado y llevar a 1000 ml con agua - destilada.

- Sol. de EDTA 16 mM  
0.596 g/100 ml de EDTA disódico.2H<sub>2</sub>O, calidad Merck, p.a.

- Sol. de Cl<sub>2</sub>Mg 50 mM  
1.016 g/100 ml de Cl<sub>2</sub>Mg.6H<sub>2</sub>O, calidad Merck, p.a.

- Sol. de Cisteína 50 mM  
0.6060 g/100 ml de cisteína, calidad Merck, p.a.

- Sol. de Fructosa 1,6-bisfosfato 20 mM  
11.0 mg/ml de fructosa 1,6-bisfosfato, sal trisódica, con -- 8H<sub>2</sub>O, calidad Boehringer.

- Sol. de ácido tricloroacético al 5%  
5 g/100 ml de ácido tricloroacético, calidad Merck, p.a.

- Reactivo sulfomolibdico: se prepara mezclando sol.A y B.

Sol. A { Molibdato amónico ..... 25 g  
          { agua destilada ..... 300 ml

Sol. B {  $\text{SO}_4\text{H}_2$  conc. .... 75 ml  
          { agua destilada ..... 125 ml

- Sol. de Hidroquinona  
1 g/100 ml de Hidroquinona, calidad Merck, p.a. en agua destilada acidulada con unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Es de preparación extemporánea.

- Sol. de Sulfito sódico  
20 g/100 ml de sulfito sódico, calidad Merck, p.a. en agua destilada acidulada con unas gotas de sulfúrico concentrado. Es de preparación extemporánea. La disolución se ha de efectuar con fuerte agitación con el fin de evitar la cristalización del sulfito.



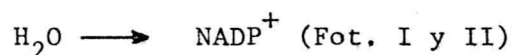
RESULTADOS





## A.- Transporte electrónico

### A.-1.- Operatividad de la cadena de transporte:

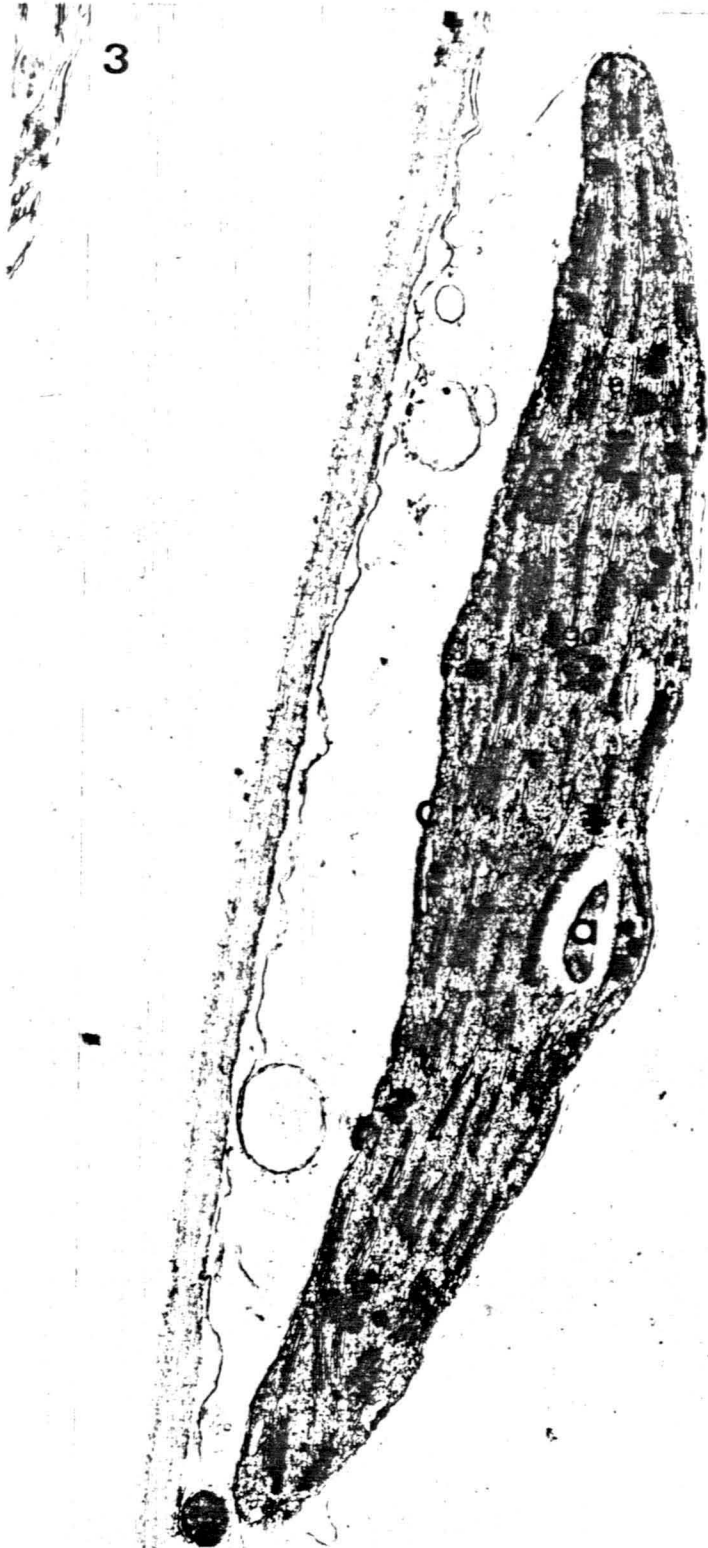


Se han usado cloroplastos integros tipo A, según la clasificación de Hall, como muestra la fotografía al microscopio electrónico (figura 3). Usados como testigos, presentan una actividad de 40  $\mu$ moles de oxígeno desprendido por mg. de clorofila en una hora.

La acción ejercida por los diferentes herbicidas a diversas concentraciones sobre el transporte electrónico de la cadena completa en el cloroplasto se esquematiza en las figuras 4 a 7, representando el porcentaje de oxígeno desprendido en relación al estandar. Así mismo la tabla I recoge el tanto por cien de inhibición ó activación producida por los herbicidas sobre esta transferencia electrónica.

Los valores debidos a la acción de amitrol, no se incluyen en figura ni en tabla por ser nula su actividad. Los resultados en ésta y en las restantes experiencias son la media de -- tres determinaciones como mínimo.

Fig. 3: CLOROPLASTO TESTIGO. Cubierta plastidial (c); estroma (e); grana (g); glóbulos osmiófilos (go); almidón (a). x 15.000.



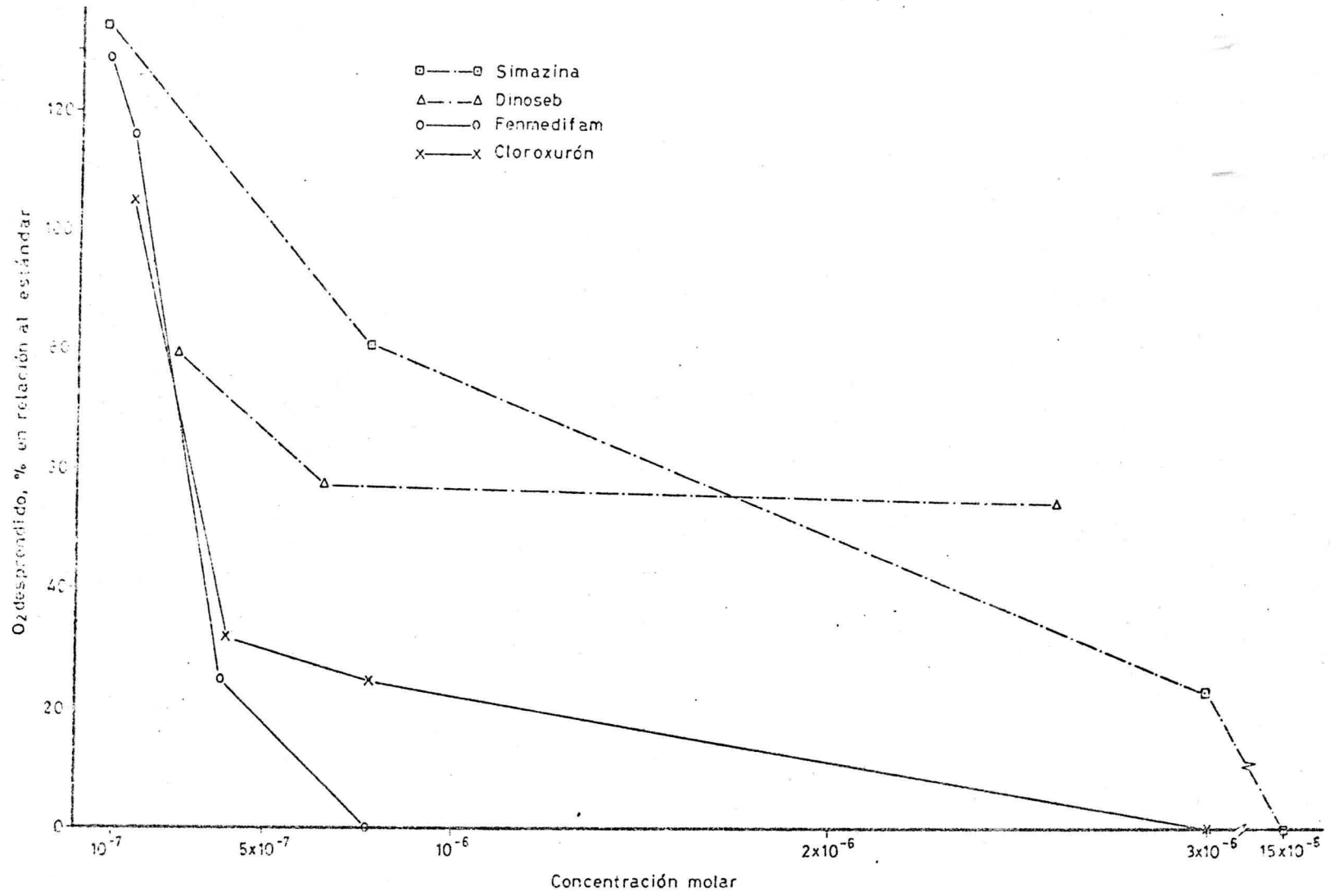


Fig. 4

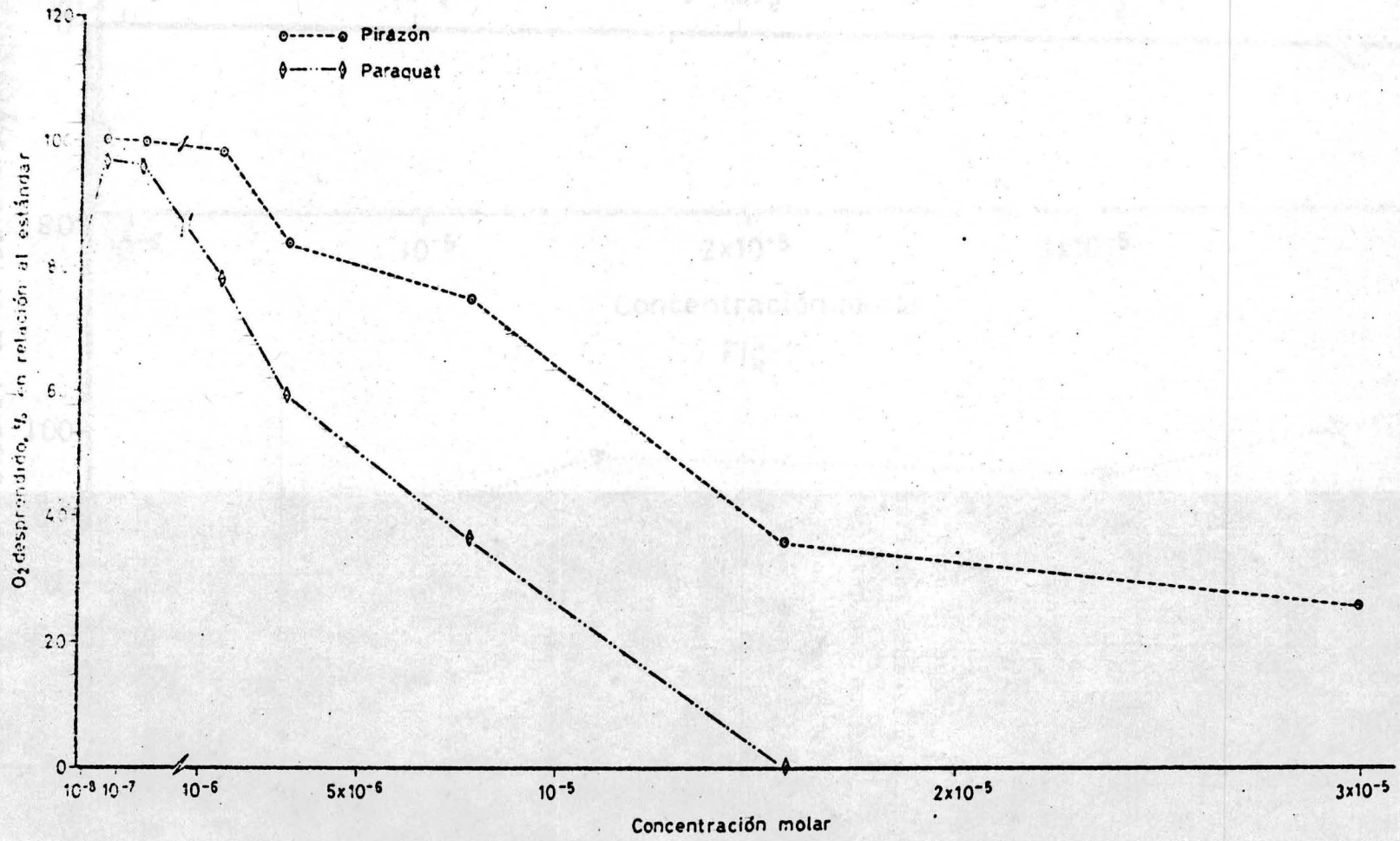


Fig. 5

052

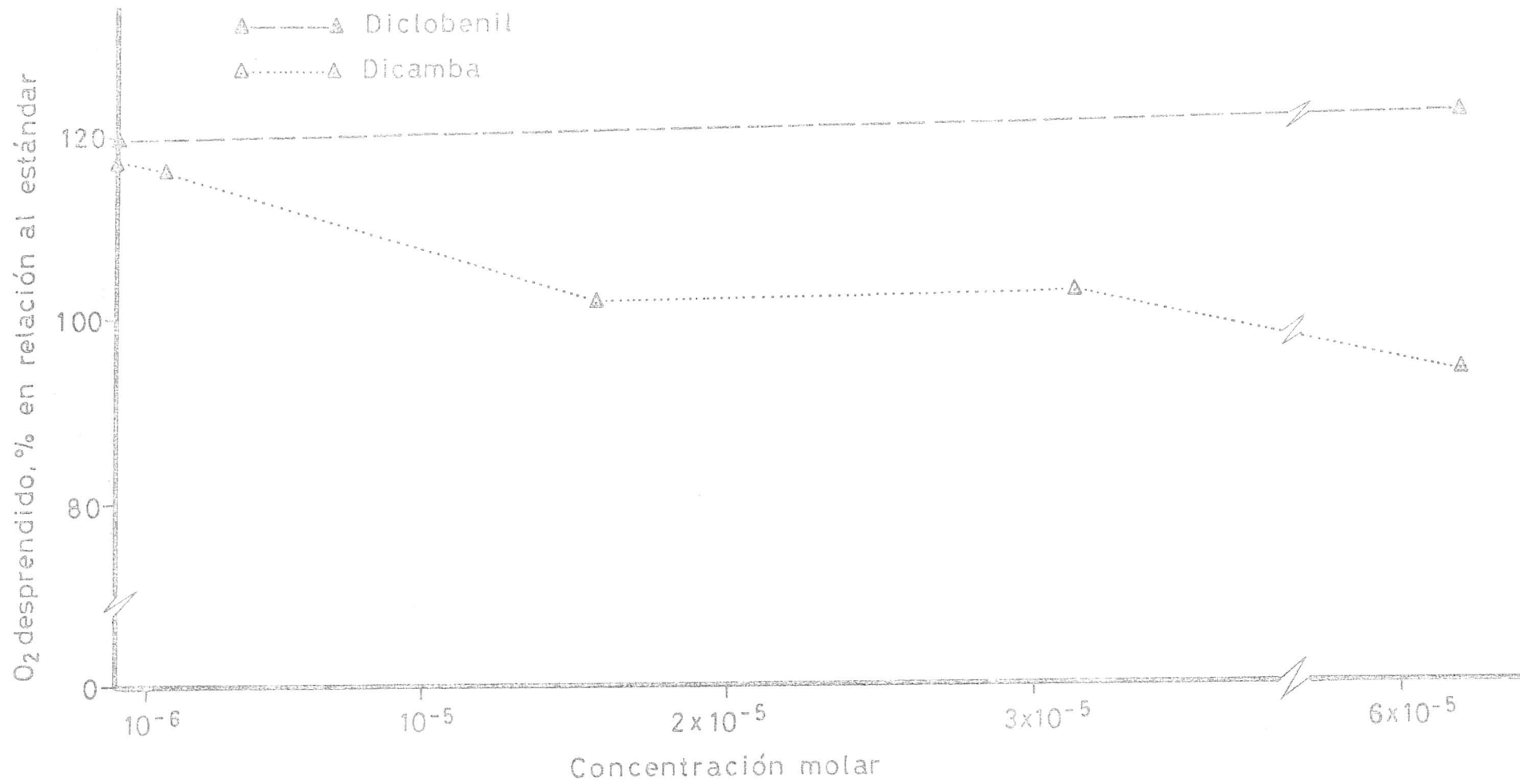


Fig. 6

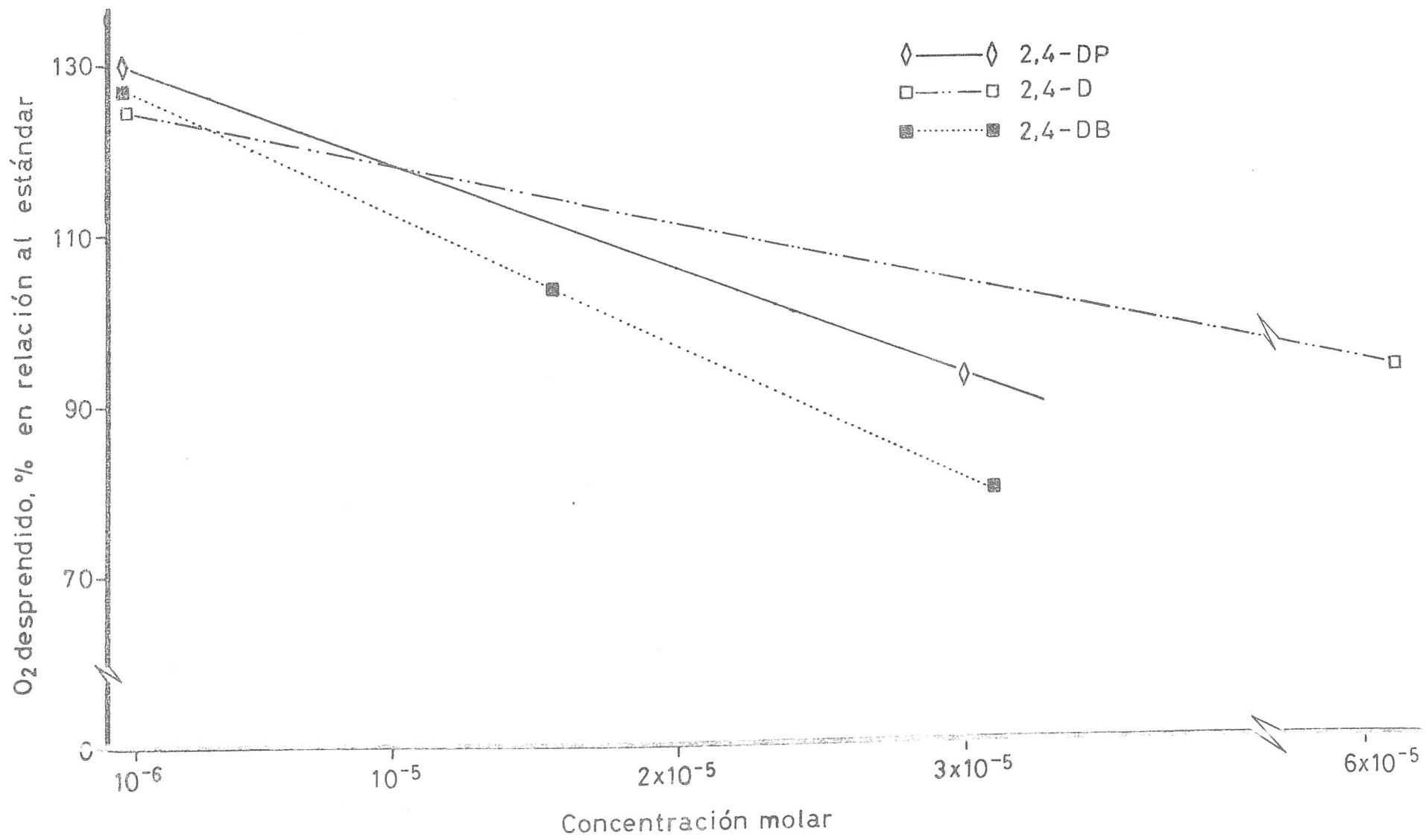


Fig. 7



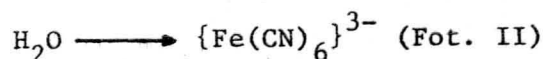
TABLA I

Transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^*$  (Fot. I y II)

% de inhibición o activación (a) producida

| <u>Herbicida</u> | <u>Concentraciones (<math>\mu M</math>)</u> |             |            |            |            |            |            |             |           |             |
|------------------|---|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----------|-------------|
|                  | <u>0,08</u>                                 | <u>0,15</u> | <u>0,3</u> | <u>0,8</u> | <u>1,5</u> | <u>3,1</u> | <u>7,8</u> | <u>15,6</u> | <u>31</u> | <u>62,5</u> |
| Paraquat         | 3,0   | 4,0         |            |            | 22         | 41         | 64         | 100         |           |             |
| Fenmedifam       | 28a   | 16a         | 75         | 93         |            |            |            |             |           |             |
| Simazina         | 38a   |             |            | 19         |            | 77         |            | 100         |           |             |
| Cloroxurón       |   | 5a          | 69         | 75         |            | 100        |            |             |           |             |
| Dinoseb          |   |             | 22         | 43         |            | 46         |            |             |           |             |
| Pirazón          | -   | -           |            |            | 1,0        | 16         | 25         | 69          | 74        |             |
| 2,4-D            |   |             | 24a        |            |            |            |            |             |           | 4,0         |
| 2,4-DB           |   |             | 27a        |            |            |            |            | 3,0a        | 20        |             |
| 2,4-DP           |   |             | 30a        |            |            |            |            | 5,0a        | 4,0       |             |
| Diclobenil       |   |             | 20a        |            |            |            |            |             |           | 22a         |
| Dicamba          |   |             |            |            | 16a        |            |            | 2,0a        | 3,0a      | 9,0         |

A.2.- Operatividad de la cadena de transporte:

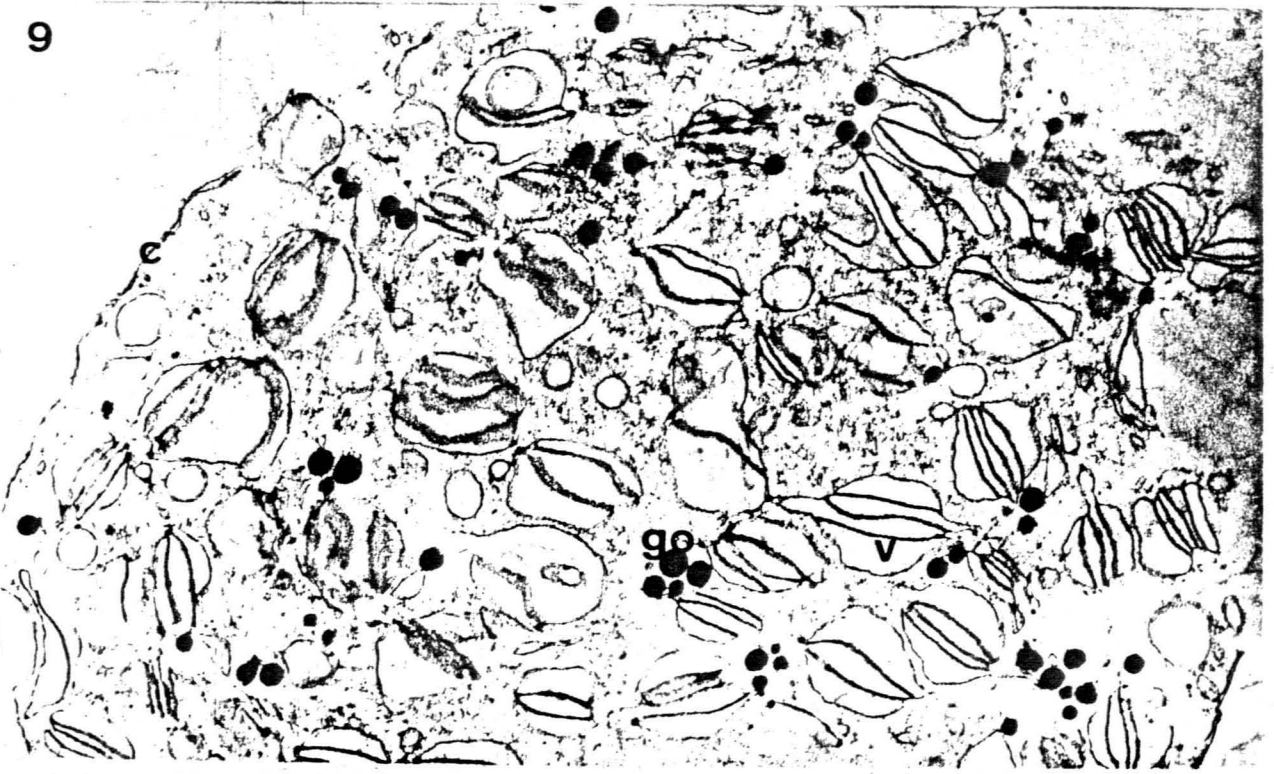


El estudio de este tramo de cadena fotosintética se lleva a cabo en cloroplastos con estructura parcialmente desorganizada, conteniendo numerosos glóbulos osmiófilos y permeables, por rotura de membranas, al aceptor químico de electrones, como puede verse en las figuras 8 y 9 que recogen diferentes estadios de envejecimiento de los cloroplastos. Bajo estas condiciones, los cloroplastos estandar desprenden 45  $\mu$ moles de oxígeno por cada mg. de clorofila en una hora.

Las figuras 10 a 13 nos muestran los porcentajes de oxígeno desprendido por los cloroplastos tratados con los diferentes herbicidas respecto al testigo. En la tabla II se expone el tanto por ciento de inhibición ó activación producido por los herbicidas sobre la actividad cloroplástica de transporte de electrones a lo largo del Fot. II.

Un ejemplo representativo de la distinta acción de algunos herbicidas cuando se trata de operatividad de la cadena completa ó relativa al Fot. II, lo tenemos en el registro polarográfico en ambos casos de la acción de Paraquat a la concentración - 9,5  $\mu$ M (figura 14). En a) se registra la inhibición total que sufre el transporte electrónico cuando se trata de analizar la cadena completa de cloroplastos en presencia del herbicida, y su reversibilidad al añadirle ferricianuro. En b) se repite la experiencia, aunque agregando el ferricianuro anteriormente al paraquat y con cloroplastos parcialmente desorganizados; en estas condiciones el desprendimiento de oxígeno ocurre con normalidad, sólo manifestándose la inhibición cuando se ha agotado el ferricianuro del medio de reacción.

Figs. 8 y 9: CLOROPLASTOS ENVEJECIDOS. Cubierta plastidial (c); granas hinchados (g); vesículas originadas a partir de tilakoides (v); glóbulos osmiófilos (go). x 20.000; x 20.000.



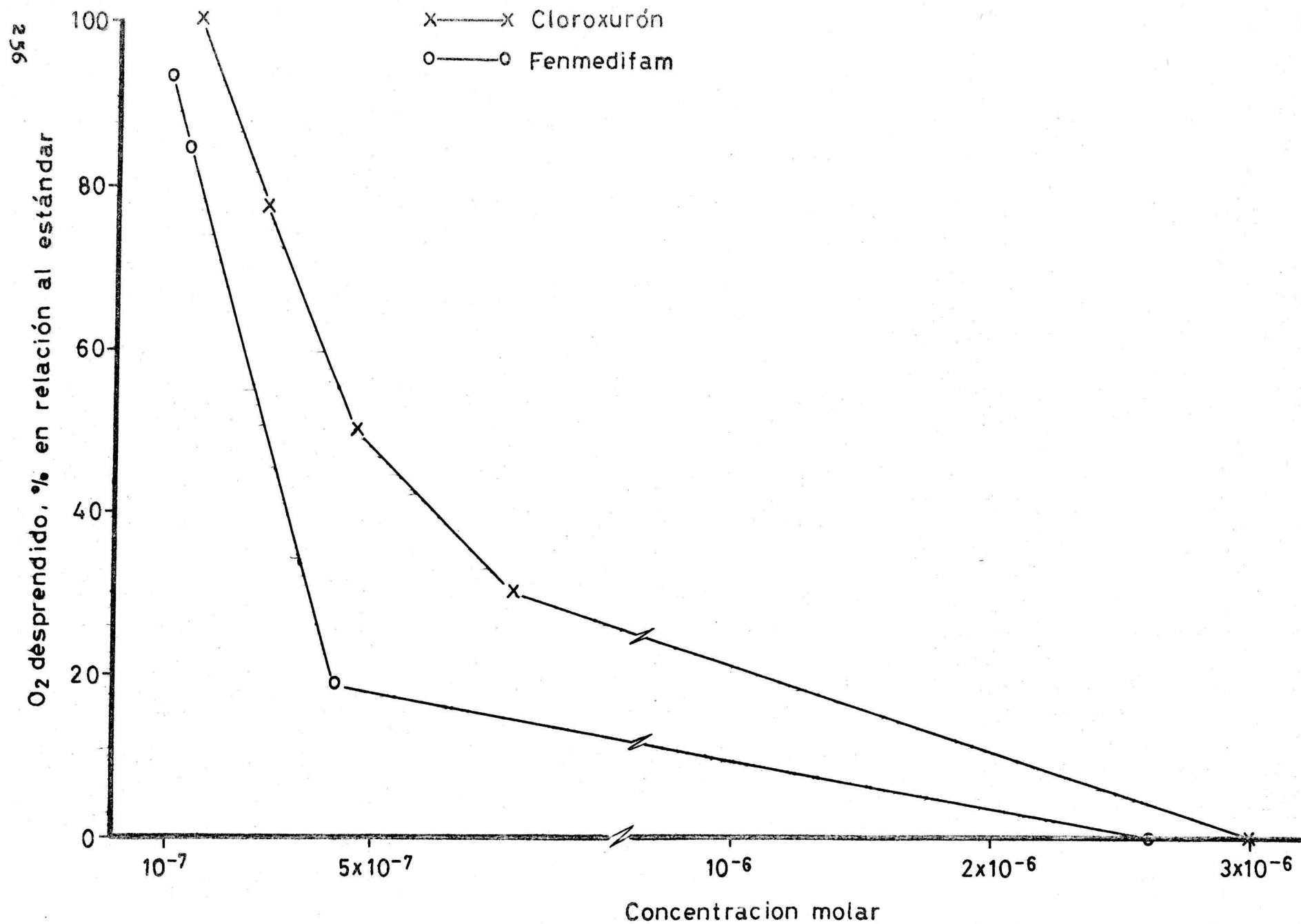


Fig. 10

áandar

130

◇—◇ 2,4-DP  
 □—□ 2,4-D  
 ■—■ 2,4-DB

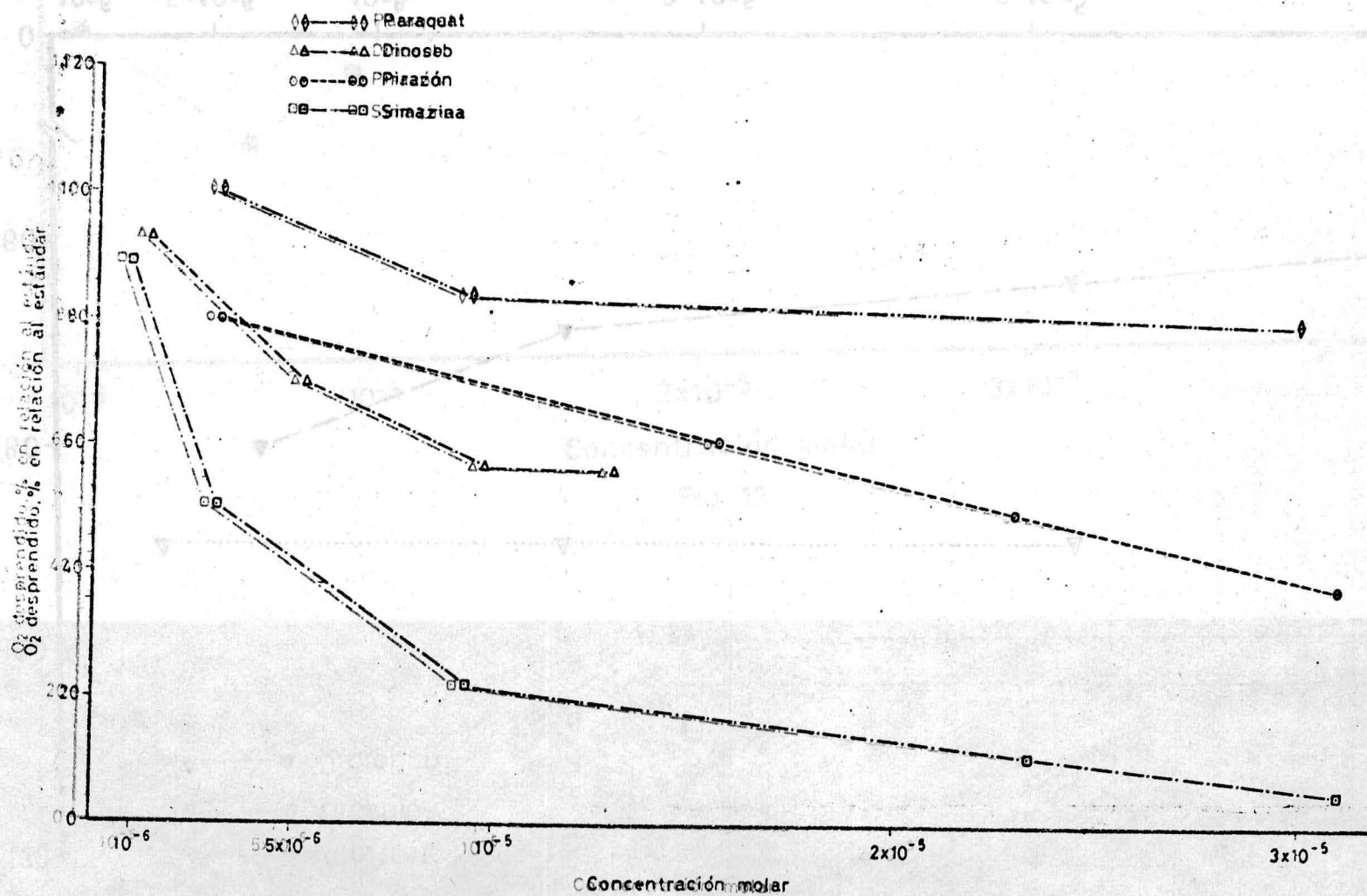


Fig. 11

258

estándar

120

100

- Amitrol  
 ▲-----▲ Dicamba  
 ▲-----▲ Diclobenil

TABLA II

Transporte electrónico  $H_2O \rightarrow \{Fe(CN)_6\}^{3-}$  (Fot. II)

% de inhibición o activación (a) producida

| Herbicida  | Concentraciones ( $\mu M$ ) |     |     |     |     |     |     |      |     |    |      |    |     |      |
|------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|------|----|-----|------|
|            | 0,1                         | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 1,5 | 3    | 6   | 9  | 15,6 | 23 | 31  | 62,5 |
| Fenmedifam | 7,0                         | 14  |     | 81  |     |     |     | 100  |     |    |      |    |     |      |
| Cloroxurón | -                           |     | 23  |     | 50  | 70  |     | 100  |     |    |      |    |     |      |
| Simazina   |                             |     |     |     |     | 12  |     | 50   | 67  | 78 |      | 89 | -95 |      |
| Dinoseb    |                             |     |     |     |     |     | 8,0 |      | 30  | 43 | 44   |    |     |      |
| Pirazón    |                             |     |     |     |     |     |     | 20   |     |    | 38   | 54 | 63  |      |
| 2,4-DB     |                             |     |     |     |     |     | 18  |      | 29  | 24 | 9,0  |    |     |      |
| Diclobenil |                             |     |     |     |     |     |     |      | 20  |    | 32   |    | 37  | 40   |
| Paraquat   |                             |     |     |     |     |     |     | 0,0  | 6,0 | 16 | 9,0  |    | 20  |      |
| 2,4-D      |                             |     |     |     |     | -   | 6,0 |      | -   |    |      |    | 7,0 | 4,0  |
| 2,4-DP     |                             |     |     |     |     |     |     | 3,0a |     |    | 5,0a |    | 31a |      |
| Dicamba    |                             |     |     |     |     |     |     | 10   |     |    | 10   |    | 10  |      |

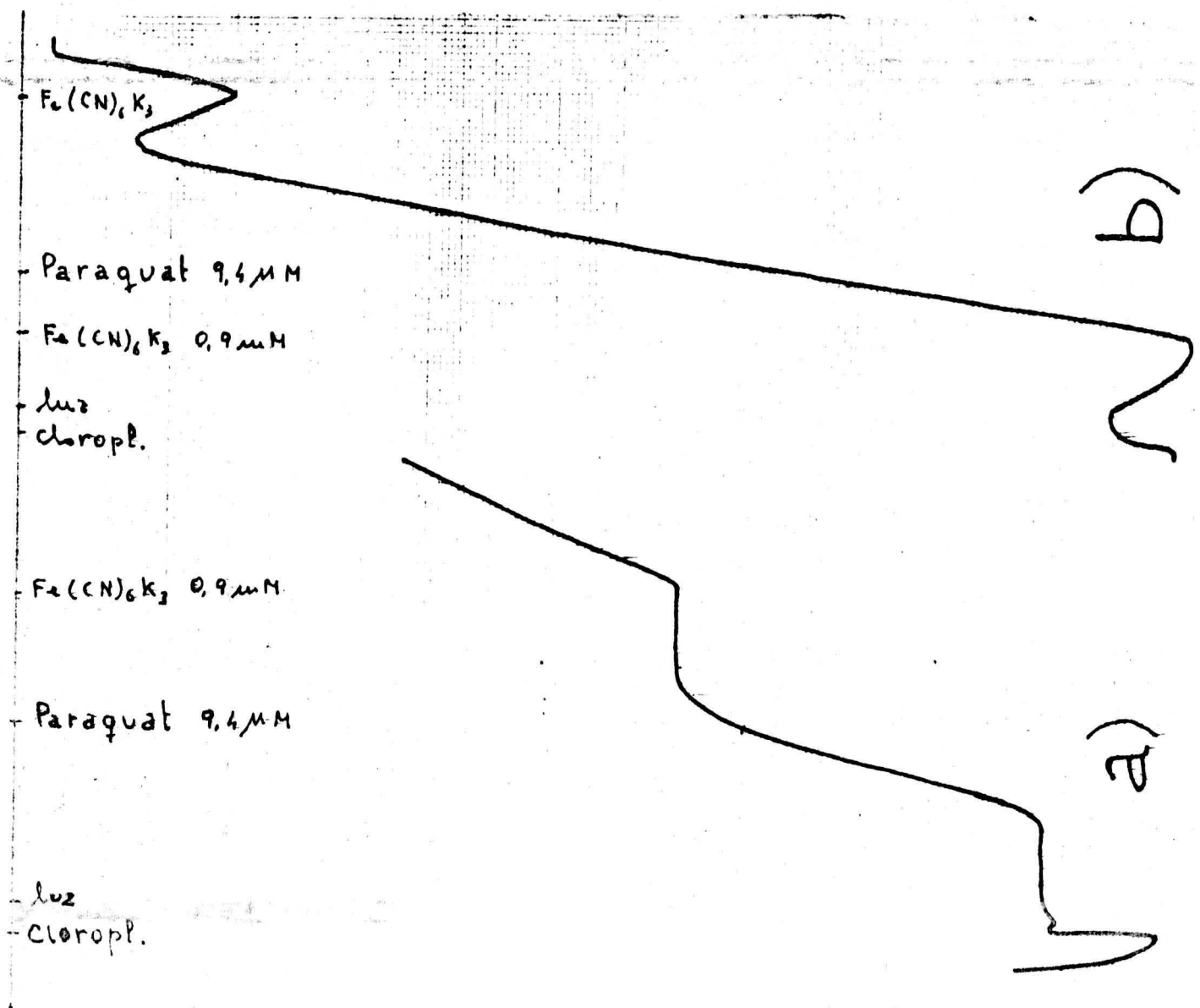
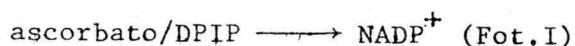


Fig. 14



Al margen de estas experiencias, aunque ligadas a --- ellas por las condiciones de ensayo y clase de cloroplastos usados, se registra excepcionalmente, y a título de prueba las observaciones al microscopio electrónico de las acciones producidas a nivel estructural en cloroplastos íntegros, por los herbicidas paraquat 50  $\mu$ M y fenmedifam 10  $\mu$ M, al incubarlos con iluminación durante 15 minutos en un medio de reacción idéntico a estos de transporte electrónico y fijación de  $\text{CO}_2$ . Las figuras 15, 16 y 17 relativas al paraquat y 18, 19 al fenmedifam, muestran los cambios en la forma y volumen sufridos por el cloroplasto, abundantes plasto glóbulos, así como la rotura en un caso e integridad en otro, de sus cubiertas externa e interna.

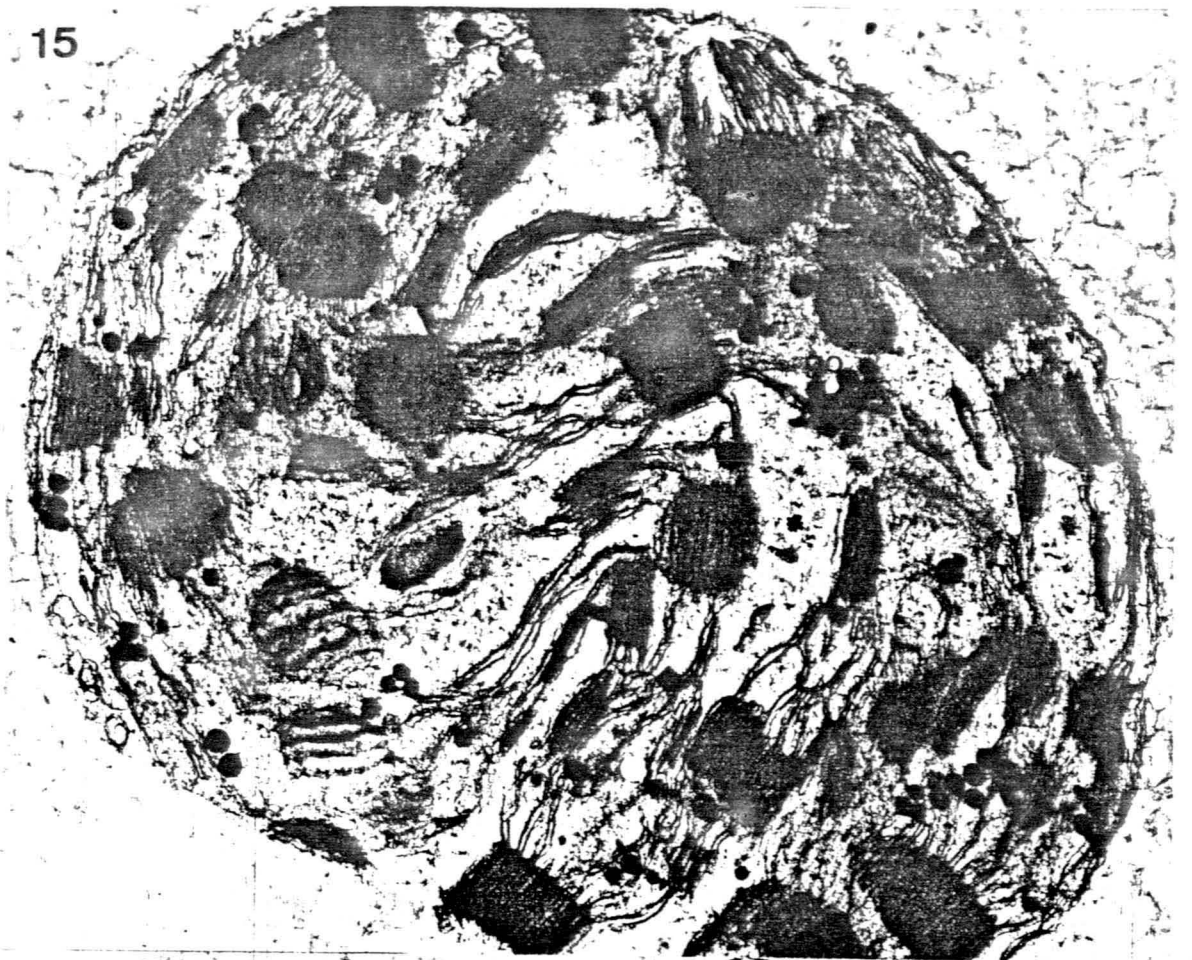
#### A.3.- Operatividad de la cadena de transporte:



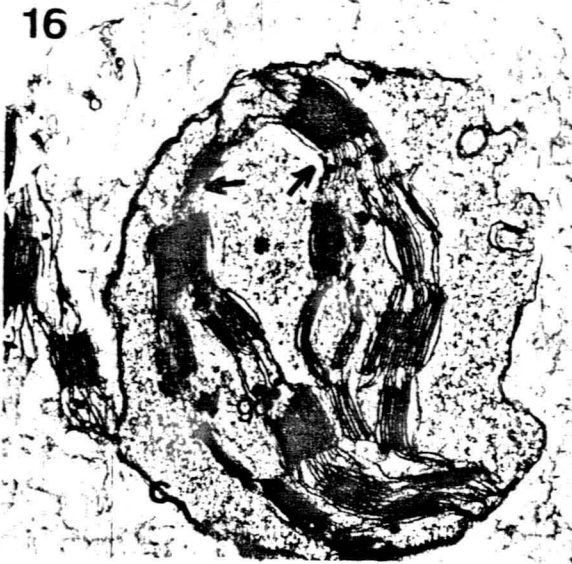
Las figuras 20 a 25 nos muestran el incremento de absorción a 340 nm a intervalos de tiempo de 3 minutos. Todas las pruebas llevadas a cabo están representadas junto a su testigo correspondiente cuya actividad presenta una media de 50,8  $\mu$ moles de NADPH por mg. de clorofila en una hora; puede observarse el aumento progresivo de la inhibición -en los casos que se produzca- al elevar la concentración, unas veces ya en la pendiente inicial antes de los 3 minutos, mientras que en otras únicamente se detecta en un periodo ya avanzado de la reacción.

En la tabla III se expresa el tanto por ciento de inhibición o activación producido en la reducción de  $\text{NADP}^+$  por las diferentes concentraciones usadas. Se recogen los datos producidos en los tres primeros minutos y los de un intervalo representativo de la reacción (12-18 minutos).

15



16

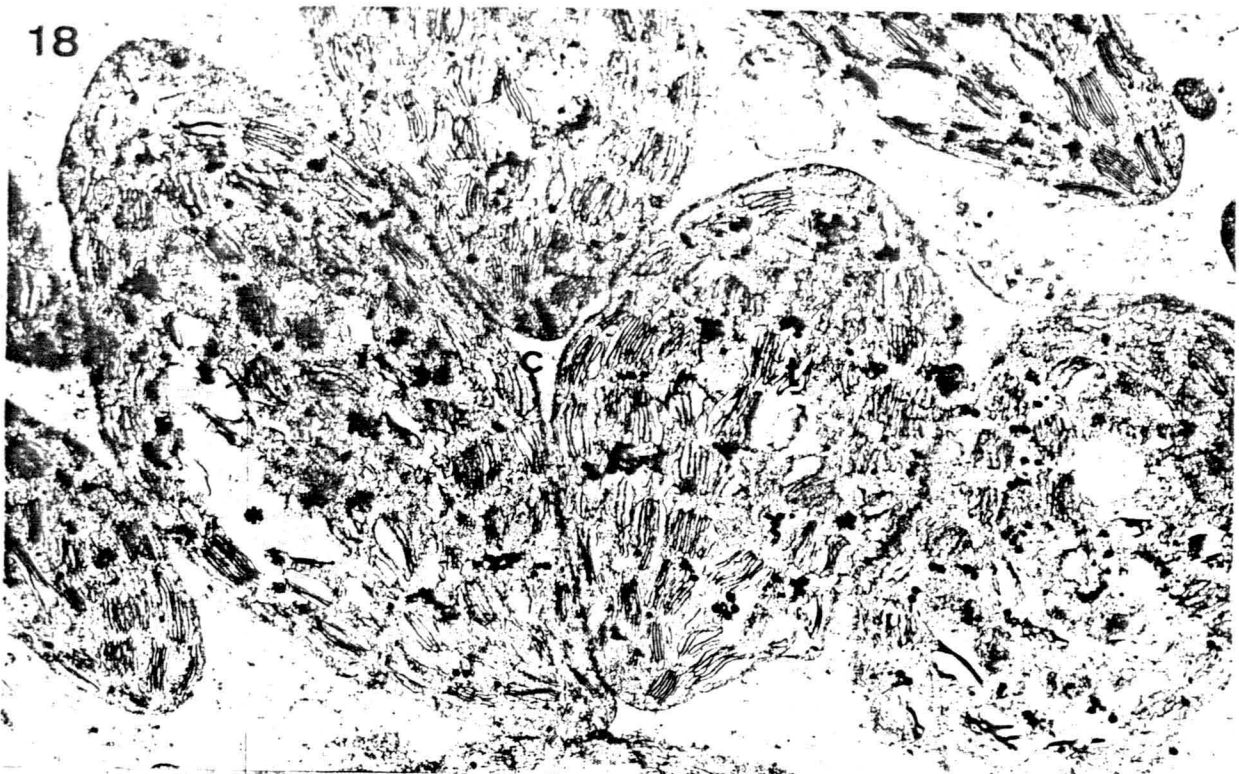


17



Figs. 15, 16 y 17: CLOROPLASTOS TRATADOS CON PARAQUAT. Cubierta plastociana (c); grana (g); sistema de membrana interno distorsionado ( $\rightarrow$ ); áreas de estroma libres de estructuras (\*); glóbulos osmiófilos (go). x 20.000; x 15.000; x 15.000.

18



19



Figs. 18 y 19: CLOROPLASTOS TRATADOS CON FENMEDIFAM. Cubierta externa (c); distorsión del sistema de membrana interno (↔); tilakoides dilatados (t); áreas de estroma degradado (\*). x 15.000; x 20.000.

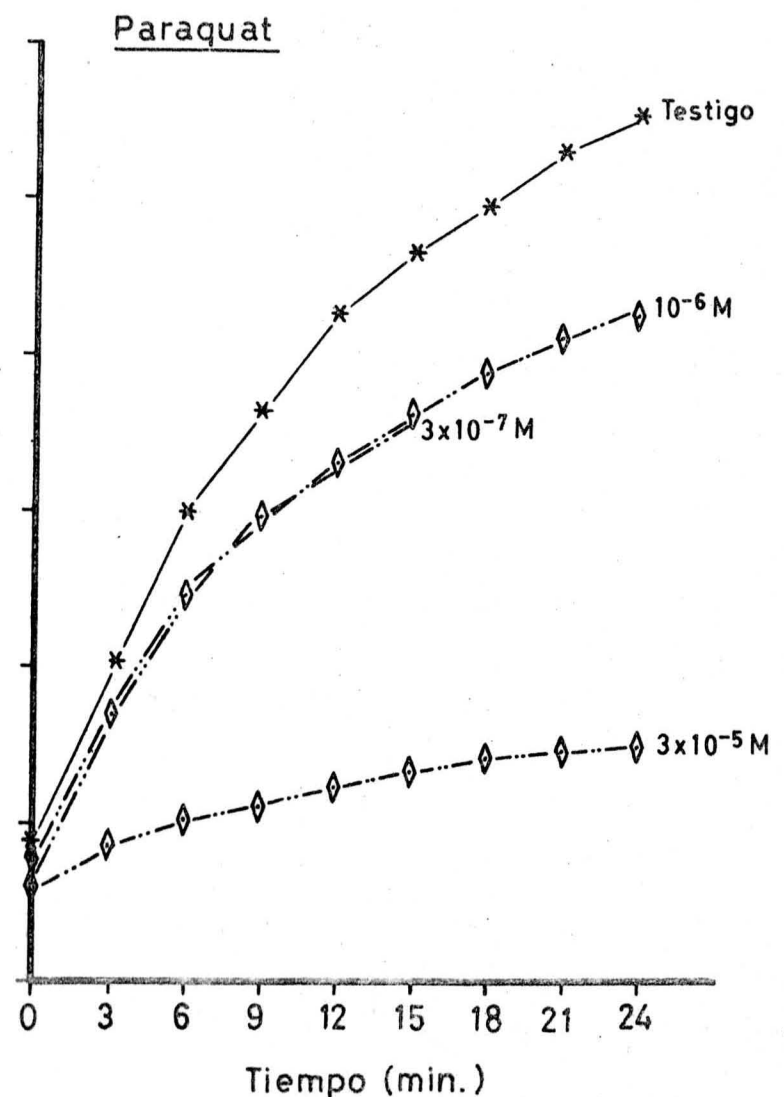
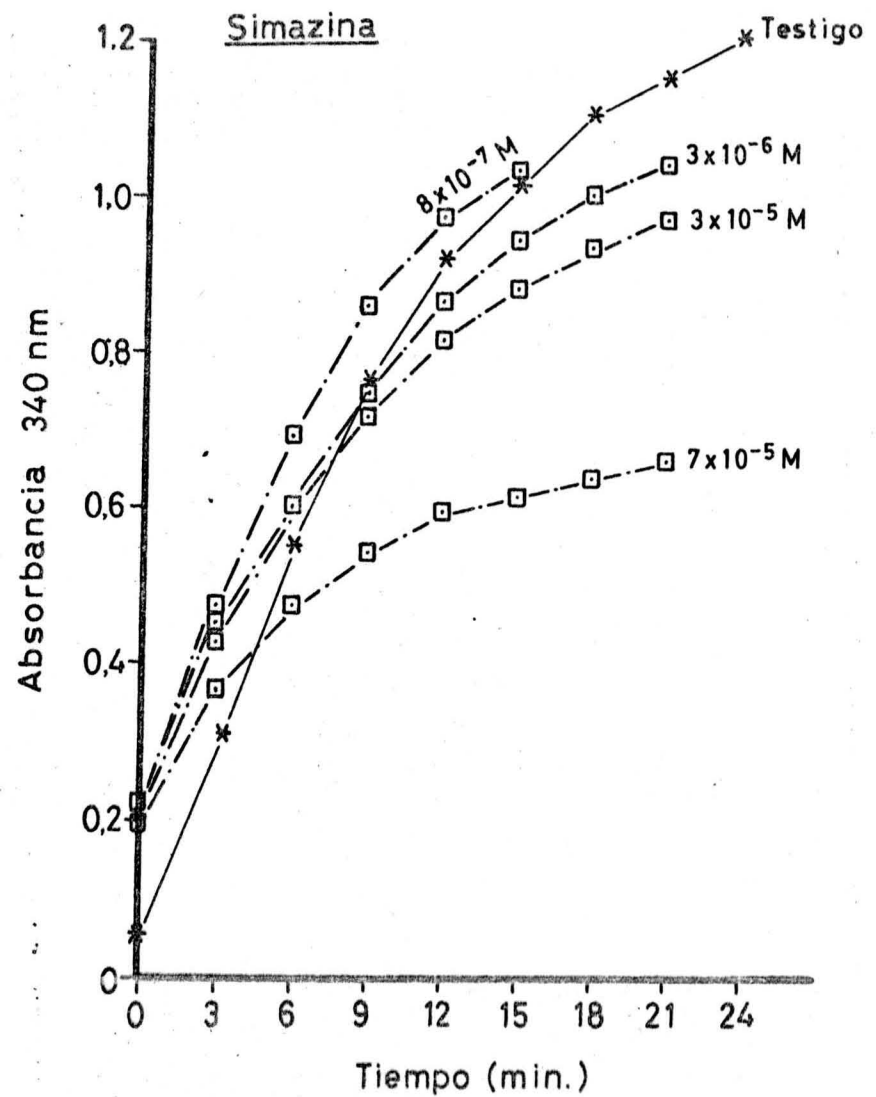


Fig. 20

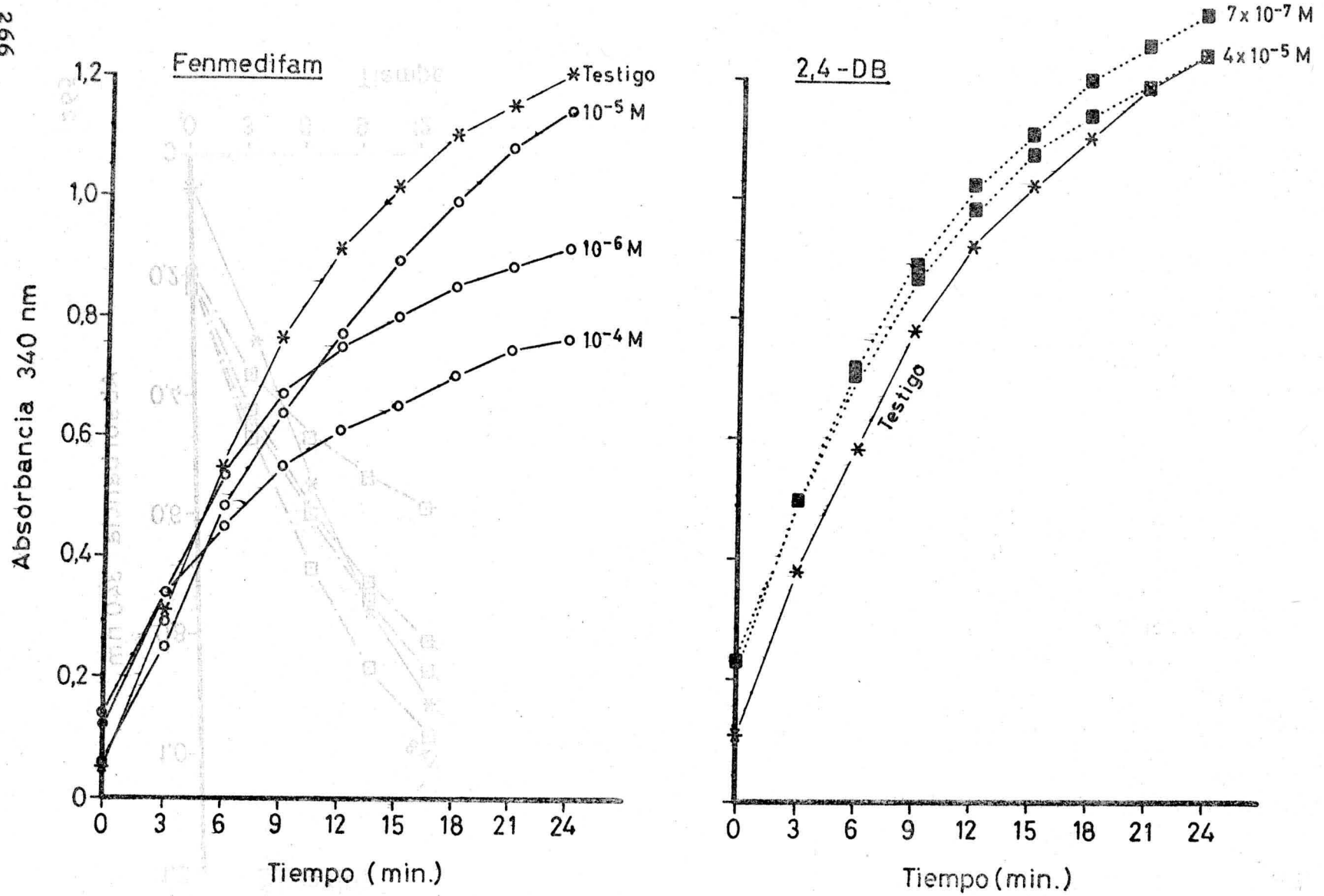


Fig. 21

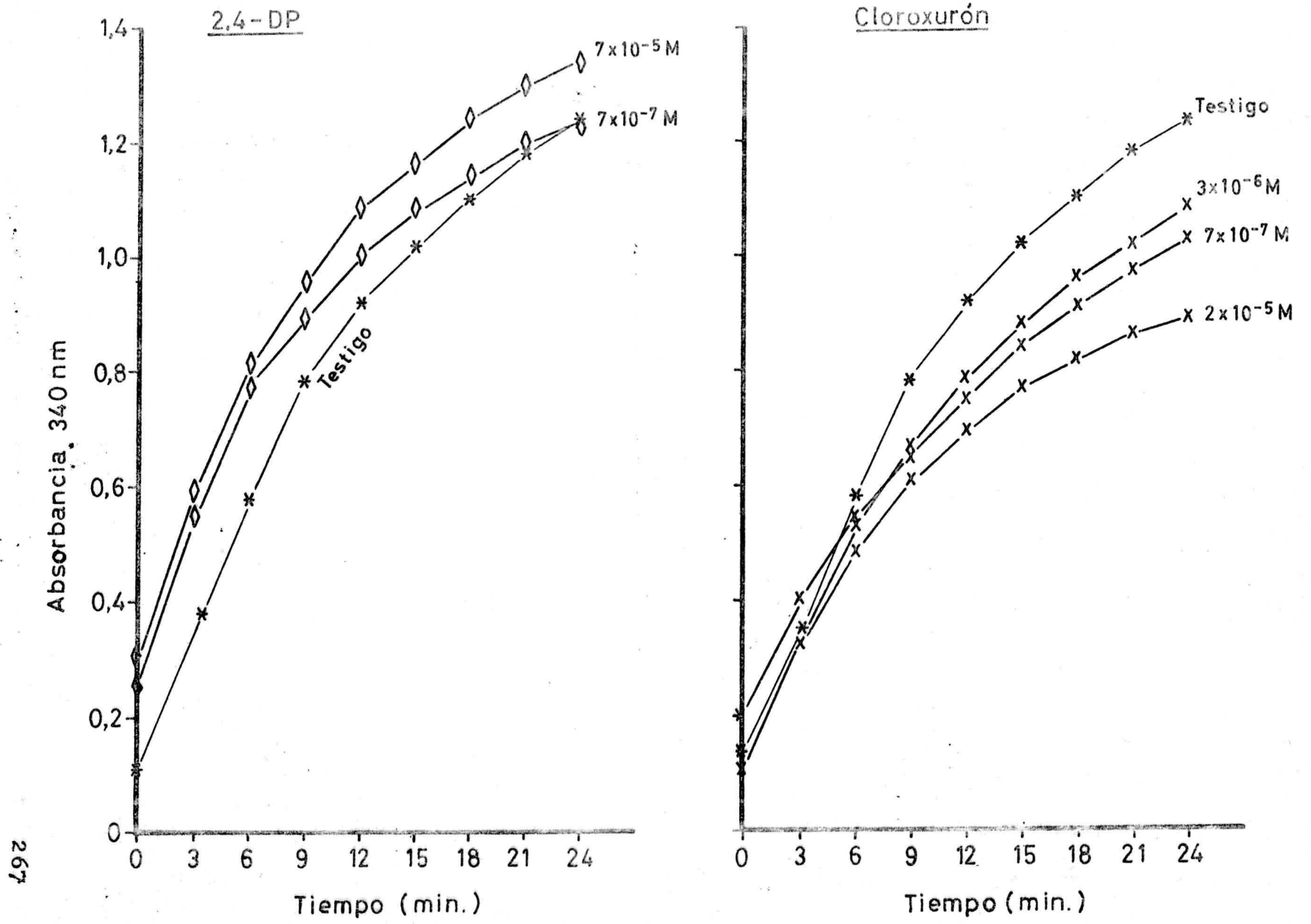
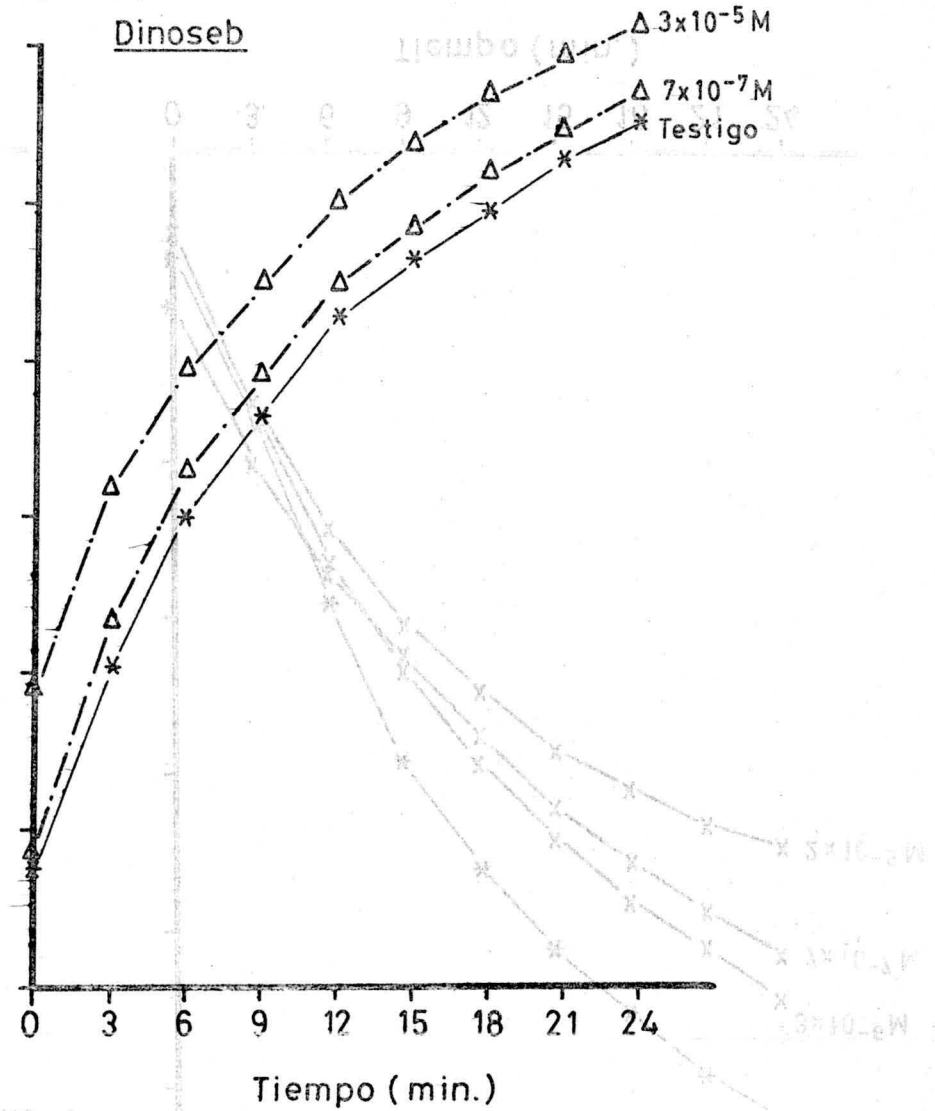
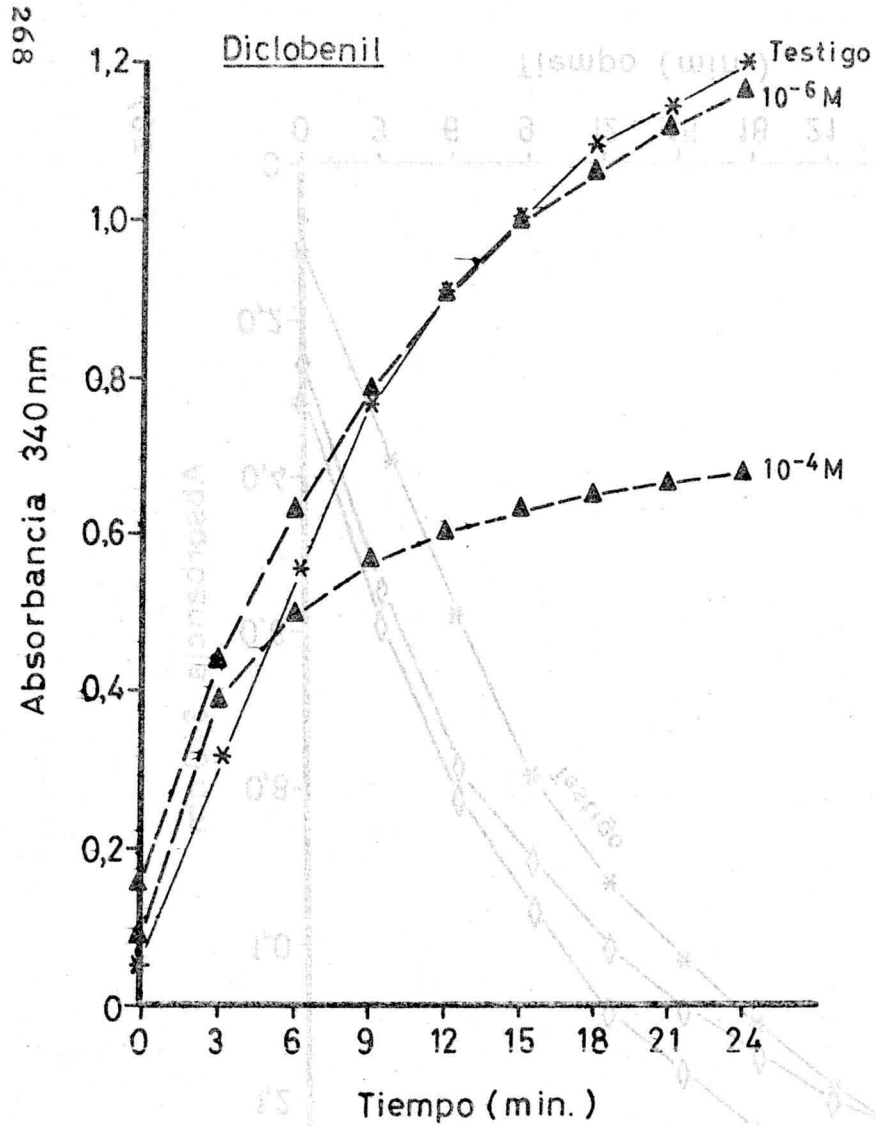


Fig. 22

267



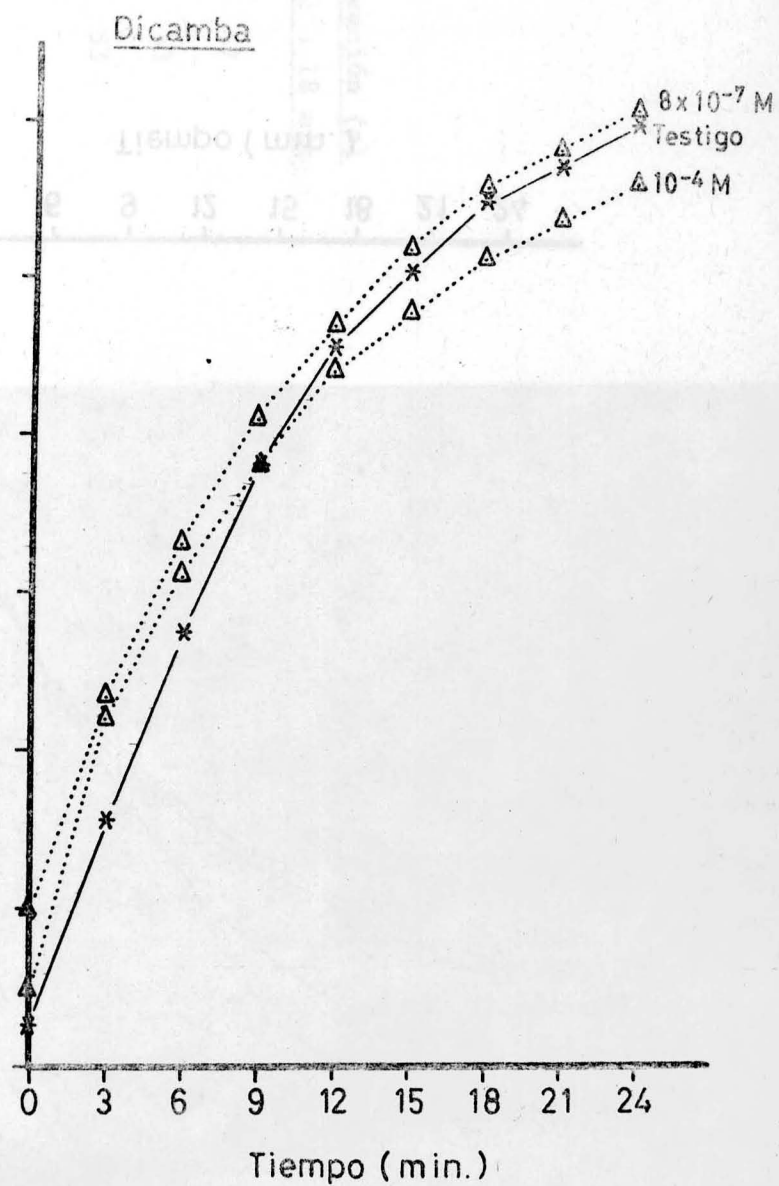
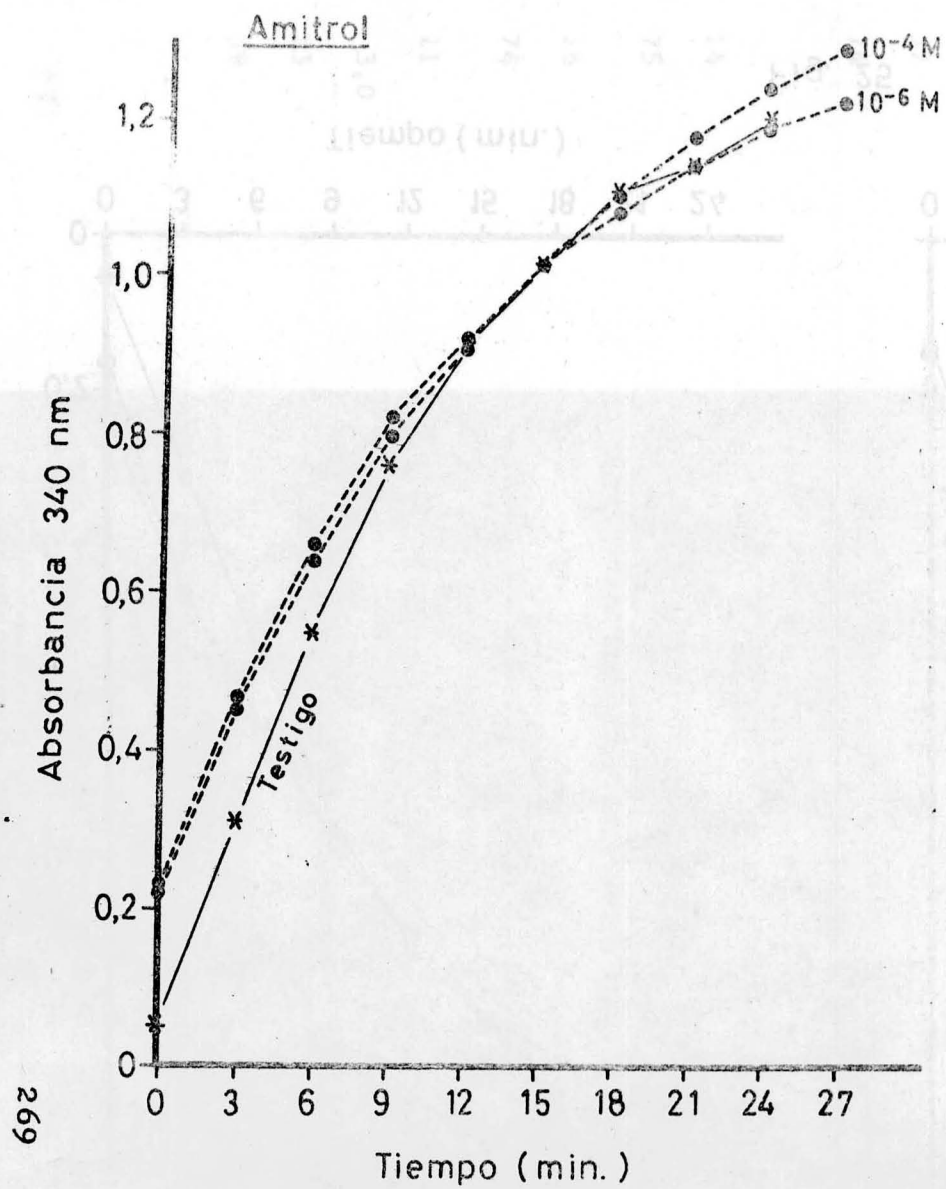


Fig. 24



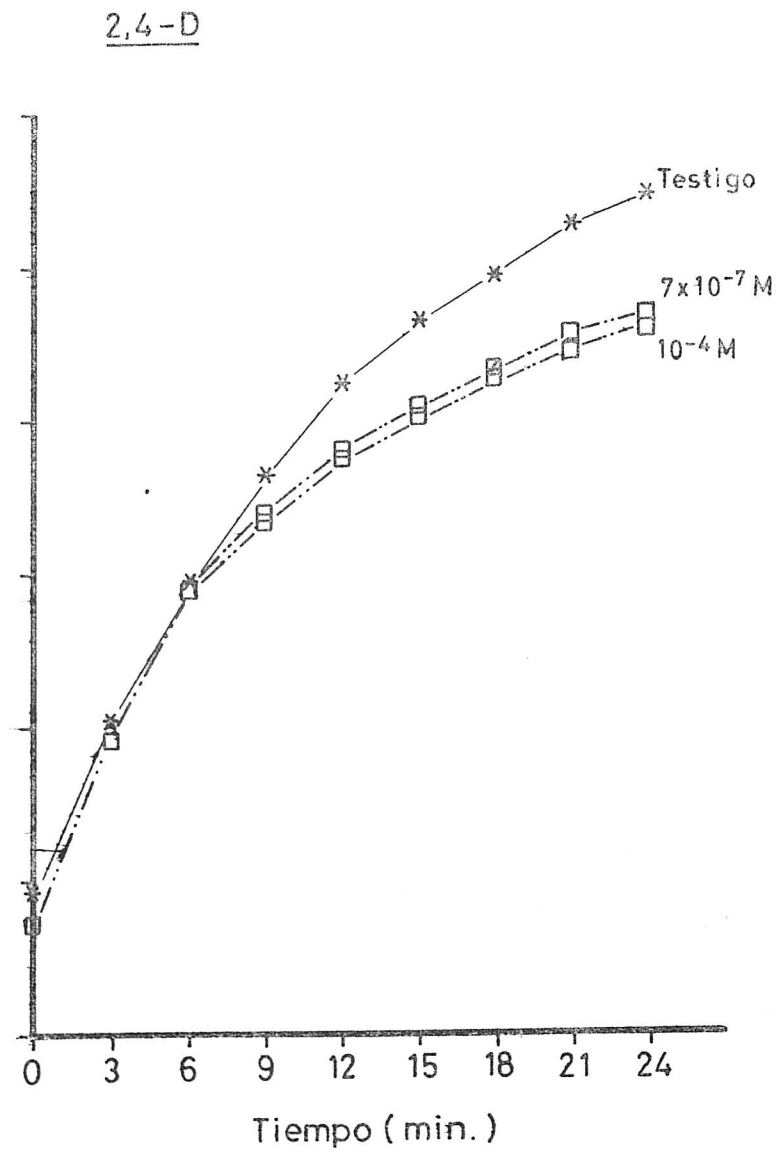
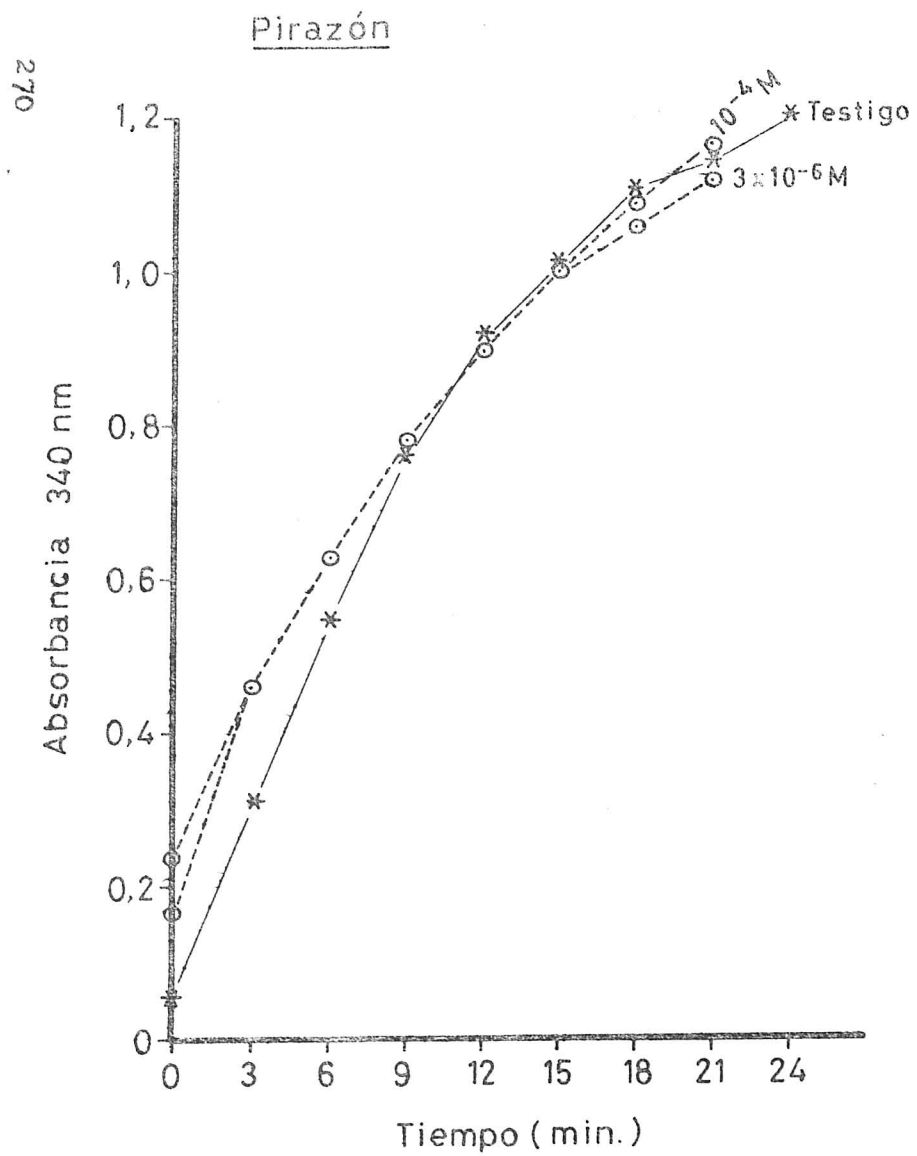


Fig. 25

TABLA III

Transporte electrónico ascorbato/DPIP → NADP<sup>+</sup> (Fot. I)

% de inhibición o activación producida

| <u>Herbicida</u> | <u>Concentración<br/>μmolar</u> | <u>% de Inhibición o Activación (a)</u> |                        |
|------------------|---------------------------------|---|------------------------|
|                  |                                 | <u>a los 3 min.</u>                     | <u>de 12 a 18 min.</u> |
| Fenmedifam       | 1                               | 17                                      | 47                     |
|                  | 11                              | 34                                      | 43                     |
|                  | 111                             | 29                                      | 53                     |
| Simazina         | 0,8                             | 5,0                                     |                        |
|                  | 3                               | 17                                      | 26                     |
|                  | 33                              | 10                                      | 37                     |
|                  | 67                              | 35                                      | 74                     |
| Paraquat         | 0,3                             | 20                                      |                        |
|                  | 1,0                             | 28                                      | 14                     |
|                  | 33                              | 82                                      | 75                     |
| Diclobenil       | 1                               | 3,0a                                    | 16                     |
|                  | 133                             | 18a                                     | 74                     |
|                  | 0,7                             | 26                                      | 11                     |
| Cloroxurón       | 3                               | 22                                      | 3,0                    |
|                  | 17                              | 23                                      | 33                     |
|                  | 33                              | 24                                      | 39                     |
|                  |                                 |   |                        |

TABLA III (cont.)

| <u>Herbicida</u> | <u>Concentración</u> | <u>% Inhibición o Activación (a)</u> |                       |
|------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
|                  | <u>μmolar</u>        | <u>a los 3 min.</u>                  | <u>de 12 a 18 min</u> |
| Pirazón          | 3                    | 17a                                  | 18                    |
|                  | 100                  | 16                                   | 0,0                   |
| Dinoseb          | 0,7                  | 2,0                                  | 0,0                   |
|                  | 28                   | 9,0a                                 | 0,0                   |
| Amitrol          | 1                    | 8,0                                  | 15                    |
|                  | 133                  | 8,0                                  | 5,0                   |
| 2,4-D            | 0,7                  | 10                                   | 21                    |
|                  | 133                  | 5,0                                  | 29                    |
| 2,4-DB           | 0,7                  | 10                                   | 0,0                   |
|                  | 40                   | 0,0                                  | 14                    |
| 2,4-DP           | 0,7                  | 9,0a                                 | 22                    |
|                  | 66                   | 7,0a                                 | 11                    |
| Dicamba          | 0,8                  | 3,0a                                 | 8,0                   |
|                  | 100                  | 34a                                  | 24                    |

La tabla IV nos muestra los resultados comparables de estas tres experiencias de transporte electrónico a lo largo de toda la cadena o parte de ella; por exigencia de cada ensayo, ha de tenerse en cuenta para esta comparación los diferentes tipos de cloroplastos usados en cada grupo, permanecían íntegros para estudiar la cadena completa, parcialmente desorganizados al usar ferricianuro como aceptor electrónico, y partículas cloroplásticas cuando se contó con donador no biológico.

Para cada herbicida se ensayaron márgenes de concentración adecuados al grado de inhibición presentado. A partir de ellos se dedujo la concentración necesaria para producir un 50% de inhibición ( $I_{50}$ ) en relación al blanco sin herbicida. En algunos casos en que ese nivel no se alcanzó, se indica la concentración de la máxima inhibición conseguida.

## B.- Fotofosforilación fotosintética

### B.1.- Fotofosforilación total

Para las pruebas de fotofosforilación tanto total como acíclica se usaron cloroplastos lisados, en diferentes grados de lisis, como se comprobó en las observaciones al microscopio electrónico y que quedan reflejadas en las figuras 26, 27 y 28.

Como ejemplo de la marcha de la reacción en la técnica de de terminación de ATP, se muestra la figura 29 que representa la separación electroforética en capa fina y autorradiografía de los diferentes componentes marcados, glucosa  $6\text{-}^{32}\text{P}$  y  $^{32}\text{Pi}$ . Cada uno de los siete puntos corresponde al tratamiento con diferente herbicida y al testigo, llevados todos a idénticas condiciones. La actividad de este testigo, resultó de 49  $\mu\text{moles}$  de ATP formado por mg. de clorofila y por hora.

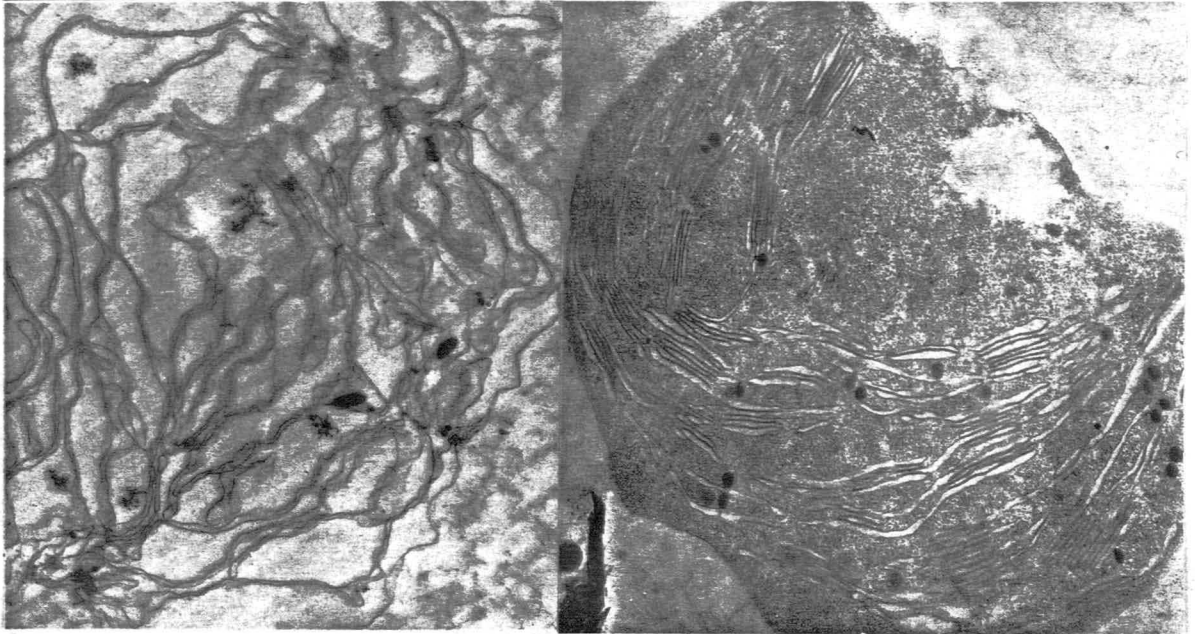
TABLA IV

Concentración  $\mu\text{M}$  de herbicida que produce el % de inhibición o activación que se indica

274

Transporte electrónico

|            | <u><math>\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+</math></u> |                 | <u><math>\text{H}_2\text{O} \rightarrow \{\text{Fe}(\text{CN})_6\}^{3-}</math></u> |                 | <u>ascorbato/DPIP <math>\rightarrow \text{NADP}^+</math></u> |                 |
|------------|--|-----------------|--|-----------------|--|-----------------|
| Fenmedifam | 0,3  | I <sub>50</sub> | 0,3  | I <sub>50</sub> | 111  | I <sub>50</sub> |
| Cloroxurón | 0,3  | I <sub>50</sub> | 0,5  | I <sub>50</sub> | 20   | I <sub>30</sub> |
| Simazina   | 2,0  | I <sub>50</sub> | 3,0  | I <sub>50</sub> | 40   | I <sub>50</sub> |
| Dinoseb    | 3,0  | I <sub>50</sub> | 9,0  | I <sub>40</sub> | nula   |                 |
| Pirazón    | 13   | I <sub>50</sub> | 20   | I <sub>50</sub> | nula   |                 |
| Paraquat   | 5,0  | I <sub>50</sub> | 30   | I <sub>20</sub> | 15   | I <sub>50</sub> |
| Diclobenil | ligera activación  |                 | 62   | I <sub>40</sub> | 100  | I <sub>50</sub> |
| 2,4-DB     | 24   | I <sub>10</sub> | nula   |                 | 30   | I <sub>10</sub> |
| 2,4-D      | nula   |                 | nula   |                 | nula   |                 |
| Amitrol    | nula   |                 | nula   |                 | nula   |                 |
| 2,4-DP     | ligera activación  |                 | ligera activación  |                 | nula   |                 |
| Dicamba    | ligera activación  |                 | nula   |                 | nula   |                 |



Figs. 26, 27 y 28: CLOROPLASTOS EN DIFERENTES GRADOS DE LISIS. Cu  
 bierta plastidial (c); estroma (e); ribosomas (r); invaginaciones  
 tilakoidales (In); estructura cristalina (cr); granos hinchados  
 (g); membranas tilakoidales (m). x 20.000; x 15.000; x 15.000.

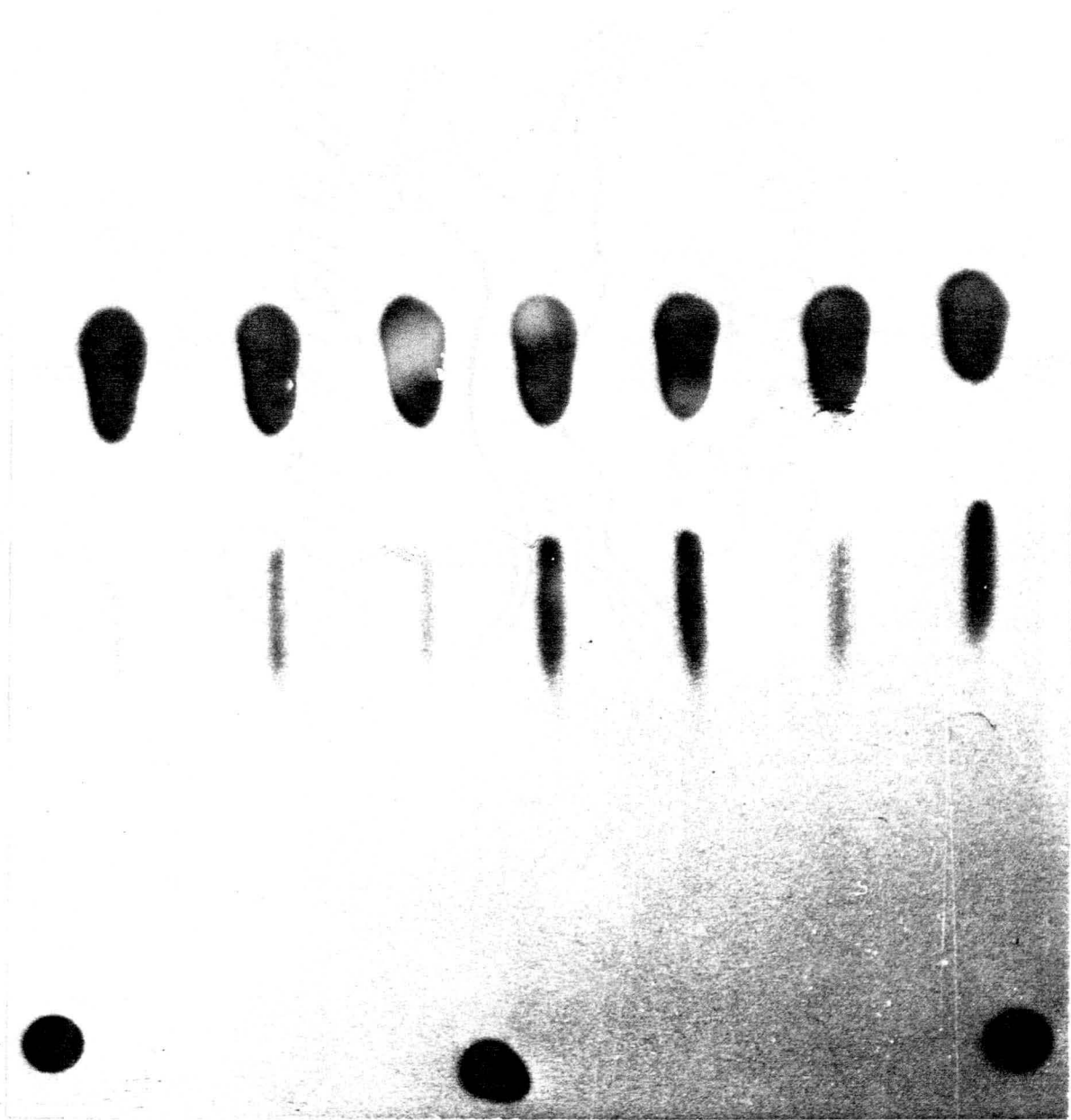


Fig. 29: Separación electroforética en capa fina y autorradiografía de los diferentes componentes marcados, glucosa 6-<sup>32</sup>P y <sup>32</sup>Pi.

Las figuras 30, 31 y 32 representan los porcentajes - correspondientes a la síntesis de ATP total, llevada a cabo en el cloroplasto cuando se le incubaba con los herbicidas a diversas con centraciones. Al igual que en otras pruebas se han elegido conve nientemente las concentraciones a ensayar, para alcanzar con apro ximación el  $I_{50}$  si se trata de inhibición; por el contrario, otros mostraron activación a lo largo de todas las concentraciones estu diadas.

## B.2.- Fotofosforilación acíclica

En las figuras 33 a 36 se representa el % de actividad cuando la formación de ATP se debe únicamente al transporte electrónico ligado a la vía acíclica y pseudocíclica, al inhibir el - transporte cíclico con antimicina; bajo estas condiciones la acti vidad del estandar se reduce a 9,3  $\mu$ moles de ATP formado por mg - de clorofila en una hora.

La tabla V muestra comparativamente los porcentajes - de inhibición ó activación en las fotofosforilaciones total y acíc lica, producida por los herbicidas a las diferentes concentracio nes usadas, idénticas en ambas pruebas.

## C.- Asimilación de $CO_2$

### C.1.- Fijación neta de $CO_2$

Se estudia la fijación de  $CO_2$  por el cloroplasto ínte gro con la sola adición de  $^{14}CO_3HNa$  como sustrato al medio isotó- mico. En estas condiciones el cloroplasto fija una media de 46 $\mu$ mo les de  $CO_2$  por mg. de clorofila en una hora.



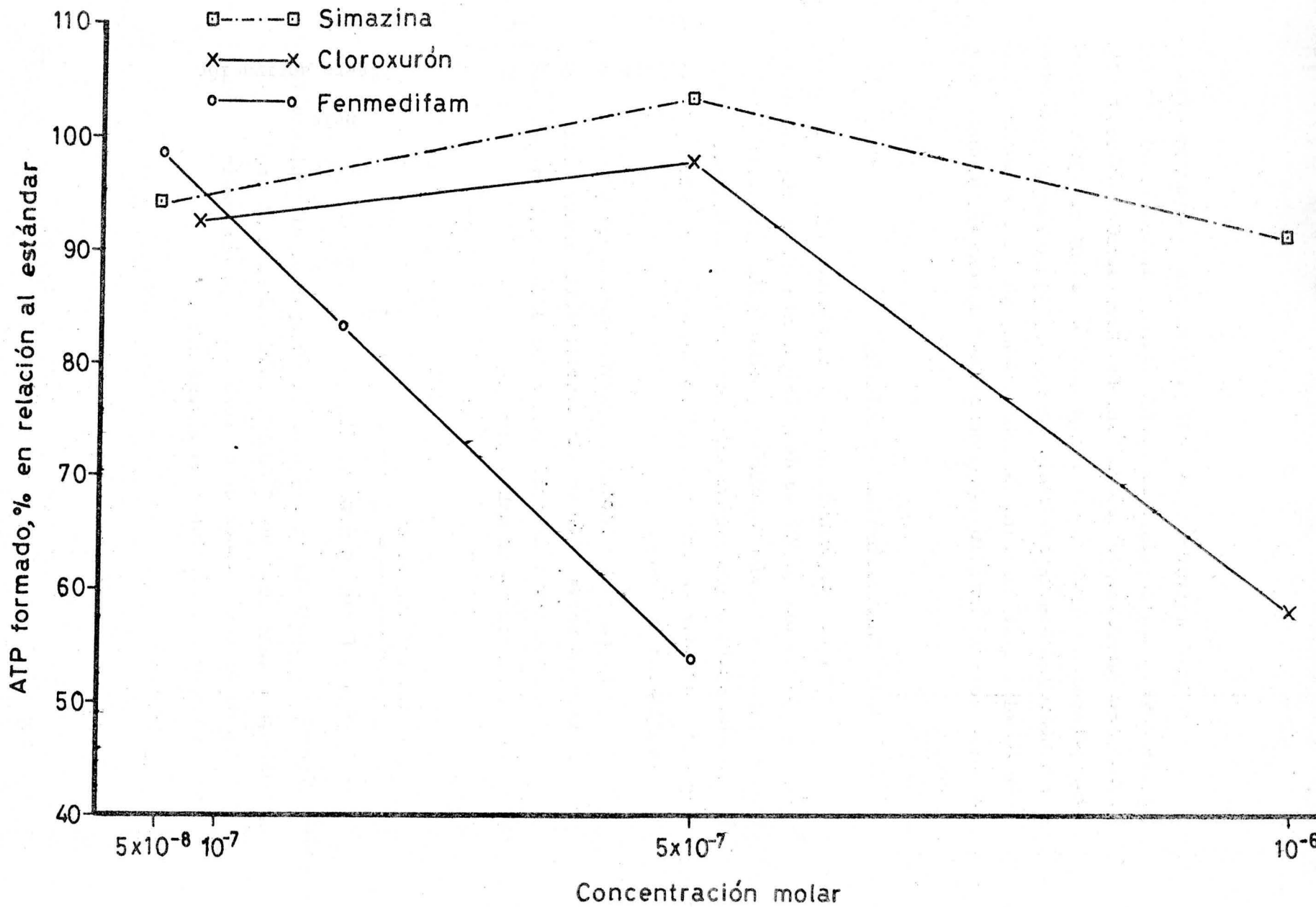


Fig. 30

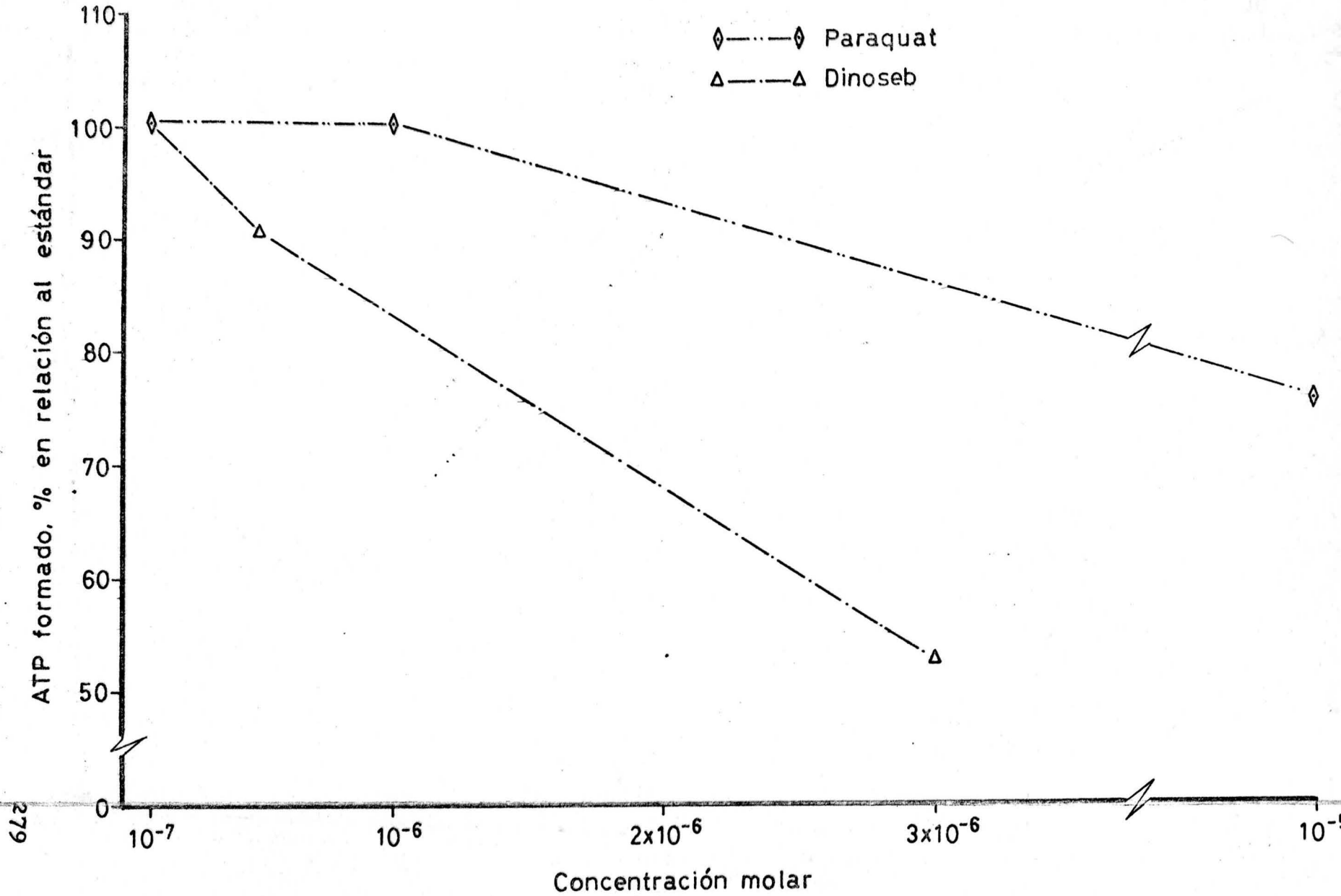


Fig. 31

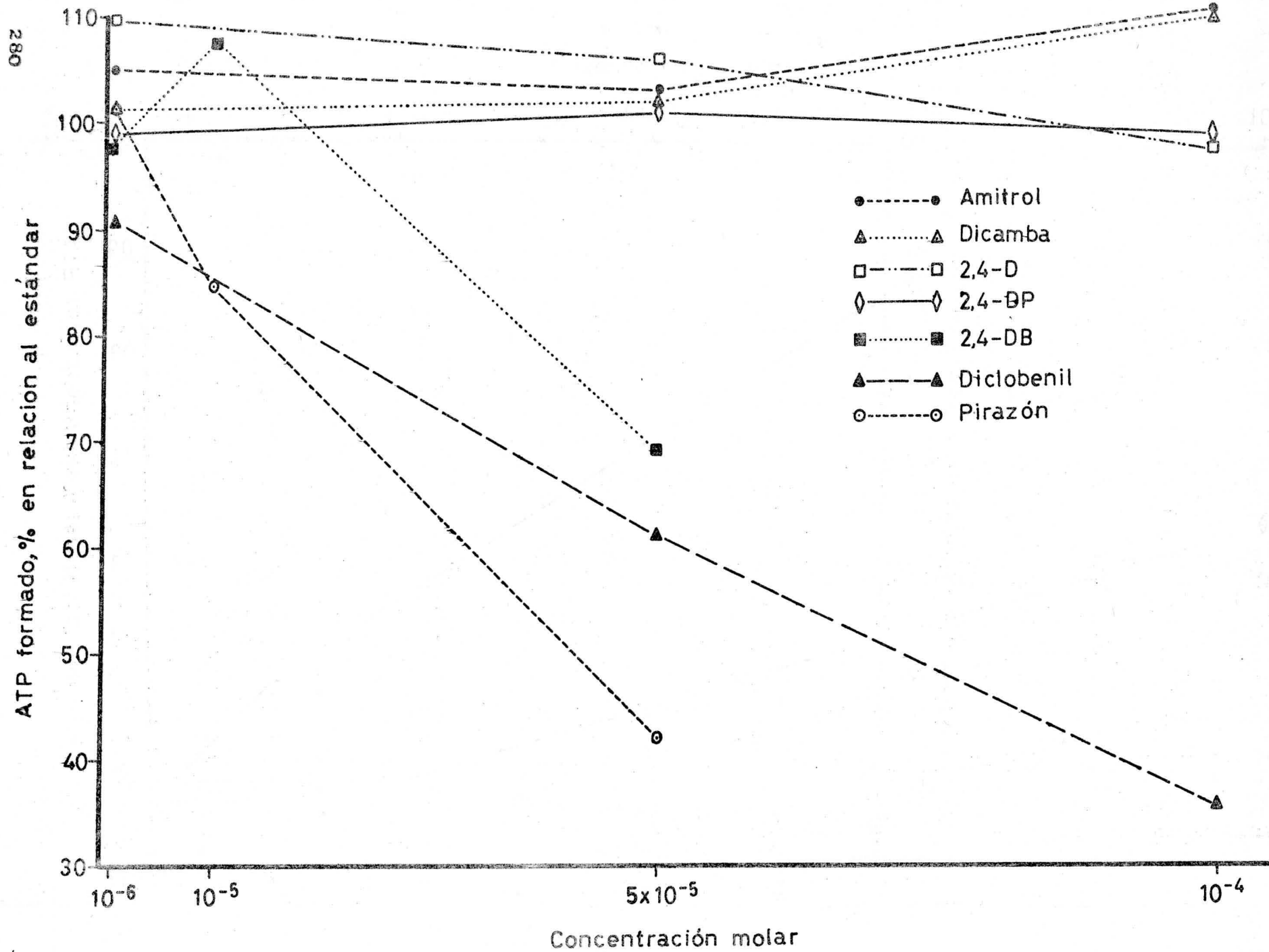


Fig. 32

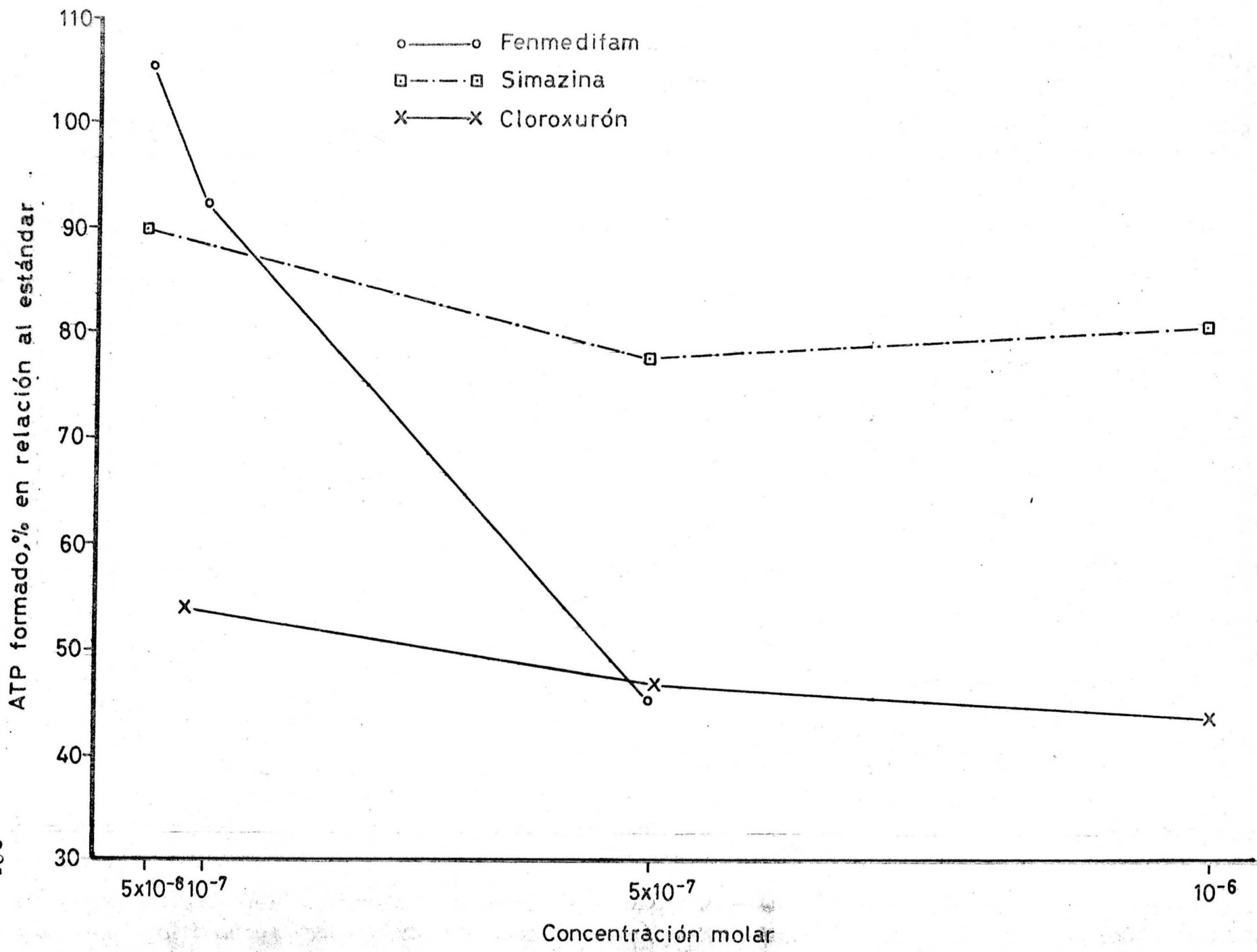


Fig. 33

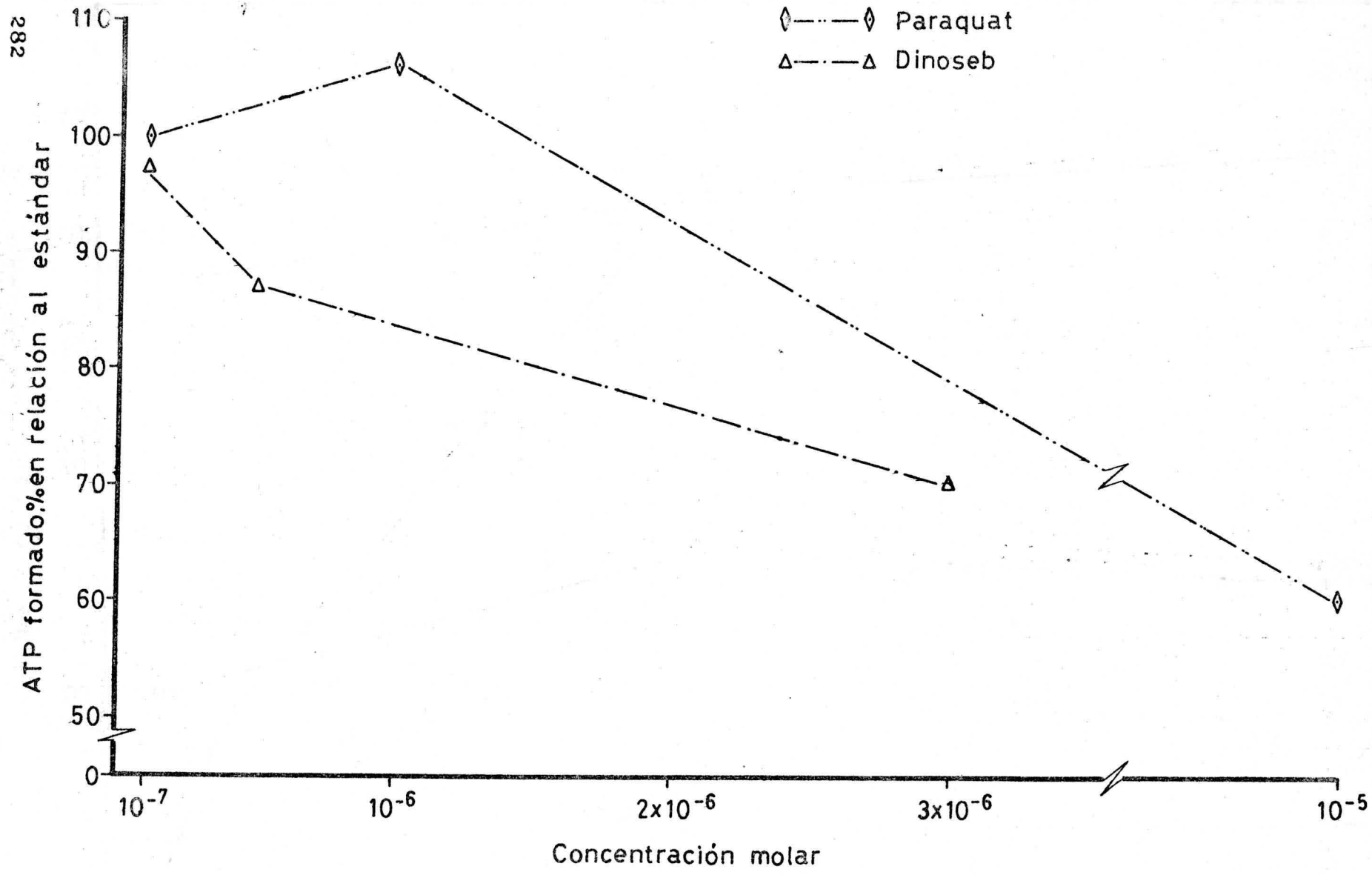


Fig. 34

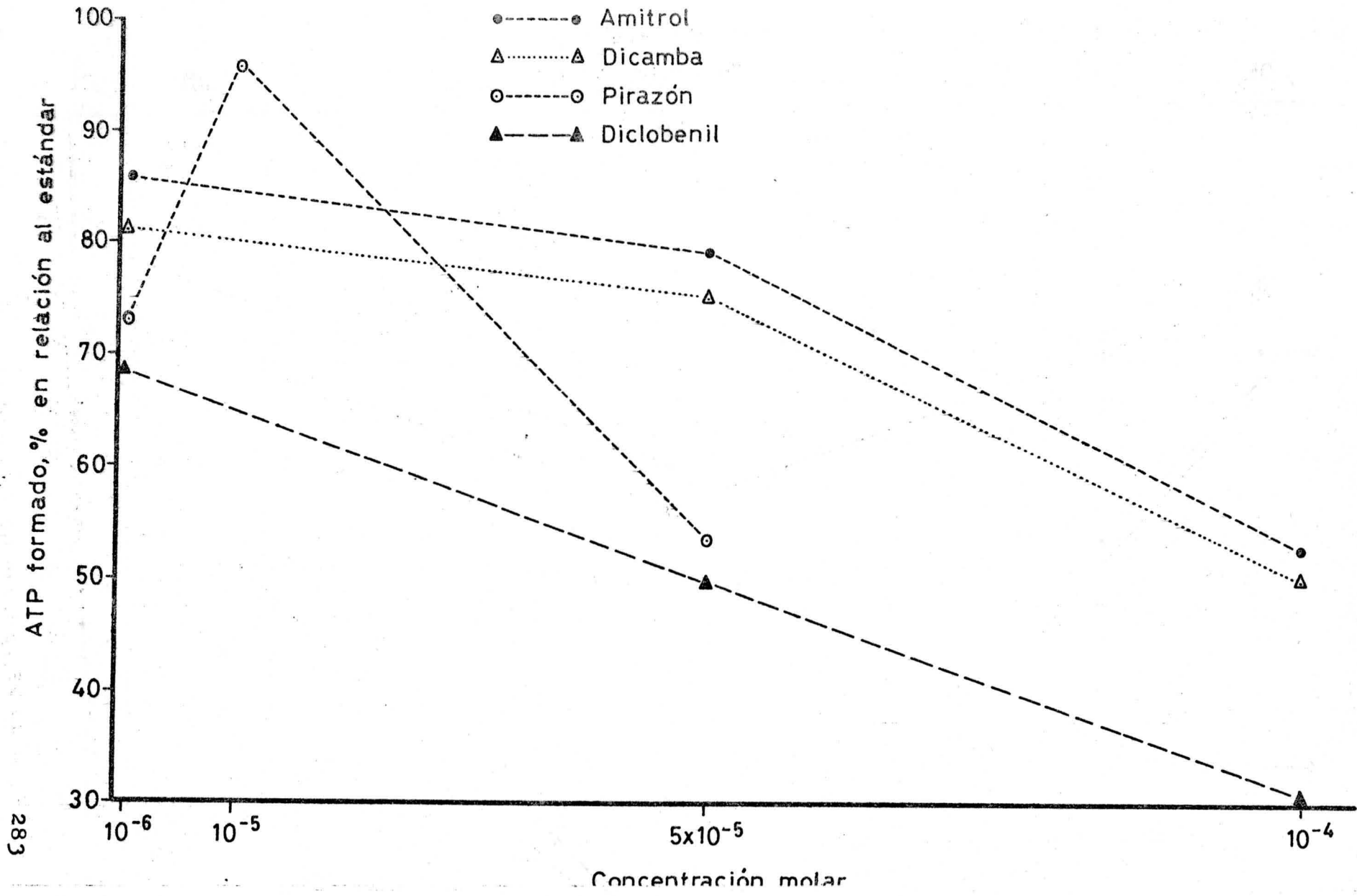


Fig. 35

283

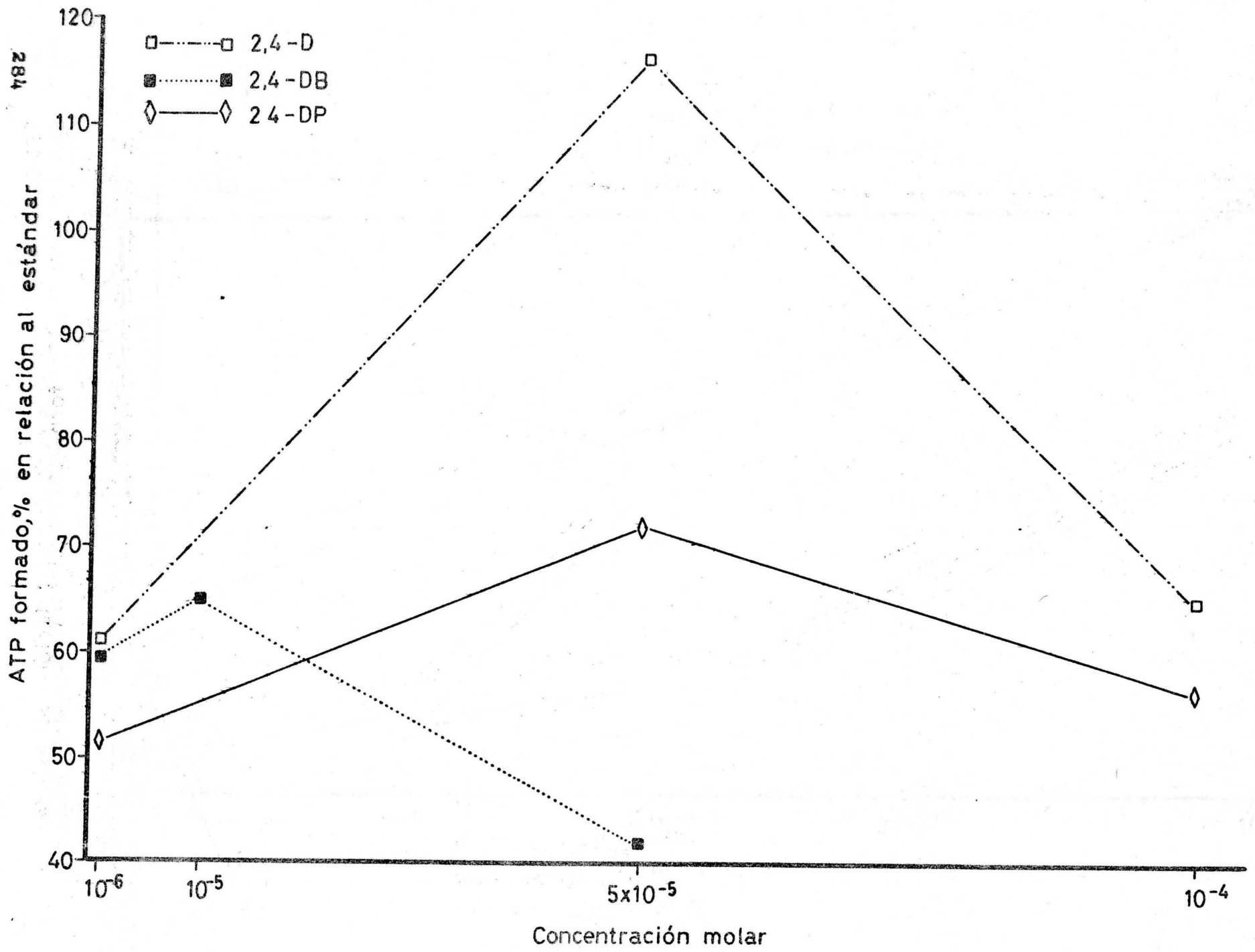


Fig. 36

TABLA V

Fotofosforilación acíclica y acíclica + cíclica (total)

% de inhibición o activación (a) producida

| <u>Herbicida</u> |   | <u>Concentraciones (µM)</u> |            |            |          |          |           |           |            |
|------------------|---|-----------------------------|------------|------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
|                  |   | <u>0,05</u>                 | <u>0,1</u> | <u>0,5</u> | <u>1</u> | <u>3</u> | <u>10</u> | <u>50</u> | <u>100</u> |
| Fenmedifam       | A | 5,0a                        | 8,0        | 55         |          |          |           |           |            |
|                  | T | 2,0                         | 6,0        | 46         |          |          |           |           |            |
| Cloroxurón       | A |                             | 46         | 53         | 56       |          |           |           |            |
|                  | T |                             | 8,0        | 2,0        | 42       |          |           |           |            |
| Simazina         | A | 10,0                        |            | 22         | 19       |          |           |           |            |
|                  | T | 6,0                         |            | 3,0a       | 9,0      |          |           |           |            |
| Dinoseb          | A |                             | 3,0        | 13         |          | 30       |           |           |            |
|                  | T |                             | 0,6a       | 9,0        |          | 47       |           |           |            |
| Paraquat         | A |                             | 0,0        |            | 6,0a     |          | 40        |           |            |
|                  | T |                             | 0,8a       |            | 0,0      |          | 24        |           |            |
| Pirazón          | A |                             |            | 27         |          |          | 4,0       | 47        |            |
|                  | T |                             |            | 4,0a       |          |          | 15        | 58        |            |



TABLA V (cont.)

| Herbicida  |   | Concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) |     |     |      |   |      |      |     |
|------------|---|-----------------------------------|-----|-----|------|---|------|------|-----|
|            |   | 0,05                              | 0,1 | 0,5 | 1    | 3 | 10   | 50   | 100 |
| Diclobenil | A |                                   |     |     | 33   |   |      | 51   | 69  |
|            | T |                                   |     |     | 10   |   |      | 39   | 63  |
| 2,4-DB     | A |                                   |     | 40  |      |   | 35   | 58   |     |
|            | T |                                   |     | 3,0 |      |   | 7,0a | 31   |     |
| 2,4-D      | A |                                   |     |     | 39   |   |      | 17a  | 36  |
|            | T |                                   |     |     | 9,0a |   |      | 6,0a | 3,0 |
| 2,4-DP     | A |                                   |     |     | 48   |   |      | 28   | 44  |
|            | T |                                   |     |     | 2,0  |   |      | 2,0a | 1,0 |
| Amitrol    | A |                                   |     |     | 14   |   |      | 21   | 47  |
|            | T |                                   |     |     | 6,0a |   |      | 3,0a | 11a |
| Dicamba    | A |                                   |     |     | 20   |   |      | 25   | 56  |
|            | T |                                   |     |     | 2,0a |   |      | 2,0a | 10a |

A = Fotofosforilación acíclica

T = Fotofosforilación total

Paralelamente a la actividad del testigo, se exponen en las figuras 37 a 42 los resultados de cada experiencia al añadirle los herbicidas a distintas concentraciones. Los valores de los compuestos estables radiactivos formados, a los 3, 6, 9 y 12 minutos se expresan en cuentas por minuto (c.p.m.).

La tabla VI recoge los porcentajes de las inhibiciones o activaciones experimentadas por el cloroplasto al asimilar  $\text{CO}_2$  durante 12 minutos bajo la influencia de los herbicidas en estudio.

Se resumen en la tabla VII los tres procesos del cloroplasto ya estudiados, transporte electrónico  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ , fotosforilación total y asimilación de  $\text{CO}_2$ . En todos ellos se presentan las concentraciones necesarias para producir un 50% de inhibición, o en su defecto la que origina una actividad más baja, así como si se trata de activación únicamente.

Como puede comprobarse el orden de inhibición de los herbicidas no es el mismo para los tres procesos. Para una mejor interpretación de estos resultados, ha de tenerse en cuenta que tanto las experiencias de transporte como de fijación de  $\text{CO}_2$  se llevan a cabo con cloroplastos íntegros, mientras que las de fotosforilación se usan una vez lisados, adicionados de los productos cloroplastídicos solubles indispensables para el proceso.

## C.2.- Productos de asimilación del $\text{CO}_2$

Se efectuó la cuantificación de intermediarios y otros productos que incorporaban  $^{14}\text{C}$  utilizando, siempre que fué posible, las concentraciones de herbicidas que producían el  $\text{I}_{50}$  de inhibición. No obstante, en algunos casos hubo de emplearse,

288

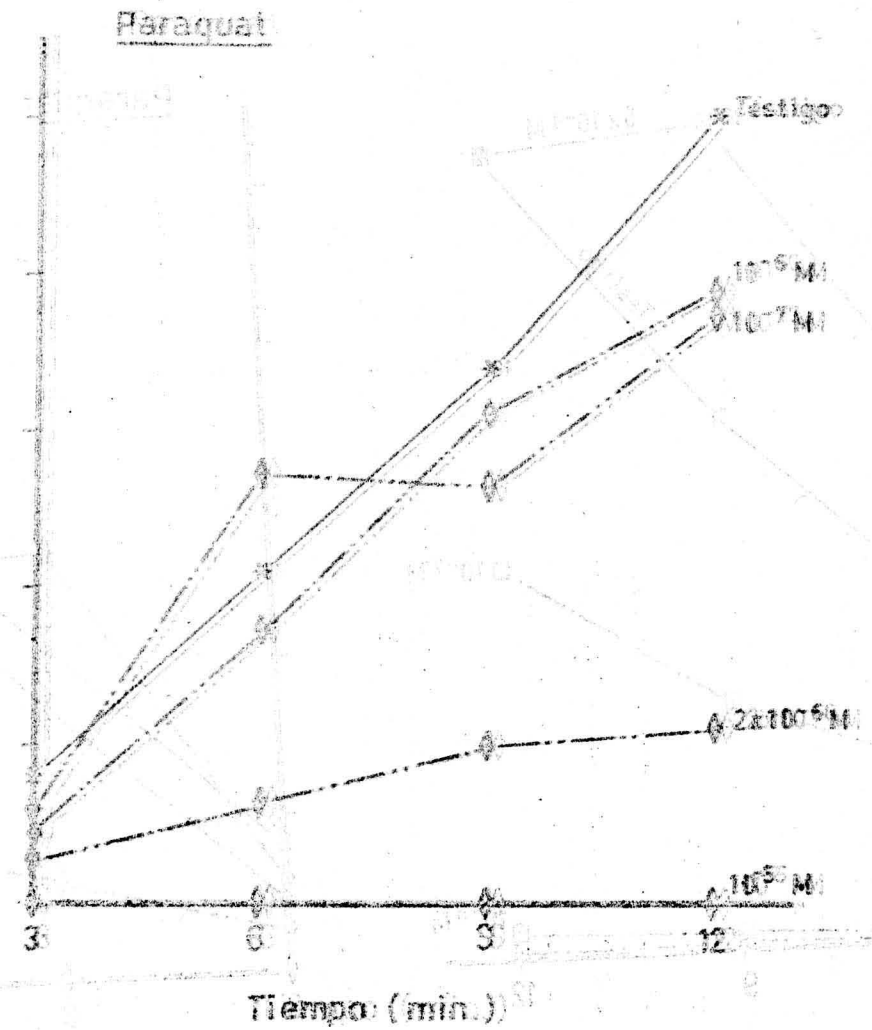
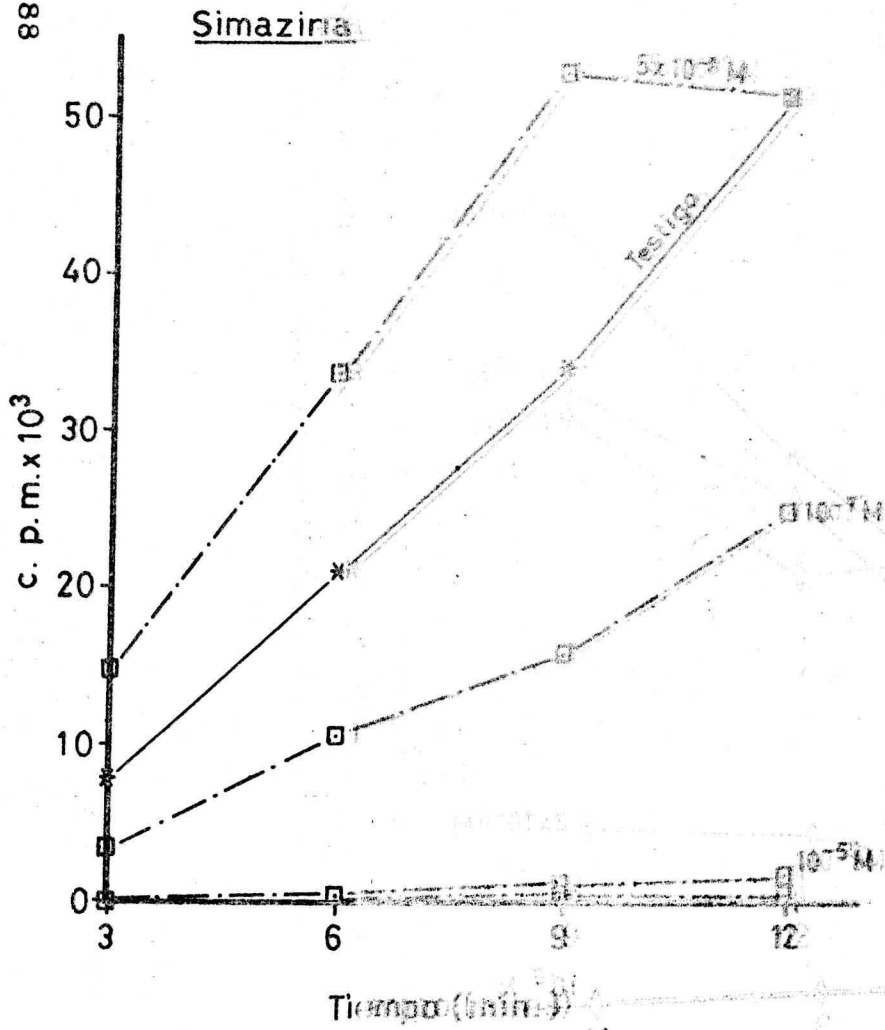


Fig. 37

Fig. 37

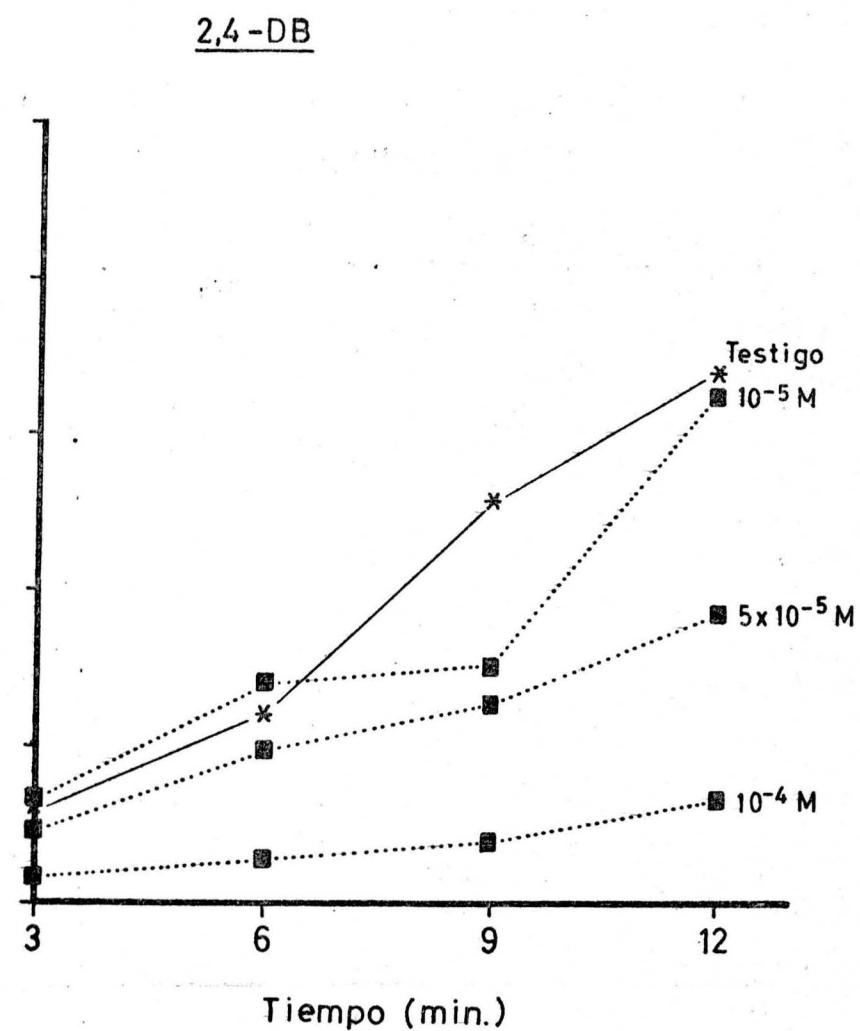
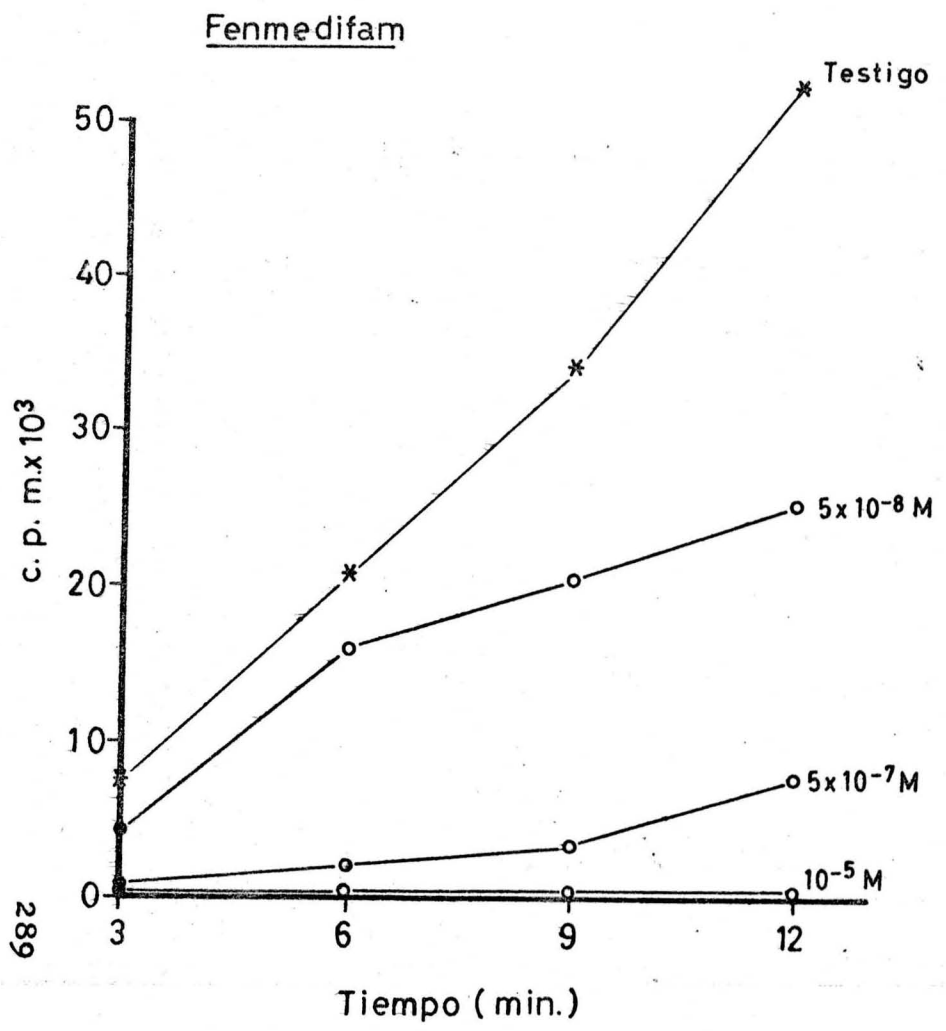


Fig. 38

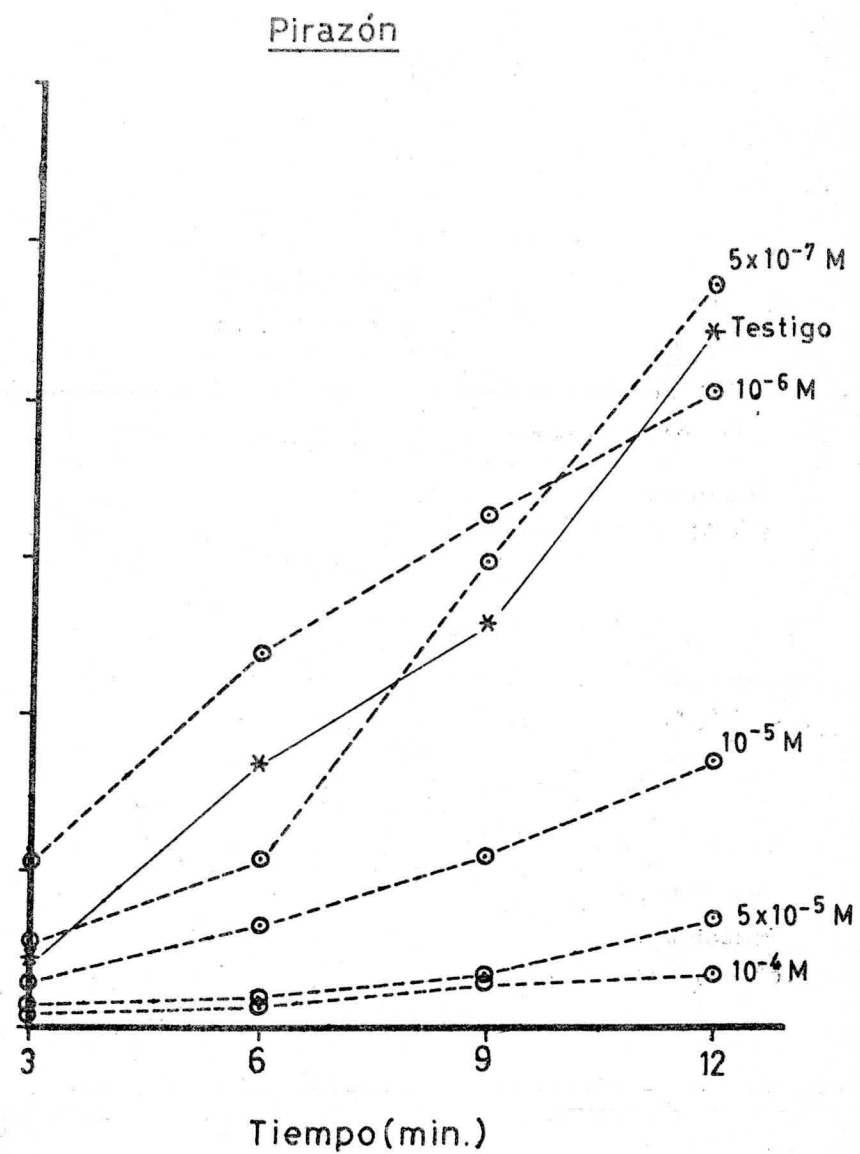
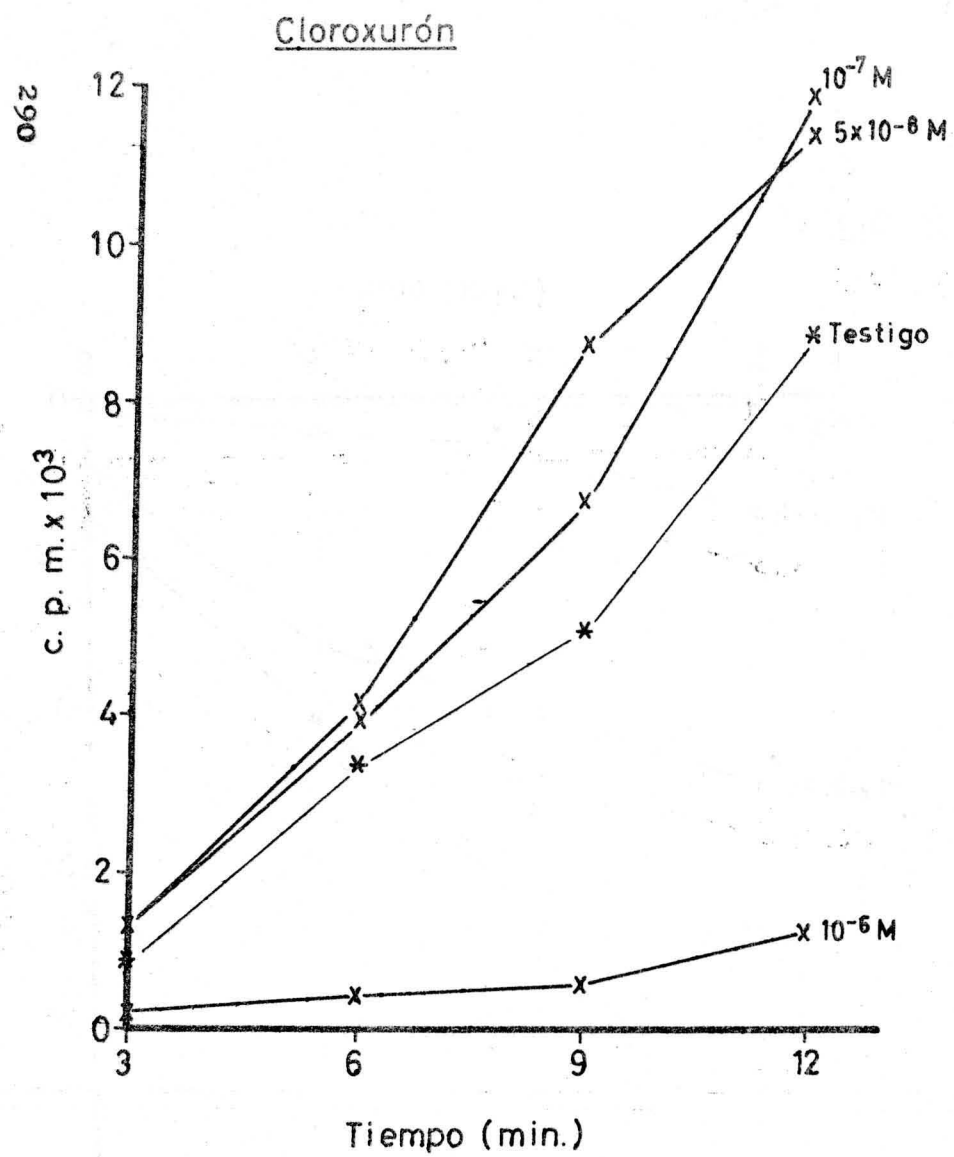


Fig. 39

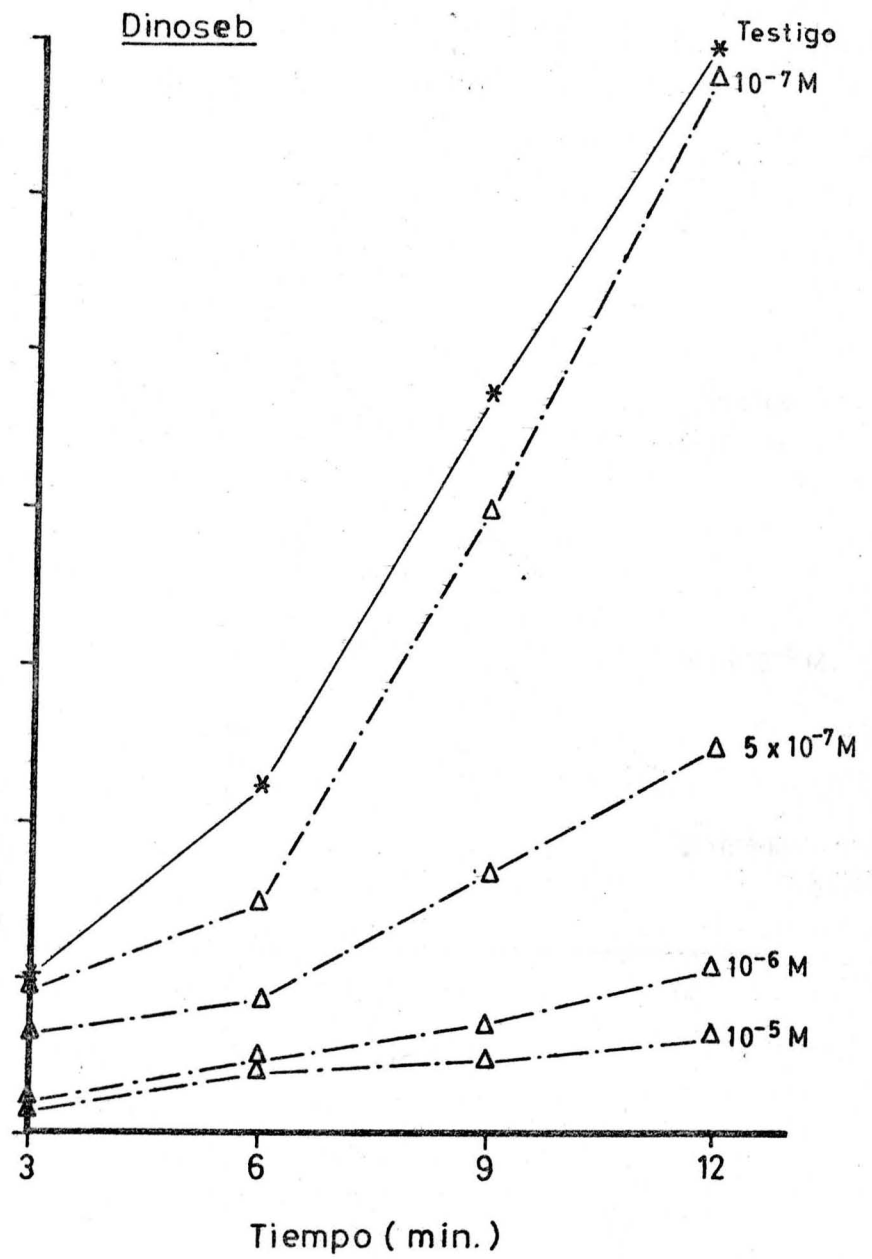
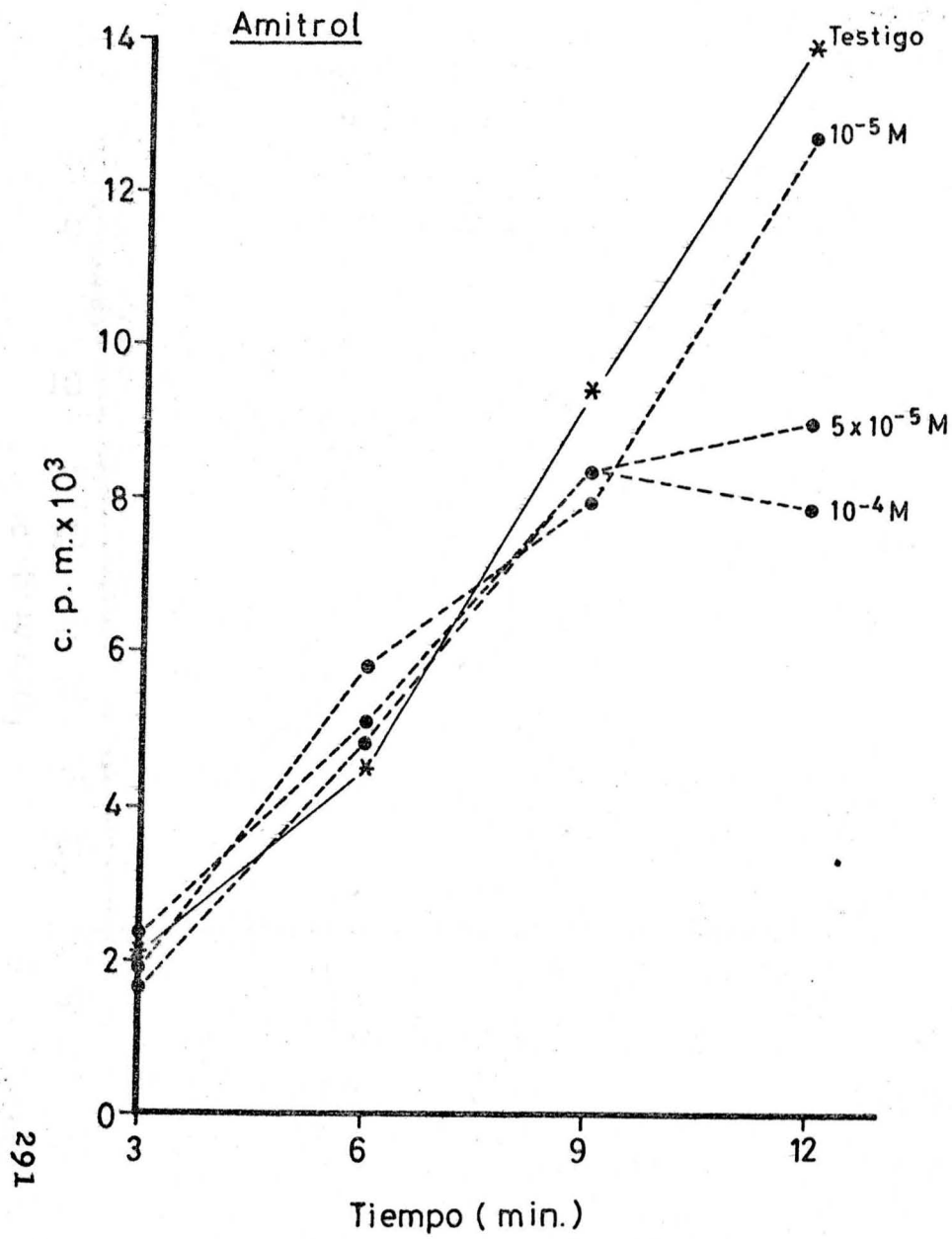


Fig. 40

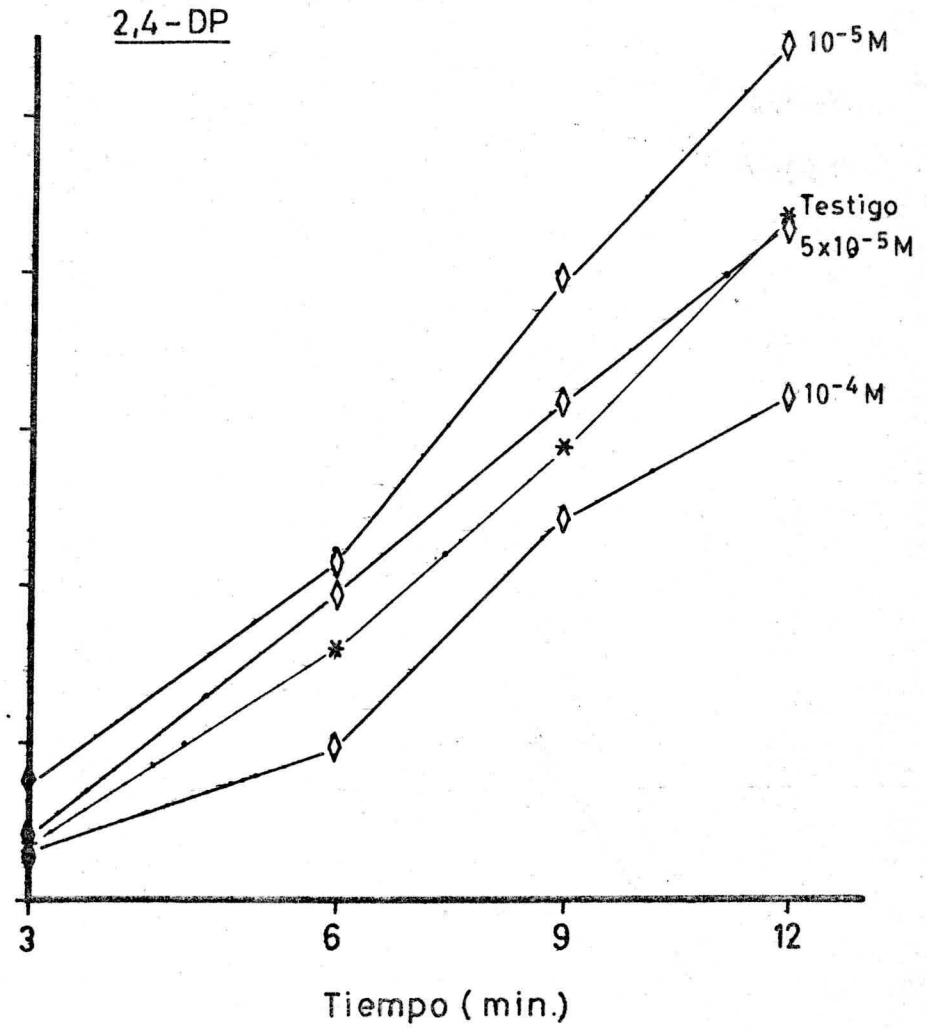
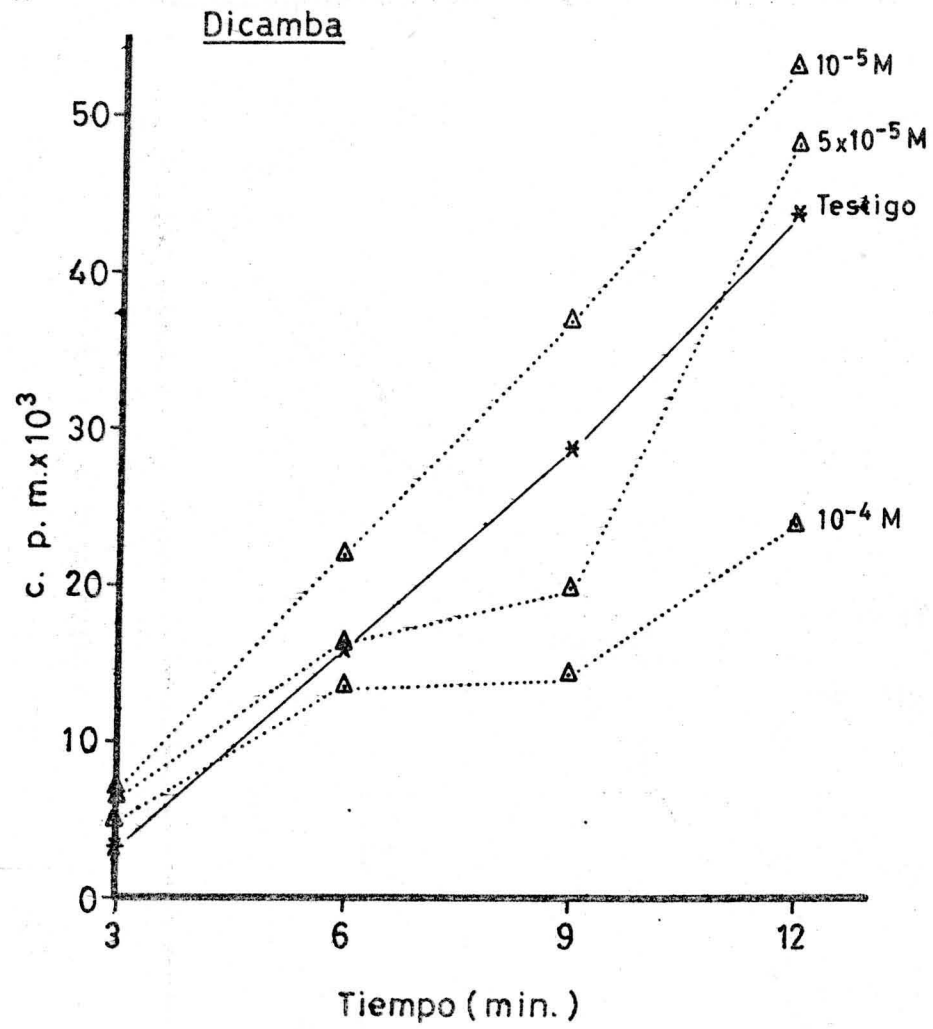


Fig. 41

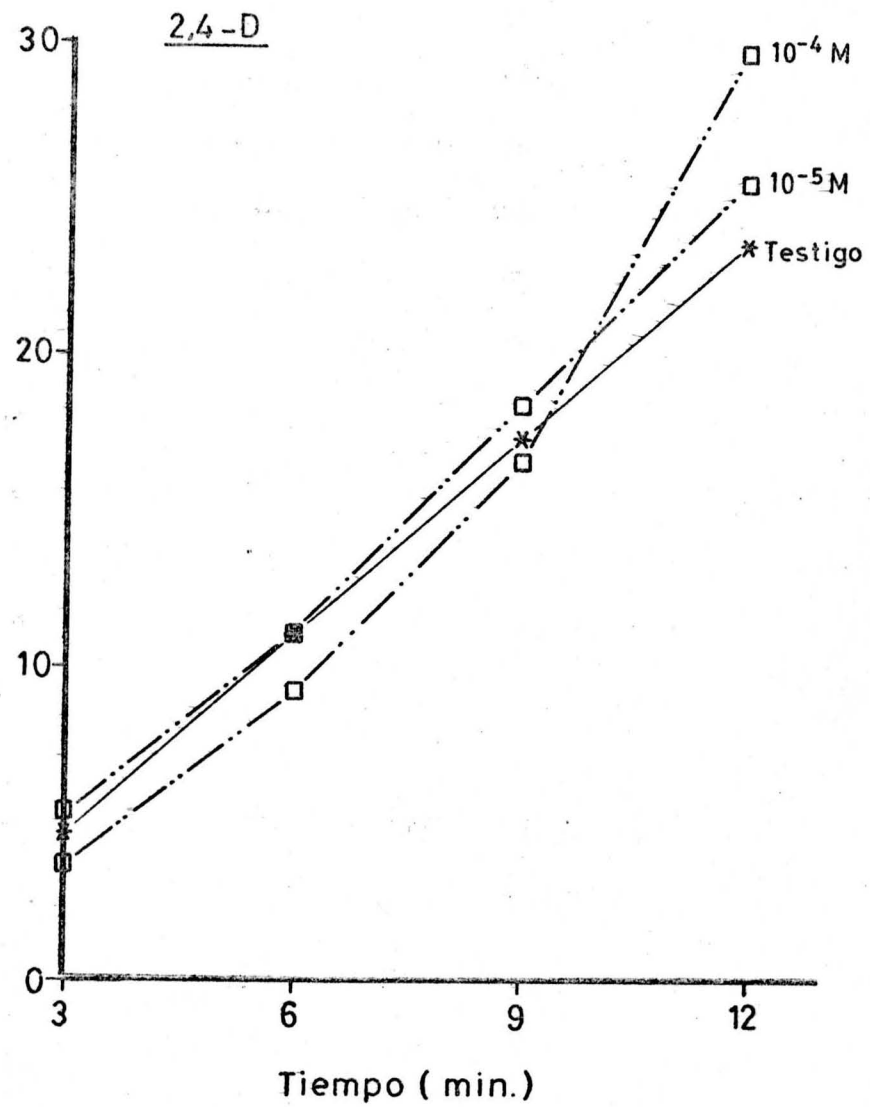
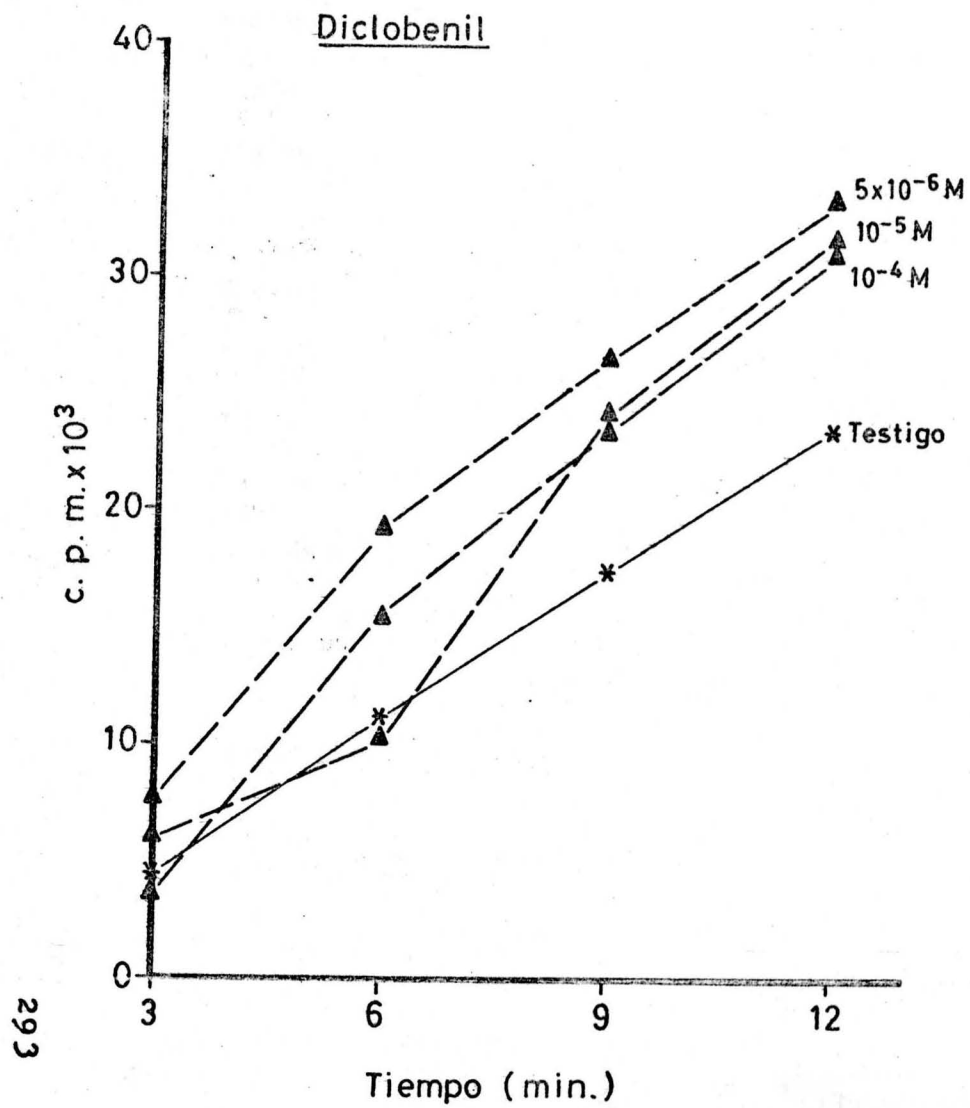


Fig. 42



TABLA VI

Fijación de CO<sub>2</sub>% de inhibición o activación (a) producida

| <u>Herbicida</u> | <u>Concentraciones (µM)</u> |            |            |          |          |           |           |            |
|------------------|-----------------------------|------------|------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
|                  | <u>0,05</u>                 | <u>0,1</u> | <u>0,5</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>10</u> | <u>50</u> | <u>100</u> |
| Fenmedifam       | 50                          |            | 84         |          |          | 100       |           |            |
| Cloroxurón       | 29a                         | 36a        |            | 86       |          | 100       |           |            |
| Simazina         | 4,0a                        |            |            | 50       |          | 82        | 100       |            |
| Paraquat         |                             | 25         |            | 22       | 77       | 100       |           |            |
| Dinoseb          |                             | 2,0        | 35         | 85       |          | 91        |           |            |
| Pirazón          |                             |            | 8,0a       | 8,0      |          | 64        | 85        | 93         |
| 2,4-DB           |                             |            |            |          |          | 6,0       | 50        | 82         |
| Amitrol          |                             |            |            |          |          | 9,0       | 35        | 44         |
| Dicamba          |                             |            |            |          |          | 21a       | 10a       | 46         |
| 2,4-DP           |                             |            |            |          |          | 24a       | 3,0       | 28         |
| 2,4-D            |                             |            |            |          |          | 8,0       |           | 4,0        |
| Diclobenil       |                             |            |            |          |          | 34a       |           | 29a        |

TABLA VII

Concentración  $\mu\text{M}$  de herbicida que produce el % de inhibición o activación que se indica

|            | Transporte electrónico                         |                 | Fotofosforilación |                 | Asimilación de $\text{CO}_2$ |                 |
|------------|--|-----------------|-------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
|            | $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ |                 | total             |                 |                              |                 |
| Fenmedifam | 0,3  | $\text{I}_{50}$ | 0,5               | $\text{I}_{50}$ | 0,05                         | $\text{I}_{50}$ |
| Cloroxurón | 0,3  | $\text{I}_{50}$ | 1,0               | $\text{I}_{50}$ | <1(0,3-0,5)                  | $\text{I}_{50}$ |
| Simazina   | 2,0  | $\text{I}_{50}$ | 1,0               | $\text{I}_{10}$ | 1,0                          | $\text{I}_{50}$ |
| Paraquat   | 5,0  | $\text{I}_{50}$ | 10                | $\text{I}_{30}$ | >1y<2(1,5)                   | $\text{I}_{50}$ |
| Dinoseb    | 3,0  | $\text{I}_{50}$ | 3,0               | $\text{I}_{50}$ | >0,5y<1(0,75)                | $\text{I}_{50}$ |
| Pirazón    | 13   | $\text{I}_{50}$ | 50                | $\text{I}_{50}$ | 10                           | $\text{I}_{50}$ |
| 2,4-DB     | 24   | $\text{I}_{10}$ | ligera inhibición |                 | 50                           | $\text{I}_{50}$ |
| 2,4-D      | nula   |                 | nula              |                 | nula                         |                 |
| Amitrol    | nula   |                 | ligera activación |                 | 100                          | $\text{I}_{50}$ |
| 2,4-DP     | ligera activación                              |                 | nula              |                 | 100                          | $\text{I}_{30}$ |
| Diclobenil | ligera activación                              |                 | 75                | $\text{I}_{50}$ | 50                           | $\text{A}_{30}$ |
| Dicamba    | ligera activación                              |                 | ligera activación |                 | 10                           | $\text{A}_{30}$ |

incubados con concentraciones menores, a fin de obtener tasas también menores de inhibición y, en consecuencia, mapas con mayor radioactividad incorporada.

Las figuras 43-55 muestran estos mapas de distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados, tanto en el testigo como en las diferentes pruebas al incubar con cada herbicida.

Esta distribución en % del total marcado, del ensayo testigo y de los restantes herbicidas se indica en la tabla VIII, subrayando para cada uno de éstos, los porcentajes correspondientes a aquellos productos marcados que muestran una desviación evidente del testigo.

#### D.- Enzimas clave del ciclo de Calvin

##### D.1.- Actividad carboxi-dismutásica

Se ha aislado y purificado el enzima Ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa, llegando a obtener un preparado con actividad específica de  $1,8 \mu\text{moles de CO}_2$  fijado por minuto y por mg. de proteína, homogéneo y puro como lo demuestra la presencia de una sola fracción en electroforesis en gel de poliacrilamida; con él se estudia el comportamiento de los distintos herbicidas sobre la actividad carboxilásica.

Las figuras 56 y 57 nos muestran las gráficas correspondientes a los porcentajes de actividad enzimática resultantes al aplicar diferentes molaridades de cada herbicida.

La tabla IX indica el tanto por cien de inhibición o activación producida en la acción carboxidismutásica al incubar el enzima con los herbicidas estudiados a tres diferentes concentraciones. Todos estos resultados son la media de cinco determinaciones.

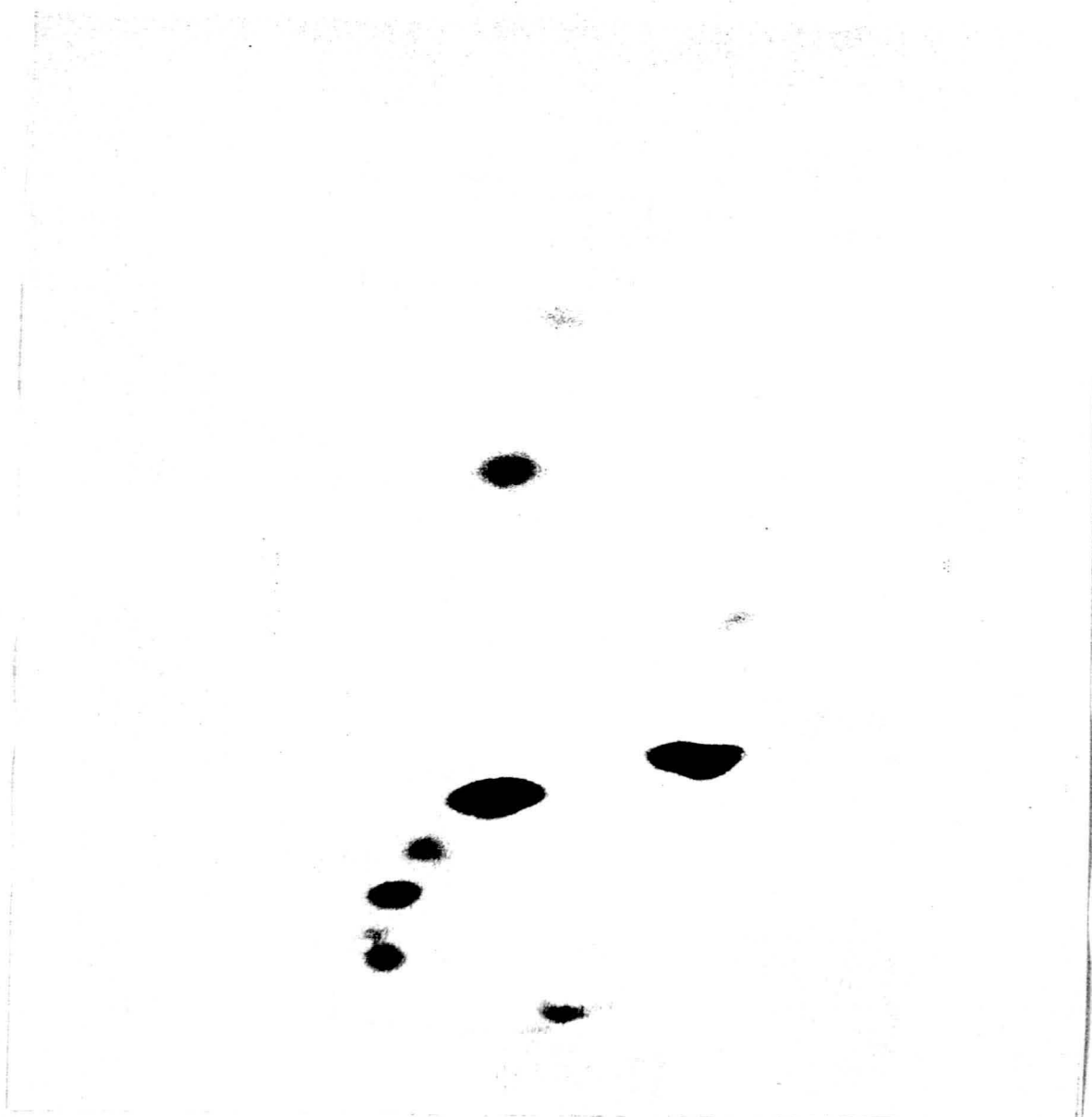


Fig. 43. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos testigos.

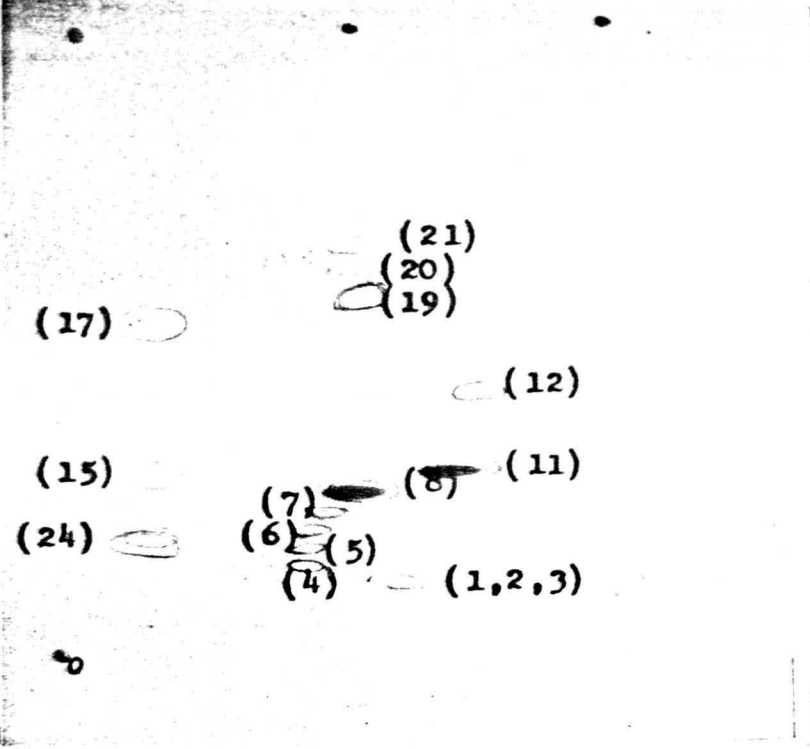


Fig. 44. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con 2,4-DP.

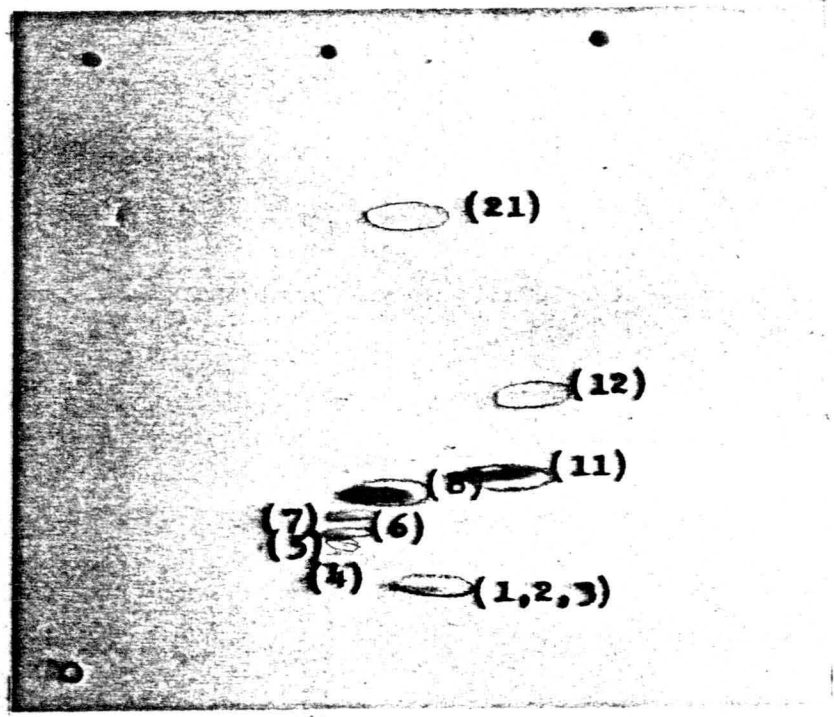


Fig. 45. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con dinoseb.



Fig. 46. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con diclofenil.

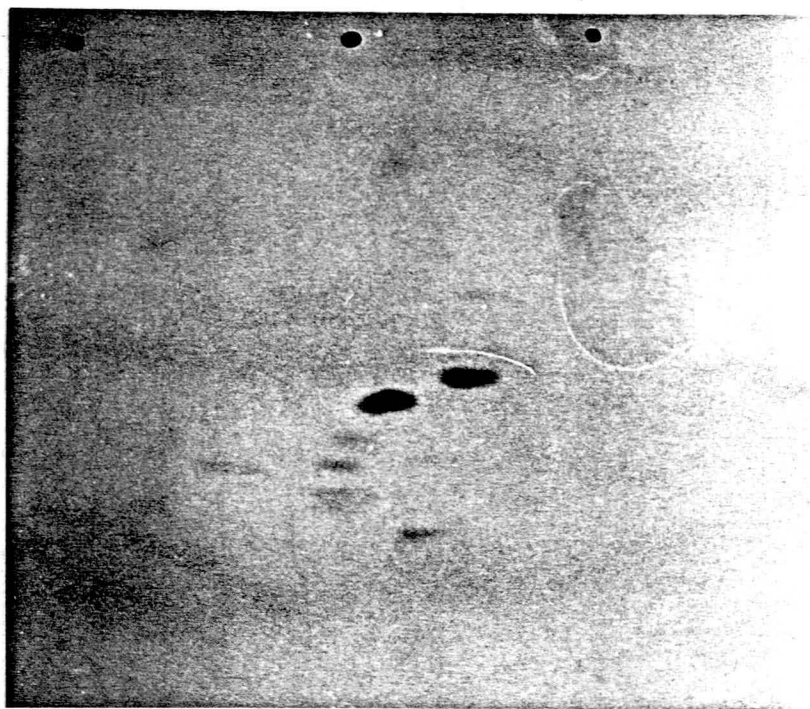


Fig. 47. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con paraquat.



Fig. 48. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con amitrol.

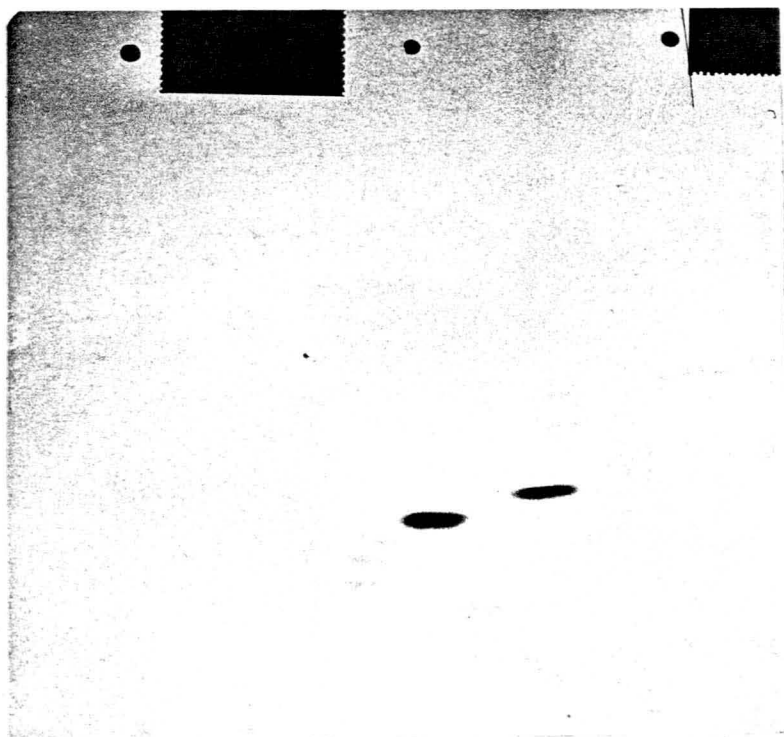


Fig. 49. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con 2,4-DB.

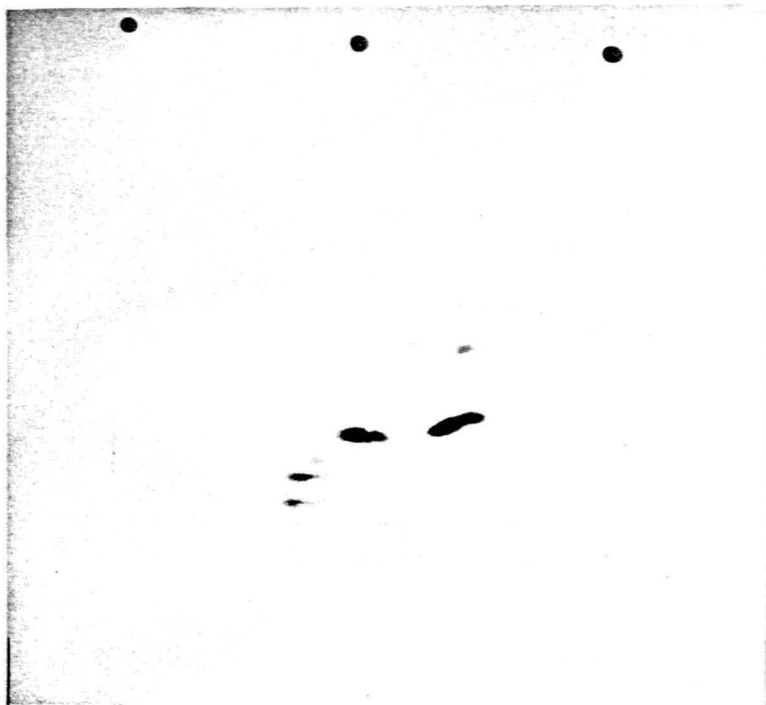


Fig. 50. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con pirazón.

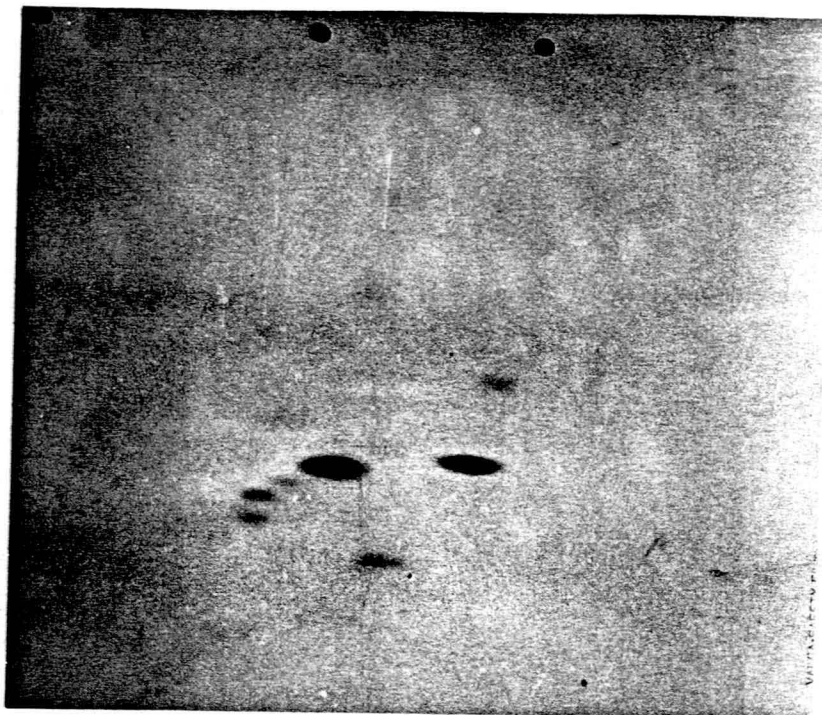


Fig. 51. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con simazina.



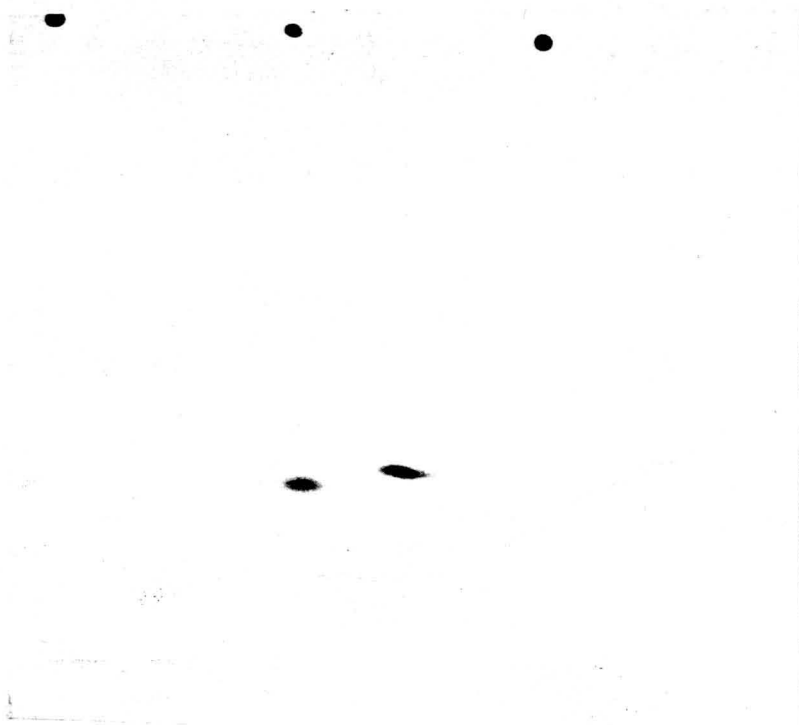


Fig. 52. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con fenmedifam.

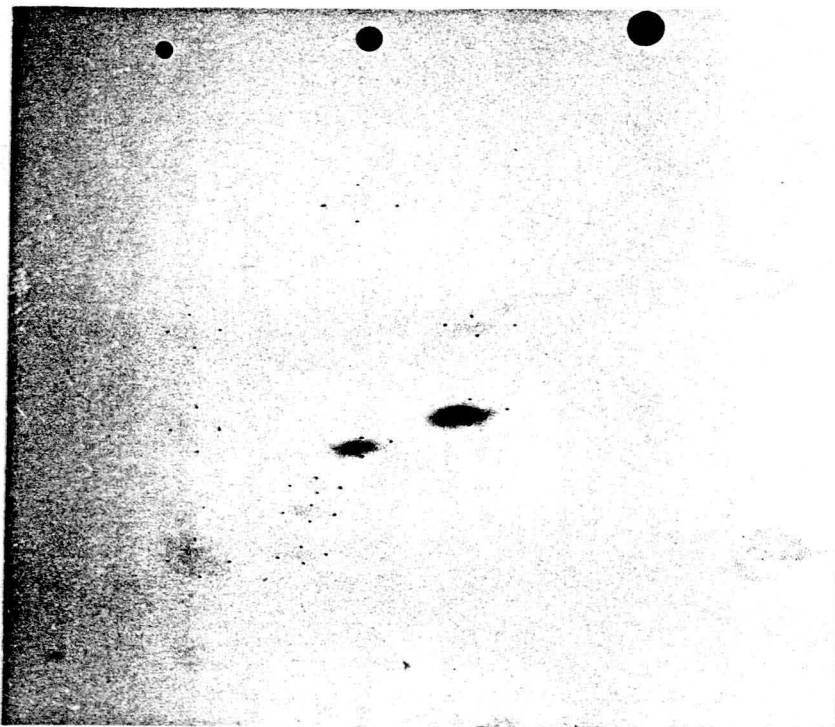


Fig. 53. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con 2.4-D.



Fig. 54. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con dicamba.



Fig. 55. Distribución de  $^{14}\text{C}$  en los productos asimilados por cloroplastos tratados con cloroxurón.

TABLA VIII

% de  $^{14}\text{C}$  incorporado en los distintos productos de asimilación de  $\text{CO}_2$  en relación al total marcado

|                  | Testigo    | Fenmedifam<br>0,05 $\mu\text{M}$ | Cloroxurón<br>0,3 $\mu\text{M}$ | Simazina<br>1 $\mu\text{M}$ | Paraquat<br>1 $\mu\text{M}$ | Dinoseb<br>0,5 $\mu\text{M}$ | Pirazon<br>1 $\mu\text{M}$ | 2,4-DB<br>50 $\mu\text{M}$ | 2,4-D<br>100 $\mu\text{M}$ | Amitrol<br>10 $\mu\text{M}$ | 2,4-DP<br>10 $\mu\text{M}$ | Diclobenil<br>10 $\mu\text{M}$ | Dicamba<br>10 $\mu\text{M}$ |
|------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Hexosas-P        | <u>7,5</u> | 7,0                              | 9,6                             | <u>14</u>                   | <u>13</u>                   | 9,0                          | <u>19</u>                  | 7,5                        | 7,0                        | 9,0                         | 11                         | 10                             | <u>15</u>                   |
| Hexosas-2P       | <u>3,0</u> | 2,0                              | 2,5                             | <u>8,0</u>                  | 4,0                         | <u>7,0</u>                   | <u>9,0</u>                 | 4,0                        | -                          | 4,0                         | <u>8,0</u>                 | 3,0                            | 5                           |
| Ribosa-5P        | <u>2,0</u> | 2,0                              | 3,0                             | 3,0                         | 4,0                         | 3,0                          | 4,0                        | 3,0                        | 2,0                        | 4,0                         | 3,0                        | 3,0                            | 3                           |
| Triosa-P         | <u>47</u>  | <u>36</u>                        | <u>36</u>                       | <u>19</u>                   | <u>58</u>                   | <u>52</u>                    | <u>19</u>                  | 48                         | <u>11</u>                  | 47                          | <u>34</u>                  | <u>43</u>                      | <u>32</u>                   |
| P-glicerato      | <u>32</u>  | <u>47,0</u>                      | <u>39</u>                       | <u>27</u>                   | <u>18</u>                   | <u>24</u>                    | <u>36</u>                  | 29                         | <u>39</u>                  | 33                          | <u>30</u>                  | 35                             | <u>36</u>                   |
| P-enólpiruvato   | <u>0,5</u> | <u>4,0</u>                       | <u>3,0</u>                      | <u>11</u>                   | <u>3,0</u>                  | 1,0                          | <u>4,5</u>                 | 2,0                        | <u>4,0</u>                 | 1,5                         | 2,0                        | 2,5                            | <u>4,0</u>                  |
| Disacáridos      | <u>0,9</u> |                                  | <u>3,0</u>                      | <u>4,0</u>                  |                             |                              | 1,5                        | 1,5                        | <u>11</u>                  |                             | <u>4,5</u>                 |                                |                             |
| Aminoácidos      | <u>1,0</u> |                                  |                                 | <u>4,0</u>                  |                             |                              | <u>3,0</u>                 |                            | <u>24</u>                  |                             | <u>3,0</u>                 |                                | <u>2,0</u>                  |
| Glicerato        | <u>4,0</u> | <u>0,4</u>                       |                                 |                             |                             |                              | 1,0                        |                            |                            |                             | 3,0                        |                                | <u>0,4</u>                  |
| Malato           | <u>0,1</u> | 0,6                              | <u>1,6</u>                      | 0,2                         |                             |                              | <u>1,6</u>                 |                            | <u>3,0</u>                 |                             | 0,3                        | 0,3                            | 0,2                         |
| Glicolato        | <u>1,0</u> | 1,2                              | 1,6                             | 1,7                         |                             | <u>3,0</u>                   | 1,0                        | <u>2,5</u>                 |                            | 1,4                         | 2,0                        | <u>2,7</u>                     | 2,0                         |
| No identificados | <u>1,0</u> |                                  |                                 | 8,2                         |                             |                              |                            | 2,9                        |                            |                             |                            |                                |                             |

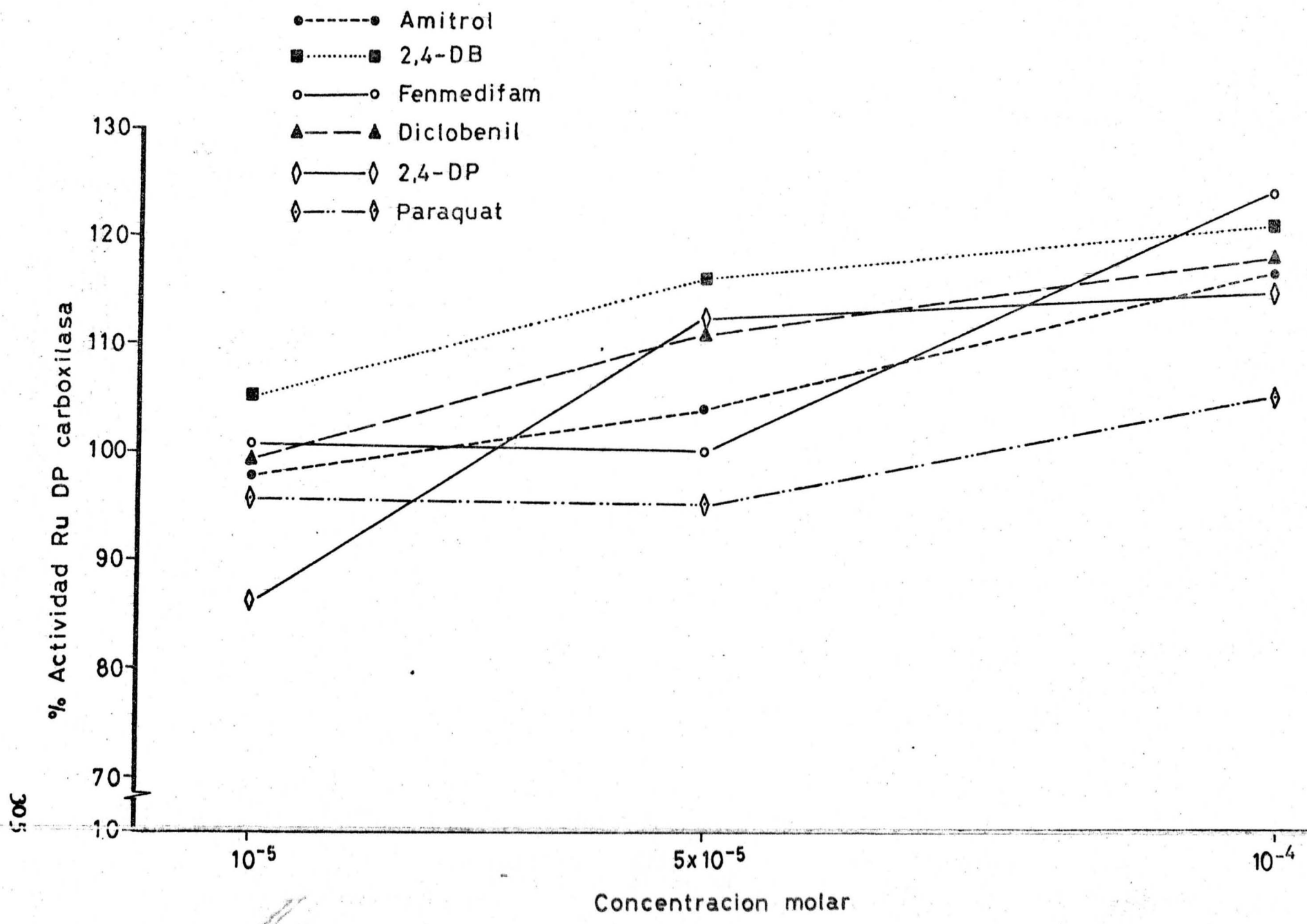


Fig. 56

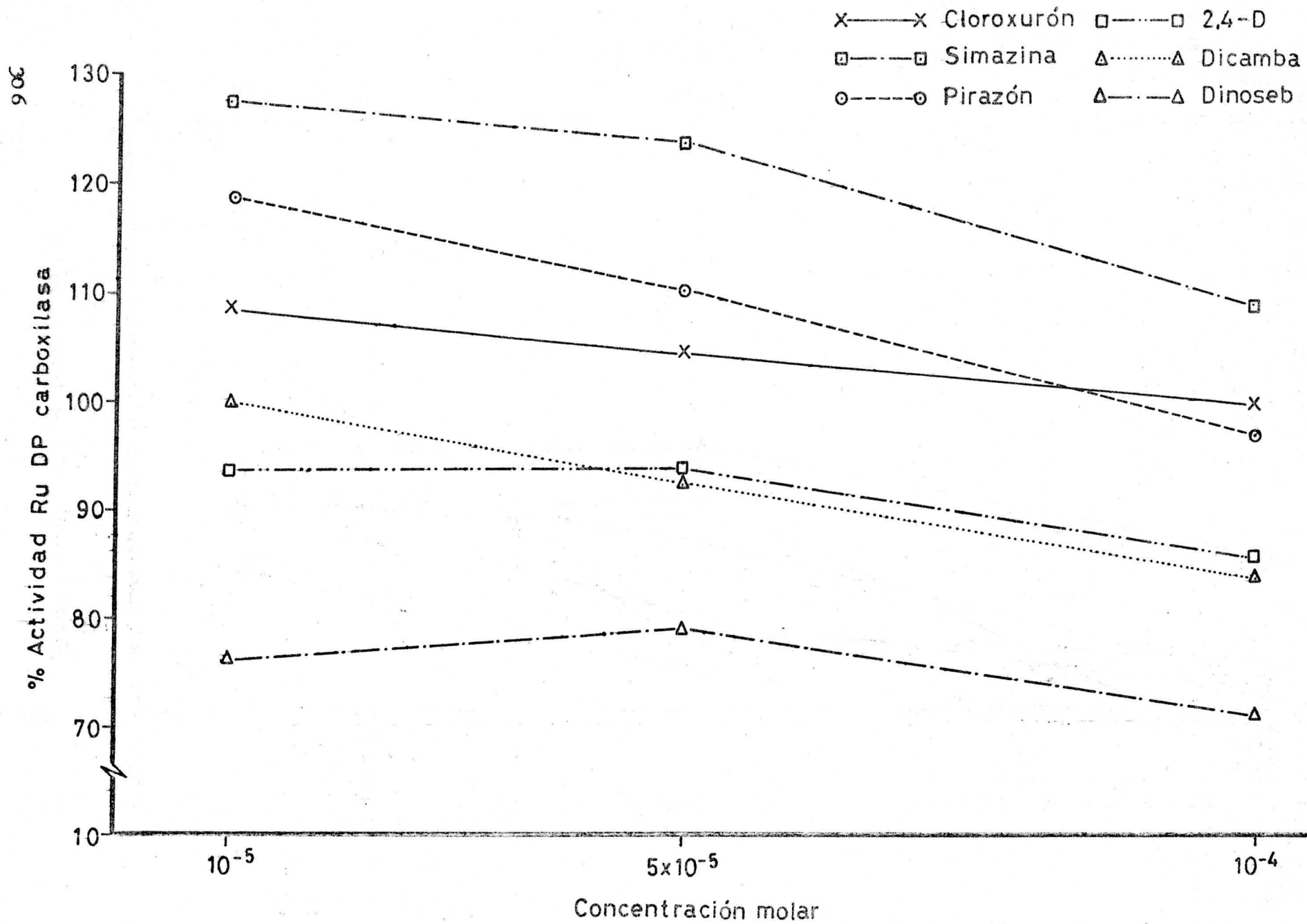


Fig. 57

TABLA IX

Actividad carboxidismutásica

% de inhibición o activación (a) producida

| <u>Herbicidas</u> | <u>Concentraciones (<math>\mu</math>M)</u> |           |            |
|-------------------|--|-----------|------------|
|                   | <u>10</u>                                  | <u>50</u> | <u>100</u> |
| Fenmedifam        | 0,6a                                       | 0,0       | 24a        |
| Simazina          | 28a  | 24a       | 9,0a       |
| Pirazón           | 19a  | 10a       | 3,0        |
| Amitrol           | 2,0  | 4,0       | 29a        |
| Dicamba           | 0,0  | 13        | 16         |
| Diclobenil        | 2,0  | 11a       | 18a        |
| Paraquat          | 3,0  | 5,0       | 5,0a       |
| Dinoseb           | 24   | 21        | 29         |
| 2,4-D             | 6,0  | 6,0       | 14         |
| 2,4-DB            | 5,0a                                       | 16a       | 22a        |
| Cloroxurón        | 9,0a                                       | 5,0a      | 1,0        |

## D.2.- Actividad fructosa bisfosfatásica

Asímismo se aisló y purificó el enzima Fructosa 1,6 bisfosfatasa hasta obtener una sola banda electroforética en gel de poliacrilamida, con una actividad específica de 40  $\mu$ moles de fósforo inorgánico liberado por cada mg. de proteína en un minuto, al actuar como testigo, y con el que se comparan los valores obtenidos por la acción de los distintos herbicidas sobre la actividad fosfatásica.

Cada resultado es la media de tres determinaciones, - considerándolo suficiente por ser extremadamente coincidentes. Exponemos en las figuras 58 y 59 las gráficas relativas al tanto por ciento de actividad fructosa bisfosfatásica bajo la influencia inhibidora o activante de los herbicidas usados, cada uno a cuatro concentraciones diferentes.

Igualmente la tabla X recoge esos mismos resultados como inhibición o activación cuantitativa producida en cada caso.

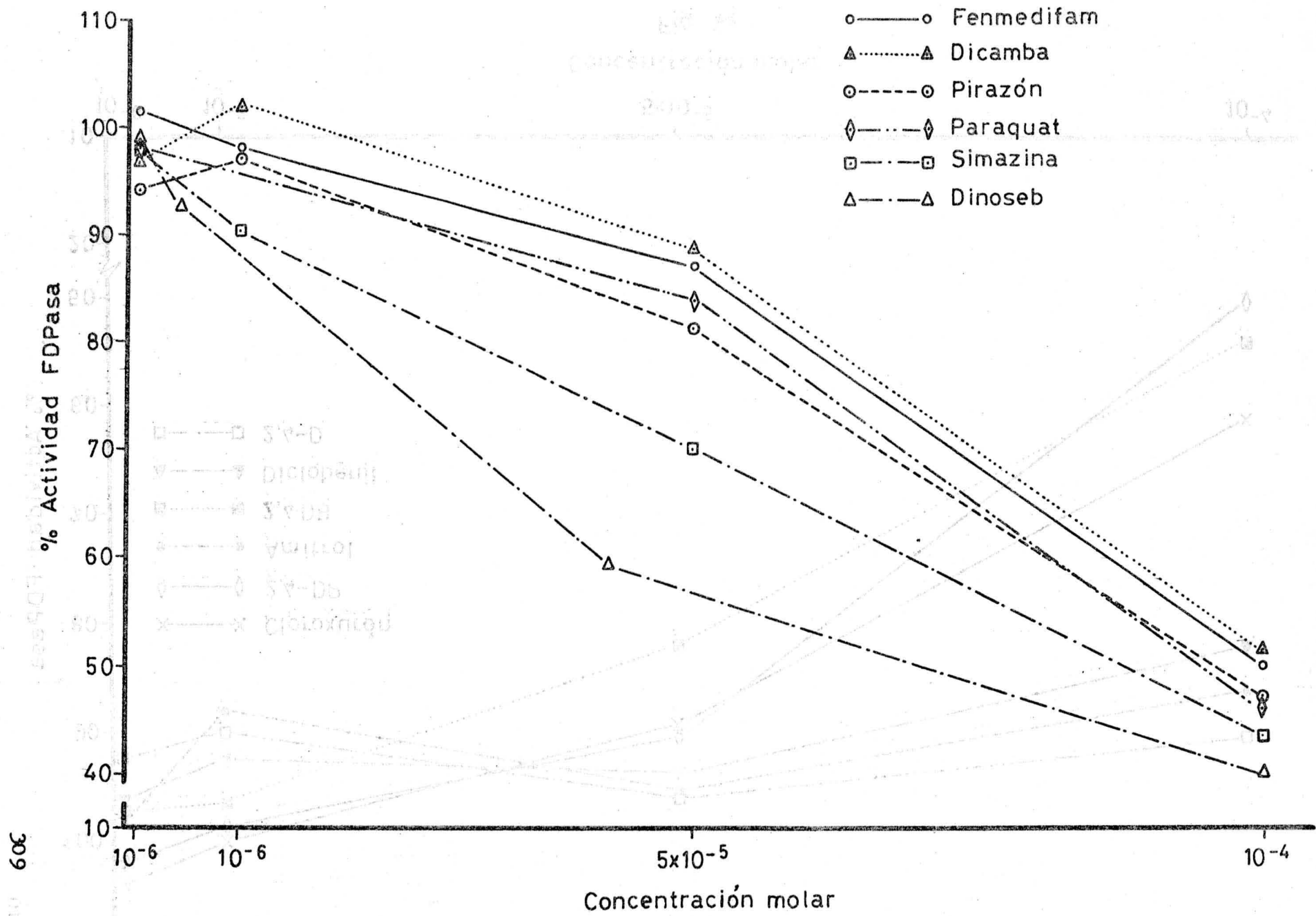


Fig. 58



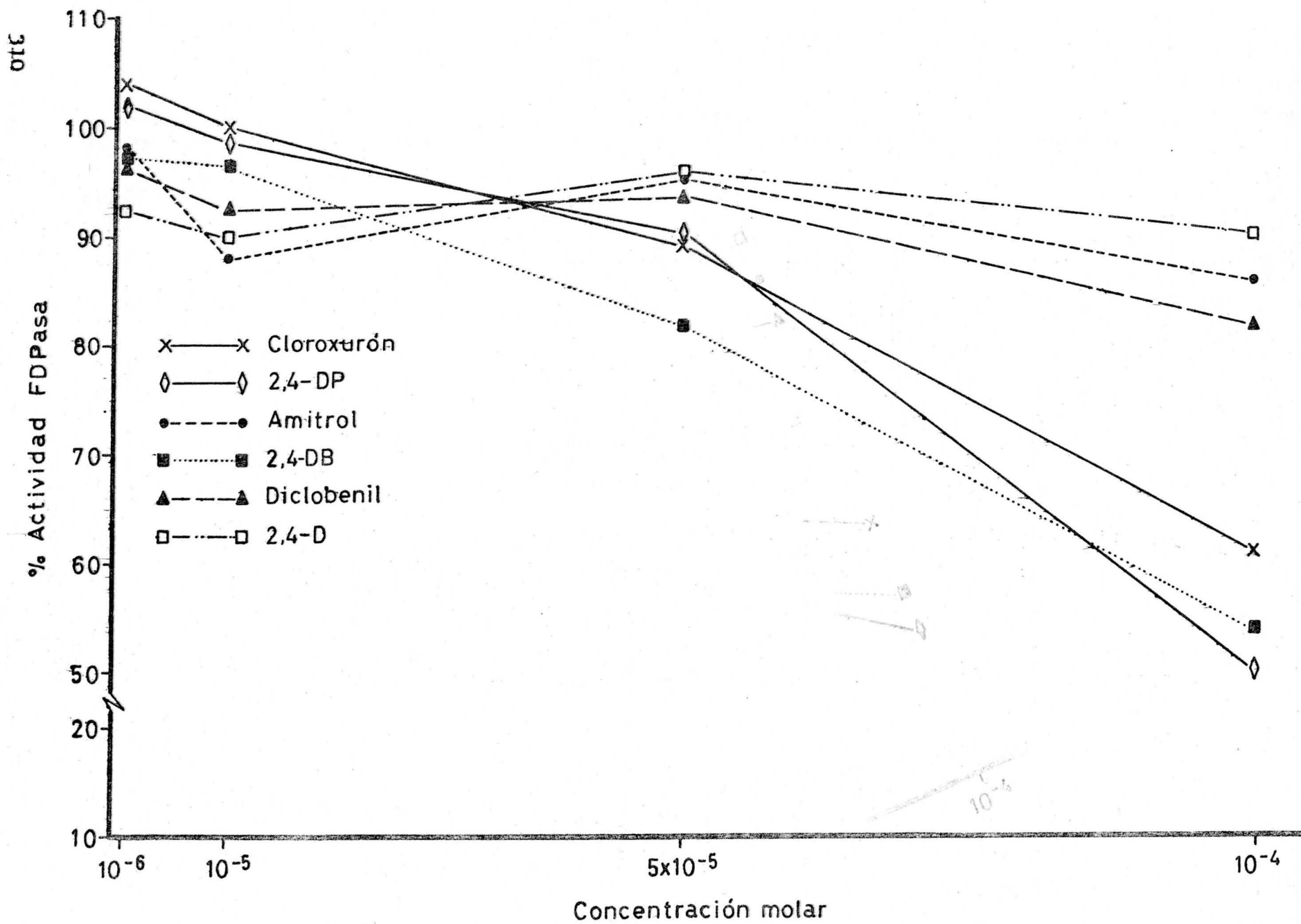


Fig. 59

TABLA X

Actividad fructosa bisfosfatásica

% de inhibición o activación (a) producida

| <u>Herbicida</u> | <u>Concentraciones (<math>\mu</math>M)</u> |           |           |            |
|------------------|--|-----------|-----------|------------|
|                  | <u>1</u>                                   | <u>10</u> | <u>50</u> | <u>100</u> |
| Fenmedifam       | 1,5a                                       | 2,0       | 13        | 50         |
| Simazina         | 2,5  | 10        | 30        | 57         |
| Pirazón          | 6,0  | 3,0       | 19        | 53         |
| Amitrol          | 2,0  | 12        | 4,0       | 14         |
| Dicamba          | 3,0  | 2,0a      | 12        | 50         |
| Diclobenil       | 3,5  | 7,5       | 6,0       | 18         |
| Paraquat         | 2,0  | 4,0       | 16        | 54         |
| Dinoseb          | 1,0  | 2,0a      | 50        | 60         |
| 2,4-D            | 8,0  | 10        | 4,0       | 10         |
| 2,4-DB           | 3,0  | 4,0       | 18        | 46         |
| 2,4-DP           | 2,0a                                       | 1,0       | 10        | 50         |
| Cloroxurón       | 4,0a                                       | 0,0       | 11        | 39         |



DISCUSSION



La obtención de altas tasas de transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$  requiere, dada su dependencia de los dos Fotosistemas I y II, un alto grado de integridad cloroplastídica que respete la estructura de las membranas granales y, por otro lado, evite la pérdida de los componentes solubles de la cadena, ferredoxina y  $NADP^+$ , que pueden fácilmente escaparse del cloroplasto cuando las envolturas del mismo se rompan. Este requisito lo cumplen los cloroplastos "tipo A" de Hall (35), en los que dicho transporte tiene lugar estrictamente con la dotación endógena de elementos de la cadena y de la fosforilación a ella acoplada, es decir, en las condiciones definidas por el "estado 2" de West y Wirkich (260). No obstante, dada la baja concentración de  $NADP^+$  y adenilatos existente en el cloroplasto —alrededor de 1 mM y 2 mM, respectivamente (106)— se necesitará un mecanismo que consuma el NADPH y ATP que se va formando, y permita la consecución de un ritmo mantenido de la reacción; como tal se utiliza la asimilación del  $CO_2$  adicionado al medio en forma de  $CO_3H^-$  — que, por ser perfectamente permeable a las envolturas del cloroplasto, y constituir un mecanismo fisiológico de disipación del NADPH y ATP, permite una perfecta funcionalidad del proceso.

Hemos utilizado cloroplastos íntegros "tipo A" preparados según Cockburn y col. (241), que mantienen una alta integridad

de las cubiertas externas y de la estructura granal, según puede observarse en la microfotografía al microscopio electrónico. En ella aparece un cloroplasto con su típica forma alargada y el sistema granal orientado en sentido longitudinal, características que aparecen constantes en todos los campos observados; en el espacio estromático aparecen, además de ribosomas, glóbulos osmiófilos reunidos en grupos de 2 a 4, y algunos -- granos de almidón. Exhiben una tasa de transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$  de 40  $\mu$ moles de  $O_2$  desprendidos por mg. de clorofila y hora, valor asimilable a los 20-80  $\mu$ moles obtenidos habitualmente por los autores del método, y superiores a los -- 10-40  $\mu$ moles encontrados con las preparaciones de cloroplastos, también "tipo A", de Jensen y Bassham (32).

El análisis de la tasa de transporte  $H_2O \rightarrow \{Fe(CN)_6\}^{3-}$  vinculada al Fot. II presenta pocos antecedentes bibliográficos, ya que este aceptor de electrones se ha utilizado fundamentalmente a nivel de Fot. I con cloroplastos íntegros, y cuando se ha usado a nivel de Fot. II ha sido como reactivo secundario -- para mantener en forma oxidada cantidades catalíticas de un -- auténtico aceptor quinónico. En realidad el empleo del ferric-- cianuro como aceptor electrónico del Fot. II o Fot. I es incompatible con el uso de cloroplastos con envolturas intactas, dada la impermeabilidad de las mismas a dicho reactivo, por lo -- que su extendida utilización como aceptor a nivel de Fot. I implica la existencia de una rotura, al menos parcial, de las cubiertas. En estas condiciones, y supuesta la existencia de una estructura granal intacta que no haga accesibles las partículas del Fot. II a un aceptor hidrofílico como el ferric-- cianuro, éste es fundamentalmente reducido a nivel de Fot. I; sin embargo, una desorganización parcial de la estructura granal --indu

cida por soluciones de baja fuerza iónica, sonicación, envejecimiento, etc.— provoca una accesibilidad del Fot. II a los aceptores hidrofílicos y una mayor dificultad en la transmisión electrónica del Fot. II al Fot. I, con lo que el flujo electrónico es absorbido a nivel del Fot. II por estos -- aceptores (207).

A la vista de ésto se han empleado los mismos cloroplastos anteriores, desorganizados luego parcialmente por un proceso de envejecimiento, tal como ha podido constatarse por observación al microscopio electrónico. En un estadio temprano de envejecimiento, exhiben una forma más o menos esférica, conservando la cubierta externa, al menos parcialmente; las agrupaciones granales de "tilakoides" aparecen dilatadas, aunque la característica más marcada son las numerosas vesículas que se forman a nivel de las membranas intergranales, de tal forma que los "grana" aparecen en su mayoría independientes unos de otros. También hay que señalar numerosos glóbulos osmiofílicos, localizados preferentemente rodeando a las membranas tilakoidales. En un grado más avanzado de envejecimiento podemos observar que las cubiertas del cloroplasto desaparecen, quedando sólo restos de las mismas, mientras que la estructura plastidial aparece constituida por vesículas, en las que se puede apreciar su procedencia de los "grana"; el único constituyente que permanece inalterado son los glóbulos osmiofílicos, muy abundantes ahora, como es característico de los cloroplastos seniles.

Este preparado mostró una tasa de transporte equivalente a 45  $\mu$ moles de  $O_2$  desprendido por mg. de clorofila y hora. Usando cloroplastos no desorganizados, y en los que la reducción del  $\{Fe(CN)_6\}^{3-}$  es presumible tendrá lugar por el Fot. I,



Reeves y Hall (108) encuentran niveles de reducción equivalentes a 22  $\mu\text{moles}$  de  $\text{O}_2/\text{mg.}$  de clorofila/hora en situación de fosforilación endógena propia del "estado 2", que pasan a 55  $\mu\text{moles}$  de  $\text{O}_2/\text{mg.}$  de clorofila/hora en condiciones de transporte y fotofosforilación forzadas correspondientes al "estado 3". Nishimura y col. (261) usan para testar la reacción de Hill - cloroplastos de espinaca con tasas de transporte electrónico  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \{\text{Fe}(\text{CN})_6\}^{3-}$  de 130-200  $\mu\text{moles}$  de ferricianuro reducido, equivalentes a 33-50  $\mu\text{moles}$  de  $\text{O}_2$  desprendido/mg. de clorofila/hora.

Finalmente, el transporte electrónico ascorbato/DPIP  $\rightarrow \text{NADP}^+$  vinculado al Fot. I resulta también muy dependiente del estado de integridad del cloroplasto. Razones de accesibilidad y de potencial redox hacen que el ascorbato reduzca al Fot. II - con un  $E_0 > + 500 \text{ mV}$  para el componente fotooxidable P-680- con -- mucha mayor facilidad que al Fot. I - con un  $E_0 = + 450 \text{ mV}$  para el componente P-700- cuando se trata de cloroplastos íntegros; operando con cloroplastos fragmentados el ascorbato puede ya ceder electrones al Fot. I, pero por razones de afinidad hidrofílica mucho mejor lo hace el DPIP, que en cantidades catalíticas es mantenido en estado reducido por el propio ascorbato (262). Por esta razón se han empleado los cloroplastos rotos  $\text{C}_1\text{S}_2$  de Whatley y Arnon (244), a los cuales se les adicionó la ferredoxina y el  $\text{NADP}^+$  perdidos durante el proceso de preparación de los mismos; con ellos se obtuvieron tasas de transporte de 51  $\mu\text{moles}$  de ---  $\text{NADPH}/\text{mg.}$  de clorofila/hora, comparables a las tasas obtenidas por Keister (263), y mucho mayores que los 3.2  $\mu\text{moles}$  de TPN reducidos/mg. de clorofila/hora reseñados por Losada y col. (59) utilizando los fragmentos  $\text{P}_1\text{S}_2$ , preparados sin adición de ascorbato a las soluciones de aislamiento, lavado y lisis de clo-

roplastos, que en este sentido resultan menos estables (264). Conviene, no obstante, indicar que los cloroplastos rotos -  $C_{12}$  no han perdido la capacidad de fotolisar el  $H_2O$ , la cual se pone de manifiesto -aunque a una tasa mucho mas baja que la exhibida por los cloroplastos íntegros "tipo A"- cuando empieza a agotarse la fuente artificial de electrones constituida por el par ascorbato/DPIP.

Numerosas son las referencias bibliográficas referentes a la acción de herbicidas sobre el transporte electrónico fotosintético. Sin embargo, la diversidad de especies utilizadas, edad de la planta, tiempo desde su recolección, condiciones de conservación, distintos métodos de preparación de los cloroplastos, y las diferentes formas de llevar a cabo los tests de funcionalidad, hacen muy difícil y escasamente fiable la comparación de resultados (265). Los derivados de la urea están considerados como los mas potentes inhibidores de la reacción de Hill, habiendo sido su forma de actuación extensamente revisada por Moreland (156); dentro de esta familia existen descritos mas de 20 miembros, siendo el diurón - el mas representativo por su mayor efectividad. Wessels y Van der Veen (187) apuntaron ya una concentración  $0.2 \mu M$  como  $I_{50}$  del diurón en la reacción de Hill con DPIP como aceptor electrónico, frente a un valor  $4 \mu M$  para el monurón; datos mas recientes utilizando distintos aceptores señalan concentraciones de  $I_{50}$  para el diurón en el rango  $0.03-0.1 \mu M$ , con una inhibición prácticamente total del transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  a la concentración  $10 \mu M$  (266), mientras que valores de hasta  $10 \mu M$  -fenurón  $10 \mu M$  y metabentiazurón  $7 \mu M$  (267)- son exhibidos por los miembros menos activos de la serie.

Para el cloroxurón se han dado concentraciones  $I_{50}$  de 0.1  $\mu\text{M}$  (162) y aún de 0.05  $\mu\text{M}$  en la inhibición del transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DPIP}$  por cloroplastos de lechuga (268). Estos valores, bastante inferiores al 0.3  $\mu\text{M}$  obtenido por nosotros en el transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ , y al 0.5  $\mu\text{M}$  en el  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  ferricianuro, hay que relacionarlos, como ya indica su autor, a la marcada sensibilidad de los cloroplastos de lechuga. En cualquier caso, el cloroxurón se muestra, junto con el diurón, como la fenil-urea más activa en la inhibición de la reacción de Hill, con una cesación total del transporte a una concentración 3  $\mu\text{M}$ , y aún menor. No obstante, los datos obtenidos con derivados de la fenil-urea acostumbran a presentar poca variabilidad en relación con la procedencia de los cloroplastos, pues según Moreland e Hill (240) aun tratándose de plantas de muy distinta tolerancia a estos herbicidas, sus cloroplastos muestran parecida susceptibilidad frente a la reacción de Hill. Quizás no sea a esto extraño la gran permeabilidad que a este tipo de herbicidas muestran las envolturas del cloroplasto (269).

Diversos hechos llevaron hace tiempo a la conclusión que el diurón actúa a nivel del Fot. II, con una fluorescencia inducida que hace pensar en una reducción total del aceptor primario Q; de ello se ha deducido un punto de actuación entre éste y el aceptor secundario de electrones del Fot. II (216); el cit.  $b_{559}$  según Izawa y Good (190). No obstante, algunos consideran la posibilidad que pueda existir un lugar adicional de actuación en el lado oxidante de este fotosistema (217). En cualquier caso, los herbicidas uréicos inhiben la actividad fotosintética del vegetal y deben producir una disminución de las disponibilidades hidrocarbonadas del mismo. Sin embargo, el hecho de que su acción fitotóxica aumente con el grado de -

iluminación ha desarrollado la hipótesis de un segundo efecto (165) en forma de oxidaciones letales fotodependientes; la producción por fotoexcitación de radicales libres, altamente reactivos, no sería contrarrestada por la síntesis de equivalentes de reducción necesarios para su disipación, produciéndose una oxidación de las moléculas de clorofila que explicaría la clorosis característica del tratamiento con estos herbicidas. Sobre esta base se podría esperar una fitotoxicidad análoga con todos aquellos herbicidas que interrumpiesen el flujo electrónico fotosintético; sin embargo, Kaplanova y Spicha (270) han demostrado que entre soluciones de clorofila "a" tratadas con una serie de herbicidas y luego iluminadas, sólo aquellas con diurón y fluometurón presentan una fotodescomposición de la clorofila. Una disminución selectiva de la razón clorofila a/b ha sido observada en tratamientos con metabentiazurón, lo que quizás deba correlacionarse con un aumento del número de "lamelas" granales, más ricas en clorofila b, a fin de contrarrestar el bloqueo del Fot. II por el herbicida (271).

Los derivados triazínicos están también reconocidos como clásicos inhibidores de la reacción de Hill a nivel del Fot. II (272, 273); sin embargo, ni su punto exacto de actuación está tan definido, ni su acción fitotóxica es tan específica. Las triazinas producen en la planta completa un aumento del contenido de compuestos nitrogenados, según algunos debido a un aumento de la actividad nitrato-reductásica (274), junto con una paralela disminución de los componentes azucarados, cosa nada extraña en un inhibidor fotosintético; adicionalmente, parecen también actuar sobre el metabolismo auxínico (275). Constituye también un grupo muy numeroso de

herbicidas, con valores de  $I_{50}$  que oscilan entre 0.09  $\mu\text{M}$  para la prometrina, hasta cerca de 300  $\mu\text{M}$  para la trietazina (240); esta diversidad de efectividades ya indica la mayor heterogeneidad de este grupo frente a las fenil-ureas, aunque estas grandes diferencias puedan muy bien achacarse en parte a una mayor dificultad en la standardización de resultados. Así, para la simazina se han dado valores de  $I_{50}$  —trabajando con —cloroplastos de distintas especies, y con distintos aceptores electrónicos— que oscilan entre 0.4  $\mu\text{M}$  (275) y 8.4  $\mu\text{M}$  (240); nosotros, en las condiciones standardizadas establecidas, hemos obtenido para este mismo compuesto valores de  $I_{50}$  de 2  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  en las cadenas de transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  y  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  ferri-cianuro, respectivamente, con inhibición total a concentraciones respectivas 15 y 30  $\mu\text{M}$ . Algunas triazinas, especialmente las muy activas, como la prometrina, parecen tener además una acción inhibitoria del transporte electrónico en un punto que no afecta al flujo electrónico ascorbato/DPIP  $\rightarrow \text{NADP}^+$  vinculado al Fot. I, pero sí al flujo cíclico dependiente del mismo, catalizado por la fenazina metasulfato (276).

Las opiniones sobre el lugar de actuación de la atrazina parecen dirigirse a considerarlo coincidente con el del diurón, como se deduce de experiencias de competencia entre ambos por un mismo punto de unión al "tilakoide" (277). No obstante, el hecho de que cloroplastos de algunas estirpes de *Chenopodium album* resistentes a la atrazina no experimenten frente a ésta una inhibición de la reacción de Hill, y que esta inhibición sí se manifieste con el diurón, ha hecho dudar de que el punto de actuación sea el mismo (179). Al igual que sucedía con las fenil-ureas, la restricción en la síntesis de  $\text{NADP}^+$  provoca una degradación fotooxidativa de la clorofila, que en último

extremo se manifiesta en cambios en la estructura del cloroplasto (278),

Los carbamatos han sido considerados hasta hace poco como herbicidas que interfieren procesos de fosforilación oxidativa y de síntesis protéica, y sólo recientemente ha empezado a dárseles importancia como inhibidores fotosintéticos. Solamente el bis-carbamato fenmedifam ha gozado de una más antigua consideración como bloqueante de la reacción de Hill a nivel del Fot. II, pero nada se ha descrito sobre su lugar exacto de actuación. Se ha registrado para él una concentración  $I_{50}$  de 0.17-0.19  $\mu\text{M}$  en la inhibición de la reacción de Hill por cloroplastos aislados (279); nosotros hemos obtenido un valor 0.3  $\mu\text{M}$  tanto en el transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  como en el  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  ferricianuro, produciéndose una inhibición total del primero a concentración 0.8  $\mu\text{M}$ , y del segundo a concentración ligeramente superior. Si exceptuamos el SWEP, con un  $I_{50}$  próximo a 4  $\mu\text{M}$  con ferricianuro como aceptor (280), los restantes carbamatos muestran una actividad menor, con concentraciones  $I_{50}$  de 100 a 300  $\mu\text{M}$ ; no obstante todos estos valores son actualmente objeto de revisión, pues algunos de ellos, como el betanin, se han mostrado como potentes inhibidores de la reacción de Hill (281). Concentraciones bajas de fenmedifam, por debajo de 0.1  $\mu\text{M}$ , han mostrado en nuestras manos un ligero efecto activador del transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ ; un efecto activador del clorprofam sobre la "fotosíntesis neta" había sido ya descrito en los primeros estadios de desarrollo de plantas de cebolla (282).

Los efectos del fenmedifam se manifiestan también a nivel ultraestructural, según se puede apreciar en la correspondiente microfotografía. Los cloroplastos aparecen mas volumi-

nosos pero, a diferencia de lo que ocurre con el paraquat, su cubierta externa permanece bien conservada y la densidad es--  
tromática se mantiene semejante a la de los testigos; sín em-  
bargo, algunas zonas del estroma se presentan transparentes a  
los electrones, libres de estructura alguna. Las pilas tilakoii  
dales, aunque consérvan su estructura granal, aparecen dilatada  
das y algo distorsionadas; finalmente, se detecta un aumento  
del número de glóbulos osmiófilos.

Como ya se indicó anteriormente, los herbicidas del bipi-  
ridilo son con los uréicos los mas profundamente estudiados -  
en relación con su mecanismo de acción. Su dependencia de la  
iluminación y de la presencia de oxígeno para ejercer su efecto  
tóxico es muy particular, a lo que en el terreno agronómi-  
co hay que unir una fuerte adsorción por el suelo que lo hace  
totalmente inexistente para la planta una vez que el herbici-  
da llega a él. El punto en que tiene lugar la reducción del -  
herbicida es directamente a nivel del aceptor primario de electr  
ones X del Fot. I, lo que implica que ni el flujo electróni-  
co acíclico ni la fosforilación a él acoplada quedan detenidos.  
Sín embargo, al quedar bloqueada la reducción del  $\text{NADP}^+$  hay -  
una paralización de la síntesis de azúcares; ésto, unido a la  
disgregación de las envolturas cloroplastídicas provocada por  
el  $\text{H}_2\text{O}_2$  originado en la reacción de Mehler, produce el efecto  
fitotóxico de estos herbicidas (283).

Nosotros hemos obtenido para el paraquat valores de  $I_{50}$   
en la reacción ascorbato/DPIP  $\rightarrow$   $\text{NADP}^+$  de  $15 \mu\text{M}$ , aunque una inhi  
bición del 20% se observa ya a una concentración  $0.3 \mu\text{M}$ . -  
Datos anteriores dan una  $I_{50}$  mas baja, a concentraciones  $3.5$   
 $\mu\text{M}$  (284). La acción desorganizadora de este herbicida sobre la  
estructura del cloroplasto se observa en la microfotografía ad

junta, pues aún en el escaso tiempo de exposición lumínica en presencia de paraquat puede advertirse la forma esférica que adoptan, con rotura y pérdida total o parcial de sus envolturas. La orientación longitudinal de las "lamelas" granales y estromáticas aparece alterada, y la falta de paralelismo entre estas últimas se traduce en la aparición en el "estroma" de grandes espacios vacíos, desprovistos de cualquier tipo de estructura. Se observan ribosomas en el interior de los cloroplastos, pero su densidad es menor que en cloroplastos testigos; no se ha observado ningún grano de almidón. Otro efecto observable es un incremento en el número de gránulos osmiofílicos, localizados en las cercanías de las membranas tilakoidales, y nunca libres en el "estroma".

Al igual que sucede en su actuación mitocondrial, los nitrofenoles —y lo mismo le ocurre a las nitroanilinas (285)— presentan frente al cloroplasto una actuación muy compleja derivada del carácter desacoplante e inhibidor de estos compuestos. En general, la acción desacoplante es más sensible que la inhibidora del transporte electrónico, y dado el efecto activante que sobre éste tiene aquélla se da la circunstancia de que tales compuestos a bajas concentraciones bloquean la fosforilación con un incremento del flujo electrónico, y sólo a mayores concentraciones éste también se detiene. Los niveles de actividad varían mucho de uno a otro miembro de la familia, con valores  $I_{50}$  en el transporte  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro de  $5 \mu M$  para el DNOC (286), y tasas inhibitoras de la reacción de Hill del orden de  $I_{50}$   $330 \mu M$  para el dinitrofenol (287). Para el dinoseb se ha descrito un  $I_{50}$  de  $13-17 \mu M$  (240), valor comparable al  $I_{40}$   $9 \mu M$  obtenido por nosotros en el transporte  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro, si bien hemos encontrado valores  $I_{10}$



geramente menores en la cadena  $H_2O \rightarrow NADP^+$ . El punto de actuación de los nitrofenoles en la inhibición del transporte electrónico parece estar también vinculado al Fot. II, en algún punto próximo al "pool" de plastoquinona, como lo demuestra el que el DNOC no inhiba la transferencia  $H_2O \rightarrow$  silicomolibdato, y el que este mismo herbicida aún a concentración 200  $\mu M$  active, por desacoplamiento, el flujo cíclico que en anaerobiosis tiene lugar alrededor del Fot. I en presencia de diquat, actuando el sistema ascorbato/DPIP como cebador electrónico (286). Un caso descrito en que un nitrofenol, el 2-cloromercuri-4,6-dinitrofenol, actúa a la baja concentración  $10^{-6}$  M inhibiendo el transporte ascorbato/DPIP  $\rightarrow NADP^+$  dependiente del Fot. I (288), parece deberse al conocido efecto bloqueante que los mercuriales ejercen a nivel de plastocianina (227).

El efecto inhibitor de las piridazinonas sobre la fotosíntesis fué establecido por Hilton y col. (289), que encontraron para el pirazón un valor  $I_{50}$  6-7  $\mu M$  en la inhibición de la reacción de Hill por cloroplastos aislados. Sin embargo, existen otros componentes de la serie aun más activos, como el Sandoz 6706, con un  $I_{50}$  a nivel 4  $\mu M$ . Nosotros hemos encontrado con el pirazón valores  $I_{50}$  de 13  $\mu M$  y 20  $\mu M$  en la inhibición del transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$  y  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro, respectivamente, con un incremento de la inhibición poco pronunciado en relación a la concentración, pues aún a 30  $\mu M$  las inhibiciones respectivas son sólo del 75 y 63%. Las piridazinonas son fuertemente agresivas a las estructuras cloroplastídicas, que aparecen con perforaciones de sus envolturas y roturas de las membranas granales (290).

De los restantes grupos de herbicidas ensayados poco hay descrito sobre su incidencia en el proceso fotosintético. Budi-

mir y col. (291) han descrito valores de  $I_{50}$  entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  M para el 2,4-DB en la cadena  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro, trabajando con cloroplastos de espinaca tanto en condiciones de fosforilación como en ausencia de la misma. Verdaderamente estas concentraciones son tan elevadas que es pueril hablar de efectos directos debidos al herbicida, cuando a concentraciones menores se reconocen para los ácidos fenoxialquil-carboxílicos otras acciones que indudablemente incidirán indirectamente sobre la fotosíntesis. En general, existe un gran vacío en experiencias "in vitro" realizadas con este grupo de herbicidas que, por el contrario, han sido ampliamente testados "in vivo" en relación con su efecto auxínico.

Aunque a los derivados del p-hidroxibenzonitrilo se les reconoce una acción directa sobre la fotosíntesis, no ocurre lo mismo con los benzonitrilos no hidroxilados que, como el diclobenil, están catalogados como herbicidas de mecanismo de acción indeterminada (160). Respecto a los herbicidas benzoicos y a los heterociclos derivados del triazol, nada hay descrito sobre su incidencia en el proceso fotosintético.

Analizando comparativamente todos los herbicidas testados en la reacción de transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  se observa que dos de ellos, fenmedifam y cloroxurón, muestran un  $I_{50}$  inferior a  $1 \mu M$ , con una mayor actividad por parte del primero por cuanto produce una inhibición total a concentración  $0.8 \mu M$ , frente a  $3 \mu M$  en el segundo. Esta gran actividad del fenmedifam puede explicarse por su carácter de bis-carbamato, con un doble grupo funcional activo aril-carbámico en su molécula. Un segundo grupo, simazina, paraquat y dinoseb exhiben un  $I_{50}$  a concentraciones entre  $1$  y  $10 \mu M$ , con total bloqueamiento del transporte para los dos primeros a concentración  $15 \mu M$ , que no pudo deter

minarse con el dinoseb por no haberse utilizado concentraciones suficientemente altas. Llama la atención el valor  $I_{50}$  relativamente alto del paraquat en comparación con el del fenmedifam, simazina, etc., cuando su fitotoxicidad es mucho más drástica; esto corrobora que la gran agresividad del paraquat sobre la planta radica, más que en su inhibición del transporte electrónico, en la producción paralela de peróxido que ello conlleva. Por otro lado, no puede olvidarse que los efectos inhibidores obtenidos con el paraquat son ficticios cuando se miden a través del oxígeno desprendido, ya que tiene lugar una toma paralela de oxígeno del medio por "efecto Mehler", que depende de la concentración del herbicida y de su "turnover" de óxido-reducción; así pues, las concentraciones  $I_{50}$  obtenidas son bajas, lo que explica el valor  $I_{50}$  bastante mayor obtenido para este herbicida en la reacción de transporte ascorbato/DPIP  $\rightarrow$  NADP<sup>+</sup>. El valor  $I_{50}$  3  $\mu$ M encontrado por nosotros para el dinoseb es bastante bajo, y cae dentro de la concentración en que los nitrofenoles manifiestan efectos desacoplantes; por esta razón hay que atribuirle al dinoseb un poder inhibitor aun mayor que el reflejado en estos valores, toda vez que el efecto desacoplante debería producir una activación del transporte electrónico. Finalmente, el pirazón exhibe una efectividad claramente más moderada, con un  $I_{50}$  13  $\mu$ M y una inhibición aun del 75% a concentraciones tan altas como 30  $\mu$ M. Los restantes herbicidas testados no muestran efectos inhibidores de este transporte, y sólo el 2,4-DB exhibe una ligera inhibición con un  $I_{10}$  a 24  $\mu$ M. Más aún, algunos de ellos exhiben una activación evidente a las concentraciones más bajas utilizadas, que en el caso del diclobenil se extiende aún a la concentración 60  $\mu$ M.

Analizando la reacción de transporte  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro, se observa en la mayor parte de los casos un paralelismo muy cerrado con la anteriormente estudiada. Fenmedifam y cloroxurón son los más potentes inhibidores, con  $I_{50}$  por debajo de  $1 \mu M$ . Le siguen simazina y dinoseb, aunque en este último no se ha conseguido una inhibición del  $I_{50}$  a la concentración  $-15 \mu M$ , máxima empleada. Esto contrasta con el bajo valor  $3 \mu M$ , ya comentado, hallado para el transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  e indica, o una transferencia electrónica más eficiente, o un efecto desacoplante más potente en la secuencia  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro, lo que conduciría también a un transporte electrónico más fluido. En cuanto al pirazón, el  $I_{50}$   $20 \mu M$  obtenido le adjudica, al igual que ocurría antes, un poder inhibidor más reducido. Con todos estos herbicidas resulta evidente un lugar de actuación a nivel del Fot. II, dada su operatividad tanto en el proceso  $H_2O \rightarrow NADP^+$  como en el  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro. No ocurre lo mismo con el paraquat, que a la máxima concentración  $30 \mu M$  utilizada mostró sólo una inhibición del 20%, valor que contrasta con el  $I_{50}$   $5 \mu M$  indicado anteriormente; esto es una clara indicación que el lugar de actuación de este herbicida no está a nivel del Fot. II. Finalmente, los restantes herbicidas, o no muestran efecto alguno, o como el diclobenil, producen inhibiciones a concentraciones tan altas  $-I_{40}$  a  $60 \mu M-$  que no merecen ser consideradas.

El estudio de las cinéticas de transporte ascorbato/DPIP  $\rightarrow NADP^+$  requiere un análisis cuidadoso. Como puede observarse en las gráficas correspondientes, el decaimiento pronunciado con el tiempo del ritmo de reducción de  $NADP^+$  que tiene lugar en presencia de algunos herbicidas cabe achacarlo a un progre

sivo agotamiento de la forma reducida de ascorbato, que actúa como fuente de electrones, y que no se ve compensada con un aporte electrónico procedente del Fot. II debido al carácter inhibitor que sobre éste ejercen dichos herbicidas. Conviene indicar aquí que si bien los preparados cloroplásticos  $C_1S_2$  utilizados no han perdido su capacidad de fotolisar el  $H_2O$ , la capacidad de transferencia electrónica del  $H_2O$  al  $NADP^+$  se encuentra muy disminuída, y en ningún caso el flujo electrónico que tenga este origen podrá reemplazar en todo su valor al procedente del donador artificial ascorbato/DPIP. Por eso, en los casos de herbicidas que no actúan inhibiendo el Fot. II— y también en los standards sin herbicida—, este decaimiento es menos evidente, aunque no deja de existir. En conclusión, aunque las cinéticas de reacción se han mantenido hasta tiempos de 25 minutos, y se han hecho cálculos de tasas de reacción en los intervalos 0-3 minutos y 12-18 minutos, el valor de estos últimos es muy limitado y sus resultados deberán manejarse con suma precaución.

Fenmedifam, cloroxurón y simazina presentan a los tres minutos inhibiciones que no pasan del 20-30% a las máximas -- concentraciones ensayadas, y que son algo mayores a los 12-18 minutos como consecuencia del efecto inhibitor que estos herbicidas muestran sobre el flujo electrónico procedente del -- Fot. II. A la baja concentración 1  $\mu M$  los dos primeros parecen exhibir cierto porcentaje de inhibición, y resulta comprometido decir si ello se puede deber a un efecto directo sobre el Fot. I o, dada su potente acción inhibitora del Fot. II, sea sólo una manifestación de un flujo electrónico residual procedente del  $H_2O$  aún en los momentos iniciales de la reacción, -- cuando la concentración de ascorbato reducido es alta. No ocu

re lo mismo con el paraquat, que muestra un valor  $I_{50}$  15  $\mu\text{M}$  cuando se calcula en el intervalo de 0 a 3 minutos de tiempo de reacción, con una inhibición ya del 20% en dicho tiempo a la concentración 0.3  $\mu\text{M}$ ; ésto coincide con su reconocido carácter de secuestrador electrónico actuando entre el aceptor primario X y la ferredoxina. Un efecto nulo presentaron el dinoseb, amitrol, pirazón, 2,4-D, 2,4-DB y 2,4-DP; la no existencia de un efecto activante del flujo electrónico como consecuencia de concentraciones desacoplantes de dinoseb, debe ser interpretada en el sentido de una acción selectiva desacoplante de la fotofosforilación acíclica mas que la cíclica. El dicamba muestra un ligero efecto activador, aunque a concentraciones muy dispares para que se le pueda correlacionar con el que aparece en el proceso  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ ; finalmente, el diclobenil dió resultados desconcertantes, pues exhibía ligeros efectos activantes o inhibidores según concentración y tiempo de reacción.

La determinación de los niveles de fotofosforilación cíclica y no cíclica ha sido objeto de una gran controversia en relación con los preparados cloroplastídicos a usar y las condiciones de reacción. Dada la escasa permeabilidad de las envolturas cloroplásticas a los adenilatos, es evidente que el uso de cloroplastos íntegros "tipo A" en esta clase de experiencias conduciría a la obtención de tasas de reacción próximas a las de fosforilación endógena, típicas del "estado 2". La obtención de ritmos mas rápidos implica hacer desaparecer las envolturas del cloroplasto como barreras que se oponen a la libre entrada de los reactantes ADP y Pi, en una situación que corresponde al "estado 3". Lógicamente, estos preparados de cloroplastos rotos habrán de obtenerse en unas condiciones

tales que no dañen el sistema integral de transporte electrónico, ni la fotofosforilación a él acoplada, y habrán además de completarse con aquellos elementos necesarios para aquél y para ésta que hayan podido perderse durante el proceso de preparación. En esta línea hemos empleado los cloroplastos "tipo A" utilizados en la experiencia de transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$ , -- que posteriormente fueron lisados por choque osmótico según -- puede observarse en las microfotografías que se adjuntan.

En un estado inicial de lisis se detecta un aumento del volumen plastidial, adoptando una forma más o menos esférica con una sola membrana de delimitación externa. Aunque el "estroma" se encuentra todavía bien conservado, cabe destacar -- una serie de invaginaciones internas de las membranas tilakoidales, dando lugar a grandes sáculos o bolsas de "estroma". Una posterior manifestación de la lisis es la rotura de la membrana externa y principio de degradación del "estroma" localizado en las cercanías de la cubierta dañada. En estadios más avanzados, de la estructura inicial del cloroplasto sólo queda un conjunto de membranas tilakoidales, sin señales de "estroma" y con la presencia de algunos glóbulos osmiófilos.

Mientras que la determinación de la fosforilación ligada al flujo electrónico no cíclico se ha venido haciendo con un aceptor electrónico --fisiológico como la ferredoxina, o no fisiológico como el ferricianuro o el MV-- como aceptor terminal de electrones, la vinculada al proceso cíclico se ha efectuado utilizando la PMS como donador-aceptor alrededor del Fot. I. En la fosforilación cíclica se prevenía cualquier interferencia del flujo no cíclico bloqueándolo mediante un inhibidor del Fot. II, mientras que en la fosforilación no cíclica se impedía un posible flujo cíclico merced a la inhi

bición que sobre éste ejerce la antimicina A. Alternativamente, era posible utilizar luz monocromática específica del transporte electrónico cíclico alrededor del Fot. I. Sin embargo, el empleo de PMS es totalmente afisiológico, no sólo cuantitativa sino cualitativamente ya que, como anteriormente se expuso, cataliza una vía cíclica completamente distinta a la natural, con rendimientos de fosforilación exageradamente altos. Por esta razón, de acuerdo con Arnon y Chain (113), decidimos adicionar ferredoxina al preparado de cloroplastos como catalizador nativo tanto de la fotofosforilación cíclica como no cíclica, determinándose en estas condiciones el nivel de fotofosforilación total; un ensayo paralelo en presencia de antimicina A nos dará la tasa de fotofosforilación no cíclica. Estos mismos autores han demostrado la inutilidad de operar en condiciones anaerobias —en realidad sólo necesarias para eliminar la fosforilación pseudocíclica, y evitar su confusión con la cíclica en cuanto ambas no producen modificaciones ambientales de la concentración de oxígeno—, por lo que hemos operado en condiciones de aerobiosis, contabilizando como proceso no cíclico tanto la fotofosforilación acíclica como la pseudocíclica.

En estas condiciones hemos obtenido tasas de fotofosforilación en ausencia de antimicina de unos 50  $\mu$ moles de ATP -- formados por mg. de clorofila y hora, y de 10  $\mu$ moles en presencia de antimicina. Como ya indican Arnon y Chain (113), — estos valores son bastante bajos comparados con los obtenidos por otros autores, lo que se debe a la no utilización de condiciones saturantes en lo que respecta a la iluminación y concentración de clorofila. Efectivamente, con la iluminación de 10.000 lux empleada por nosotros se calcula por diferencia



una fotofosforilación cíclica del orden de 40  $\mu$ moles de ATP/mg. de clorofila/hora, mientras que Nishimura y col. (261) obtienen tasas próximas a 100  $\mu$ moles utilizando 15.000 lux, y Moreland y col. (285) de 640  $\mu$ moles con 100.000 lux. Como le ocurre a estos últimos autores, la razón obtenida entre la cantidad de ATP originada por el sistema cíclico y por la vía acíclica es próxima a 4, exactamente lo contrario de lo que ocurre "in vivo" (119), lo que puede explicarse por una disminución progresiva del flujo electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$  al no consumirse el NADPH que se vá originando en el proceso.

Como ya antes se ha apuntado, los inhibidores del transporte electrónico inciden en la fotofosforilación reduciendo la tasa de la síntesis no cíclica de ATP, no alterando sustancialmente la síntesis cíclica, a diferencia de los inhibidores que presentan un carácter adicional desacoplante, que reprimen tanto la fosforilación cíclica como la acíclica. Por otro lado, los desacoplantes puros se caracterizan por inhibir ambos tipos de fotofosforilación, pero no ejercen influencia aparente sobre el proceso de transporte de electrones.

El fenmedifam, con un 55% de inhibición de la fosforilación acíclica y un 35% de la cíclica a concentración 0.5  $\mu$ M, se presenta pues como un típico inhibidor-desacoplante, cosa ya apuntada por Alsop y Moreland (232) para otro fenil-carbamato, el clorprofam. Por el contrario, el cloroxurón, que presenta también niveles de inhibición del 50% de la fosforilación acíclica en el rango de concentraciones 0.1-0.5  $\mu$ M no inhibe la síntesis cíclica de ATP, lo que obliga a considerarlo a dichas concentraciones como un típico inhibidor del transporte electrónico. Sin embargo, a concentración 1  $\mu$ M la inhibición

de la fotofosforilación cíclica salta ya a un 30%, lo que implica un cambio a carácter inhibidor-desacoplante. Efectivamente, Nishimura y col. (261) indican que el diurón, junto con otros herbicidas testados, muestra a concentraciones del orden  $10^{-4}$  M —muy superiores a aquéllas en que se usan como potentes inhibidores del transporte electrónico— una inhibición específica de la fotofosforilación cíclica catalizada por la PMS. Un carácter también de inhibidor no desacoplante tiene la simazina a las concentraciones 0.5-1  $\mu$ M, con una inhibición del 20% de la fotofosforilación acíclica y ausencia de operatividad en la cíclica; si a mayores concentraciones presenta, al igual que el cloroxurón, una acción desacoplante no ha podido verificarse por no haberse testado tales concentraciones.

El dinoseb a 3  $\mu$ M exhibe un 30% de inhibición de la fotofosforilación acíclica y el 50% de la cíclica, lo que indica una naturaleza de inhibidor-desacoplante, pero con una fuerte incidencia del carácter desacoplante al ser más patente el efecto inhibidor del proceso cíclico. El  $I_{50}$  de la fotofosforilación global se sitúa alrededor de 3  $\mu$ M, valor análogo al  $I_{50}$  del proceso de transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$ ; este valor es indicativo de su gran efectividad, cuando se le compara con las concentraciones del orden 300  $\mu$ M requeridas para que manifieste su actividad el 2.4-dinitrofenol (287), y confirma el criterio establecido por Van Rensen y col. (286) de que el grado de efectividad desacoplante de los nitrofenoles aumenta con la longitud del radical alquilo unido al núcleo bencénico. No obstante, comparando los valores de inhibición del proceso de transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  y de la fotofosforilación global, a todas las concentraciones ensayadas, hay que reconocer que el -

dinoseb presenta una mayor incidencia sobre el primero que sobre la segunda, a diferencia de lo que Moreland y col. (285) han descrito para las dinitroanilinas sustituidas.

El fuerte carácter desacoplante de los nitrofenoles, especialmente de la fosforilación oxidativa y en menor grado de la fotofosforilación fotosintética, han sido ampliamente reconocidos. En relación con la primera se postuló hace tiempo que estos compuestos desacoplan por provocar la hidrólisis de intermediarios altamente energéticos que se establecen entre el proceso de transporte y el de síntesis de ATP; posteriormente --- Weinbach y Garbus (292) han sugerido que los nitrofenoles interactúan con proteínas mitocondriales que participan en el proceso de la fosforilación. Sin embargo, a la luz de la "teoría quimiosmótica" resulta claro que los nitrofenoles y otros desacoplantes actúan al pH ácido que se establece en el espacio intramitochondrial después de iluminar, pasando a una forma protonada y reduciendo el gradiente protónico del medio; por el contrario, su efecto inhibitor del transporte electrónico tiene lugar preferentemente al pH ligeramente alcalino del espacio estromático (191).

El paraquat no presenta efecto alguno a las concentraciones 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ , mientras que a la 10  $\mu\text{M}$  exhibe efectos inhibidores del 40% y 20% de las fotofosforilaciones acíclica y cíclica, respectivamente. No se detecta, por tanto, el efecto ac tivante que los bupiridilos acostumbran a mostrar sobre la fotofosforilación acíclica cuando se opera en condiciones aerobias (284). Con el pirazón no aparecen efectos inhibidores claros hasta una concentración 50  $\mu\text{M}$ , con inhibición de la fotofosforilación acíclica y cíclica, respectivamente, del 47% y -

60%; puesto que el  $I_{50}$  del transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  está a nivel de  $13 \mu M$ , es evidente que este herbicida tiene efectos desacoplantes despreciables.

Muy interesante es el comportamiento del diclobenil. Aunque este herbicida no incide sobre el transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$  a la concentración  $60 \mu M$ , la más alta ensayada, ya a  $1 \mu M$  inhibe el 33% de la fotofosforilación acíclica, pasando a inhibir el 50% y 37%, respectivamente, de los procesos acíclico y cíclico cuando la concentración salta a  $50 \mu M$ . Esto indica que, si bien el diclobenil no parece ser un potente inhibidor de la fotofosforilación, actúa, al igual que la perfluido-na, estrictamente como desacoplante; ello tiene gran importancia, pues solo ella de los herbicidas actualmente en uso ha sido descrita como desacoplante puro, sin ningún tipo de acción sobre el transporte electrónico fotosintético. Hasta el presente la fitotoxicidad del diclobenil se ha vinculado a una acción negativa sobre los procesos de división meristemáticos, y sólo tímidamente se ha mencionado la acción desacoplante que sobre la fotofosforilación oxidativa mitocondrial pueden ejercer algunos hidroxi-derivados catabólicos de este herbicida (293). - Por el contrario, a los p-hidroxibenzonitrilos tipo ioxinil y bromoxinil sí se les reconoce un fuerte efecto inhibidor-desacoplante (232).

Los ácidos fenoxialquil carboxílicos han sido profusamente descritos como inhibidores-desacoplantes de la fosforilación oxidativa mitocondrial, si bien a unas dosis  $10^{-3} M$  tan altas (294) que resulta dudoso puedan tener alguna significación en relación con su comprobada fitotoxicidad sobre el vegetal completo. Mucho más escasas son las referencias sobre su inciden-

cia en la fosforilación fotosintética, con valores también del mismo orden de magnitud; así, Budimir y col. (291) encuentran en cloroplastos de espinaca un valor  $I_{50}$   $1.7 \times 10^{-3}$  M en la inhibición de la fotofosforilación acíclica por 2.4-DB. Nosotros - hemos obtenido valores poco claros, y desde luego podemos afirmar que sólo a nivel 50  $\mu$ M parece empezar a apreciarse un claro efecto inhibitor de la fotofosforilación acíclica por 2.4-DB, y a 100  $\mu$ M por 2.4-D y 2.4-DP. En conexión con esto puede apuntarse que Matlib y col. (295) encuentran un efecto desacoplante más potente del 2.4-DB que el 2.4-D sobre la fosforilación oxidativa testada "in vitro", efecto que se invierte "in vivo" seguramente por dificultades de absorción y/o traslocación del 2.4-DB. Finalmente, el amitrol y dicamba sólo empiezan a manifestar efectos inhibidores de la fotofosforilación acíclica a concentraciones del orden 100  $\mu$ M, por lo que no creemos procedente hacer ningún comentario.

Analizados globalmente y de forma comparativa los herbicidas testados, es el fenmedifam el que aparece con un mayor efecto inhibitor de la fotofosforilación fotosintética considerada en su totalidad, con un  $I_{50}$  de 0.5  $\mu$ M, siguiéndole el cloroxurón con un  $I_{50}$  1  $\mu$ M; el dinoseb exhibe dicha inhibición a la concentración 3  $\mu$ M. Los restantes presentan ya mucha menor efectividad, con valores  $I_{50}$  que se sitúan ya en la cota 50-100  $\mu$ M, y aún mayor.

Las experiencias de fijación de  $CO_2$  por cloroplastos aislados son las que requieren más sutiles procedimientos de preparación de éstos, pues sobre obtener inalteradas las estructuras tilakoidales necesarias para los procesos fotoquímicos, se requiere un alto grado de integridad de las envolturas cloroplásticas, que impida la pérdida de los componentes solubles,

enzimáticos o no, existentes en el contenido estromático, y que son los responsables del proceso de asimilación del  $\text{CO}_2$ . En este contexto los métodos de preparación de cloroplastos han ido mejorándose, y desde las primitivas tasas de fijación equivalentes a  $1.5 \mu\text{M}$  (296) y  $5 \mu\text{M}$  (297) de  $\text{CO}_2$  por mg. de clorofila y por hora, se ha pasado a niveles de  $25 \mu\text{M}$  (298),  $37 \mu\text{M}$  (30) y  $60-100 \mu\text{M}$  (299) por el grupo de Walker, y a los  $50 \mu\text{M}$  por el grupo de Arnon (34), culminándose con las espléndidas preparaciones de Jensen y Bassham (32), obtenidas con espinacas seleccionadas y recién recolectadas; estos cloroplastos previa una preiluminación de 3 minutos, exhiben inmediatamente después tasas de fijación de  $155 \mu\text{moles de CO}_2/\text{mg. de clorofila/hora}$ , lo que equivale a un 63% del nivel de fijación de la hoja, aunque al cabo de 20-30 minutos esa actividad ha disminuído a  $40 \mu\text{moles de CO}_2/\text{mg. de clorofila/hora}$ .

En todos estos casos se adiciona, además de  $\text{CO}_2$  en forma de  $\text{CO}_3\text{H}^-$ , un precursor que actúa como cebador del ciclo de Benson-Calvin, y que unas veces es la ribulosa-1.5-difosfato, sobre el que se fija directamente el  $\text{CO}_2$ , y otras un precursor del mismo, P-glicerato o ribosa-5-P. A la vista de todos estos condicionantes, nosotros hemos utilizado los cloroplastos íntegros "tipo A" preparados según Cockburn y col. (241), los mismos usados anteriormente en las experiencias de transporte electrónico  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  a los que se adicionaba  $^{14}\text{CO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y ribulosa-1.5-P como cebador. Según se comentó anteriormente, el enzima responsable de la fijación del  $\text{CO}_2$ , la carboxi-dismutasa, se activa por iluminación; además, según se dijo, resulta fundamental agregar el activador  $\text{Mg}^{2+}$  con anterioridad al sustrato ribulosa-1.5-P, si se quiere evitar un cambio conformacional que conduce al enzima hacia una forma menos activa.

En estas condiciones nuestros preparados de cloroplastos nos suministraron tasas de fijación de 45-50  $\mu$ moles de  $\text{CO}_2$ /mg. - de clorofila/hora.

Salvo algún efecto directo del herbicida en la compleja secuencia de reacciones que constituye el ciclo reductivo de las pentosas-fosfato —cosa hasta ahora no estudiada en absoluto, y que en algunos aspectos ha sido objeto de análisis en este trabajo—, la incidencia que tienen los herbicidas sobre la tasa de fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$  por cloroplastos aislados es una consecuencia del efecto que estos compuestos tienen en los procesos lumínicos de la fotosíntesis, y que conducen a la formación del ATP y NADPH necesarios para que dicha fijación pueda tener lugar. No debería entonces sorprender — que entre estos dos grupos de parámetros, transporte electrónico fotosintético y fotofosforilación, por un lado, y asimilación de  $\text{CO}_2$ , por otro, exista un paralelismo muy cerrado; — así pues, el análisis de los niveles de fijación de  $\text{CO}_2$  servirá, en cierto modo, de confirmación y síntesis de los resultados hasta ahora discutidos. Sin embargo, puesto que un ritmo normal del ciclo de Benson-Calvin comporta un suministro equilibrado de ATP y NADPH, una alteración de dicho equilibrio — provocada por una diferente incidencia del herbicida sobre el ritmo de transporte electrónico o sobre la fotofosforilación, conducirá a un desajuste del complejo entramado de reacciones del ciclo, lo que se traducirá en una modificación cuanti y — posiblemente cualitativa del cuadro de metabolitos intermedios del mismo.

Finalmente, la determinación de los niveles de  $\text{CO}_2$  asimilado en función de los datos obtenidos en los primeros minutos de reacción, lleva consigo un fuerte componente erróneo debido

a la existencia del "período de inducción", anteriormente comentado, durante el cual el ritmo de fijación de  $\text{CO}_2$  es generalmente menor, y en el que el espectro de intermediarios del ciclo de Benson-Calvin es cuali y cuantitativamente diferente del que ocurre en la situación de equilibrio. Por esta razón, se ha dejado progresar la reacción hasta un período de 12 minutos, tiempo que se ha considerado suficiente para la consecución de un estado de equilibrio, y para que quede absorbida cualquier desviación derivada de dicho período.

Comparando los niveles de inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$  por los distintos herbicidas ensayados, frente a las concentraciones requeridas para inhibir el transporte electrónico y la fotofosforilación fotosintética, nos encontramos algunas veces con el predominio del componente mínimo, es decir, que la concentración necesaria para inhibir la fijación de  $\text{CO}_2$  en un determinado nivel es la más baja que inhibe ese mismo nivel, bien del transporte electrónico, bien de la fotofosforilación. Sin embargo, lo más frecuente es la existencia de un efecto de potenciación de ambos niveles de inhibición, de tal forma que la concentración de herbicida que produce un 50% de inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$  es bastante mas baja que las que producen ese mismo efecto sobre el transporte electrónico y/o la fotofosforilación. El caso más evidente de esto último es el fenmedifam, con un  $I_{50}$  de fijación de  $\text{CO}_2$  a  $0.05 \mu\text{M}$ , -- frente a un  $I_{50}$   $0.3 \mu\text{M}$  en el transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  y  $0.5 \mu\text{M}$  de la fotofosforilación total; lo mismo ocurre con la simazina, paraquat, dinoseb y, en menor grado, con el 2.4-DB, según puede apreciarse en los valores de estos tres parámetros recogidos en la Tabla VII. Con el cloroxurón y pirazón parece mas bien manifestarse el efecto del factor en mínimo, localizado



en ambos en una mayor susceptibilidad del transporte electrónico a la acción del herbicida. En el caso del amitrol y 2.4-DP, la ligera inhibición que a altas concentraciones exhiben sobre la fijación de  $\text{CO}_2$  no se correlaciona con una inhibición paralela del transporte electrónico o de la fotofosforilación, que o no existe o aun más bien se manifiesta como activación; de todas formas, el 2.4-DP parece manifestar también a menores concentraciones un efecto activador de la asimilación de carbónico. El 2.4-D no presenta prácticamente acción alguna sobre la fijación de  $\text{CO}_2$  en el rango de concentraciones utilizadas, coincidiendo con un efecto nulo también sobre el transporte  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$  y fotofosforilación; finalmente, dicamba y diclobenil manifiestan una activación del 30% a la concentración 10 y 50  $\mu\text{M}$ , lo que contrasta en este último con su  $\text{I}_{50}$  75  $\mu\text{M}$  sobre la fotofosforilación neta.

Comparando entre sí los niveles brutos de inhibición de la asimilación de  $\text{CO}_2$  aparece de nuevo el fenmedifam como el más activo, con un  $\text{I}_{50}$  0.05  $\mu\text{M}$ , seguido del cloroxurón, dinoseb, simazina y paraquat, con valores  $\text{I}_{50}$  a nivel de 0.3-0.5  $\mu\text{M}$ , 0.75  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 1.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Mucho menos activos son el pirazón y 2.4-DB, con valores  $\text{I}_{50}$  respectivos de 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ; el amitrol, con un  $\text{I}_{50}$  100  $\mu\text{M}$ , y el 2.4-DP, con un  $\text{I}_{30}$  100  $\mu\text{M}$ , presentan una inhibición mínima. Los restantes, o no inhiben, caso del 2.4-D, o activan, como el diclobenil y dicamba, que exhiben un valor  $\text{A}_{30}$  a 50  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

La determinación de los niveles de intermediarios del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato se ha venido efectuando hasta hace pocos años —y aún algunos así lo hacen— mediante separación cromatográfica en papel, mono o bidimensional según

el grado de resolución que se desee, de los extractos de cloroplastos sometidos a incubación con  $^{14}\text{CO}_2$ , seguido de conteo en un centelleador del  $^{14}\text{C}$  incorporado a las distintas entidades moleculares separadas. La técnica cromatográfica en papel adolece, sin embargo, de dos grandes inconvenientes: falta de suficiente resolución para unas separaciones tan sutiles, y gran duración del desarrollo. Por eso, el papel ha sido sustituido en la actualidad por un soporte de polvo microcristalino de celulosa, extendido en capas de unas décimas de mm. de espesor sobre una base de vidrio, metálica o material plástico, efectuándose la separación bien por cromatografía bidimensional (300), bien por acoplamiento electroforesis-cromatografía (249); la localización de los componentes separados se efectúa por autorradiografía, y su cuantificación por conteo en un centelleador líquido del  $^{14}\text{C}$  incorporado. Una determinación de los niveles de intermediarios puede efectuarse, sin necesidad de utilizar material marcado, mediante técnicas enzimáticas de dosificación específica de cada componente (301); es una técnica larga, problemática en sus resultados, y adolece de no dar una visión panorámica del cuadro de intermediarios.

No son excesivas las publicaciones que dan un cuadro completo de los niveles de intermediarios que se manifiestan en una situación de equilibrio, cuando un preparado de cloroplastos se incuba en presencia de  $^{14}\text{CO}_2$  bajo iluminación. Por otra parte, estos resultados presentan una gran variabilidad derivada del estado en que se encuentren los cloroplastos utilizados, a veces contaminados con restos de células completas, mitocondrias, etc., que provocan reacciones colaterales que desfigurán la situación real, otras veces con un gran porcentaje de cloroplastos rotos, perdiéndose en el medio la mayor parte -

de los componentes solubles. Como ejemplo de ésto exponemos en la Tabla XI los resultados obtenidos por nosotros, junto con los encontrados hace tiempo por el grupo de Calvin (302), utilizando la anticuada técnica en papel, con cloroplastos de espinaca obtenidos por doble centrifugación y, por tanto, con una presumible gran proporción de ellos rotos; al lado se indican también los valores obtenidos por Larsson y Albertsson (303) - utilizando la misma técnica de separación usada por nosotros, pero empleando cloroplastos íntegros, no contaminados, obtenidos a partir de cotiledones de espinaca por distribución en contracorriente. Destaca la fuerte diferencia en el nivel de triosas-P entre los valores obtenidos por el grupo sueco y los nuestros, y que nos hace pensar en una distinta funcionalidad de -- los cloroplastos de cotiledones y hojas, con distinta capacidad de transporte electrónico y, por tanto, de síntesis de NADPH necesario para la reducción del P-glicerato a triosas-P. Tenemos aquí que indicar que el grado de resolución de la técnica es mayor que el que se deduce de los resultados expuestos, ya que -- dentro del grupo de las hexosas-P se incluyen la glucosa-6-P, - glucosa-1-P y fructosa-6-P, todas ellas perfectamente separadas por este procedimiento; por otro lado, dentro del grupo de las hexosas-difosfato, fundamentalmente fructosa-1.6-P, se incluye la mínima cantidad que se detecta de ribulosa-1.5-P y sedoheptu losa-1.7-P, también perfectamente separables. En ambos casos la agrupación se hace por razones de funcionalidad con vistas a la comparación de los escasos datos dados por la bibliografía.

Efectivamente, la interpretación de las modificaciones que, a consecuencia del tratamiento por herbicidas, ocurren en el espectro de productos de asimilación del  $^{14}\text{CO}_2$  por cloroplastos - aislados es muy compleja, dada la heterogeneidad de reacciones

TABLA XI

% de <sup>14</sup>C incorporado en los distintos productos de asimilación  
de CO<sub>2</sub> en relación al total marcado

| <u>Compuesto</u>       | <u>Nosotros</u> | <u>Según(303)</u> | <u>Según(302)</u> |
|------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Uridín-difosfo-glucosa | -               | -                 | 4,9               |
| Hexosas-2P             | 3,0             | 4,0               | 3,4               |
| Hexosas-P              | 7,5             | 20,6              | 46                |
| Ribosa-5P              | 2,0             |                   |                   |
| Triosas-P              | 47              |                   |                   |
| P-glicerato            | 32              | 43                | 17                |
| P-enolpiruvato         | 0,5             | -                 | -                 |
| Aminoácidos            | 1,0             | 1,4               | 14                |
| Disacáridos            | 0,9             | 0,7               | -                 |
| Glicerato              | 4,0             | -                 | -                 |
| Malato                 | 0,1             | -                 | 4,0               |
| Glicolato              | 1,0             | 4,0               | -                 |
| P-glicolato            | -               | 0,1               | -                 |
| Azúcares libres        | -               | -                 | 3,2               |
| Otros ácidos           | -               | -                 | 7,0               |
| Almidón                | -               | 1,4               | -                 |
| No identificados       | 1,0             | 4,3               | -                 |

colaterales que pueden tener lugar aún en los pocos minutos - en que se mantiene el proceso de asimilación. Por otro lado, son prácticamente nulos los casos en que se ha hecho uso de esta matización en estudios con herbicidas en cloroplastos -- aislados, y aún en estos casos se han empleado técnicas de es casa resolución con lo que los resultados obtenidos son difícilmente asimilables a los nuestros.

En general, los herbicidas que tienen un poder inhibitor con incidencia más acentuada en el proceso de transporte  $H_2O \rightarrow NADP^+$  que en la fotofosforilación, actúan inhibiendo selectivamente el proceso NADPH-dependiente de tránsito del P-glicerato a triosas-P, con acúmulo del primero y productos de su - metabolismo, y disminución porcentual del segundo y sus derivados en la secuencia metabólica del ciclo de Calvin; en esta situación el ATP en exceso se utiliza en el paso de ribulosa-5-P a ribulosa-1.5-P, con lo que se acentúa la acumulación a nivel de P-glicerato. En los casos en que la inhibición afecta por igual a la síntesis de NADPH y ATP, el desequilibrio - anterior entre los niveles de P-glicerato y triosas-P ya no - es, sobre una base porcentual, tan manifiesto, viniendo la mo dificación del cuadro de metabolitos dirigida por otros facto res.

En el primer caso hay que situar al fenmedifam y al cloro-xurón, en ambos casos con un porcentaje del 36% de triosas-P marcadas, frente a un 47% en el testigo; con el fenmedifam el P-glicerato salta del 32% al 47%, y su producto de metabolismo P-enolpiruvato, del 0.5% al 4%, mientras que con el cloro-xurón ambos compuestos representan, respectivamente, el 39% - y 3%. Con este último herbicida -e igual ocurre con otros más- hay un incremento del nivel de disacáridos, que pasan del 0.9%

en el testigo al 3%, lo que constituye algo difícil de comprender. Aunque algunos autores (303) detectan sacarosa marcada - entre los productos de asimilación fotosintética del  $^{14}\text{CO}_2$  -- por cloroplastos aislados, la mayoría no lo hacen (302, 304), lo que parece lógico sobre la base de que la síntesis de sacarosa no tiene lugar en el cloroplasto, sino en el citoplasma del tejido foliar (305); mas bien parece lógico identificar - este compuesto como un intermediario de la síntesis de almidón, cosa difícil de comprender dado el carácter inhibitor que sobre la síntesis global de azúcares presentan estos herbicidas. Una disminución, muy generalizada entre todos los herbicidas ensayados, del porcentaje de glicerato, habrá que achacarlo a una inhibición inespecífica de una P-glicerato fosfatasa. Finalmente, el aumento del malato que en algunos casos se observa hay que vincularlo a una carboxilación del P-enolpiruvato, que en estos casos se encuentra también siempre aumentado.

En presencia de simazina y pirazón hay un fuerte descenso en el porcentaje de triosas-P -de 47% en el testigo al -19%-, que sin embargo no se traduce en un aumento paralelo de P-glicerato, por diversificarse a partir de él una serie de vías colaterales con un aumento porcentual de P-enolpiruvato, aminoácidos y, en el caso de la simazina, otros compuestos cuya naturaleza ha quedado sin dilucidar. Que las triazinas disminuyen el contenido global de azúcares no sólo se debe a su función inhibitoria de la actividad fotosintética, sino también a una degradación de los mismos con vistas a suministrar el esqueleto hidrocarbonado necesario para la intensa síntesis de aminoácidos que estos herbicidas inducen (306). - El incremento de los porcentajes de hexosas-mono y -difosfatos podría también contribuir al brusco descenso de las triosas-P;

su explicación no es fácil, como no sea por una activación específica de la actividad aldolásica. Trabajando con plántulas de *Pinus nigra*, Shaukat (307) encuentra que la fijación de  $^{14}\text{CO}_2$  en presencia de simazina da un cuadro de intermediarios que, aunque exhiben menores niveles de  $^{14}\text{C}$  incorporado en términos absolutos, mantienen respecto al testigo el mismo porcentaje de radioactividad; no obstante, los intermediarios reseñados aparecen reunidos en grandes grupos, dada la poca resolución de la cromatografía monodimensional en papel utilizada en su separación.

El dinoseb pertenece al grupo de herbicidas que inciden al mismo nivel sobre el transporte electrónico y fotofosforilación, con un  $I_{50}$  entre 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ; en consecuencia, no se observa una especial actividad inhibitoria en el tránsito P-glicerato  $\rightarrow$  triosa-P, como se vé en los porcentajes de ambos metabolitos. Un porcentaje doble en los niveles de hexosas-difosfato podría explicarse, como antes, por un incremento de la actividad aldolásica. En cualquier caso, debería esperarse un mayor desequilibrio en el cuadro de intermediarios, especialmente en relación con el tránsito ribulosa-5-P  $\rightarrow$  ribulosa-1.5-P, muy sensible a un déficit de ATP; utilizando fosfón-D, una sal clorofenilada de fosfonio con acción desacoplante sobre la fosforilación, Lenzian y col. (308) encuentran una disminución de  $^{14}\text{C}$  incorporado a la ribulosa-1.5-P en experiencias de asimilación de  $^{14}\text{CO}_2$  en cloroplastos reconstituídos de espinaca.

Un caso sorprendente es el del paraquat. Puesto que este herbicida inhibe la síntesis de NADPH, afectando poco la actividad fotofosforilante, su punto básico de actuación debería esperarse, como en los otros casos comentados, en la reducción del P-glicerato a triosas-P. Por el contrario, el nivel de trios

triosas-P aparece aumentado al 58% de la radioactividad incorporada, y el de P-glicerato disminuído al 18%. En realidad, el efecto inhibitor que sobre la fijación de  $\text{CO}_2$  ejercen el paraquat y otros reactivos de Mehler se debe, no sólo al déficit inducido de NADPH, sino también a la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (309); esta inhibición es, al menos parcialmente, revertida en presencia de ribosa-5-P, lo que ha llevado a Allen (310) a deducir que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con algún intermediario del ciclo de Calvin, o inhibe algún sistema enzimático, en la zona comprendida entre las triosas-P y la ribosa-5-P. Heldt indica que los pasos del ciclo de Calvin mas sensibles al  $\text{H}_2\text{O}_2$  son los catalizados por la fructosa-1,6-difosfatasa y sedoheptulosa-1,7-difosfatasa (311).

El 2,4-D no produce una inhibición del  $^{14}\text{CO}_2$  neto asimilado, pero sin embargo distorsiona el cuadro de metabolitos marcados. El esquema que se obtiene con una concentración 100  $\mu\text{M}$  es muy parecido al inducido por simazina y pirazón, con una fuerte disminución del porcentaje de triosas-P, y un aumento del de P-enolpiruvato y, sobre todo, aminoácidos. Este fenómeno no cabe ahora achacarlo a un defecto en la síntesis de NADPH, y cabe sólo interpretarlo como una intensa desviación metabólica a nivel del P-glicerato hacia la síntesis de aminoácidos y proteínas, consecuencia del carácter auxínico de este herbicida. El aumento del porcentaje de malato en los tratamientos con 2,4-D ya había sido descrito con anterioridad en experiencias con plantas completas, aunque en esas circunstancias se achaca a una inhibición de la oxidación de este sustrato en el ciclo de Krebs (312); puesto que los cloroplastos no tienen actividad respiratoria, su origen debe estar en la línea antes indicada para el cloroxurón, en un aumento de la actividad P-enolpiruvato carboxilasa.



Con los restantes herbicidas las modificaciones porcentuales de los intermediarios son poco relevantes. El aumento que en algunos casos —diclobenil, 2.4-DB, así como con el dinoseb— se observa en el porcentaje de glicolato hay que vincularlo a un incremento de la actividad oxigenásica del enzima carboxilante.

No existen prácticamente referencias bibliográficas en que se testen "in vitro" los distintos sistemas enzimáticos implicados en el ciclo de Benson-Calvin en relación a su posible activación o inhibición por herbicidas. Esto es una consecuencia del marcado efecto que la mayoría de los herbicidas utilizados ejercen sobre los procesos fotoquímicos de transporte electrónico y fosforilación, lo que a su vez deriva de la mayor sutileza de las reacciones en sí, y de su alta dependencia topográfica, cuando se las compara con la falta de localización —tienen lugar en solución, en el comparativamente enorme espacio estromático— y carácter genérico de las reacciones del ciclo de fijación del  $\text{CO}_2$ . Sólo recientemente, y a causa de la no existencia de herbicidas que exhiban una acción tóxica selectiva sobre malas hierbas del tipo  $\text{C}_4$ , se han iniciado trabajos conducentes al desarrollo de estructuras que inhiban selectivamente procesos enzimáticos esenciales de las plantas  $\text{C}_4$ : P-enol piruvato carboxilasa, enzima málico, piruvato diquinasa (313).

De la compleja gama de reacciones que constituyen el ciclo de Benson-Calvin, nosotros hemos seleccionado la ribulosa-1.5-P carboxilasa y la fructosa-1.6-difosfatasa que, como se comentó con anterioridad, constituyen los dos sistemas enzimáticos clave del ciclo. Para ello se han utilizado preparados completamente puros, homogéneos a la electroforesis en

acrilamida de ambas enzimas de cloroplastos de espinaca. La carboxilasa mostró una actividad específica de 1.8'  $\mu$ moles de  $\text{CO}_2$  fijado/mg. de proteína/min., valor del mismo orden que los 1.3  $\mu$ moles del preparado de Buchānan y Schürmann (136) y los 1.4  $\mu$ móles de Paulsen y Lane (314); por su parte la ---- FDPasa tenía una actividad específica de 40  $\mu$ moles de Pi liberado/mg. de proteína/min., frente a los 24  $\mu$ moles de Buchanan y col. (258) y los 100  $\mu$ moles de Lázaro y col. (141) y Zimmermann y col. (139).

De todos los herbicidas analizados el dinoseb es el único que presenta un efecto claro, constante entre las concentraciones 10 y 100  $\mu\text{M}$ , sobre la ribulosa-1.5-P carboxilasa, con una inhibición oscilando alrededor del 25%. Evidentemente esta acción es de menor grado, y queda minimizada cuando se la compara con los efectos negativos que este herbicida produce sobre el transporte electrónico y la fotofosforilación fotosintética, con un  $I_{50}$  3  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, y como se ha discutido antes, el 50% de inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$  tiene lugar a una concentración mas baja, aproximadamente 0.75  $\mu\text{M}$ , por lo que es presumible la incidencia de otros factores ajenos a los puramente fotoquímicos, entre los que podría encontrarse una acción directa sobre el enzima carboxilante. Un efecto inhibidor menor, y sólo a concentraciones próximas a 100  $\mu\text{M}$ , presenta el dicamba, por lo que no merece la pena su discusión. Análogamente, una acción activadora entre el 15 y el 30% a estas altas concentraciones la muestran el fenmedifam, amitrol, diclobenil, 2.4-DB y 2.4-DP, por lo que su interés es muy escaso; mas relevante sea quizás la activación entre el 10 y 30% que la simazina y pirazón ejercen a concentración 10  $\mu\text{M}$  que, por el contrario, desaparece al aumentar ésta. Finalmente, paraquat y diclobenil se han mos-

trado totalmente inefectivos entre los límites utilizados.

Aunque en algunos trabajos se analiza el efecto que algunos compuestos ejercen sobre la cantidad neta de  $\text{CO}_2$  asimilado y la actividad carboxi-dismutásica de plantas completas (315, 316), la existencia de factores de absorción, traslocación, -- etc., los hace difícilmente comparables con nuestros datos. En un reciente trabajo Weidner y Burchartz (317) estudian el efecto inhibitor que una serie de herbicidas, y formulados comerciales preparados con ellos, ejercen sobre la ribulosa-1.5-P carboxilasa y otras actividades enzimáticas en extractos crudos - de plántulas de maíz, y encuentran que ni el amitrol, simazina, diclobenil, los carbamatos clorprofam y barbán, y otros herbicidas más, ejercen efecto inhibitor alguno sobre los enzimas - ensayados a concentración de 100 ppm (entre 200 y 500  $\mu\text{moles}$ , - según el herbicida); estos resultados, aunque obtenidos con extractos crudos, están totalmente de acuerdo con los nuestros.

Algo mas sensible a la acción de estos herbicidas se muestra la fructosa-1.6-difosfatasa. También ahora el dinoseb parece ser el de mayor efecto inhibitor, con un  $I_{50}$  a la concentración 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la simazina, fenmedifam, pirazón, dicamba, paraquat, 2.4-DB y 2.4-DP, muestran dicha inhibición a 100  $\mu\text{M}$ ; la capacidad inhibitor del cloroxurón se encuentra ya por debajo de la de éstos, mientras que el amitrol, diclobenil y 2.4-D no ejercen efecto alguno. No hemos encontrado en la bibliografía referencia alguna, ni operando con extractos crudos ni con preparados enzimáticos purificados, que permita chequear nuestros resultados. Aunque a primera vista puede resultar sugestivo correlacionar los datos de inhibición-activación de - ambas actividades enzimáticas con los correspondientes a los -

niveles de  $\text{CO}_2$  asimilado, resulta evidente que con la mayor parte de los herbicidas las concentraciones que se muestran efectivas sobre éstos son mucho menores que las operativas sobre aquéllas, lo que demuestra el carácter marginal que, - en relación con la inhibición de la fotosíntesis, tienen los efectos sobre estos enzimas del ciclo de Calvin. Para aquellos otros herbicidas que inhiben la asimilación de  $\text{CO}_2$  a -- concentraciones del mismo orden que las efectivas sobre estos enzimas, puede resultar sorprendente que una acción activadora sobre la carboxilasa coincida con una depresión de la asimilación de  $\text{CO}_2$ ; sin embargo, no debemos olvidar que ello ocurre a concentraciones tales que la incidencia de efectos secundarios, totalmente incontrolables, es siempre probable.

1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

CONCLUSIONES





- 1.- Analizados comparativamente los herbicidas tratados en relación con el transporte electrónico  $H_2O \rightarrow NADP^+$ , fenmedifam y cloxurón muestran un  $I_{50}$  a  $0.3 \mu M$ , con una mayor efectividad del fenmedifam, que a  $0.8 \mu M$  produce una inhibición total del proceso. Simazina, paraquat y dinoseb exhiben un  $I_{50}$  a concentraciones entre 1 y  $10 \mu M$ , siendo de  $13 \mu M$  el correspondiente al pirazón. Los restantes herbicidas tratados —amitrol, diclobenil, disamba, 2,4-D, 2,4-DB y 2,4-DP— no muestran acción inhibitoria evidente, e incluso exhiben un ligero efecto activador en la gama de concentraciones utilizadas.
  
- 2.- En relación con el transporte electrónico  $H_2O \rightarrow$  ferricianuro se observan resultados paralelos a los anteriores, con la excepción del paraquat, que apenas muestra inhibición a la máxima concentración empleada; por el contrario, el análisis del transporte electrónico ascorbato/DPIP  $\rightarrow NADP^+$  reveló un  $I_{50}$  a  $15 \mu M$  para el paraquat, mientras que con los demás herbicidas la inhibición se minimiza aún a las mayores concentraciones ensayadas. De ello se concluye que el paraquat es el único herbicida de entre los estudiados que actúa a nivel del Fotosistema I, mientras que el fenmedifam, cloxurón, simazina, dinoseb y pirazón lo hacen a nivel del Fotosistema II.



- 3.- Considerados globalmente, de todos los herbicidas ensayados el fenmedifam es el que muestra un mayor efecto inhibitor de la fotofosforilación, con un  $I_{50}$  a  $0.5 \mu\text{M}$ , seguido del cloroxurón y dinoseb, con valores 1 y  $3 \mu\text{M}$ , respectivamente; los restantes tienen un efecto inhibitor mas reducido, o carecen totalmente de él. Fenmedifam y dinoseb inhiben tanto el proceso cíclico como acíclico de síntesis de ATP, teniendo categoría de inhibidores-desacoplantes; el cloroxurón a bajas concentraciones se comporta como inhibidor puro, sin incidir sobre la síntesis cíclica, mientras que a mayores concentraciones manifiesta un efecto adicional desacoplante.
- 4.- El diclobenil carece de una fuerte acción inhibitora de la fotofosforilación; sin embargo, exhibe características de desacoplante puro, comportamiento hasta ahora sólo reconocido a la perfluidona entre los herbicidas en uso.
- 5.- Respecto a la capacidad de asimilación de  $\text{CO}_2$ , el fenmedifam es el único herbicida ensayado que muestra un  $I_{50}$  inferior a  $0.1 \mu\text{M}$ , estando entre  $0.1$  y  $1 \mu\text{M}$  los del cloroxurón, simazina y dinoseb; el del paraquat es  $1.5 \mu\text{M}$ , de  $10 \mu\text{M}$  el del pirazón, y a nivel de  $50$  y  $100 \mu\text{M}$  los del 2,4-DB y amitrol. El dicamba presenta un ligero efecto activante de la fijación de  $\text{CO}_2$ .
- 6.- En presencia de fenmedifam, cloroxurón, simazina, pirazón y 2,4-D, la razón triosas-P/P-glicerato, superior a 1 en el testigo, se hace inferior a la unidad, lo que indica una inhibición del paso de P-glicerato a triosas-P, debi-

do fundamentalmente a un defecto en la síntesis de NADPH. Sorprendentemente el paraquat no provoca esta inversión, aumentando incluso dicho cociente, lo que podría explicarse por un efecto inhibitor del  $H_2O_2$  formado en la reacción de Mehler, en la secuencia de reacción que parte de las triosas-P.

- 7.- De los herbicidas ensayados sólo el dinoseb muestra un pequeño efecto inhibitor de la ribulosa-1,5-P carboxilasa y fructosa-1,6-difosfatasa a concentraciones medias; esto podría contribuir al mayor efecto inhibitor que, en relación al transporte electrónico y fotofosforilación, presenta este herbicida sobre la asimilación de  $CO_2$ .



BIBLIOGRAFIA



#### BIBLIOGRAFIA

1. HELDT, H.W. y RAPLEY, L. 1970. Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate, dihydroxyacetone--phosphate, and dicarboxilats across the inner membrane of spinach chloroplasts. FEBS Lett., 10, 143.
2. MENKE, V. 1962. Structure and chemistry of plastids. Ann. -- Rev. Plant Physiol., 13, 27.
3. MÜHLETHALER, K. 1971. The ultrastructure of plastids, "Structure and functions of Chloroplasts" (M. Gibbs, Ed., - Springer-Verlag, Berlin), 7.
4. WEHRMEYER, W. 1964. Zur klärung der strukturellen variabilität der chloroplastengrana des spinats in Profil und Aufsicht. Planta, 62, 272.
5. VAN WYK, D. 1966. Mitteilungen über lamellare Strukturproteide. VI.- Über die Kohlenhydrate im löslichen Strukturproteide von Antirrhinum magis und Spinacia oleracea. Z. Naturforsch., 21B, 700.
6. MACKENDER, R.O. y LEECH, R.M. 1974. The galactolipid, phospholipid and fatty acid composition of the chloroplast envelope membranes of Vicia faba L., Plant Physiol., 53, -- 496.

7. MURAKAMI, S. y PACKER, L. 1970. Light-induced changes in the conformation and configuration of the tilakoid membrane of *Ulva* and *Porphyra* chloroplast in vivo. *Plant -- Physiol.*, 45, 289.
8. ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A. y CRANE, F.N. 1969. Comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques, and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from - digitonin-treated spinach chloroplasts. *J. Cell Biol.*, 43, 16.
9. COOMBS, J. y GREENWOOD, A.D. 1976. Compartmentation of the Photosynthetic apparatus. "The intact chloroplast" (J. Barber, Ed.; Elsevier, Amsterdam), 1.
10. KOPP, F. 1972. Membrane structure: Localization of membrane lipids in the plasmalemma of yeast. *Cytobiologie*, 6, 287.
11. ARNTZEN, CH.J. y BRIANTAIS, J.M. 1975. Chloroplast structure and function. "Bioenergetics of Photosynthesis" (Govindjee, Ed., Academic Press, London), 51.
12. EMERSON, R. y ARNOLD, W.S. 1932. The photochemical reaction in Photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, 16, 191.
13. HAUSKA, G.A. y SANE, P.V. 1972. The distribution of photosynthetic reactions in the chloroplast lamellar system. II. Latent ATPase, proton pump, cyclic phosphorylation and its sensitivity towards ammonia. *Z. Naturforsch.*, 27B, 938.
14. PARK, R.B. y SANE, P.V. 1971. Distribution of function and structure in chloroplast lamellas. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22, 395.

15. SANE, P.V., GOODCHILD, D.J. y PARK, R.B. 1970. Characterization of chloroplast Photosystems 1 and 2 separated by a nondetergent method. B.B.A., 216, 162.
16. KAWASHIMA, N. y WILDMAN, S.G. 1970, Fraction I protein, Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 325.
17. LICHTENTHALER, H.K. 1969. Plastoglobuli of spinach: their size, isolation, and lipoquinone composition. Protoplasma, 68, 65.
18. BLAIR, G.E. y ELLIS, R.J. 1973. Protein synthesis in chloroplasts. I.-Light driven-synthesis of the large subunit of Fraction I protein by isolated pea chloroplasts. - B.B.A., 319, 223.
19. CAVALIER-SMITH, T. 1975, The origin of nuclei and of eukariotic cells. Nature, 256, 463.
20. RAVEN, P.H. 1970. A multiple origin for plastids and mitochondria. Science, 169, 641.
21. BISULPUTRA, T. 1974. In "Algal Physiology and Biochemistry" (W.D. Stewart Ed., Blackwell, Oxford), 124.
22. ANDERSON, J.M., GOODCHILD, D.J. y BOARDMAN, N.K. 1973. Composition of the Photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants, B.B.A., 325, 573.
23. LAETSCH, W.M. 1974, The C<sub>4</sub> syndrome: a structural analysis, Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 27.
24. KAHN, A., BOARDMAN, N.K. y THORNE, S.W. 1970, Energy transfer between protochlorophyllide molecules; evidence for multiple chromophors in the photoactive protochlorophyllide-protein complex in vivo and in vitro. J. Mol. Biol., 48, 85.



25. TREFFRY, T. 1970. Phytylation of chlorophyllide and prolamellar body transformation in etiolated peas. *Planta* -- (Berl.), 91, 279.
26. WHATLEY, F.R., GREGORY, P., HASLETT, B.G. y BRADBEER, J.W. 1972. Development of electron transport intermediates in greening chloroplasts. Proc. 2nd. Inform. Congr. - Photosynthesis (G. Forti, M. Avron, A. Melandri, Eds., Dr. Junk, La Haya), vol. III, 2375.
27. HEBER, U., BOARDMAN, N.K. y ANDERSON, J.M. 1976, Cytochrome b-563 redox changes in intact CO<sub>2</sub>-fixing spinach chloroplasts and in developing pea chloroplasts. *B.B.A.*, 423, 275.
28. JACOBI, G. y LEHMANN, H. 1968. Fragmentation of isolated chloroplasts. I.- Functional and structural characterization of fragments from sonicated chloroplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, 59, 457.
29. STOCKING, C.R. 1959. Chloroplasts isolation in non-aqueous media. *Plant Physiol.*, 34, 56.
30. WALKER, D.A. 1965. Correlation between photosynthetic activity and membrane integrity in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.*, 40, 1157.
31. ARNON, D.I., ALLEN, M.B. y WHATLEY, F.R. 1956. Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *B.B.A.*, 20, 449.
32. JENSEN, P.G. y BASSHAM, J.A. 1966. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, -- 1095.

33. NOBEL, P.S. 1967. A rapid technique for isolating chloroplasts with high rates of endogenous photophosphorylation. *Plant Physiol.*, 42, 1389.
34. KALBERER, P.P., BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I, 1967. Rates of photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57, 1542.
35. HALL, D.G. 1972. Nomenclature of isolated chloroplasts. *Nature*, 235, 125.
36. BOARDMAN, N.K. y THORNE, S.W. 1969. Fluorescence properties of fragments from sonicated spinach chloroplasts. *B.B.A.*, 189, 294.
37. BOARDMAN, N.K. y ANDERSON, J.M, 1964. Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll a and chlorophyll b and their possible role in the light reactions of photosynthesis. *Nature*, 203, 166.
38. VERNON, L.P. y SHAW, E.R. 1971. Subchloroplast fragments: - Triton X-100 method. *Methods in Enzymol.*, 23A, 277.
39. JACOBI, G. 1977. Subchloroplast preparations. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), 543.
40. KNAFF, D.B. 1973. Contrasting effects of plastocyanin in the photoreduction and photooxidation of cytochrome f in chloroplasts. *B.B.A.*, 292, 186.
41. BLACK, C.C. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO<sub>2</sub> uptake, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 253.

42. JUNGE, W. 1977. Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation in Photosynthesis of green plants. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), 59.
43. EMERSON, R. 1957. Dependence of yield of Photosynthesis in longwave red on wave length and intensity of supplementary light. *Science*, 125, 746.
44. CLAYTON, R.K. 1966. Spectroscopic analysis of bacterio-chlorophylls in vitro and in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 5, 669.
45. KNOX, R.S. 1975. Excitation energy transfer and migration: theoretical considerations. "Bioenergetics of Photosynthesis" (Govindjee Ed., Academic Press, London), 183.
46. FÖRSTER, T. 1947. Theory of photosynthesis. *Z. Naturforsch.*, 2B, 174.
47. BORISOV, A.Y. e IL'INA, M.D. 1973. The fluorescence lifetime and energy migration mechanism in Photosystem I of plants. *B.B.A.*, 305, 364.
48. MURATE, N. 1969. Control of excitation transfer in Photosynthesis. II.- Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment system in spinach chloroplasts. *B.B.A.*, 189, 171.
49. THORNER, J.P. 1975. Chlorophyll-proteins: Light harvesting-reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 127.

50. GRIFFITHS, M., SISTROM, W.R., COHEN-BAZIRE, G. y STANIER, R.Y. 1955. Function of carotenoids in Photosynthesis. *Nature*, 176, 1211.
51. CLAYTON, R.K. 1969. Characteristics of prompt and delayed fluorescence from spinach chloroplasts. *Biophys. J.*, 9, 60.
52. JUNGE, W. y ECKHOF, A. 1974. Photosynthesis studies on the orientation of chlorophyll  $a_1$  in the functional membrane of Photosynthesis. *B.B.A.*, 357, 103.
53. NORRIS, J.R., UPHANS, R.A., CRESPI, H.L. y KATZ, J.J. 1971. Electron spin resonance of chlorophyll and the origin of signal I in Photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 625.
54. HAEHNEL, W. 1976. The ratio of the two light reactions and their coupling in chloroplasts. *B.B.A.*, 423, 499.
55. AVRON, M. y SHNEYOUR, A. 1971. On the site of action of plastocyanin in isolated chloroplasts. *B.B.A.*, 226, 498.
56. DÖRING, G., RENGGER, G., VATER, J. y WITT, H.T. 1969. Properties of the photoactive chlorophyll- $a_{11}$  in Photosynthesis. *Z. Naturforsch.*, 24B, 1139.
57. VAN GORKOM, H.S. y DONZE, M. 1973. Charge accumulation in the reaction center of Photosystem II. *Photochem. Photobiol.* 17, 333.
58. HILL, R. y BENDALL, F. 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature*, 186, 136.
59. LOSADA, M., WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. 1961. Separation of two light reactions in noncyclic photophosphorylation of green plants. *Nature*, 190, 606.

60. GOVINDJEE, R., GOVINDJEE, B. y HOCK, G. 1964. Emerson Enhancement effect in Chloroplasts Reactions. *Plant Physiol.*, 39, 10.
61. ARNON, D.I., KNAFF, D.B., McSWAIN, B.D., CHAIN, R.K. y TSUJIMOTO, H.Y. 1971. Three light reactions and the two photosystems of plant Photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 14, 397.
62. IZAWA, S., HEATH, R.L. y HIND, G. 1969. The role of chloride ion in Photosynthesis. III.- The effect of artificial electron donors upon electron transport. *B.B.A.*, 180, 388.
63. BLANKENSHIP, R.E., BABCOCK, G.T. y SAUER, K. 1975. Kinetic study of oxygen evolution parameters in Tris-washed, reactivated chloroplasts. *B.B.A.*, 387, 165.
64. KOK, B., FORBUSH, B. y McGLOIN, M. 1970. Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I.- A linear four-step mechanism. *Photochem. Photobiol.*, 11, 457.
65. BOUGES-BOCQUET, B. 1973. Limiting steps in Photosystem II - and water decomposition in *Chlorella* and spinach chloroplasts. *B.B.A.*, 292, 772.
66. RENGER, G. 1977. A model for the molecular mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *FEBS Lett.*, 81, 223.
67. ERIXON, K. y BUTLER, W.L. 1971. Light-induced absorbance changes in chloroplasts at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Photochem. Photobiol.*, 14, 427.
68. PORTER, G. 1978. In vitro model for Photosynthesis. *Proc. Roy. Soc. London A*, 362, 281.

69. BÖHME, H. y CRAMER, W.A. 1971. Plastoquinone mediates electron transport between cytochrome b-559 and cytochrome f in spinach chloroplasts. FEBS Lett., 15, 349.
70. BUTLER, W.L. 1966. Fluorescence yield in photosynthetic systems and its relation to electron transport. Current Topics Bioenerg., 1, 49.
71. STIEHL, H.H. y WITT, H.T. 1969. Quantitative treatment of the function of plastoquinone in Photosynthesis. Z. Naturforsch., 24B, 1588.
72. VAN GORKOM, H.J. 1974. Identification of the reduced primary electron acceptor of Photosystem II as a bound semiquinone anion. B.B.A., 347, 439.
73. FORBUSH, B. y KOK, B. 1968. Reaction between primary and secondary electron acceptors of Photosystem II of Photosynthesis. B.B.A., 162, 243.
74. MARSHO, T.V. y KOK, B. 1970. Interaction between electron transport components in chloroplasts. B.B.A., 223, 240.
75. VELTHUYS, B.R. y AMESZ, J. 1974. Charge accumulation at the reducing site of system II of Photosynthesis. B.B.A., 333, 85.
76. PLESNICAR, M. y BENDALL, D.S. 1970. Plastocyanin content of chloroplasts from some higher plants stimulated by a sensitive enzymic assay. B.B.A., 216, 192.
77. BÖHME, H. y CRAMER, W.A. 1972. The role of cytochrome b<sub>6</sub> in cyclic electron transport: Evidence for an energy-coupling site in the pathway of cytochrome b<sub>6</sub> oxidation in spinach chloroplasts. B.B.A., 283, 302.
78. MALKIN, R. y APARICIO, P.J. 1975. Identification of a g=1.90 high-potential iron-sulfur protein in chloroplasts. Biochem, Biophys. Res. Commun., 63, 1157.

79. YOCUM, C.F. y SAN PIETRO, A. 1970. Ferredoxin-reducing substance (FRS) from spinach. II. Separation and assay. -- Arch. Biochem. Biophys., 140, 152.
80. MALKIN, R., APARICIO, P.J. y ARNON, D.I. 1974. The isolation and characterization of a new iron-sulfur protein from photosynthetic membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 2362.
81. EVANS, M.C.W., TELFER, A. y LORD, A.V. 1972. Evidence for the role of a bound ferredoxin as the primary electron acceptor of Photosystem I in spinach chloroplasts. B.B.A., 267, 530.
82. EVANS, M.C.W. y CAMMACK, R. 1975. The effect of the redox state of the bound iron-sulfur centers in spinach chloroplasts on the reversibility of P-700 photooxidation at low temperatures. Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 187.
83. EVANS, M.C.W., SIHRA, C.K., BOLTON, J.R. y CAMMACK, R. 1975. Primary electron acceptor complex of Photosystem I in spinach chloroplasts. Nature, 256, 669.
84. GIBSON, J.F., HALL, D.O., THORNLEY, J.H.M. y WHATLEY, F.R. - 1966. The Fe complex in spinach ferredoxin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 56, 987.
85. LEE, S.S., TRAVIS, J. y BLACK, C.C. 1970. Characterization of ferredoxin from nutsedge. *Cyperus rotundus* and other species with a high photosynthetic capacity. Arch. Biochem. Biophys., 141, 676.
86. FORTI, G., MELANDRI, B.A., SAN PIETRO, A. y KE, B. 1970. Photoreduction of ferredoxin and the ferredoxin-NADP-reductase flavoprotein by chloroplasts fragments: effect of

- pyrophosphate. Arch. Biochem. Biophys., 140, 107.
87. FORTI, G. y MEYER, E.M. 1969. Effect of pyrophosphate on photosynthetic electron transport reactions. Plant Physiol., 44, 1511.
  88. MÜHLETHALER, K. 1977. Introduction to structure and function of the photosynthesis apparatus. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlin), 503.
  89. SAHA, S., OITRAKUL, R., IZAWA, S. y GOOD, N.E. 1971. Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. J. Biol. Chem., 246, 3204.
  90. WILLIAMS, R.J.P. 1978. History and hypothesis concerning ATP-formation by energized protons. FEBS Lett., 85, 9.
  91. BOYER, P.D. 1974. In "Dynamics of energy-transducing membranes" (L. Ernster, R. Estabrook y E.C. Slater, Eds., Elsevier, Amsterdam), 289.
  92. NELSON, N., NELSON, H. y RACKER, E. 1972. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. - Purification and properties of an inhibitor isolated - from chloroplast coupling factor I. J. Biol. Chem., 247, 7657.
  93. MITCHELL, P. 1966. Chemiostotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41, 445.
  94. DILLEY, R.A. y VERNON, L.P. 1967. Quantum requirement of the light-induced proton uptake by spinach chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 57, 395.



95. SCHLIEPHAKE, W., JUNGE, W. y WITT, H.T. 1968. Correlation between field formation, proton translocation and the light reactions in Photosynthesis. Z. Naturforsch., 23B, 1571.
96. DILLEY, R.A. y VERNON, L.P. 1965. Ion and water transport processes related to the light-dependent shrinkage of spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 111, 365.
97. AUSLÄNDER, W. y JUNGE, W. 1974. The electric generator in Photosynthesis of green plants. II.- Kinetic correlation - between protolytic reactions and redox reactions, B.B.A. 357, 285.
98. SCHULDINER, S., ROTTENBERG, H. y AVRON, M. 1972. Determination of  $\Delta\text{pH}$  in chloroplasts. 2.- Fluorescent amines as a probe for the determination of  $\Delta\text{pH}$  in chloroplasts. Eur. J. Biochem., 25, 64.
99. RUMBERG, B. 1977. Field changes. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), 405.
100. HIND, G. y JAGENDORF, A. 1963. Separation of light and dark stages in photophosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 49, 715.
101. URIBE, E.G. y JAGENDORF, A.T. 1967. Organic acid specificity for acid-induced ATP synthesis by isolated chloroplasts. Plant Physiol., 42, 706.
102. RUMBERG, B. y WITT, H.T. 1964. Analysis of Photosynthesis - with a flashing light. I.- The photooxidation of chlorophyll a ( $\text{Chl-a}_1$  -430 -703). Naturforsch., 19B, 693.

103. HIND, G. y WHITTINGHAM, C.P. 1963. Reduction of ferricyanide by chloroplasts in the presence of nitrogenous bases. B.B.A., 75, 194.
104. HORTON, P, y CRAMER, W.A. 1974. The accessibility of the  $\tau$ -chloroplast cytochromes f and  $b_{559}$  to ferricyanide. B.B.A., 368, 348.
105. PORTIS, A.R. y McCARTY, R.E. 1974. Effects of adenine nucleotides and of photophosphorylation on  $H^+$  uptake and -- the magnitude of the  $H^+$  gradient in illuminated chloroplasts. J. Biol. Chem., 249, 6250.
106. HEBER, U. 1973. Stoichiometry of reduction and phosphorylation during illumination of intact chloroplasts. B.B.A. 305, 140.
107. TREBST, A. y BURBA, M. 1967. The inhibition of photosynthetic reactions in isolated chloroplasts and in *Chlorella* by disalicylidenepranediamine. Z. Pflanzenphysiol., 57, 419.
108. REEVES, S.G. y HALL, D.O. 1973. The stoichiometry ( $ATP/2e^-$ ) ratio of noncyclic photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. B.B.A., 314, 66.
109. ELSTNER, E.F. y HENPEL, A. 1974. On the mechanism of photosynthetic oxygen reduction by isolated chloroplast lamellas. Z. Naturforsch., 29C, 564.
110. EGNEUS, H., HEBER, U., MATTHIESEN, U. y KIRK, M. 1975. Reduction of oxygen by the electron transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. B. B.A., 408, 252.
111. GIMMLER, H. 1977. Photophosphorylation in vivo. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photo-

- phosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), 448.
112. TAGAWA, K., TSUJIMOTO, H.Y. y ARNON, D.I. 1963. Role of -- chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of Photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci., US., 49, 567.
113. ARNON, D.I. y CHAIN, R.K. 1975. Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 4961.
114. SIMONIS, W. y URBACH, W. 1973. Photophosphorylation in vivo. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 89.
115. SANTARIUS, K.A. y HEBER, U. 1965. Changes in intracellular levels of adenosine 5'-triphosphate, adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-monophosphate and inorganic phosphate and regulation function of adenylate system in leaf cells during Photosynthesis. B.B.A., 102, 39.
116. BANCHOP, T. y ELSDEN, R. 1960. Growth of microorganisms in relation to their energy supply. J. Gen. Microbiol., 23, 457.
117. HEBER, U. y KIRK, M. 1975. Flexibility of coupling and stoichiometry of ATP formation in intact chloroplasts. B. B.A., 376, 136.
118. DUTTON, P.L. y WILSON, D.F. 1974. Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. B.B.A., 346, 165.
119. HALL, D.O. 1976. The coupling of photophosphorylation to -- electron transport in isolated chloroplasts. "The intact chloroplast" (J. Barber, Ed., Elsevier, Amsterdam), 135.

120. RADWER, R.J. y KOK, B. 1977. Light conversion efficiency in Photosynthesis. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), 125.
121. AVRON, M. 1963. A coupling factor in photophosphorylation. B.B.A., 77, 699.
122. FARRON, F. 1970. Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosinetriphosphatase. Biochemistry, 9, 3823.
123. PEDERSEN, P.L. 1975. Mitochondrial adenosinetriphosphatase, Bioenergetics, 6, 243.
124. ROY, H. y MONDRIANAKIS, E.N. 1971. Interactions between ADP and the coupling factor of photophosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68, 464.
125. PETRACK, B. y LIPMANN, F. 1961. Photophosphorylation and photohydrolysis in cell-free preparations of blue-green alga. "Light and life" (W.D. Mc Elroy y H.B. Glass, Eds., John Hopkins, Baltimore), 621.
126. VAMBUTAS, V.K. y RACKER, E. 1965. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I.- Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent calcium dependent adenosinetriphosphatase from chloroplast. J. Biol. Chem. 240, 2660.
127. NELSON, N., DETERS, D.W., NELSON, H. y RACKER, E. 1973. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIII.- Properties of isolated subunits of coupling factor I from spinach chloroplasts. J. Biol. Chem., 248, 2049.

128. HELDT, H.W. 1969. Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. FEBS Lett., 5, 11.
129. HEBER, U. 1974. Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 393.
130. ANDERSON, L.E., NG, T.C.L. y PARK, K.E.Y. 1974. Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose 6-phosphate dehydrogenase by light and dithiothreitol. - Plant Physiol., 53, 835.
131. HEBER, U. y KRAUSE, G.H. 1971. Transfer of carbon, phosphate energy, and reducing equivalents across the chloroplast envelope. "Photosynthesis and Photorespiration" (M.D. Hatch, C.B. Osmond y R.O. Slatyer, Eds., Wiley-Interscience, New York), 218.
132. KRAUSE, G.H. y HEBER, U. 1976. Energetics of intact chloroplasts. "The intact chloroplast" (J. Barber, Eds., Elsevier, Amsterdam), 171.
133. PETERKOFSKY, A. y RACKER, E. 1961. Reductive pentose phosphate cycle. III.- Enzymes activities in cell-free extracts of photosynthetic organisms. Plant Physiol., 36, 409.
134. SUGIYAMA, T., NAKAYAMA, N. y AKAZAWA, T. 1968. Structure and function of chloroplast proteins. V.- Homotropic effect of bicarbonate in RuDP carboxylase reaction and the mechanism of activation by magnesium ions. Arch. Biochem. Biophys., 126, 737.
135. LILLEY, R. McC. y WALKER, D.A. 1975. Carbon dioxide assimilation by leaves, isolated chloroplasts, and ribulose - bisphosphate carboxylase from spinach. Plant Physiol., 55, 1037.

136. BUCHANAN, B.B. y SCHURMANN, P. 1973. Regulation of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase in the photosynthetic assimilation of carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, 248, 4956.
137. KUNG, S.D. 1976. Tobacco Fraction I protein: A unique genetic marker. *Science*, 191, 429.
138. WOLOSIIUK, R.A. y BUCHANAN, B.B. 1977. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature*, 266, 565.
139. ZIMMERMANN, G., KELLY, G.S. y LATZKO, E. 1976. Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, - 70, 361.
140. CHUECA, A., LAZARO, J.J. y LOPEZ GORGE, J. 1977. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: Subunit structure. *Plant Sci. Lett.*, 8, 71.
141. LAZARO, J.J., CHUECA, A., LOPEZ GORGE, J. y MAYOR, F. 1974. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: Purification and heterogeneity. *Phytochemistry*, 13, 2455.
142. WOLOSIIUK, R.A. y BUCHANAN, B.B. 1976. Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 251, 6456.
143. WOLOSIIUK, R.A., CRAWFORD, N.A., YEE, B.C. y BUCHANAN, B.B. Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J. Biol. Chem.*, en prensa (comunicación personal).
144. WALKER, D.A. 1976. Regulatory mechanisms in photosynthetic carbon metabolism. *Current Topics Cell. Reg.*, 11, 203.

145. SCHACTER, B. y BASSHAM, J.A. 1972. Antimycin A stimulation of rate-limiting steps of Photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 49, 411.
146. WALKER, D.A. y LILLEY, R. McC. 1974. Autocatalysis in a reconstituted chloroplast system. *Plant Physiol.*, 54, -- 950.
147. KANAZAWA, T., KIRK, M. y BASSHAM, J.A. 1970. Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella pyrenoidosa*. *B.B.A.*, 205, 401.
148. ANDREWS, T.J., LORIMER, G.H. y TOLBERT, N.E. 1973. Ribulose diphosphate oxygenase. I.-Synthesis of phosphoglycolate by fraction-I protein of leaves. *Biochemistry*, 12, 11.
149. LAING, W.A. y FORDE, B.J. 1971. Comparative photorespiration in *Amaranthus*, soybean and corn. *Planta*, 98, 221.
150. MARX, J.L. 1973. Photorespiration: Key to increase plant productivity? *Science*, 179, 365.
151. WILDNER, G.F. y HENKEL, J. 1976. Specific inhibition of the oxygenase activity of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 268.
152. CHEN, T.M., BROWN, R.H. y BLACK, C.C. 1970. Carbon dioxide compensation concentration, rate of photosynthesis, and carbonic anhydrase activity of plants. *Weed Sci.*, 18, 399.
153. CHOLLET, R. y OGREN, W.L. 1972. Greening in a virescent mutant of maize. II.- Enzyme studies. *Z. Pflanzenphysiol.* 68, 45.

154. GALMICHE, J.M. 1973. Studies on the mechanism of glycerate 3-phosphate synthesis in tomato and maize leaves. *Plant Physiol.*, 51, 512.
155. TAYLOR, A.O., SLACK, C.R. y Mc PHERSON, H.G. 1974. Plants under climatic stress. VI.- Chilling and light effects on photosynthetic enzymes of sorghum and maize. *Plant Physiol.*, 54, 696.
156. MORELAND, D.E. 1967. Mechanism of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18, 365.
157. FREAR, D.S., HODGSON, R.H., SHIMABUKURO, R.H. y STILL, G.G. 1972. Behavior of herbicides in plants. *Adv. Agron.*, 24, 327.
158. ASHTON, F.M. y CRAFTS, A.S. 1973. "Mode of action of herbicides" (John Wiley & Sons, Inc., New York).
159. ANDERSON, J.L. y THOMSON, W.W. 1973. Effects of herbicides on the ultrastructure of plant cells. *Residue Rev.*, 47, 167.
160. CORBETT, J.R. 1974, "The biochemical mode of action of pesticides" (Academic Press, London).
161. DODGE, A.D. 1975. Some mechanisms of herbicide action. *Sci. Prog. Oxf.*, 62, 447.
162. GEISSBUHLER, H., MARTIN, H. y VOSS, G. 1975. "Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action" (P.C. Kearney y D.D. Kaufman, Eds., Marcel Dekker Inc., New York).
163. ANDUS, L.J. 1976. "Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology" (Academic Press, London), vol. 1 y 2.
164. MORELAND, D.E., MALHOTRA, S.S., GRUENHAGEN, R.D. y SHOKRAU, E.H. 1969. Effect of herbicides on RNA and protein syntheses. *Weed Sci.*, 17, 556.



165. STANGER, C.E. y APPLEBY, A.P. 1972. Proposed mechanism for diuron-induced phytotoxicity. *Weed Sci.*, 20, 357.
166. VAN OVERBEEK, J. 1964. "The Physiology and Biochemistry of Herbicides" (L.J. Andus, Ed., Academic Press, London).
167. BRIAN, R.C. 1976. The history and classification of herbicides. "Herbicides. Physiology, Biochemistry and Ecology" (L.J. Andus, Ed., Academic Press, London), p.1.
168. SCHÖNHERR, J. y BUKOVAC, M.J. 1973. Ion exchange properties of isolated tomato fruit cuticular membrane: Exchange capacity, nature of fixed charges and cation selectivity. *Planta*, 109, 73.
169. SANDS, R. y BACHELARD, E.P. 1973. Uptake of picloram by eucalypt leaf discs. I.- Effect of surfactants and nature of the leaf surfaces. *New Phytol.*, 72, 69.
170. PARR, J.F. y NORMAN, A.G. 1965. Use of surfactants in plant systems. A review. *Bot. Gaz.*, 126, 86.
171. SARGENT, J.A. y BLACKMAN, G.E. 1965. Studies on foliar penetration. II.- The role of light in determining the penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Exp. Bot.*, 16, 24.
172. WARDLAW, I.F. 1969. Effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. II. Effect during leaf development in *Lolium temulentum*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 1.
173. DAVIS, F.S., VILLAREAL, A., BAUR, J.R. y GOLDSTEIN, I.S. -- 1972. Herbicidal concentrations of picloram in cell cultures and leaf buds. *Weed Sci.*, 20, 185.

174. CROSBY, D.G. 1976. Non biological degradation of herbicides in the soil. "Herbicides, Physiology, Biochemistry and Ecology" (L.S. Andus, Ed., Academic Press, London), vol. 2, 65.
175. GROSSBARD, E. 1976. Effects of herbicides on the soil microflora. "Herbicides. Physiology, Biochemistry and Ecology" (L.J. Andus, Ed., Academic Press, London), vol. 2, pág. 99.
176. EIJSACKERS, H. y VAN DER DRIFT, J. 1976. Effects of herbicides on the soil fauna. "Herbicides. Physiology, Biochemistry and Ecology" (L.J. Andus, Ed., Academic Press, London), vol. 2, 149.
177. SHIMABUKURO, R.H., FREAR, D.S., SWANSON, H.R. y WALSH, W.C. 1971. Glutathione conjugation. Enzymic basis for atrazine resistance in corn. *Plant Physiol.*, 47, 10.
178. WAIN, R.L. 1955. Herbicidal selectivity through specification of plants on compounds applied. *J. Ag. Food Chem.*, 3, 128.
179. SOUZA-MACHADO, V., BANDEEN, J.D., STEPHENSON, G.R. y JENSEN, K.I.N. 1977. Differential atrazine interference with the Hill reaction of isolated chloroplasts from *Chenopodium album* L. biotypes. *Weed Research*, 17, 407.
180. SOUZA-MACHADO, V., ARNTZEN, C.J., BANDEEN, J.D. y STEPHENSON, G.R. 1978. Comparative triazine effects upon System II Photochemistry in chloroplasts of two common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes. *Weed Sci.*, 26, 318.
181. ALDHONS, J.R., ATTERSON, A.J.L. y BROWN, R.M. 1968. Nursery investigation: weed control. *Rep. For. Res.*, London, - 32.

182. KRISHNAKUMARI, M.K. 1977. Sensitivity of the alga *Scenedesmus acutus* to some pesticides. *Life Sci.*, 20, 1525.
183. SAGGERS, D.T. 1976. The search for new herbicides. "Herbicides. Physiology, Biochemistry and Ecology" (L.J. Andus, Ed., Academic Press; London), vol. 2, 447.
184. GABBOT, P.A. 1966. Design of herbicides. Rational approach. *Biochem. J.*, 101, 1P.
185. WARBURG, O. 1919. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biöchem. Z.*, 100, 258.
186. TEMPLEMAN, W.G. y SEXTON, W.A. 1945. Effect of some arylcarbamic esters and related compounds upon cereals and -- other species. *Nature*, 156, 630.
187. WESSELS, J.S.C. y VAN DER VEEN, R. 1956. Action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *B.B.A.*, 19, 548.
188. LOSADA, M. y ARNON, D.I. 1963. Selective inhibitors of Photosynthesis. "Metabolic inhibitors" (R.M. Hochster, M. Kates y J.H. Quastel, Eds., Academic Press, New York), - vol. II, pág. 391.
189. AVRON, M. y SHAVIT, W. 1965. Inhibitors and uncouplers of - photosphorylation. *B.B.A.*, 109, 317.
190. IZAWA, S. y GOOD, N.E. 1972. Inhibition of photosynthetic - electron transport and photophosphorylation. *Methods - in Enzymol.* (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York), vol. XXIV, pág. 355.
191. GOOD, N.E. e IZAWA, S. 1973. Inhibition of Photosynthesis.

- "Metabolic inhibitors" (R.M. Hochster, M. Kates y J.H. Quastel, Eds., Academic Press, New York), vol. IV, pág. 180.
192. MORELAND, D.E. e HILTON, J.L. 1976. Actions of herbicides - on photosynthetic systems. "Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology (L.J. Andrus, Ed., Academic Press, - London), vol. 1, pág. 493.
193. KRINSKY, N.I. 1966. Biochemistry of chloroplasts" (T.W. Goodwin, Ed., Academic Press, New York), vol. I, pág. 423.
194. DODGE, J.D. y LAWES, G.B. 1972. Some effects of the herbicide haloxydine on the structure and development of chloroplasts. *Am. Bot. (London)*, 36, 315.
195. FICEK, S. y WIECKOWSKI, S. 1974. The effect of chloramphenicol, actinomycin D and 5-bromouracil on the synthesis of photosynthetic pigments. *Acta Soc. Bot. Pol.*, XLIII, 251.
196. VAN OORSCHOT, J.L.P. 1970. Effect of transpiration rate of bean plants on inhibition of photosynthesis by some - root-applied herbicides. *Weed. Res.*, 10, 230.
197. MITTELHEUSER, C.J. y VAN STEVENINCK, R.F.M. 1971. Rapid action of abscisic acid on photosynthesis and stomatal resistance, *Planta*, 97, 83.
198. KANDLER, O. 1960. Energy transfer through phosphorylation - mechanisms in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11, 37,
199. AVRON, M. y NEUMAN, J. 1968. Photophosphorylation in chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19, 137.

200. TREBST, A. 1974. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 423.
201. HANSKA, G. 1977. Artificial acceptors and donors. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and Photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), pág. 253.
202. KATOH, S. y SAN PIETRO, A. 1967. Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated Euglena chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 122, 144
203. HARTH, E., OETTMEIER, W. y TREBST, A. 1974. Native and artificial energy conserving sites operating in coupled electron donor systems for photosystem II. *FEBS Lett.*, 43, 231.
204. VERNON, L.P. y SHAW, E.R. 1969. Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalyzed by Tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments. *Plant Physiol.*, 44, 1645.
205. YAMASHITA, T. y BUTLER, W.L. 1969. Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II. *Plant Physiol.*, 44, 435.
206. ONITRAKUL, R. e IZAWA, S. 1973. Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. II. Acceptor-specific inhibition by KCN. *B.B.A.*, 305, 105.
207. BÖHME, H., REIMER, S. y TREBST, A. 1971. Role of plastoquinone in photosynthesis. Effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone, on noncyclic and cyclic

- electron flow systems in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch., 26B, 341.
208. ORT, D.R. e IZAWA, S. 1974. Studies on the energy-coupling sites of photophosphorylation. V. Phosphorylation efficiencies ( $P/e_2$ ) associated with aerobic photooxidation of artificial electron donors. Plant Physiol., 53, 370.
209. MEHLER, A.H. 1951. Reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch. Biochem. Biophys., 33, 65.
210. GIAQUINTA, R.T. y DILLEY, R.A. 1975. A partial reaction in photosystem II: Reduction of silicomolybdate prior to the site of dichlorophenyl dimethylurea inhibition. B. B.A., 387, 288.
211. HANSKA, G., REIMER, S. y TREBST, A. 1974. Native and artificial energy-conserving sites in cyclic photophosphorylation systems. B.B.A., 357, 1.
212. BLACK, C.C. 1966. Chloroplast reactions with dipyriddy salts. B.B.A., 120, 332.
213. YOCUM, CH.F. 1977. Photophosphorylation associated with photosystem II. II.- Effects of electron donors, catalyst oxidation, and electron transport inhibitors on photosystem II cyclic photophosphorylation. Plant Physiol., 60, 592.
214. IZAWA, S. 1977. Inhibitors of electron transport. "Photosynthesis I: Photosynthetic electron transport and photophosphorylation" (A. Trebst y M. Avron, Eds., Springer-Verlag, Berlín), pág. 266.
215. CHENIAE, G.M. y MARTIN, I.F. 1970. Sites of function of man

- ganese within photosystem II. Roles in oxygen evolution and system II. B.B.A., 197, 219.
216. DUYSSENS, L.N.M. y AMESZ, J. 1962. Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis. B. B.A., 64, 243.
217. RENGER, R. 1973. The action of 3-(3,4-diclorophenyl)-1,1-dimethyl-urea on the water-splitting enzyme system Y of photosynthesis. B.B.A., 314, 113.
218. BÜCHEL, K.H. 1972. Mechanism of action and structure-activity relations of herbicides that inhibit Photosynthesis. Pest. Sci., 3, 89.
219. BARTH, A. y MICHEL, H.J. 1969. Reaction mechanisms and substituent effects of urea, carbamate, amide and triazine herbicides. Pharmazie, 24, 11.
220. SATOH, K. 1974. Action of some derivatives of 1,10-phenanthroline on electron transport in chloroplasts. B.B.A., 333, 127.
221. TREBST, A., HARTH, E. y DRABER, W. 1970. New inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch., 25B, 1157.
222. TREBST, A. y REIMER, S. 1973. Properties of photoreductions by photosystem II in isolated chloroplasts. II. B.B.A., 305, 129.
223. BERING, CH.L. y LOACH, P.A. 1977. Effects of 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl benzoquinone (DBMIB) on photochemical events in *Rhodospirillum rubrum*. Photochem. Photobiol., 26, 607.
224. Mc CARTY, R.E. 1974. Inhibition of electron transport in chloroplasts between the two photosystems by a water-soluble carbodiimide. Arch. Biochem. Biophys., 161, 93.

225. BRAND, J., BASZINSKI, T., CRANE, F.L. y KROGMANN, D.W. 1972. Selective inhibition of Photosynthetic Reactions by Polycations. J. Biol. Chem., 247, 2814.
226. BERG, S. y KROGMANN, D.W. 1975. Mechanism of KCN inhibition of photosystem I. J. Biol. Chem., 250, 8957.
227. KIKIMURA, M. y KATOH, S. 1972. Studies on electron transport associated with photosystem I. I. Functional rate of plastocyanin: Inhibitory effects of  $\text{HgCl}_2$  on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. B.B.A., 283, 279.
228. AUTOR, A.P. 1977. "Biochemical mechanisms of paraquat toxicity" (Academic Press, New York).
229. DODGE, A.D. 1971. Mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. Endeavour, 30, 130.
230. MEES, G.C. 1960. Herbicidal action of 1,1'-ethylene-2,2'-dipyridinium dibromide. Ann. Appl. Biol., 48, 601.
231. HARRIS, N. y DODGE, A.D. 1972. The effect of paraquat on flax cotyledon leaves: Physiological and biochemical changes. Planta, 104, 210.
232. ALSOP, W.R. y MORELAND, D.E. 1975. Effects of herbicides on the light-activated, magnesium-dependent ATPase of isolated spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplasts. Pestic. Biochem. Physiol., 5, 163.
233. DAVIS, E.A. 1966. Role of starvation in fenuron injury to shrub live oak. Weeds, 14, 10.
234. ASHTON, F.M. 1965. Relation between light and toxicity symptoms caused by atrazine and mopuron. Weeds, 13, 164.



235. DOWTON, W.J.S. y TREGUNNA, E.B. 1968. Photorespiration and glycolate metabolism: A re-examination and correlation of some previous studies. *Plant Physiol.*, 43, 923.
236. GIBBS, M. 1971. Biosynthesis of glycolic acid. "Photosynthesis and Photorespiration" (M.D. Hatch, C.B. Osmond y - R.O. Slatyer, Eds., Wiley-Interscience, New York), pág. 433.
237. ZELITCH, I. 1973. Alternative pathways of glycolate synthesis in tobacco and maize leaves in relation to rates of photorespiration. *Plant Physiol.*, 51, 299.
238. VAN OORSCHOT, J.L.P. y BELKSMA, M. 1961. An assembly for the continuous recording of CO<sub>2</sub> exchange and transpiration of whole plants. *Weed Res.*, 1, 245.
239. IZAWA, S. y GOOD, N.E. 1965. The number of sites sensitive to 3-(3,4-dicloropheny)-1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea, and 2-chloro-4-(2-propylamino)-6-ethylamino-s-triazine in isolated chloroplasts. *B.B.A.*, 102, 20.
240. MORELAND, D.E. y HILL, K.L. 1962. Interference of herbicides with the Hill reaction of isolated chloroplasts. *Weeds*, 10, 229.
241. COCKBURN, W., WALKER, D.A. y BALDRY, C.W. 1968. The isolation of spinach chloroplasts in Pyrophosphate media. *Plant Physiol.*, 43, 1415.
242. ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1.
243. BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1971. Ferredoxins from photosynthetic bacteria, algae and higher plants. *Methods in Enzymol.*, 23A, 413.

244. WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. 1963. Photosynthetic Phosphorylation in plants. *Methods in Enzymol.* VI, 308.
245. DAVENPORT, H.E. 1960. A protein from leaves catalysing the reduction of metmyoglobin and triphosphoryridine nucleotide by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.*, 77, 471.
246. DE LA TORRE, A., CHUECA, A. y LOPEZ GORGE, J. 1978. Isolation and properties of crystalline Ferredoxin from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry*, 17, 35.
247. LOWRY, H.O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. -- 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
248. WALKER, D.A., BALDRY, C.W. y COCKBURN, W. 1968. Photosynthesis by Isolated Chloroplasts, Simultaneous Measurement of Carbon Assimilation and Oxygen Evolution. *Plant Physiol.*, 43, 1419.
249. SCHÜRMAN, P. 1969. Separation of phosphate esters and algal extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *J. Chromatog.*, 39, 507.
250. TAKABE, T., NISHIMURA, M. y AKAZAWA, T. 1976. Presence of Two Subunit Types in Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase from Blue-Green Algae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, (2), 537.
251. TAKABE, T. y AKAZAWA, T. 1975, Further Studies on the Subunit Structure of Chromatium Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase. *Biochemistry*, 14, 46.
252. ORNSTEIN, L. 1964, Disk electrophoresis. I, Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321.

253. DAVIS, B.J. 1964. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404.
254. LAING, W.A., OGREN, W.L. y HAGEMAN, R.H. 1975. Bicarbonate Stabilization of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. *Biochemistry*, 14, 2269.
255. BAHR, J.T. y JENSEN, R.G. 1978. Activation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase in Intact Chloroplasts by CO<sub>2</sub> -- and Light. *Arch. Biochem. Biophys.*, 185, (1), 39.
256. RACKER, E. y SCHROEDER, E.A.R. 1958. Reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose-1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 326.
257. PREISS, J., BIGGS, M.L. y GREENBERG, E. 1967. The effect of magnesium ion concentration on the pH optimum of the spinach leaf alkaline fructose diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 242, 2292.
258. BUCHANAN, B.B., SCHURMAN, P. y KALBERER, P.P. 1971. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 246, 5952.
259. FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375.
260. WEST, K.R. y WISKICH, J.T. 1968. Photosynthetic control by isolated pea chloroplasts. *Biochem. J.*, 109, 527.
261. NISHIMURA, K., KAWATA, T., ASADA, K. y NAKAJIMA, M. 1975. -- Effect of Hill reaction inhibitors on the photoreduction of ferricyanide and cyclic photophosphorylation by spinach chloroplasts. *Agr. Biol. Chem.*, 39, 867.

262. TREBST, A. 1964. Photosynthetic reduction of NADP (nicotina<sub>mide</sub> adenine dinucleotide phosphate) by phenylenediami<sub>nes</sub> in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch., B19, -- 418.
263. KEISTER, D.L. 1965. Indophenols as electron donors and cata<sub>lysts</sub> of photophosphorylation in chloroplast reactions. J. Biol. Chem., 240, 2673.
264. WHATLEY, F.R., ALLEN, M.B. y ARNON, D.I. 1959. Photosynthe<sub>sis</sub> by isolated chloroplasts. VII. Vitamin K and ribo<sub>flavin</sub>ephosphate as cofactors of cyclic phosphorylation. B.B.A., 32, 32.
265. LEE, S.S. y FANG, S.C. 1972. Association of monuron in chlo<sub>roplasts</sub> in relation to inhibition of Hill reaction. -- Phytochemistry, 11, 2693.
266. VERNON, L.P. y ZANGG, W.S. 1960. Photoreductions by fresh - and aged chloroplasts: require<sub>ment</sub> for ascorbate and - 2,6-dichlorophenolindophenol with aged chloroplasts. J. Biol. Chem., 235, 2728.
267. FEDTKE, C. 1972. Influence of photosynthesis-inhibiting her<sub>bicides</sub> on the regulation of crop plant matabolism. -- Pestic. Biochem. Physiol., 2, 312.
268. DICKS, J.W. 1978. Inhibition of the Hill reaction of isola<sub>ted</sub> chloroplasts by herbicidal phenylureas. Pestic. Sci. 9, 59.
269. DE MUR, A.R., SWADER, J.A. y YOUNGNER, V.B. 1972. Siduron - inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts. Pestic. Biochem. Physiol., 2, 337.
270. KAPLANOVA, M. y SOCHA, J. 1977. The effect of herbicides on

- the photooxidation of chlorophyll a in solution. *Photosynthetica*, 11, 276.
271. FEDTKE, C., DEICHGRABER, G. y SCHNEPF, E. 1977. Herbicide - induced changes in wheat chloroplast ultrastructure - and chlorophyll a/b ratio. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 171, 307.
272. MORELAND, D.E., GENTNER, W.A., HILTON, J.L. y HILL, K.L. -- 1959. Mechanism of herbicidal action of 2-chloro-4,6-bis (ethylamino)-s-triazine. *Plant Physiol.*, 34, 432.
273. EBERT, E. y MUELLER, P.W. 1968. Biochemical aspects of triazine herbicides. *Experientia*, 24, 1.
274. RIES, S.K., CHEMEL, H., DILLEY, D.R. y FILNER, P. 1967. The increase in nitrate reductase activity and protein content of plants treated with simazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 58, 526.
275. EBERT, E. y VAN ASSCHE, CH.J. 1969. Influence of atrazine - (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) on auxin metabolism of plants. *Experientia*, 25, 758.
276. FADEEVA, L.M., MATORIN, D.N. y KRENDELEVA, T.E. 1977. The - effect of herbicides on primary processes of photosynthesis in isolated pea chloroplasts. *Sov. Plan. P.*, 24, 560.
277. STROTMANN, H., TISCHER, W. y EDELMANN, K. 1974. Spezifische bindung von inhibitoren durch elektronenüberträger der photosynthetischen electronentransportkette. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.* 87, 457.
278. ASHTON, F.M., GIFFORD, E.M. y BISULPUTRA, T. 1963. Structural changes in *Phaseolus vulgaris* induced by atrazine.

- I. Histological changes. Bot. Gaz., 124, 329.
279. SCHULZ, H. 1969. "Progress in photosynthesis research" (H. Metzner, Ed., Tübingen), vol. III, 1752.
280. WAKAMORI, S. 1973. The mode of herbicidal action of benzyl N,N-dialkyldithiocarbamates. Agr. Biol. Chem., 37, 307.
281. MEREZHINSKY, Y.G. y LAPINA, T.V. 1973. Photophosphorylation and primary products of photosynthesis under betanal - effect. Fisiol. Biokhim. Kul't. Rast., 5, 293.
282. KOJIC, M., SINZAR, B. y KLJAJIC, R. 1973. Study of the net assimilation rate of onion treated with herbicides CDAA y CIPC. Agrohemija, 1, 13.
283. BLACK, C.C. y MEYERS, L. 1966. Some biochemical aspects of - the mechanism of herbicidal activity. Weeds, 14, 331.
284. ZWEIG, G., SHAVIT, N. y AVRON, M. 1965. Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-dipyridylum dibromide) in photoreactions of isolated chloroplasts. B.B.A., 109, 332.
285. MORELAND, D.E., FARMER, F.S. y HUSSEY, G.G. 1972. Inhibition of photosynthesis and respiration by substituted 2,6-dinitroaniline herbicides. I. Effect on chloroplast and mitochondrial activities. Pestic. Biochem. Physiol., 2, 342.
286. VAN RENSEN, J.J.S., VAN DER VET, W. y VAN VLIET, W.P.A. 1977. Inhibition and uncoupling of electron transport in isolated chloroplasts by the herbicide 4,6-dinitro-o-cresol. Photochem. Photobiol., 25, 579.
287. NEUMANN, J. y JAGENDORF, A.T. 1964. Light-induced pH changes related to phosphorylation by chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 107, 109.

288. RAGHAVENDRA, A.S. y DAS, V.S.R. 1976. Inhibition of chloroplast photochemical reactions with 2-chloromercuri-4,6-dinitro-phenol. Arch. Biochem. Biophys., 175, 355.
289. HILTON, J.L., SCHAREN, A.L., ST. JOHN, J.B., MORELAND, D.E. y NORRIS, K.H. 1969. Modes of action of pyridazinone herbicides. Weed Sci., 17, 541.
290. ANDERSON, J.L. y SCHAEILING, J.P. 1970. Effects of pyrazon on bean chloroplast ultrastructure. Weed Sci., 18, 455.
291. BUDIMIR, M., PLESNICAR, M. y KLJAJIC, R. 1976. Effects of the herbicide 2,4-DB and fungicide captan on reactions of mitochondria and chloroplasts. Arch. Envir. Contam. Toxicol., 4, 166.
292. WEINBACH, E.C. y GARBUS, J. 1965. The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. J. Biol. Chem., 240, 1811.
293. VERLOOP, A. 1972. Fate of the herbicide dichlobenil in plants and soil in relation to its biological activity. Residue Rev., 43, 55.
294. LOTLIKAR, P.D., REMMERT, L.F. y FREED, V.H. 1968. Effects of 2,4-D and other herbicides on oxidative phosphorylation in mitochondria from cabbage. Weed Sci., 16, 161.
295. MATLIB, M.A., KIRKWOOD, R.C. y PATTERSON, J.D.E. 1971. Binding of certain substituted phenoxy acids by bovine serum albumin. Weed Res., 11, 190.
296. ALLEN, M.B., ARNON, D.I., CAPINDALE, J.B., WHATLEY, F.R. y DURHAM, L.J. 1955. Photosynthesis by isolated chloroplasts. III. Evidence for complete photosynthesis. J. Am. Chem. Soc., 77, 4149.

297. LOSADA, M., TREBST, A.V. y ARNON, D.I. 1960. Photosynthesis by isolated chloroplasts. XI. Carbon dioxide assimilation in a reconstituted chloroplast system. *J. Biol. Chem.*, 235, 832.
298. WALKER, D.A. 1964. Improved rates of carbon dioxide fixation by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.*, 92, 22C.
299. PONCKE, C., WALKER, D.A. y BALDRY, C.W. 1966. Some effects of sugars and sugar phosphates on carbon dioxide fixation by isolated chloroplasts. *Biochem. J.*, 101, 636.
300. FEIGE, B., GIMMLER, H., JESCHKE, W.D. y SIMONIS, W. 1969. - Fine methode zur dünn-schichtchromatographischen auf-trennung von  $^{14}\text{C}$ -und  $^{32}\text{P}$ -markierten stoffwechselprodukten. *J. Chromatog.*, 41, 80.
301. LATZKO, E. y GIBBS, M. 1972. Measurement of the intermedia-tes of the photosynthet-ic carbon reduction cycle, using enzymatic methods. *Methods in Enzymol.*, XXIV, 261.
302. HOLM-HANSEN, O., PON, N.G., NISHIDA, K., MOSES, V. y CALVIN, M. 1959. Uptake and distribution of radioactive carbon from labelled substrates by various cellular components of spinach leaves. *Physiol. Plant.*, 12, 475.
303. LARSSON, C. y ALBERTSSON, P.A. 1974. Photosynthetic  $^{14}\text{CO}_2$  - fixation by chloroplasts and chloroplast-containing sub-cellular particles. *Proc. 3rd. Int. Congr. Photosynth.* (M. Avron, Ed., Elsevier, Amsterdam), 1489.
304. SCHÜRMAN, P., BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1971. Role of cyclic photophosphorylation in photosynthetic carbon dioxide assimilation by isolated chloroplasts. *B.B.A.*, 267, 111.



305. BIOD, I.F., CORNELIUS, M.J., KEYS, A.J. y WHITTINGHAM, C.P. 1974. Intracellular site of sucrose synthesis in leaves. *Phytochemistry*, 13, 59.
306. WU, M.T., SINGH, B. y SALUNKHE, D.K. 1971. Influence of s-triazines on some enzymes of carbohydrates and nitrogen metabolism in leaves of pea (*Pisum sativum*) and -- sweet corn (*Zea mays*). *Plant Physiol.*, 48, 517.
307. SHAUKAT, S.S. 1975. Effects of simazine, atrazine and 2,4-D on  $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and composition of  $^{14}\text{C}$ -assimilates - in *Pinus nigra* var. *Calabrica* Scheneid. *Pak. J. Bot.*, 7, 57.
308. LENDZIAN, K.J., ZIEGLER, H. y SANKHLA, N. 1978. Effect of - phosphon-D on photosynthetic light reactions and on -- reactions of the oxidative and reductive pentose phosphate cycle in a reconstituted spinach (*Spinacia ole-racea* L.) chloroplast system. *Planta*, 141, 199.
309. FORTI, G. y GEROLA, P. 1977. Inhibition of photosynthesis - by azide and cyanide and the role of oxygen in photosyn- thesis. *Plant Physiol.*, 59, 859.
310. ALLEN, J.F. 1978. Induction of a Mehler reaction in chloro- plast preparations by flavin mononucleotide: effects - on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Sci. - Letters*, 12, 151.
311. ALLEN, J.F. 1978. Induction of a Mehler reaction in chloro- plast preparations by methyl viologen and by ferredo-- xin: effects on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Sci. Letters*, 12, 161.
312. MATLIB, M.A., KIRKWOOD, R.C. y SMITH, J.E. 1972. Differen-- tial effect of selected phenoxyacid compounds on the -

- oxidative phosphorylation of mitochondria from *Vicia faba* L. J. Exp. Bot., 23, 886.
313. PATTERSON, D.T. 1976. C<sub>4</sub>-photosynthesis in smooth pigweed. Weed Sci., 24, 127.
314. PAULSEN, J.M. y LANE, M.D. 1966. Spinach ribulose diphosphate carboxylase. I. Purification and properties of the enzyme. Biochemistry, 5, 2350.
315. FEDTKE, C. 1974. Changed physiology in wheat plants treated with the herbicide methabenzthiazuron. Die Naturwiss., 61, 272.
316. PASSERA, C. y ALBUZIS, A. 1978. Benzylaminopurine induced changes in photosynthesis and photorespiration of barley plants. Biol. Plant., 20, 274.
317. WEIDNER, M. y BURCHARTZ, N. 1978. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by formulated herbicides and anionic detergents. Biochem. Physiol. Pflanzen. 173, 381.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



Biblioteca Universitaria de Granada



01052397