



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

ENVERDECIMIENTO DE LA ESPATA DE
Spathiphyllum wallisii Regel

SUSANA GONZÁLEZ AGUILAR

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

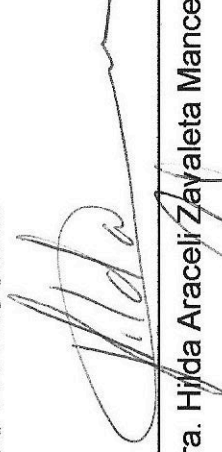
2009

La presente tesis titulada “**ENVERDECIMIENTO DE LA ESPATA DE *Spathiphyllum wallisii Regel***”, fue realizada por la alumna **Susana González Aguilar**, bajo la dirección del Consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA**

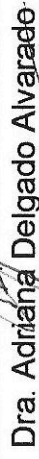
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO y DIRECTOR



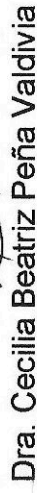
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESOR



Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR



Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

ASESOR



Dra. Rocio Vaca Paulín

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2009

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por su dedicación, paciencia y por ser parte de mi formación profesional.

Al personal del laboratorio de Bioquímica del Colegio de Postgraduados, Dr. F. Víctor Conde Martínez y Dra. Adriana Delgado Alvarado por su asesoría en el presente proyecto de investigación.

Al personal del laboratorio de Bioquímica Vegetal del Postgrado de Química de la UNAM la Dra. Herminia Loza Tavera y Dr. Martín Vargas Suárez por facilitar el equipo para densitometría.

A la Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia por su apoyo, asesoría y facilidades proporcionadas para el uso de las instalaciones de su laboratorio.

Al dr. José Rodolfo García Nava por su colaboración junto con la Dra. Cecilia Peña Valdivia para realizar los análisis de fluorescencia.

A la Dra. Rocío Vaca Paulin por su valiosa asesoría y apoyo en Estadística.

Al M. en C. Ricardo Martínez Gutiérrez por su apoyo y enseñanzas durante el periodo de investigación en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Programa Nacional de papa, INIFAP.

A los profesores de los cursos que tome en el Colegio de Postgraduados, gracias por sus enseñanzas, que son muy importantes para la formación.

Al CONACYT por el apoyo económico que me otorgo durante el tiempo del Postgrado.

DEDICATORIA



In memoriam Miguel Aguilar Franco

CONTENIDO

Págs.

RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Botánica de <i>Spathiphyllum</i> spp.	4
2.2. Fotosíntesis.....	5
2.2.1 Fotosistema II (PSII).....	6
2.2.2 Oxido reducción en la fotosíntesis.....	8
2.2.3 Absorción de la luz.....	10
2.2.4 Fluorescencia de la clorofila	11
2.2.5 Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).....	13
2.3 Ontogenia y tipos de plastidios.....	14
2.3.1 Cromoplastos.....	15
2.3.2 Cloroplastos	16
2.3.3 Plastidios envejecidos (gerontoplastos)	17
2.4 Pigmentos fotosintéticos.....	17
2.4.1 Enverdecimiento	18
2.4.2 Biosíntesis de la clorofila.....	18
2.5 Senescencia foliar	20
2.5.1 Senescencia foliar en Aráceas	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25

4. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	26
4.1 Hipótesis.....	26
4.2 Justificación.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Material vegetal.....	27
5.1.1 Monitoreo del enverdecimiento.....	27
5.1.2 Determinación de las etapas de enverdecimiento.....	28
5.2 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	28
5.3 Verdor de la espata (SPAD-meter Minolta)	29
5.4 Proteínas solubles totales.....	30
5.5 Cuantificación de Rubisco.....	30
5.6 Actividad fotosintética por fluorescencia.....	31
5.7 Microscopia de epifluorescencia.....	31
5.8 Diseño experimental y análisis estadísticos.....	32
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Etapas de enverdecimiento.....	35
6.2 Calibración del SPADmeter.....	35
6.3 Pigmentos fotosintéticos totales.....	36
6.4 Proteína soluble total.....	41
6.5 La subunidad grande (LSU) de Rubisco.....	42
6.6 Fluorescencia.....	42
6.6.1 Fluorescencia inicial (Fo).....	46
6.6.2. Fluorescencia variable (Fv).....	46
6.6.3 Fluorescencia máxima (Fm).....	46
6.6.4 Relación Fv/Fm	47

6.7 Microscopia de epifluorescencia.....	47
7. DISCUSIÓN.....	54
8. CONCLUSIONES.....	68
9. LITERATURA CITADA.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Págs

Cuadro 1	Concentración de pigmentos fotosintéticos en las diferentes etapas de enverdecimiento	40
Cuadro 2	Cambios en el contenido de dos proteínas (P1 y P2), de la espata de <i>Spathiphyllum wallisii</i> R., separadas por electroforesis en SDS-PAGE.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Spathiphyllum wallisii Regel.....	7
Figura 2	Esquema simplificado de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis..	7
Figura 3	Distribución de las proteínas en membrana tilacoidal.....	9
Figura 4	Estructura molecular del PSII.....	9
Figura 5	Las clorofilas están asociadas a proteínas específicas, formando los complejos de captura de luz (LHC).....	22
Figura 6	Diferenciación del plastidio.....	22
Figura 7	Estructura del cloroplasto	23
Figura 8	Molécula de Chl a y Chl b.....	23
Figura 9	Ruta 5 de la biosíntesis de clorofila.....	24
Figura 10	Segmentos de la espata.....	33
Figura 11	Espectro de absorbancia de la clorofila.....	33
Figura 12	Efecto Kautsky. Curva de emisión de fluorescencia.....	34
Figura 13	Enverdecimiento de tres regiones de la espata.....	37
Figura 14	Fotografías de las etapas de enverdecimiento de la espata.....	38

Figura 15	Modelo de regresión lineal.....	39
Figura 16	Concentración de proteínas solubles totales.....	43
Figura 17	Gel de poliacrilamida con la separación de proteínas.....	44
Figura 18	Contenido relativo proteínas expresado en unidades de densidad óptica·mm ² (ODU/mm ²).....	44
Figura 19	Relación gráfica del contenido relativo de LSU Rubisco expresado en unidades de densidad óptica por·mm ²	45
Figura 20	Niveles de fluorescencia inicial (Fo) en relación con la cantidad de clorofila	48
Figura 21	Niveles de fluorescencia variable (Fv) en relación con la cantidad de clorofila.....	49
Figura 22	Niveles de fluorescencia máxima (Fm) en relación con la cantidad de clorofila	50
Figura 23	Índice F_v/F_m (fluorescencia máxima/fluorescencia variable) y su dependencia con la cantidad de clorofila de espatas.....	51
Figura 24	Fotos de microscopia de campo claro y epifluorescencia de espatas blancas (B) y dos etapas de enverdecimiento (E1 y E2)	52
Figura 25	Fotos de microscopia de campo claro y epifluorescencia de la etapa E3 y de las hojas del follaje.....	53

RESUMEN

Enverdecimiento de la espata de *Spathiphyllum wallisii* Regel

Susana González Aguilar, MC

Colegio de Postgraduados, 2009

Spathiphyllum spp. es conocida comúnmente como cuna de moisés, se utiliza como planta ornamental, presenta una hoja modificada (espata), de color blanco, y conforme madura enverdece. Este fenómeno típico de algunas Aráceas es poco conocido. En el presente trabajo se analizaron algunos parámetros que intervienen en el enverdecimiento. Para clasificar el enverdecimiento la clorofila se midió con un medidor portátil (SPAD-meter 50), se delimitaron tres etapas en unidades relativas "SPAD"; E1 con 5 a 10, E2 de 15 a 20 y E3 de 25 a 30, como referencia se usaron espatas blancas (B) y hojas del follaje (V) con un rango de 35 a 46 unidades relativas. El contenido de clorofila total en las hojas del follaje (2.99 $\mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$) fue el doble que en E3 (1.07 $\mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$). En las espatas blancas la concentración fue 0.02 $\mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, y se detectó la clorofila en las células oclusivas de los estomas. La proteína soluble total incrementó en E3 (19.78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$), y fue mayor que en el follaje (10.59 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$). La subunidad grande de la Rubisco (LSU) en la espata E3 representó 9.28 $\text{ODU}\cdot\text{mm}^{-2}$, valor similar al de las hojas del follaje 8.58 $\text{ODU}\cdot\text{mm}^{-2}$. También se midieron *in situ* los parámetros de la fluorescencia (fluorescencia inicial F_o , variable F_v , máxima F_m , y su relación F_v/F_m) de la clorofila *a* en la espata durante su enverdecimiento, con un analizador portátil de la fluorescencia (Plant Efficiency Analyser, PEA). Con el enverdecimiento aumentaron los valores de fluorescencia esto se atribuye al incremento de la actividad fotosintética. La espata B presentó relación F_v/F_m de 0.300, mientras que la E3 presentó 0.700, similar al follaje con 0.700 a 0.800. El enverdecimiento se asocia con el aumento de pigmentos fotosintéticos, en proporciones mayores de clorofila *a*. El incremento los pigmentos, subunidad gran de Rubisco (LSU) y fluorescencia durante las diferentes etapas de enverdecimiento indican la reactivación de la actividad fotosintética que podría intervenir en la producción de fotosintatos para el desarrollo de la inflorescencia.

Palabras clave: clorofila, enverdecimiento, fluorescencia, LSU de Rubisco.

GENERAL SUMMARY

Greening of *Spathiphyllum wallisii* Regel

Susana González Aguilar, MC
Colegio de Postgraduados, 2009

Spathiphyllum wallisii R. is used as an ornamental plant; it has a modified leaf or hypsophyll called "spath". The spath is white but when it matures gets green. Greening is a typical phenomenon of some Araceae, but little is known. In this work, some parameters that take place in greening were analyzed. The greening was quantified with a portable measurer (SPAD-meter 50), this instrument measures the relative "green" provided by the chlorophyll. Three stages in relative units were delimited from this data SPAD" (G1 with 5 to 10, G2 15 to 20 and G3 25 to 30), white spathes (W) (≤ 1 SPAD units and foliage leaves (F) with a rank of 35 to 46 SPAD unit; they were used as a manner of reference. The total chlorophyll content in the foliage leaves ($2.99 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{FW}$) was the double that in E3 ($1.07\mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{FW}$). In the white spathes the concentration was $0.02 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{FW}$, the chlorophyll was detected in *guard cells* of the stomata. The total soluble protein increased in E3 ($19.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$), this was major that in foliage leaves ($10.59 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$). The LSU of Rubisco in spath E3 presented $9.28 \text{ ODU}\cdot\text{mm}^{-2}$ a similar value to the foliage leaves $8.58 \text{ ODU}\cdot\text{mm}^{-2}$. The green fluorescence (initial fluorescence F_o , variable F_v , maximal F_m , and F_v/F_m relation), of chlorophyll *a*, analyzed *in situ*, using a portable Plant Efficiency Analyser (PEA). The values of fluorescence increased with the greening, suggesting photosynthetic activity. The relation F_v/F_m in white spathes (W) was 0.300, whereas in the E3 the relation was 0.700 similar to the foliage leaves with 0.700 to 0.800. The greening is associated with the increase of photosynthetic pigments and activity, in larger chlorophyll *a* proportions. The moderate increase of the pigments, the significant accumulation of LSU Rubisco and more fluorescence during greening maybe indicates the reactivation of the photosynthesis and the production of photosynthates needed for the development of the inflorescence.

Key words: chlorophyll, greening, fluorescence, LSU of Rubisco.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de enverdecimiento típico de algunas Aráceas es poco conocido. La mayor parte de la información sobre enverdecimiento refiere a la conversión de etioplastos a cloroplastos, hecho que sucede en estadios muy tempranos del desarrollo de hojas y en plantas etioladas. Las Aráceas se caracterizan por presentar un hipsofilo modificado (bráctea o espata) el cual presenta un proceso de senescencia diferente a las hojas del follaje, este hipsofilo puede presentar el proceso de enverdecimiento o reverdecimiento según el genotipo. Biológicamente este proceso es poco común y tiene un interés fisiológico y botánico relevante para el entendimiento del enverdecimiento después de la madurez y durante la senescencia. En el presente trabajo se estudian algunas variables relacionados con el enverdecimiento y la fotosíntesis en *Spathiphyllum wallisii* R tales como la acumulación de pigmentos fotosintéticos (Clorofila a, clorofila b, xantofilas+carotenoides), contenido de proteínas foliares, con énfasis en la proteína LSU de Rubisco, fluorescencia del PS-II y la histocalización de la clorofila que se acumula en la espata durante tres estadios de enverdecimiento (E1, E2, y E3) los cuales se comparan con el estadio inicial blanco (B) y la hoja verde del follaje (V). Se usa el medidor relativo del clorofila SPAD meter para detectar y referir a los estadios mencionados.

Los resultados indicaron que te el enverdecimiento de la espata de *S. wallisii* esta relacionado con la acumulación de proteínas foliares, significativamente la LSU de Rubisco, e incremento de la fluorescencia del PS-II, aun cuando la concentración de clorofilas fue 50% menor que en la hoja del follaje (V). El significado biológico de este fenómeno podría estar asociado con la necesidad de fotosintatos de la inflorescencia para completar su desarrollo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Botánica de *Spathiphyllum spp.*

Spathiphyllum spp. conocida como cuna de moisés o lili de la paz, pertenece a la familia Araceae, que es representada por monocotiledóneas. El género *Spathiphyllum*, comprende 41 especies, la mayoría procedentes de regiones tropicales de América (Mayo *et al.*, 1997). El *Spathiphyllum*, originario de Colombia, es una planta perenne de tallos cortos, pecíolos alargados envueltos en la base por las hojas. Las hojas son lanceoladas, lisas, de color verde oscuro con pecíolos largos y nervaciones prominentes en el envés. Presenta una espata blanca o verde sostenida por un peciolo, que encierra a un espádice de color blanco. El pedúnculo de la inflorescencia es de igual o mayor longitud que el del peciolo; presenta una espata de color verde o blanco. Tiene flores masculinas en la parte media y ápice, y femeninas en la base del espádice, al madurar da lugar a una baya con varias semillas; cada flor se encuentra envuelta en un perigonio de tépalos; la flor masculina tiene seis estambres, la flor femenina presenta un ovario trilocular, cada lóculo con uno a siete óvulos. Una característica propia del género es que el espádice siempre es más corto que la espata (Nicolson, 1968).

La mayoría de las especies del género son neotropicales; sin embargo, tres especies se encuentran en el viejo mundo. En el continente Americano, las especies se encuentran en México, América Central, Perú y la tercera en parte del norte de Suramérica (Bunting, 1960). En el viejo mundo, la distribución incluye las Islas Filipinas, Molucca, Nueva Guinea, el Palau, el nuevo Britian y las islas de Solomon (Nicolson, 1968). *Spathiphyllum* se coloca en la tribu Spathiphyllaeae y la subfamilia Monsteroideae (Bogner y Nicolson 1991; Mayo *et al.*, 1997). Los espatifilos se cultivan en jardinería, igual que el anturio (*Anthurium sp.*) y el filodendro (*Monstera sp.*), por la calidad de sus hojas y flores (Font Quer, 1979). Al inicio de

su vida la espata es de color blanco y al final se vuelve verdoso. Una de las especies ornamentales más populares es *Spathiphyllum wallisii* (Fig. 1).

2.2 Fotosíntesis

La fotosíntesis es la absorción de energía lumínica y su conversión a energía química (ATP) para la síntesis de compuestos orgánicos (fotosintatos), puede considerarse como un proceso de tres fases: a) La absorción de la luz y retención de energía lumínica, b) la conversión de energía lumínica en potencial químico y c) la estabilización y almacenaje del potencial químico en carbohidratos.

La fotosíntesis tiene lugar dentro de los cloroplastos que contienen las clorofilas, proteínas tilacoidales y compuestos enzimáticos necesarios para realizar las distintas reacciones de este proceso (Fig. 2). Cuando un quantum de luz golpea y es absorbido por una molécula de clorofila, la molécula se excita y un electrón se eleva a un nivel de energía mayor que el original; toda la energía absorbida es transferida a un aceptor de electrones. El aceptor se reduce químicamente y la energía que entra a la molécula de clorofila queda “atrapada” y se convierte en potencial químico. La fotosíntesis requiere la coordinación de una serie de procesos que se distribuyen por la estructura organizada de la membrana del cloroplasto (Bidwell, 2002).

Los organismos fotosintéticos atrapan la luz solar y forman ATP y NADPH que utilizan como fuentes de energía para fabricar glúcidos u otros componentes orgánicos a partir de CO₂ y H₂O (Nelson *et al.*, 2001). El proceso de fotosíntesis se divide en cuatro etapas:

- 1) Absorción de la luz, 2) transporte de electrones que conduce a la reducción del NADP+ a NADPH, 3) generación de ATP y 4) conversión del CO₂ en carbohidratos (fijación del carbono). La energía luminosa es atrapada primero en el PSII y los electrones son transferidos a un receptor; el hueco que dejan es reemplazado en el PSII por electrones procedentes de moléculas de agua, reacción que va acompañada de liberación de oxígeno.

Los electrones energéticos recorren una cadena de transporte que los conduce al PSI, y en el curso de este fenómeno se genera un ATP, rico en energía. La luz absorbida por el PSI pasa a su centro de reacción y los electrones energéticos son transferidos a su aceptor.

La membrana tilacoidal (Fig. 3) es responsable de la captación de la energía solar, gracias a la presencia de clorofilas y de otros pigmentos asociados con proteínas en unas estructuras funcionales que son los fotosistemas, y ATP-asa (Lodish *et al.*, 2001).

Las reacciones bioquímicas se realizan en el estroma de los cloroplastos, la energía almacenada en forma de ATP y NADPH₂ se usa para reducir el CO₂ a carbono orgánico. Esta función se lleva a cabo en el ciclo de Calvin. Cada vez que se recorre el ciclo entra una molécula de CO₂, inicialmente se combina con un azúcar de cinco carbonos llamada ribulosa 1,5-difosfato para formar dos moléculas de tres carbonos (3-fosfoglicerato), luego dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato se combinan para formar glucosa (Salisbury, 2004).

2.2.1 Fotosistema II (PSII)

El PSII consta de un complejo central de seis polipéptidos integrales, conectados entre sí de manera no covalente, éste contiene al centro de reacción P680. Todos estos polipéptidos son codificados por el genoma del cloroplasto. Dos de éstos polipéptidos, con pesos moleculares cercanos a los 33 kDa y 31 kDa, se conocen como D1 y D2, respectivamente y se unen de manera directa con el P680 y ciertas quinonas necesarias para la fotooxidación del agua. Asociados al complejo central del PSII y la interfaz lumen membrana se encuentran también tres polipéptidos extrínsecos codificados por genes del núcleo. Además de estos polipéptidos, el complejo central contiene 40 moléculas de clorofila *a*, varias moléculas de β-caroteno, algunos lípidos de membrana (sobre todo galactolípidos) cuatro iones magnesio (Mg²⁺), un ion hierro (Fe²⁺) unido de manera covalente, uno o más Ca²⁺, varios iones Cl⁻, dos moléculas de plastoquinona y dos moléculas de feofitina (Berg *et al.*, 2002).



Figura 1. *Spathiphyllum wallisii* Regel, Fuente, Instituto de Biología Kobenhavns Universitet. (<http://www.bi.ku.dk/tavler/thumb.asp?ID=574>).

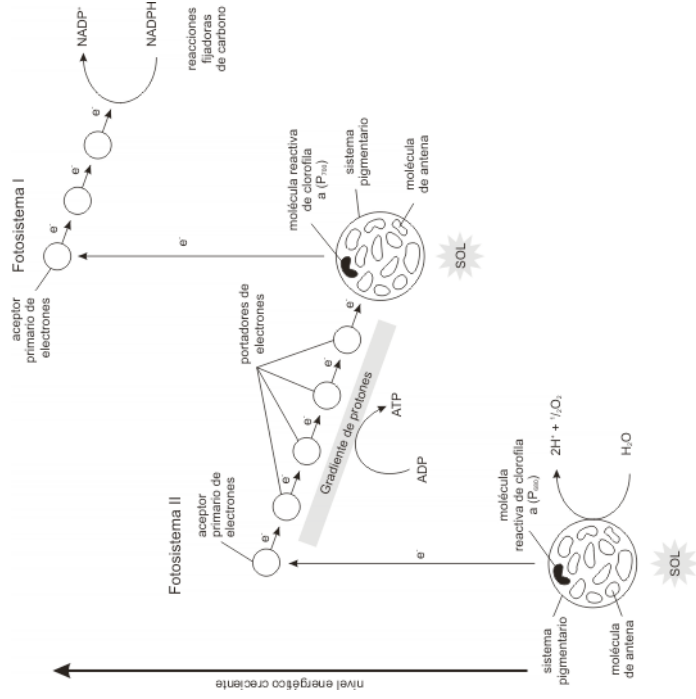


Figura 2. Esquema simplificado de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis (imagen modificada de Karp, 1998).

El P680 situado en el complejo central del PSII recibe energía luminosa por resonancia inductiva de un total aproximado de 250 moléculas de clorofila *a* y *b*, y de numerosas xantofilas. Estos pigmentos se presentan en el complejo del PSII (Fig. 4) que captura la luz, denominado LHCII (complejo colector de luz del fotosistema II) (Fig. 5). Cada pigmento se asocia con una proteína integral, 10 clorofilas y dos o tres xantofilas por cada molécula de proteína. Actúan como sistema colector “antena”, absorben luz y pasan energía al P680. El PSII utiliza energía luminosa para reducir plastoquinona (PQ) oxidada a su forma completamente reducida (PQH₂) y los electrones del agua (Mathews *et al.*, 2002).

2.2.2 Oxido reducción en la fotosíntesis

En la fotosíntesis suceden oxidaciones y reducciones químicas. El proceso global incluye la oxidación de agua (eliminación de electrones con liberación de O₂ como subproducto) y una reducción de CO₂ para formar compuestos orgánicos, como carbohidratos. La fotosíntesis utiliza energía luminosa para transportar los electrones del agua hacia un aceptor de electrones más débil, el CO₂. El cloroplasto tiene la función de reducir el CO₂. Una de las dos funciones esenciales de la luz en la fotosíntesis es impulsar los electrones provenientes del H₂O encargados de reducir el NADP⁺ a NADPH; la otra función es proporcionar energía con la que se forma el ATP a partir de ADP y Pi (Curtis *et al.*, 2000). El ATP se sintetiza en los cloroplastos sólo en presencia de luz en un proceso conocido como fotofosforilación; debido a esta dependencia por la luz, en las hojas se sintetiza mucho más ATP con la luz de día que con la fosforilación en las mitocondrias una misma hoja. La energía del ATP y NADPH se utiliza en el proceso de reducción de CO₂ y en la síntesis de carbohidratos, donde el ADP, Pi y NADP⁺ son liberados. Así, ADP y Pi son transformados rápidamente en ATP mediante la energía luminosa, mientras que el ATP se degrada con la misma rapidez cuando la fotosíntesis se efectúa a un ritmo constante (Salisbury, 2004).

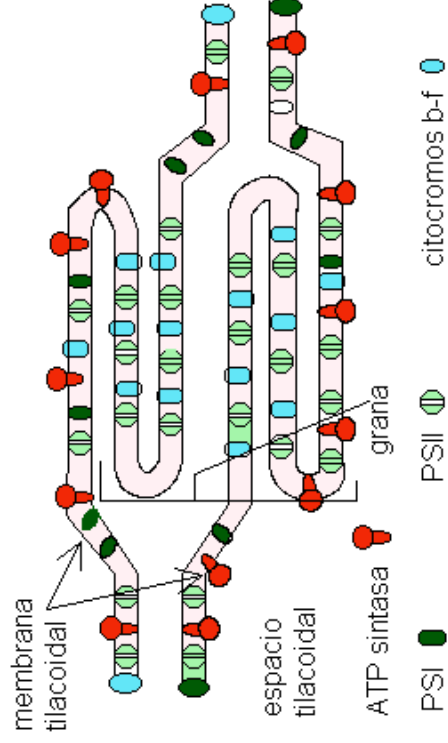


Figura 3. Distribución de las proteínas en membrana tilacoidal. El PSII se localiza principalmente en la grana, mientras que el fotosistema I (PSI) el complejo ATP-sintasa lo hace en contacto con el estroma. El citocromo b-f, tiene como función el transporte de los electrones desde el fotosistema II al I (Imagen adaptada de Lodish *et al.*, 2001).

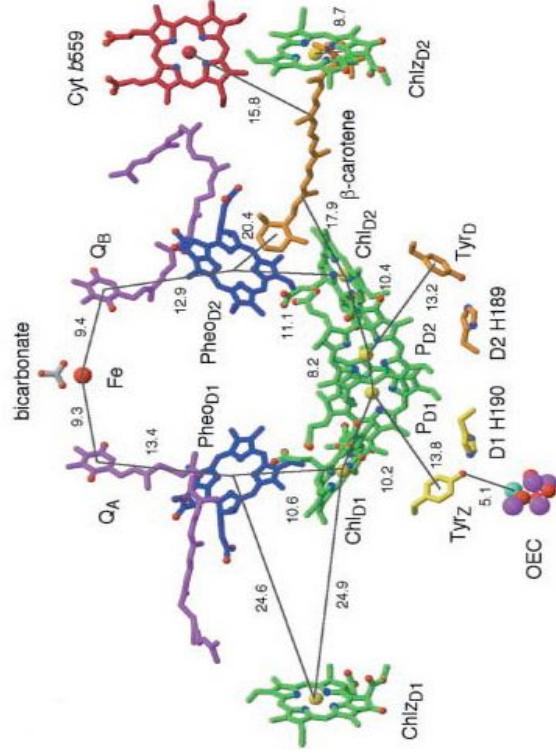


Figura 4. Estructura molecular del PSII. (Imagen de Berg *et al.*, 2002)

2.2.3 Absorción de la luz

La luz representa sólo la porción de la energía radiante con longitudes de onda (λ) visibles para el ojo humano (entre 390 a 760 nm). La energía de cada fotón es inversamente proporcional a la λ . Un principio fundamental de la absorción de la luz, conocido como ley de Stark Einstein, es que cualquier molécula sólo puede absorber un fotón a la vez, y que este fotón causa la excitación de sólo un electrón (Gilbert *et al.*, 2000; Salisbury, 2004).

Las clorofilas y otros pigmentos pueden permanecer en estado de excitación solo por períodos cortos. La energía de excitación se puede perder en su totalidad por la liberación de calor que se presenta cuando el electrón regresa a su estado basal. Después de ser excitado por un fotón de luz azul, el electrón de una clorofila siempre pierde su contenido energético al liberar calor, lo cual lo sitúa en un nivel energético menor; este nivel se alcanza con la luz roja de menor energía sin la pérdida de calor, cuando se absorbe un fotón de luz roja. Desde este nivel pueden presentarse la pérdida de calor, emisión de fluorescencia o fotosíntesis. Todas las moléculas de pigmentos de un fotosistema pueden absorber fotones, pero solo unas pocas moléculas de clorofila asociadas al centro de reacción fotoquímica están especializadas en traducir la energía luminosa en energía química. Las otras moléculas se denominan captadoras de luz o moléculas antena, que absorben energía luminosa y la transmiten rápida y eficientemente al centro de reacción (Curtis *et al.*, 2000).

Para la fotosíntesis se requiere que la energía de los electrones excitados de varios pigmentos se transfieran a un pigmento colector de energía en el centro de reacción. Las hojas de la mayoría de las especies absorben más del 90% de las λ del violeta y el azul que inciden en ellas, y un porcentaje casi tan elevado de las correspondientes al rojo y el anaranjado. Casi toda esta absorción la realizan los pigmentos del cloroplasto. En los tilacoides, cada fotón es capaz de excitar un electrón de un carotenoide o una clorofila. Las clorofilas son verdes ya que son ineficientes para absorber las longitudes de onda del verde, de modo que las reflejan o transmiten. Los carotenoides aparte de funcionar como pigmentos

colectores de luz que contribuyen a la fotosíntesis, protegen las clorofilas contra la destrucción oxidativa por el O₂ cuando los niveles de irradiancia son elevados. La asociación de clorofila *a* con las proteínas de los tilacoides produce picos de actividad adicionales en la región del rojo. Los que se presentan alrededor de los 680 y 700 nm, ya que se origina de moléculas de clorofila *a* situadas en ambientes químicos especiales y que actúan como pigmentos de los centros de reacción P680 y P700 (Salisbury, 2004).

2.2.4 Fluorescencias de la clorofila

Si un pigmento absorbe luz la energía puede: a) disiparse como calor, b) emitirse inmediatamente como una de λ más larga, fenómeno conocido como fluorescencia, c) dar lugar a una reacción química, como en la fotosíntesis. La clorofila solo desencadena una reacción química cuando se asocia con una proteína embebida en una membrana como las de los tilacoides de los cloroplastos (Salisbury, 2004).

La energía luminica es absorbida por una molécula de clorofila, si se altera temporalmente su configuración electrónica (estado excitado) puede emitir fluorescencia. Este estado es inestable y de corta duración ($<10^{-8}$ segundos). Por lo tanto, *in vivo*, la clorofila presenta cambios en el rendimiento fluorescente durante la exposición a la luz (Kautsky y Hirsch, 1931). Estos cambios se deben a que la clorofila forma parte de complejos de proteínas y pigmentos embebidos en la membrana tilacoidal, y transmiten la excitación energética a los centros de reacción de los fotosistemas I (P680) y fotosistema II (P700) donde se produce la conversión energética por separación de cargas (Zúñiga, 2003).

El estudio de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* proporciona información valiosa sobre el efecto logrado por los diferentes tipos de estrés en la fotosíntesis (Maxwell y Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001). Las técnicas se basan en inducir la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* en plantas en oscuridad y posteriormente iluminadas. La fluorescencia depende del estado de reducción de los aceptores primarios de electrones del

PSII. La emisión de fluorescencia presenta una curva característica, denominada efecto de Kautsky (Fig. 11), cuyos parámetros son utilizados en la interpretación del rendimiento cuántico del PSII (Kautsky, 1931, Fracheboud *et al.*, 1999; Maxwell y Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001). La emisión de fluorescencia procede de las moléculas de clorofila *a* asociadas con el PSII, éste es el sitio donde se produce la fotólisis del agua y la reducción de los transportadores electrónicos fotosintéticos. Gran parte de los estudios sobre emisión de luz fluorescente se ha centrado en la respuesta de ésta cuando la hoja es rápidamente iluminada, tras un período de adaptación a la oscuridad (Baker y Horton, 1987).

De acuerdo a Kautsky, cuando una hoja es iluminada con una intensidad de luz constante emitirá fluorescencia también constante. Sin embargo, si la hoja es mantenida en la oscuridad donde todos los componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentran oxidados y posteriormente es irradiada con luz continua, la fluorescencia aumenta rápidamente al nivel inicial o fluorescencia basal (F_o), característico de la apertura de los centros del PSII, se produce cuando la mayoría de los centros de reacción de PSII están abiertos, es decir cuando el aceptor primario Q_A está oxidado. Con la iluminación intensa, la emisión de fluorescencia aumenta en un corto tiempo (t_m) hasta un nivel máximo (F_m) y refleja un proceso en que los aceptores electrónicos primarios están reducidos. A partir de ese momento los electrones comienzan a fluir desde el aceptor primario Q_A hasta la plastoquinona. La emisión de la fluorescencia a partir de F_m esta asociada a procesos fotoquímicos, originados por la transformación de energía en los centros de reacción del PSII, y un proceso no fotoquímico que representa la emisión de calor (Zuñiga, 2003). A medida que la luz es absorbida y la separación de cargas tiene lugar, se produce el cierre de los centros y la reducción de Q_A , aumenta la fluorescencia hasta un nivel máximo (F_m), lo cual indica que Q_A se encuentra totalmente reducida. La fluorescencia variable (F_v) es la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal y se relaciona con la capacidad del PSII para reducir Q_A .

Al mantenerse la luz, los procesos fotosintéticos se activan, la cadena transportadora de electrones funciona y la energía es usada en la reducción del CO₂. En esta condición la emisión de fluorescencia disminuye paulatinamente y pasa por un segundo máximo (M), asociado con el inicio de la reducción del CO₂ en el ciclo de Calvin (Ireland *et al.*, 1984), hasta llegar a un nivel (T) cercano a F_o. La disminución de la fluorescencia más allá de su valor máximo responde a la activación de los procesos, relacionados con la transformación de la energía en el PSII y la cadena transportadora de electrones, coeficiente fotoquímico de amortiguamiento del inglés “quenching” (qP) y el coeficiente de “quenching” no fotoquímico (qNP). Este último representa los procesos que disipan la energía como calor o como energía de transferencia (Kautsky y Hirsch, 1931).

A temperatura ambiente (F_v) se origina casi exclusivamente del PSII, por lo que los cambios en fluorescencia reflejan primariamente el estado del PSII (Krause y Weise 1991). La fotoinhibición está relacionada con una disminución del rendimiento de F_v de la clorofila *a* del PSII, lo que se manifiesta en una disminución de F_v/F_m (Fracheboud *et al.*, 1999; Maxwell y Johnson, 2000). Se ha demostrado que el índice de F_v/F_m es proporcional al rendimiento cuántico de las reacciones fotoquímicas, en condiciones normales, la mayoría de las plantas sanas poseen un F_v/F_m óptimo, cercano a 0.83, y puede oscilar entre 0.7 y 0.85 (Björkman y Demming, 1987, Maxwell y Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001). Un descenso de F_v/F_m ha sido relacionado con una caída en el rendimiento fotónico óptimo de la fotosíntesis, mientras que la recuperación se asocia con un restablecimiento de F_v/F_m (Adams *et al.*, 1990). Cualquier proceso de estrés puede reflejar una disminución de F_v/F_m (Öquist, 1987).

2.2.5 Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco)

La ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) es la enzima responsable de la mayor parte de la conversión de CO₂ inorgánico en carbono orgánico. La enzima cataliza la primera reacción del ciclo de Calvin, el paso inicial de la asimilación

fotosintética (Ellis, 1979; Ferreira *et al.*, 2000). Rubisco es un heteropolímero con ocho subunidades grandes e idénticas, de unos 55 kDa, codificadas por un gen del cloroplasto y ocho subunidades pequeñas, idénticas de 14 kDa, codificadas por un gen nuclear, lo que hace un total de unos 560 kDa para la enzima completa. En cada subunidad existe un sitio activo que une los sustratos ribulosa cinco fosfato y CO₂ (Parry *et al.*, 2003).

Rubisco cataliza el primer paso en la fijación del CO₂, requiere pH 8 para el transporte de H⁺ del estroma hacia los canales tilacoidales, ATP y Mg²⁺ (Spreitzer y Salvucci, 2002). La Rubisco puede representar 50% del contenido proteico total del cloroplasto (Evans y Seeman, 1989). Por tanto, la degradación de la Rubisco, la movilización de sus aminoácidos y la reutilización de sus elementos durante la senescencia natural o inducida por alguna condición de estrés juegan un papel fundamental en el balance nutricional (Ferreira *et al.*, 2000; Murria, 2006). La biosíntesis de las subunidades grandes y pequeñas se lleva a cabo en forma regulada. En condiciones naturales, la biosíntesis de la Rubisco se lleva a cabo a nivel de la transcripción. También existe un control a nivel de estabilidad de los mRNAs cloroplásticos. Los transcritos del gen *rbcl* sufren una regulación redox dependiente de los periodos de luz y oscuridad. Así, en presencia de luz se promueve la degradación del mensajero de *rbcl*, y la inhibición del funcionamiento de la cadena fotosintética aumenta la estabilidad del mensajero (Salvador y Klein, 1999; Salvador *et al.*, 2004; Suay *et al.*, 2005).

La transición de oscuridad a luz provoca la activación de factores de elongación (Kim y Mullet, 2003) y el gradiente de protones actúa sobre los polisomas unidos a la membrana tilacoidal produciendo aumento en la síntesis de la Rubisco (Muhlbauer y Eichacker, 1999).

2.3 Ontogenia y tipos de plastidios

Los plastidios son organelos subcelulares característicos de células eucarióticas de las plantas. Tienen forma y tamaño variados, están envueltos por una doble membrana y se forman a partir de proplastidios, que son los plastidios de células jóvenes.

Los plastidios se clasifican en diferentes maneras. Los proplastos son heredados por las células meristemáticas; luego los proplastidios se dividen y diferencian en diferentes tipos (Fig. 6). Hay plastidios con pigmentos (cloroplastos, gerontoplastos y cromoplastos) y sin pigmentos (leucoplastos, amiloplastos, etioplastos). Los plastidios son organelos que pueden diferenciarse en un tipo u otro dependiendo de las condiciones de luz, hormonales y de desarrollo del tejido o la planta (Rost *et al.*, 1997), con excepción de la conversión de gerontoplasto a cloroplastos reverdecidos por efecto de BAP (Zavaleta *et al.*, 1999).

Los cloroplastos se desarrollan a partir de plastidios, en presencia de luz. El proplastidio sintetiza enzimas y proteínas que promueven la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos. Las membranas se desarrollan y ensamblan en grana tilacoides, mientras otras regiones quedan sin apilamientos del grana (Taiz y Zeiger, 2002). Los cloroplastos senescentes son amarillos por la disminución de clorofila y la presencia de carotenoides, reciben el nombre de gerontoplastos (Strasburger, 1994). Los etioplastos se forman a partir de los proplastos en plantas cultivadas en la oscuridad, los tilacoides se disponen formando un cuerpo prolamelar, semicristalino formado con un 70% de proteína protoclorofilide oxidoreductasa POR-A, esta enzima cataliza el único paso dependiente de luz en la síntesis de clorofila en las plantas superiores (Griffiths *et al.*, 1985; Barthélemy *et al.*, 2000).

2.3.1 Cromoplastos

En Angiospermas surgió un cambio evolutivo, la aparición de los cromoplastos, con la propiedad de almacenar pigmentos, como carotenoides: caroteno (amarillo o anaranjado), licopina (rojo), xantofila (amarillento), la transformación se produce por síntesis y localización de pigmentos no verdes en membranas o en vesículas. La conversión de cloroplastos a cromoplastos ocurre normalmente con la maduración de frutos, como el tomate y la naranja. Se desconoce si la diferenciación de un cromoplasto es un fenómeno irreversible; en la parte superior de raíces de zanahoria o tubérculos de papas expuestas a la luz, los cromoplastos

pueden diferenciarse en cloroplastos con la pérdida de los pigmentos y desarrollo de los tilacoides (Ravishankar *et al.*, 2007). Hay cuatro categorías de cromoplastos según su estructura: 1) globulosos: los pigmentos se acumulan en gotas junto con lípidos, 2) fibrilares o tubulosos: los pigmentos se asocian con fibrillas proteicas, 3) cristalosos: los pigmentos se depositan como cristaloides asociados con membranas tilacoides y 4) membranosos: con membranas enrolladas helicoidalmente (Strasburger, 1994).

2.3.2 Cloroplastos

Los cloroplastos se desarrollan en presencia de luz, a partir de protoplastidios. Tienen forma de gránulos (entre 3 y 6 μm), limitados exteriormente por una doble membrana e internamente se diferencian en dos componentes: un sistema de membranas tilacoidales y el estroma. Este último está compuesto por proteínas, contiene ARN y ADN concentrado en nucleoides. Cada cloroplasto presenta varios nucleoides con 2 a 5 moléculas circulares de ADN, fijadas a la membrana. El sistema de membranas consiste de bolsas aplanadas llamadas tilacoides, que se originan de la membrana interna. Su nivel de desarrollo varía, en plantas superiores están diferenciados en grana-tilacoides.

La clorofila, es el pigmento fotosintéticamente activo generalmente asociado con pigmentos carotenoides, está localizada en las membranas tilacoides; en los grana en unos gránulos que se denominan quantosomas, considerados como las unidades morfológicas de la fotosíntesis. En el estroma se son sintetizados los carbohidratos, así como algunos ácidos grasos y proteínas (Strasburger, 1994). Las moléculas de clorofila, que absorben luz para llevar a cabo la fotosíntesis, están unidas a las proteínas de los complejos captadores de luz, PSI y PSII de los tilacoides. La energía luminosa capturada es transformada en ATP por reacciones químicas que tienen lugar en los grana. Los cloroplastos también contienen gránulos pequeños de almidón donde se almacenan productos de la fotosíntesis de forma temporal (Buchanan *et al.*, 2000).

2.3.3 Plastidios envejecidos (gerontoplastos)

Los cloroplastos son los primeros organelos en mostrar síntomas de senescencia. Durante ésta etapa empiezan a envejecer y son llamados gerontoplastos, tienen pigmentos abundantes, xantofilas y carotenoides, que les confieren el color amarillo, característico de las hojas senescentes. Los cloroplastos senescentes, según varios autores, carecen de capacidad biosintética y pierden su ADN (Biswal y Biswal, 1999; Buchanan *et al.*, 2000). Se ha demostrado que el cloroplasto tiene toda la maquinaria bioquímica para su autodestrucción. Conforme transcurre la senescencia, disminuyen su tamaño y aparecen los glóbulos osmiofílicos, los que aumentan en diámetro y número, los grana tilacoides pierden su orientación y los tilacoides se dilatan; hay pérdida de polisomas, ribosomas y granos de almidón. Estos cambios estructurales están asociados con la caída de la tasa fotosintética; además, cesa la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y disminuye el transporte de electrones (Waz *et al.*, 2001; Biswal *et al.*, 2003; Martínez, 2008)

2.4 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos más abundantes son la clorofila *a* (Chl *a*) y clorofila *b* (Chl *b*). También se presentan pigmentos amarillos y anaranjados que se clasifican como carotenoides. Hay dos tipos de carotenoides: los carotenos que son hidrocarburos puros, y las xantofilas que contienen oxígeno. Los pigmentos involucrados en la fotosíntesis son capaces de efectuar ciertas reacciones aunque se hayan extraído del cloroplasto. Pueden absorber luz y fluorescer, es decir, emiten la energía lumínica absorbida como luz pero de longitud de onda más larga (de menor energía). Las soluciones de clorofila fluorescen y emite un color rojo oscuro (Bidwell, 2002).

Las clorofilas *a* y *b* (Fig. 8) se distinguen sólo en un grupo funcional (-CH₃ en Chl *a*, y -COO⁻ en Chl *b*). La zona que capta la luz es la estructura anular aplanada, que se asemeja a un *hemo*, contiene un átomo de magnesio en vez de hierro (Starr, 2008). Las

clorofilas tienen dos picos de absorción en el espectro de luz visible, uno en el azul (400 a 500 nm), y otro en la zona roja (600 a 700 nm); por lo que, reflejan la parte media del espectro, correspondiente al color verde (500 a 600 nm). La Chl *a* se encuentra vinculada al centro activo de los complejos moleculares, llamados fotosistemas, que absorben la luz durante la fotosíntesis (Salisbury, 1994). La clorofila puede existir en diferentes estados (dímero, oligómero o micela) dependiendo del entorno (Ei-Ichiro *et al.*, 1985).

2.4.1 Enverdecimiento

En plantas, la luz constituye una señal y un disparador ambiental importante para la producción de cloroplastos fotosintéticos activos. Se requiere luz para la síntesis de clorofila a través de la reducción de protoclorofiliide a clorofiliide. A través de la síntesis de clorofila en los cloroplastos las plantas se tornan verdes. Diversos estudios de enverdecimiento establecen marcadores variados para el desarrollo funcional del complejo fotosintético (Marder *et al.*, 1998). Los precursores de la clorofila y productos de degradación son sensibles a la luz. Esto interviene en el metabolismo del pigmento durante la síntesis y desmantelamiento del aparato fotosintético. En la célula verde, el papel estructural de la clorofila y la necesidad de llevar a cabo sus tendencias fotodinámicas son inseparables. La biosíntesis de clorofila se relaciona directamente con la expresión de genes de las proteínas de los plastidios, particularmente en el nivel post-transcripcional (Howard, 1996). El proceso de formación de membranas del tilacoide durante el enverdecimiento ocurre de manera secuencial con la aparición del PSI, seguida del PSII, los transportadores de electrones intermembranales y finalmente el ensamblaje del LHCII y LHCI (Guseinova *et al.*, 2000).

2.4.1 Biosíntesis de clorofila

La clorofila es sintetizada en el cloroplasto. La biosíntesis de clorofila (Fig. 9) está directamente influenciada por la expresión de genes para las proteínas de los plastidios,

particularmente en el nivel post-transcripcional (Howard, 1996). La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes: un anillo de porfirina sustituida con pequeños grupos enlazados, sustituyentes y una cadena larga llamada fitol. El anillo de porfirina es un tetrapirrol con cuatro anillos pentagonales de pirrol enlazados para formar un anillo conjugado de dobles enlaces, que interviene en la absorción de la luz, función primordial en la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2002). La clorofila tiene el potencial para diversos mecanismos de reacción en la absorción lumínica. Los pigmentos porfirinicos requieren luz para su síntesis. El último paso en la síntesis de clorofila, la reducción de la protoclorofila a clorofila, se lleva a cabo a expensas de energía lumínica absorbida por la propia molécula de protoclorofila (Bidwell, 2002).

La biosíntesis de las clorofilas es un proceso complejo, desconocido todavía parcialmente. Sin embargo, diversos estudios sobre el metabolismo del grupo hemo de las clorofilas y la biosíntesis de porfirinas han aportado información importante. En la primera fase, el aminoácido glutámico, sintetizado a partir del esqueleto del 2-oxoglutarato (2-OGA), es convertido en ácido δ -aminolevulínico (5-ALA) para la síntesis de clorofila. A partir de ahí, varias fases metabólicas son requeridas para la formación de los cuatro anillos que forman los tetrapirroles. La presencia de luz es necesaria durante la producción de la protoporfirina IX y los tetrapirroles. Otras enzimas de los cloroplastos pueden insertar en el centro del tetrapirrol ya sea Mg^{2+} para iniciar la síntesis de clorofila, o bien Fe^{2+} para la síntesis de grupos hemo. La protoporfirina IX puede ser exportada del cloroplasto hacia la mitocondria, donde es utilizada para producir citocromos. Esta ruta biosintética es también importante porque los grupos hemo son sustrato para la síntesis del fitocromo, una molécula fotosensible esencial para la fotomorfogénesis. Por lo tanto, los productos de los tetrapirroles están involucrados tanto en la fotosíntesis (clorofilas y citocromos en los cloroplastos), como en la respiración (citocromos en las mitocondrias) y (fitocromo) en el desarrollo de la planta (Hans-Walter, 1997, Kannangara y Gough, 1978, Beale, 1999).

2.5 Senescencia foliar

La senescencia foliar es el último estadio en el desarrollo ontogénico de una hoja. El síntoma característico es el amarillamiento como resultado de la degradación de clorofilas (Hall, 1977) y la disminución de la actividad fotosintética (Thomas y Stoddart, 1980). El proceso de senescencia foliar puede ser dividido en dos etapas: la primera es un período de redistribución de nutrientes que implica la degradación de los cloroplastos y la exportación del N y otros nutrientes hacia otros órganos y la segunda un proceso final de muerte celular una vez que la redistribución de nutrientes ha sido completada (Guiamet, 2004). La existencia de genes asociados a la senescencia provee la evidencia más directa de que la senescencia de la hoja es regulada genéticamente (Smart, 1994, Buchanan *et al.*, 2000). La senescencia de las plantas es una serie ordenada de procesos bioquímicos. Los cloroplastos son los primeros organelos en degradarse. Las clorofilas y las proteínas del tilacoide se degradan coordinadamente, en contraste los núcleos permanecen estructuralmente y funcionalmente intactos (Taiz y Zeiger, 2002). El nivel de mRNAs declina significativamente durante la fase de la senescencia. Los genes SDGs (senescence down-regulated genes) reducen su expresión. Los SDGs codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis; entre ellos se encuentran al gen CAB que codifica para la LHCP-II y el gen SSU para la subunidad pequeña de la Rubisco (Yoshida, 2003). La expresión de diversos genes es inducida durante la senescencia de flores y hojas, entre estos genes se encuentran los SAGs (senescence associated genes) que codifican para enzimas degradadoras (proteasas, ribonucleasas y lipasas), así como para enzimas relacionadas con la producción de etileno (ACC-sintasa y la ACC-oxidasa). La expresión de genes SAGs en células de las hojas parece requerirse para que inicie el envejecimiento. Otra clase de genes SAGs durante la senescencia tiene la función de codificar enzimas encargadas de la conversión o movilización de residuos, y son responsables de reciclar el nitrógeno (Weaver y Amasino, 2001; Taiz y Zeiger, 2002). Los procesos degradativos son complejos y comienzan antes de que se manifieste externamente

la fase de senescencia (Crafts-Brandner *et al.*, 1984). La degradación de proteínas se relaciona con el envejecimiento; su concentración disminuye a medida que progresa la senescencia (Thomas y Stoddart, 1980). La degradación de lípidos puede tener un papel en la regulación y progresión de la senescencia dependiente de la edad. Respecto a los ácidos nucleicos, el nivel de DNA total permanece relativamente constante, mientras que los RNAm y RNAr decrecen (Yoshida, 2003). La senescencia y la muerte celular programada son esenciales en el desarrollo de la planta. A partir de la senescencia se producen enzimas hidrolíticas, las cuales degradan proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. El proceso por el que las células individuales activan un programa intrínseco de senescencia se llama muerte celular programada del inglés “programmed cell death, PCD”. Éste puede iniciarse por señales específicas como errores en la replicación del DNA durante la división celular e implica la expresión de algunas características genéticas (Doom, 2005).

2.5.1 Senescencia foliar en aráceas

La espata es una hoja modificada que rodea la inflorescencia y tiene un patrón de senescencia diferente al de las hojas verdes normales de la planta. A diferencia de las hojas verdes, el hipsofilo o espata de algunas aráceas se torna verde. Una de las especies más estudiadas es *Zantedeschia aethiopica* L. Durante el desarrollo del fruto la senescencia de la espata es inhibida y esta reverdece antes de morir (Tavares *et al.*, 1998). Durante el desarrollo de la espata ocurren cambios en los cloroplastos y en los peroxisomas. Algunas evidencias sugieren que durante la formación de la espata blanca los peroxisomas se diferencian en glyoxysomas y los cloroplastos en amiloplastos. El reverdecimiento es seguido por la reestructuración de cloroplastos y de peroxisomas, y resulta en la re-adquisición de capacidades fotosintéticas y fotorespiración (Barbeta *et al.*, 2004).

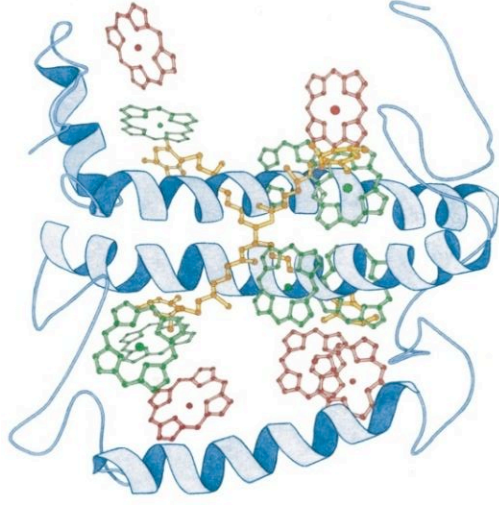


Figura 5. Las clorofilas están asociadas a proteínas específicas, formando los complejos de captura de luz (LHC). La estructura de un complejo LHC muestra que la unidad funcional es un trímero, con 36 moléculas de clorofila y 6 del pigmento accesorio, la luteína. En un monómero hay 3 segmentos α helicoidales transmembrana, 7 moléculas de clorofila *a* (verde), 5 de clorofila *b* (rojo) y dos moléculas de luteína (amarilla) (Imagen de Buchanan *et al.*, 2000).

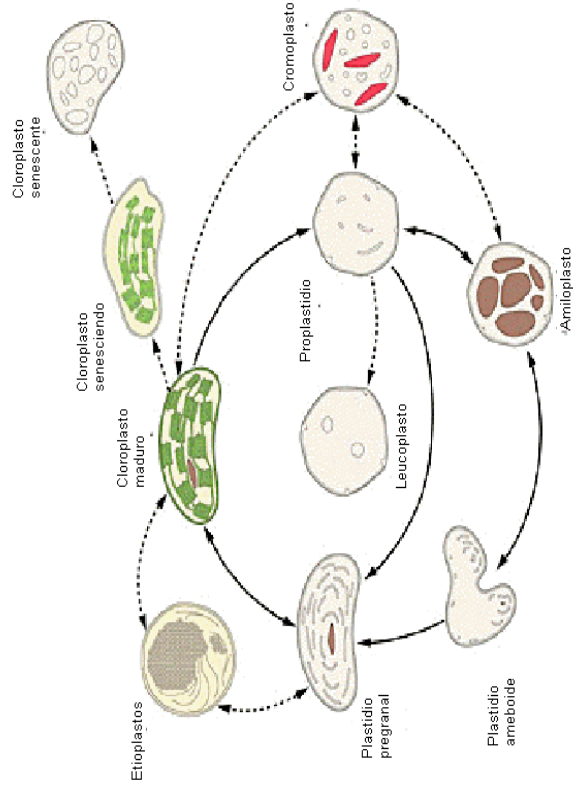


Figura 6. Diferenciación del plastidios (Buchanan *et al.*, 2000)

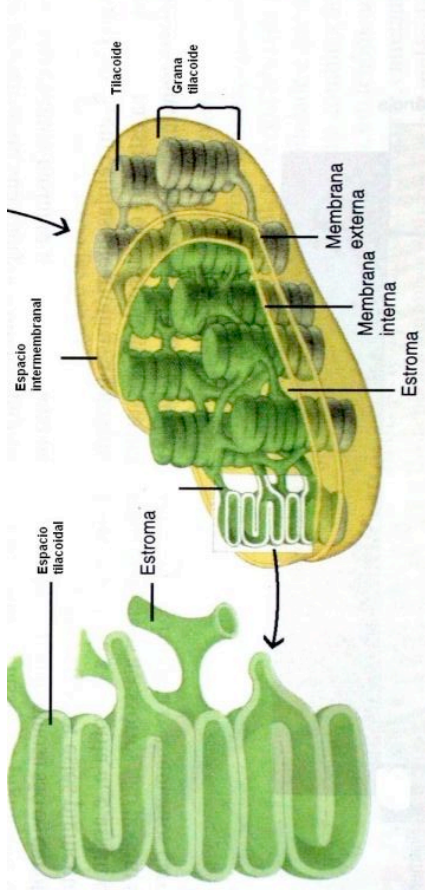


Figura 7. Estructura del cloroplasto. (Imagen modificada de Curtis *et al.*, 2000)

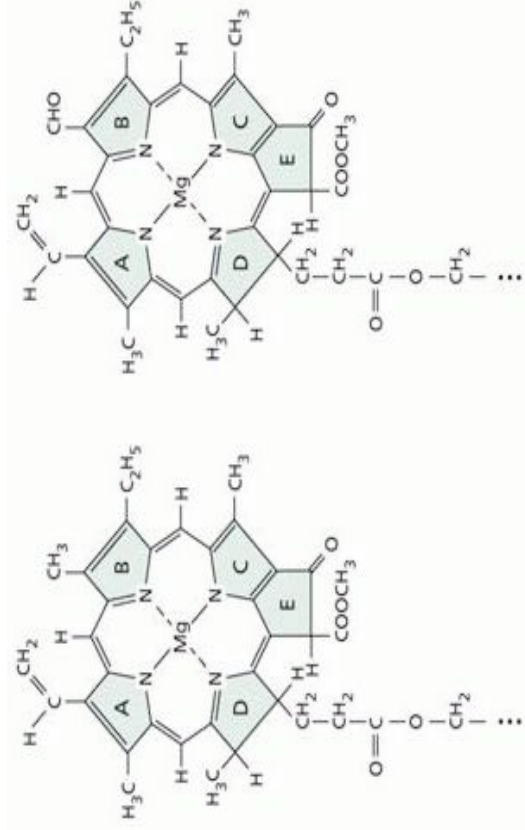


Figura 8. Molécula de Chl *a* con un grupo funcional -CH₃, y Chl *b* con un -COO (Grimm, 2001).

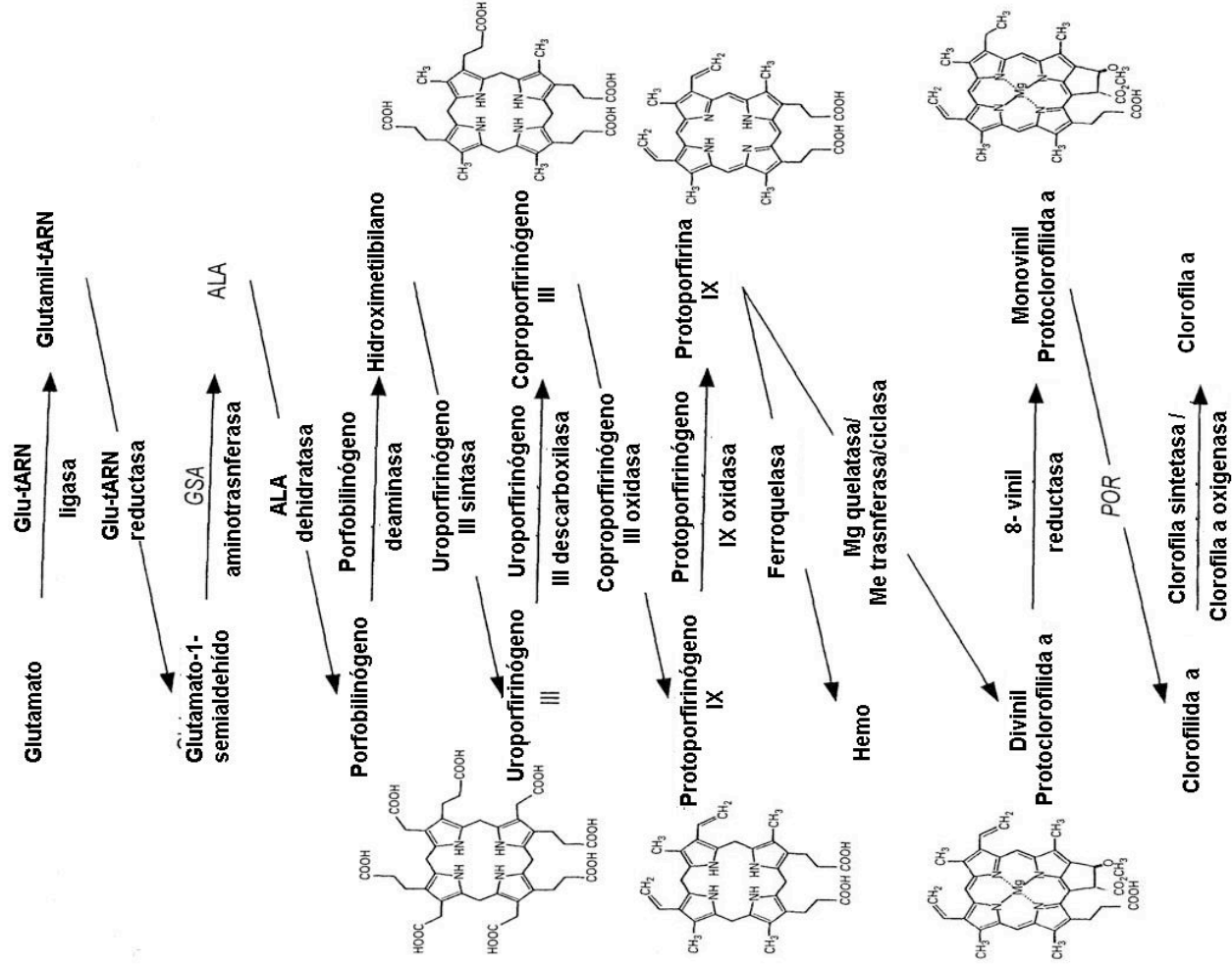


Figura 9. Ruta 5 de la biosíntesis de clorofila (Imagen modificada de Howard, 1997)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el enverdecimiento de la espata de *Spathiphyllum wallisii* mediante el análisis de los cambios en pigmentos, la proteína LSU de Rubisco y totales así como la fluorescencia de la clorofila durante el desarrollo para conocer la capacidad fotosintética y su posible función.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir los cambios en los contenidos de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, Chl *b*, $c+x$) durante el desarrollo de la espata mediante cuantificación química.
- Cuantificar las proteínas solubles totales y LSU Rubisco durante el desarrollo de la espata mediante electroforesis SDS-PAGE y espectrofotometría.
- Evaluar la actividad fotosintética durante el desarrollo de la espata, mediante la medición de la fluorescencia (F_o , F_v , F_m , F_v/F_m) de la clorofila.
- Estudiar la distribución y acumulación de la clorofila en el mesófilo de la espata usando microscopia de epifluorescencia.

4. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

4.1 HIPOTÉISIS

El enverdecimiento de la espata de *Spathiphyllum wallisii* durante la última etapa de su asociado a la acumulación de clorofilas, la proteína LSU Rubisco y totales, así como con el incremento de la actividad fotosintética para proveer fotosintatos en el desarrollo de frutos.

4.2 JUSTIFICACIÓN

Existe poca información del proceso de enverdecimiento de la espata de la planta de ornato *Spathiphyllum sp.*, por lo que el conocimiento de su desarrollo y fisiología puede contribuir al mejoramiento de la producción y calidad del cultivo y en consecuencia en su valor comercial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Se adquirieron 50 plantas *Spathiphyllum wallisii* var. Chopin, con una altura entre 20 y 30 cm y con dos inflorescencias en desarrollo por planta. Las plantas se obtuvieron de un invernadero comercial de Xochimilco, D.F., México. Las plantas fueron cultivadas individualmente en maceta con tamaño aproximado de 30 cm de diámetro conteniendo una mezcla (1:1:1 suelo, hojarasca, peat most).

Se colocaron en un arreglo aleatorio en una cámara con ambiente controlado, a temperatura mínima de $20^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante la noche y máxima de $26^{\circ}\text{C}\pm 3$ en el día, con fotoperíodo de 14 h luz y 10 de oscuridad. La iluminación fue de $59 \text{ mmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ PAR, generada con lámparas de tubo fluorescentes.

5.1.1 Monitoreo del enverdecimiento

Debido a que el enverdecimiento en ésta especie es heterogéneo entre los individuos, se consideró conveniente realizar un monitoreo de la maduración y enverdecimiento de las espatas durante 8 semanas para determinar las etapas de muestreo. El primer cambio morfológico observado en la inflorescencia fue la emergencia y apertura de estambres. La espata inicialmente blanca comenzó a presentar zonas pequeñas de color verde entre la primera y segunda semana, lo que indicó el inicio del proceso de enverdecimiento, que culminaría con la maduración de la inflorescencia e inicio del desarrollo del fruto. La espata alcanzó un color verde similar al de las hojas del follaje, posteriormente se secó y murió. Se registraron los cambios en color y pigmentos de acuerdo con los métodos descritos en los apartados 5.1.2, 5.2 y 5.3.

5.1.2 Determinación de las etapas de enverdecimiento

Para determinar las etapas de enverdecimiento se usó un medidor de clorofila portátil (SPAD-meter 502, Minolta), con el cual se mide en unidades relativas de SPAD el verdor de la planta. Con base en las unidades SPAD de la espata fueron identificadas tres etapas de enverdecimiento, éstas fueron: E1, con 5 a 10 unidades SPAD, E2 15 a 20 y E3 con 25 a 30 unidades; además, se utilizaron espatas blancas (B) en las que el SPAD no detecto verdor y hojas verdes del follaje (V) como testigo con un rango de 40 a 60 unidades SPAD.

Se utilizaron espatas de 10 plantas para los análisis no destructivos, estos incluyeron la cuantificación del color verde, relativo en unidades SPAD, y la cuantificación de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila, durante el enverdecimiento. Se usaron 20 plantas para los análisis destructivos, estos incluyeron la extracción de pigmentos y proteínas solubles; además de medir fluorescencia y verdor con el SPAD, cuando las espatas presentaron las características de cada una de las etapas se tomaron muestras para los análisis destructivos.

La espata fue dividida en cuatro segmentos desde su zona central (Fig. 10), de cada segmento se extrajo material para los análisis de: a) Pigmentos fotosintéticos, b) proteínas y c) histolocalización. Las muestras se fueron tomando conforme las espatas presentaban las características establecidas para cada etapa.

5.2 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Se utilizaron cinco espatas de cada muestra (V, B, E1, E2 y E3), de los diferentes segmentos se separaron discos de 1 cm de diámetro con un sacabocados; los discos se pesaron y maceraron con 3 mL de acetona al 80 % en agua (80:20, v:v). Los extractos se centrifugaron durante 10 min en una centrifuga clínica. La absorbancia del sobrenadante se midió con tres longitudes de onda, 470 nm, 646 nm y 663 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, Genesys^{TM6} Thermo Scientific, para calcular las concentraciones de Chl a, Chl b,

xantofilas y carotenoides (x+c). Los resultados de las absorbancias se sustituyeron en la igualdad propuesta por Lichtenthaler y Wellburn (1987).

$$\text{Chl } a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl } b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides}_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 3.27 \text{ Chl } a - 107 \text{ Chl } b}{229}$$

Los valores calculados en $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ fueron expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco (PF).

5.3 Verdor de la espata (SPAD-meter Minolta)

Para dar un seguimiento a los cambios en la cantidad de clorofilas sin destruir las muestras se utilizó un SPAD-meter, Minolta Japón; con él se determina la cantidad relativa de clorofilas en la hoja, la medición la hace con la absorbancia en dos longitudes de onda (Fig. 11), en el rojo y cerca de la región del infrarrojo. El SPAD calcula un valor numérico en unidades SPAD, con los datos de las dos transmitancias, que indica la cantidad relativa de clorofila de la hoja.

La calibración del SPAD se realizó para obtener la equivalencia de las unidades SPAD con el contenido de clorofila cuantificado por método espectrofotométrico. Para esto las lecturas se efectuaron en 10 espatas durante su madurez, de ellas se obtuvieron en total 30 muestras de tejido con una gama de valores SPAD, entre 0 y 35. Además, de cada espata se extrajo la clorofila y fue cuantificada por el método espectrofotométrico. Con los datos se realizó una correlación de unidades SPAD y clorofilas totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$) para expresar las unidades SPAD en $\mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$.

5.4 Proteínas solubles totales

Se tomó 0.1g de tejido fresco, de la parte media de la espata (cuatro repeticiones por etapa). Las muestras se maceraron con 500 μ L de un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 (1 mM de DTT, 0.1 mM de EDTA, y 12.5% de glicerol). El extracto se centrifugó a 4500 g durante 10 min en una centrifuga mini spin plus para tubos tipo eppendorf. Del extracto de proteínas se agregó una alícuota de 100 μ L, a 100 μ L de un amortiguador Tris HCl 50 mM a pH 6.8 (SDS 1%, 2-mercaptoetanol 2% y 12.5% de glicerol). La mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 min para desnaturalizar la proteína. La concentración de proteínas solubles totales se midió con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) U.S.A. a 280 nm.

5.5 Cuantificación de Rubisco

Con los datos de la concentración de proteínas solubles totales se realizaron cálculos para determinar el volumen de cada muestra que sería usado para conocer su composición por electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). El gel se preparó en una cámara vertical (Mini-Potest II Cell, Bio Rad). Se hizo un gel separador al 12 % de poli(acrilamida) (3.4 mL de agua desionizada, 4 mL bis-acrilamida al 30 %, 2.5 mL Tris HCl 1.5M a pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10 %, 10 μ L de APS al 10 %, y 10 μ L de TEMED) y otro gel de apilamiento al 4 % (6.1 mL de agua desionizada, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30 %, 2.5 mL de Tris HCl 0.5M a pH 6.8, 0.1 mL de SDS al 10 %, 10 μ L de APS al 10 %, y 10 μ L de TEMED); en el primer carril se agregó un marcador de peso molecular de bajo rango (104, 83, 49, 37 y 29 KDa), los demás carriles se cargaron con 50 μ g de proteína, en el siguiente orden: segundo carril proteínas de la hoja verde del follaje (V), carril tres proteínas de la espata blanca y en los siguientes carriles las etapas de enverdeamiento (E1, E2 Y E3), en el último carril se incluyó un estándar de la subunidad grande de la Rubisco LSU de espinaca (55 KDa) de la compañía Sigma; el gel se corrió a 20 mA, por 1.2 h, para lo que fue usada

una fuente de poder (Power Pac 3000, Bio Rad). El gel se tiñó sumergiéndolo en una solución con azul de Comassie (ácido acético glacial 40 %, metanol 60 % y azul de Comassie brillante 0.5 %, v:v:p) durante 30 min, en agitación. Finalmente, el gel se destiñó con tres lavados de una solución ácida (ácido acético al 7 % y metanol al 20 %), por 30 min cada vez. Las bandas de proteína de 55 kDa identificadas como la subunidad grande de Rubisco (LSU), se cuantificaron en unidades de densidad óptica por mm² (UDO), con un programa de análisis (Quantity One 42.1, Bio Rad) proporcionado por el laboratorio de Bioquímica Vegetal del Postgrado de Química de la UNAM.

5.6 Actividad fotosintética por fluorescencia

La fluorescencia de la clorofila y sus parámetros fueron cuantificados con un medidor de actividad fotosintética por fluorescencia “Plant Efficiency Analyser” (PEA, Hansatech Instruments), que permite obtener cinéticas de inducción de la fluorescencia de una muestra iluminada intensamente tras un periodo de oscuridad (Kautsky effect).

A cada espata se le colocó una pinza (aditamento del PEA) para mantener en oscuridad un área aproximadamente de 1 cm², durante 15 min, posteriormente a esa área se le dio un pulso de luz de 650 nm. El equipo proporcionó la medida de emisión fluorescencia basal (F_o), variable (F_v), máxima (F_m), índice F_v/F_m y tiempo en que se alcanza la fluorescencia máxima (t_m). Se realizaron mediciones a 10 espatas cada 8 días entre las 12 y 15 h del día.

5.7 Microscopía de epifluorescencia

Para observar la distribución de la clorofila durante el enverdecimiento de las hojas del follaje (V), espatas blancas (B), y etapas en el proceso de enverdecimiento (E1, E2 Y E3), se realizaron cortes transversales en el tejido fresco con un micrótopo manual. Se utilizó la zona central de la espata (cuatro repeticiones por cada una de las tres etapas de

enverdecimiento seleccionadas), los cortes frescos se montaron en un portaobjetos con glicerol. Para identificar la distribución de la clorofila en el mesófilo de las espatas blancas y enverdecidas se utilizó el filtro rojo del microscopio de epifluorescencia (Axioscop 2 Plus, Zeiss-Alemania) el filtro genera excitación de las moléculas con 430 a 450 nm y emisión de 550 a 685 nm, la emisión en rojo indica presencia de clorofila.

5.8 Diseño experimental y análisis estadísticos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con número de repeticiones variables (4-10) para cada grupo de evaluaciones. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5. La calibración del SPAD-meter se realizó con una correlación simple: para pigmentos y proteínas se aplicó un análisis de varianza ANOVA, comparación de medias Tukey con un nivel de confianza del 95% para detectar diferencias significativas en la concentración de proteínas y pigmentos entre las etapas de desarrollo estudiadas (B, E1, E2, E3).

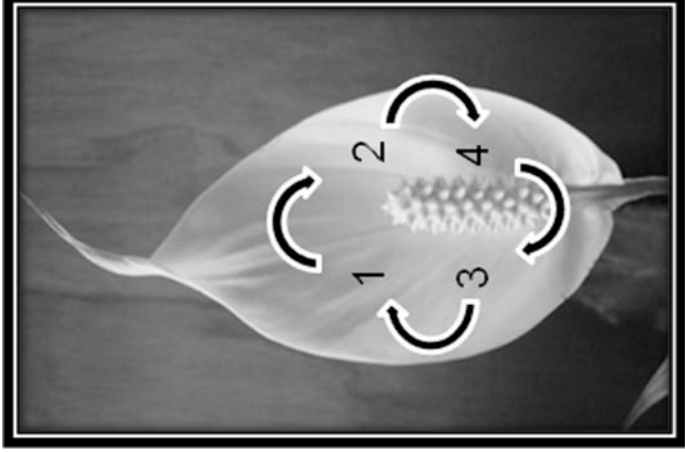


Figura 10. Cada espata se dividió en 4 segmentos, para realizar los diversos análisis se tomo cada uno de los segmentos de diferentes espatas para obtener una muestra representativa de toda la espata.

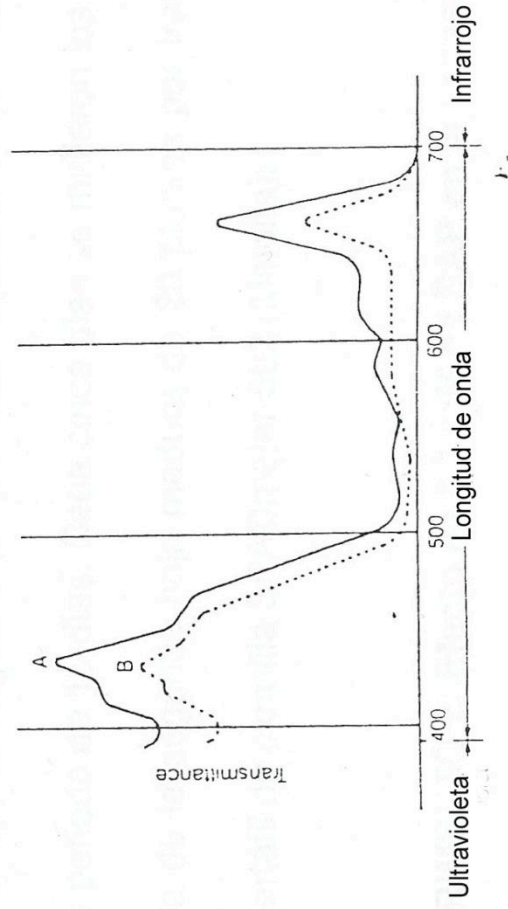


Figura 11. Espectro de absorbancia de la clorofila
(Manual del usuario SPAD meter 502).

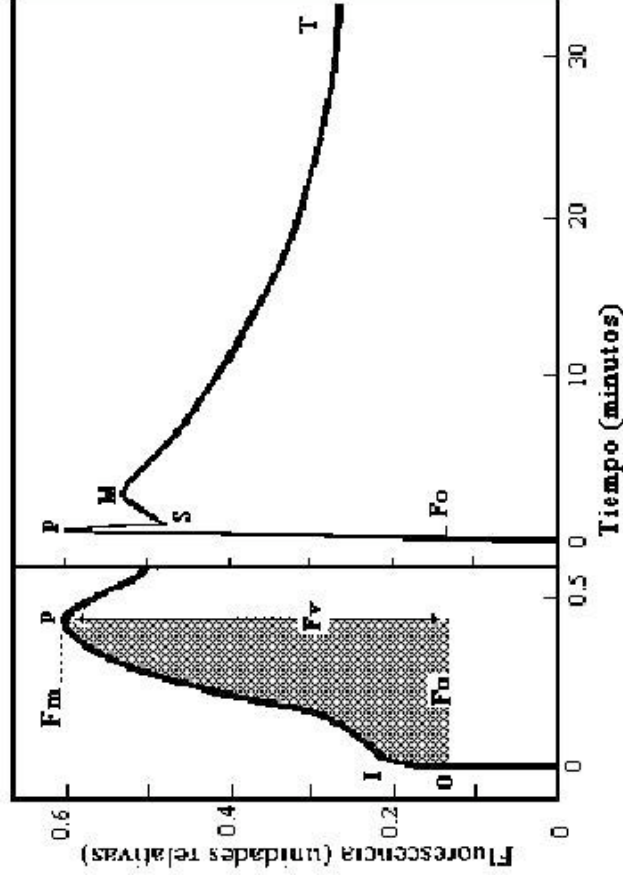


Figura 12. Efecto Kautsky. Curva de emisión de fluorescencia de hojas mantenidas previamente en la oscuridad. Estas muestran que la emisión de fluorescencia varía en función del tiempo de manera compleja. En el momento de la iluminación, la fluorescencia aumenta casi instantáneamente hasta un nivel inicial (F_0) luego aumenta rápidamente a un nivel máximo (F_m). Finalmente la emisión de fluorescencia disminuye lentamente a un estado estacionario (T). Los cambios de la intensidad de la fluorescencia observados durante la transición oscuridad/luz son función de la activación de los procesos fotosintéticos (Zuñiga, 2003).

6. RESULTADOS

6.1 Etapas de enverdecimiento

El enverdecimiento de *Spathiphyllum* coincidió con la antesis de la espata, se observó en la inflorescencia la exposición de los estambres, y a partir de este proceso las espatas comenzaron a enverdecer. La cuantificación de unidades relativas de clorofila con el SPAD se realizó en tres regiones de la espata (ápice, media y base) permitió reconocer que las espatas presentaron un patrón diferente de enverdecimiento entre regiones (Fig. 13).

Con base en los resultados del contenido de clorofila la zona central de la espata fue identificada como la más representativa, pues presentó un enverdecimiento uniforme dentro del grupo evaluado. El ápice de la espata es la zona más madura, por lo cual es la primera en presentar color verde, aunque posteriormente disminuye su verdor, la base de la espata suele tener un patrón de enverdecimiento semejante a la región media, pero con valores menores. Con los valores obtenidos se identificaron tres etapas de enverdecimiento (Fig. 14). Las etapas (denominadas E1 a E3) correspondieron a los siguientes intervalos de unidades SPAD: E1 5 a 10, E2 15 a 20 y E3 25 a 30, como testigo se utilizaron espatas blancas (B) a las que se le asignó el número 0 como unidad SPAD y hojas del follaje (V) con un rango de 40 - 60 unidades SPAD.

6.2 Calibración del SPAD-meter

Como podría esperarse, con el incremento de las unidades SPAD el tejido presentó mayor concentración de pigmentos fotosintéticos. Cuando las espatas eran de color blanco el SPAD no registró ningún valor, por lo cual se le asignó valor 0; sin embargo, en los extractos con acetona sí se detectó una pequeña cantidad de clorofilas totales, el valor promedio fue $0.023 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$. Las clorofilas de las espatas E1 incrementaron hasta alcanzar un valor de $0.332 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$; y en la etapa E2 fue $0.637 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$. En E3 la

concentración incrementó a $1.067 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$. La concentración de clorofilas totales de las espatas E3 representó 35% de contenido de las hojas verdes del follaje.

Con los valores SPAD de las espatas y la concentración de clorofila calculada con el método espectrofotométrico se obtuvo una curva de calibración del SPAD (Fig. 15), por medio de un modelo de regresión lineal. Con los datos de la correlación se obtuvo la siguiente relación $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF} = 0.0543 + (0.0341) (\text{SPAD})$; a la vez, está se utilizó para calcular los contenidos de clorofilas (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$) con los datos del SPAD.

6.3 Pigmentos fotosintéticos totales

Aunque las espatas blancas no generaron valores SPAD, y por ello se les asignó el valor 0, en la cuantificación espectrofotométrica, con los extractos de acetona, se detectaron concentraciones bajas de los pigmentos; sus valores fueron: para la Chl *a* $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, para la Chl *b* $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, y para $x+c$ $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$. La comparación entre las tres concentraciones de pigmentos fotosintéticos de las espatas blancas mostró que fueron significativamente similares entre sí ($p>0.05$), mientras que su concentración de Chl *a* sí fue significativamente diferente ($p<0.05$) a las espatas E1, E2 y E3, y a las hojas V (Cuadro 1).

Conforme la espata enverdeció se observó el incremento significativo de la concentración de pigmentos fotosintéticos entre las espatas E1, E2 y E3. La comparación de la última etapa de enverdecimiento E3 con la hoja verde V mostró que la espata enverdecida acumuló 37.3 %, 31 % y 42.3 % de Chl *a*, Chl *b* y carotenoides, respectivamente, en comparación con la hoja V (Cuadro 2). La relación Chl total/ carotenoides de la espata blanca presentó diferencias significativas respecto a las tres etapas de enverdecimiento. La relación de Chl *a/b* fue similar entre las etapas de enverdecimiento, sin diferencias significativas. La concentración media de clorofilas totales en las espatas E3 fue 35.6 % del contenido en las hojas V ($2.99 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$).

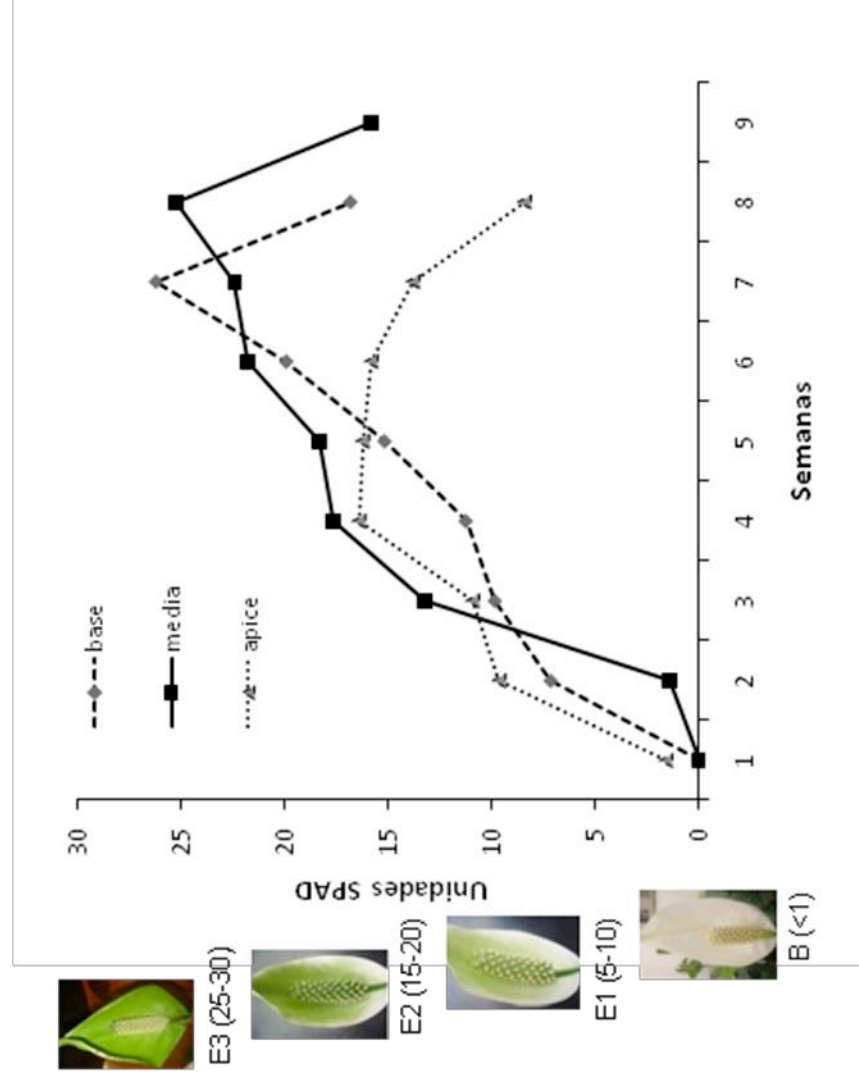


Figura 13. Enverdeamiento de tres regiones de la espata de *Spathiphyllum wallisii* R. en dependencia del tiempo (n=10).

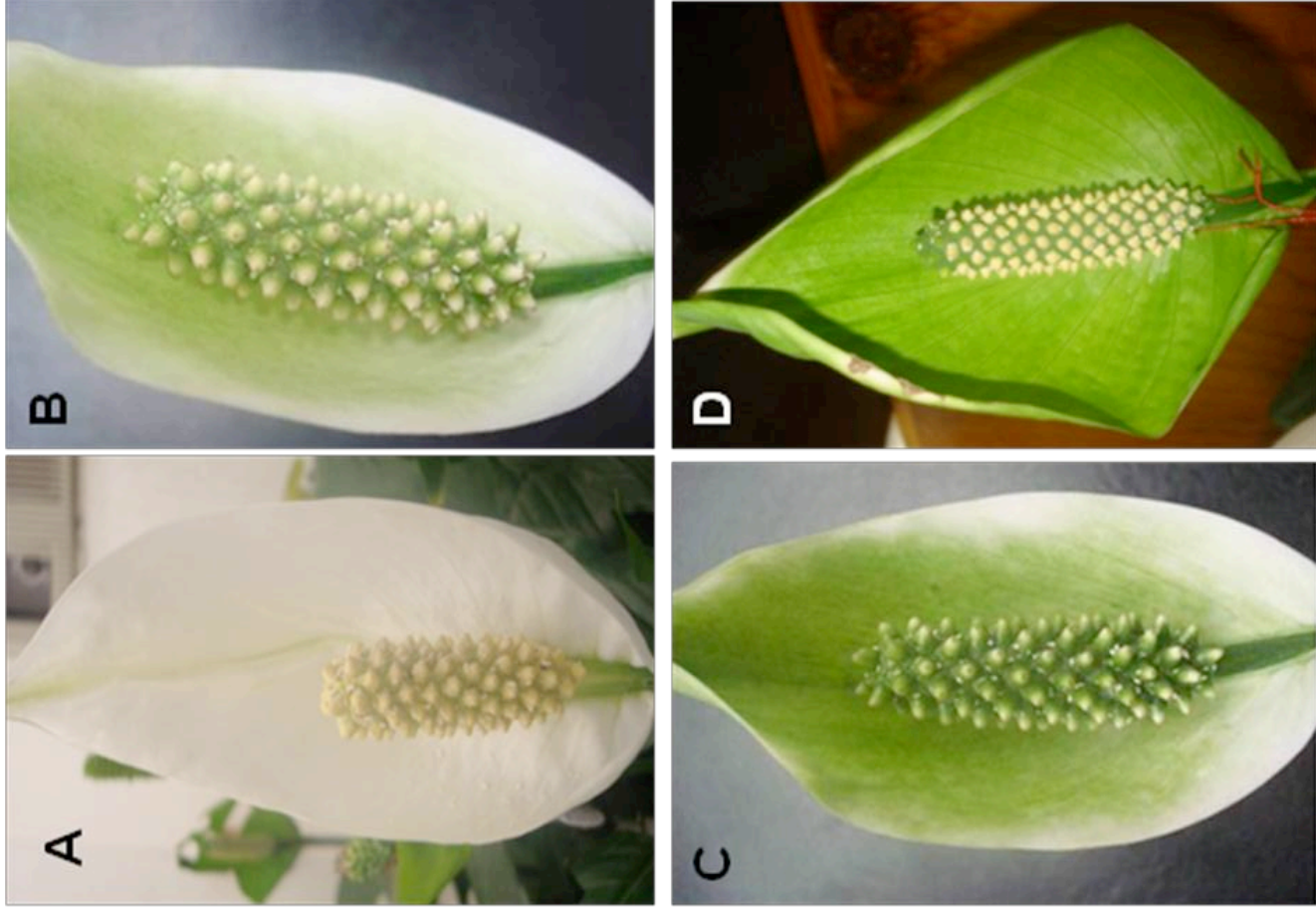


Figura 14. Espata blanca (A). Etapas de enverdecimiento de la espata (B=E1, C=E2 y D=E3) de *Spathiphyllum wallisii* R.

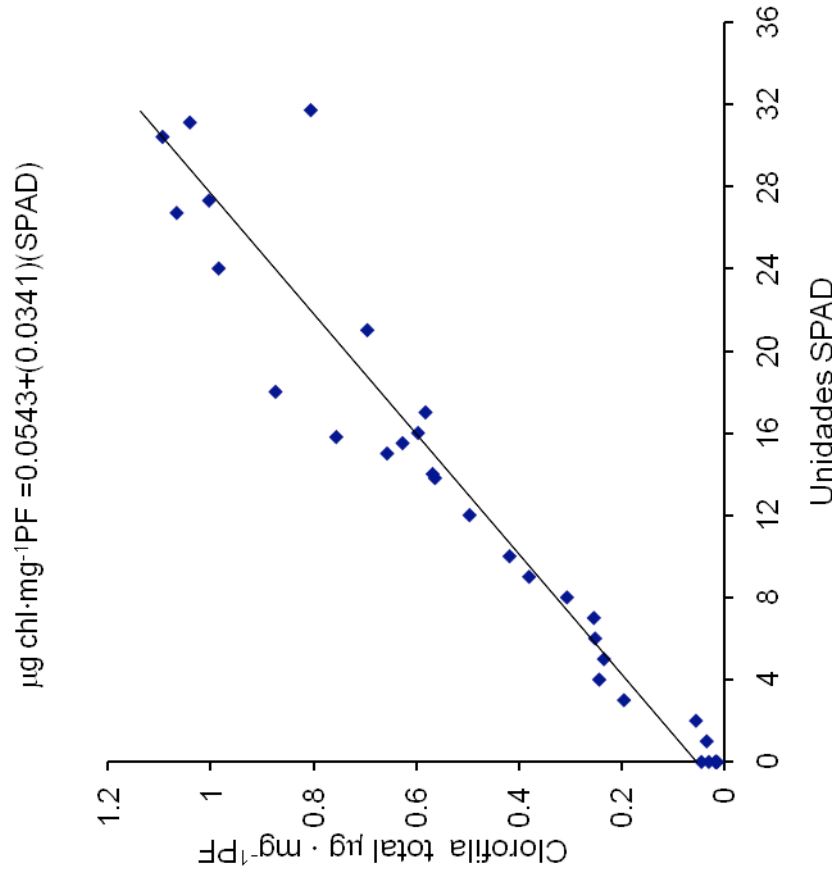


Figura 15. Modelo de regresión lineal entre $\mu\text{g Chl total}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$ y unidades SPAD, generada con espadas de *Spathiphyllum wallisii* R. durante su enverdecimiento.

Cuadro 1. Concentración de pigmentos fotosintéticos en las diferentes etapas de enverdecimiento (Blanca, E1, E2 y E3, con cero, 5 a 10, 15 a 20 y 25 a 30 unidades SPAD, respectivamente) de la espata y hoja verde del follaje (V) de *Spathiphyllum wallisii* R.

Etapas	Chl a $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$	Chl b $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$	Chl total $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$	Carotenoides $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$	Chl/carotenoides	Chl a/b
V	2.20 \pm 0.077 a	0.79 \pm 0.053 a	2.99 \pm 0.111 a	0.44 \pm 0.020 a	6.79 a	2.80 a
B	0.02 \pm 0.002 b	0.01 \pm 0.001 b	0.02 \pm 0.003 b	0.02 \pm 0.002 b	1.25 b	2.19 a
E1	0.25 \pm 0.025 bc	0.08 \pm 0.008 bc	0.33 \pm 0.033 bc	0.06 \pm 0.007 b	5.14 a	3.06 a
E2	0.50 \pm 0.031 cd	0.14 \pm 0.007 bc	0.64 \pm 0.038 cd	0.12 \pm 0.006 bc	5.37 a	3.66 a
E3	0.82 \pm 0.058 d	0.24 \pm 0.018 c	1.07 \pm 0.076 d	0.19 \pm 0.011 c	5.72 a	3.36 a

Los valores son promedios \pm ES (n=5). Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias estadísticas de acuerdo con la comparación múltiple de medias de Tukey ($p\leq 0.05$)

6.4 Proteína soluble total

Las espatas blancas contenían solo 65.5 % de proteínas totales en comparación con las hojas V. Conforme las espatas enverdecían la concentración de proteínas incrementó significativamente (Fig. 16). La comparación entre E1 y V no presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$), mientras las etapas E2 y E3 si presentaron diferencias con respecto a V. La etapa E3 tuvo mayor concentración de proteínas que la hoja V.

La cuantificación por densidad óptica de la LSU Rubisco demostró cambios en la intensidad de la coloración de la banda correspondiente a esa proteína entre las etapas y entre éstas y la hoja V. Este resultado demostró que la LSU Rubisco estuvo en cantidad variables en dependencia de la etapa de la espata. Además, de la proteína identificada como LSU Rubisco, fueron observados cambios en las bandas del gel en las diferentes etapas de enverdecimiento, identificadas como P1 y P2 (Fig. 17). Para estas bandas se determinó la movilidad electroforética relativa (Rf) en el gel, para obtener el peso molecular (PM) aproximado (Cuadro 2). La banda de proteína P1 con peso molecular aproximado de 120 kDa incrementó durante las diferentes etapas de enverdecimiento, y alcanzó valores similares a los de las hojas del follaje (Fig. 17). También se detectó otra banda (P2) con peso molecular aproximado de 32 kDa, la cual se presentó en mayor concentración en la espata blanca, mientras que en las diferentes etapas de enverdecimiento disminuyó hasta alcanzar valores similares al de las hojas del follaje.

Cuadro 2. Cambios en el contenido de dos proteínas (P1 y P2), de la espata de *Spathiphyllum wallisii* R., separadas por electroforesis en SDS-PAGE.

	Distancia (cm)	Rf	PM (kDa)
Proteína 1 (P1)	1.1	0.08	120
Proteína 2 (P2)	10.2	0.73	32
Rf= movilidad relativa; PM= peso molecular			

De las bandas P1 y P2 se cuantificó la cantidad de proteína en unidades de densidad óptica por mm² (Fig. 18). La proteína con PM aproximado a 120 kDa incremento su concentración con el enverdecimiento, hasta alcanzar valores significativamente iguales a los de la hoja V, además, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las etapas. La segunda proteína con PM aproximado de 32 kDa se presentó en mayor concentración en la espata blanca, con el enverdecimiento disminuyó, pero no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con la hoja V.

6.5 La subunidad grande (LSU) de la Rubisco

En el gel se detecta como la banda de la subunidad LSU Rubisco, con un peso molecular de 55 kDa, incrementó con el enverdecimiento; particularmente en las espatas blancas y durante la primera etapa de enverdecimiento se observaron cantidades significativamente menores de esta proteína respecto a las etapas E2 y E3 (Fig. 19A).

La concentración de LSU Rubisco en E3 representó 7.5% mayor concentración respecto a la hoja V; sin embargo, los valores fueron significativamente iguales ($p \geq 0.05$). Las espatas blancas tenían concentraciones 38 % menores de esta proteína, respecto a las espatas E3 (Fig. 19B).

6.6 Fluorescencia

Aunque las espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. son blancas a la vista del ojo humano, la luz de 650 nm sí generó fluorescencia; no obstante, esta longitud de onda induce la fluorescencia de la clorofila principalmente. Además, se observó que la fluorescencia incrementó junto con el enverdecimiento de las espatas.

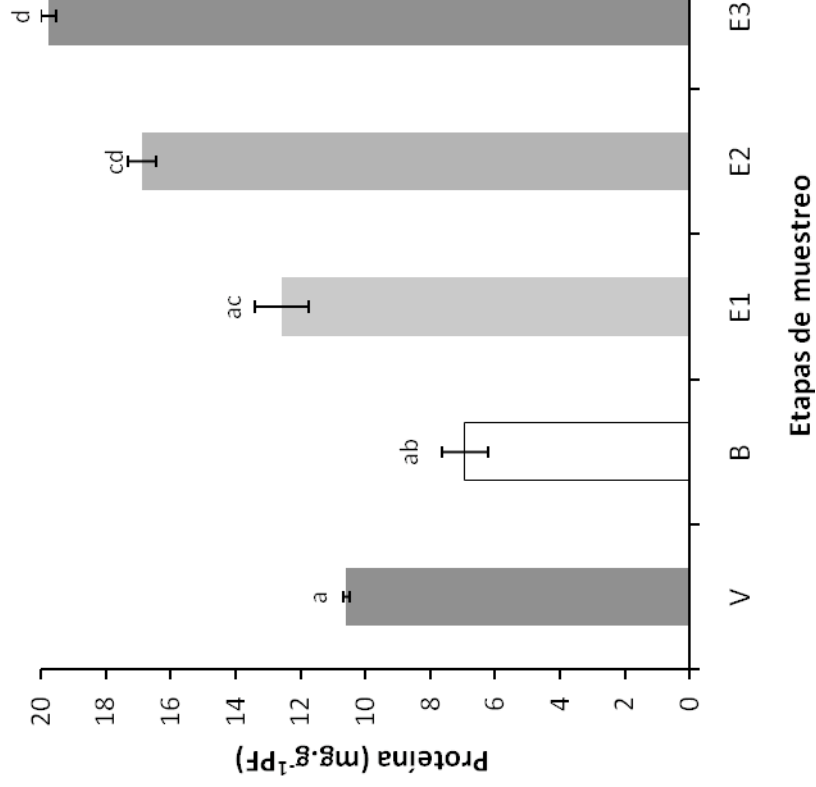


Figura 16. Concentración de proteínas solubles totales en hojas verdes del follaje, espata blanca (B), y enverdecidas (E1, E2, E3) de *Spathiphyllum wallisii* R.; los valores son promedios \pm ES (n=4). Letras distintas indican diferencias estadísticas entre hojas y espatas ($P \leq 0.05$).

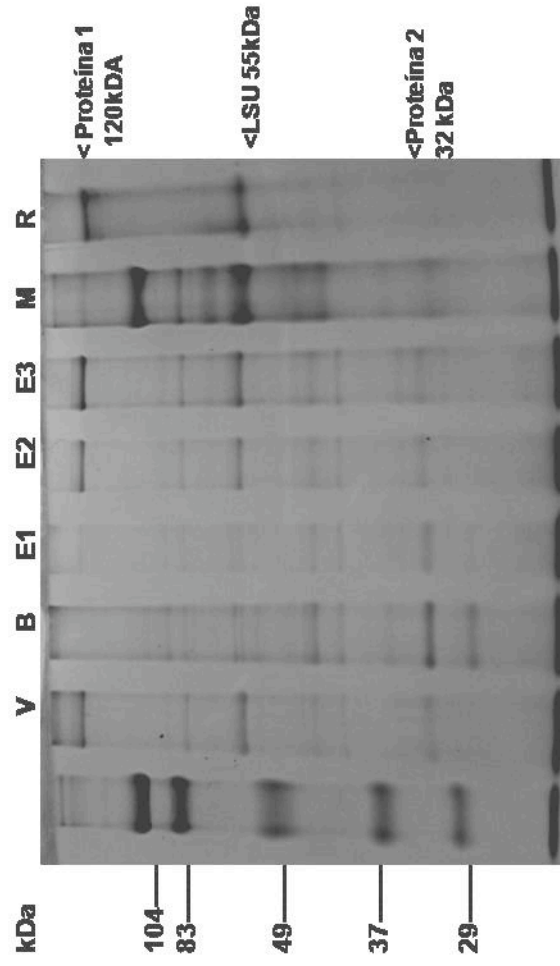


Figura 17. Gel de poliacrilamida con la separación de proteínas de hojas de follaje (V) y espatas blanca (B) en diferentes etapas de envejecimiento (E1, E2 y E3) de *Spathiphyllum wallisii* R. La banda M es una hoja de maíz que se utilizó como referencia, la banda R es del estándar de Rubisco y la banda sin identificación es el estándar de pesos moleculares (lado izquierdo del gel).

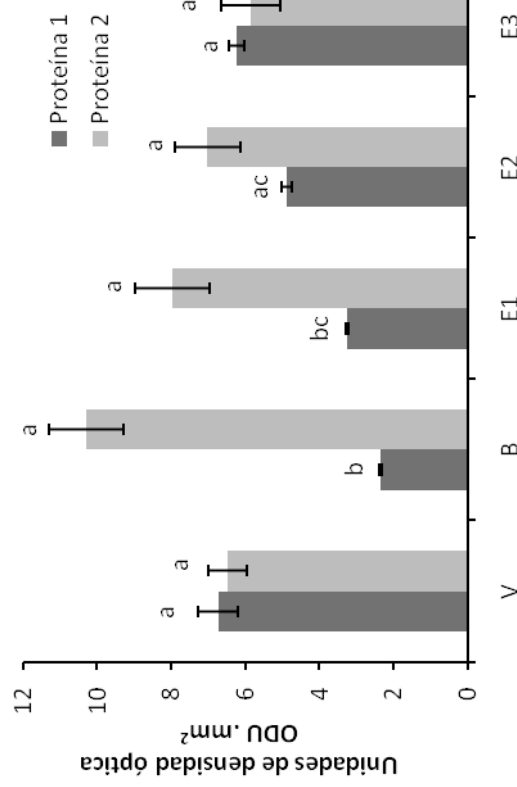


Figura 18. Contenido relativo proteínas expresado en unidades de densidad óptica·mm² (ODU/mm²). Los datos son promedio \pm E.S. (n=4) para cada etapa de envejecimiento de las espatas (E1, E2 y E3), las espatas blancas (B) y las hojas del follajes verde (V) de *Spathiphyllum wallisii* R. \pm DS. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativa entre tratamientos.

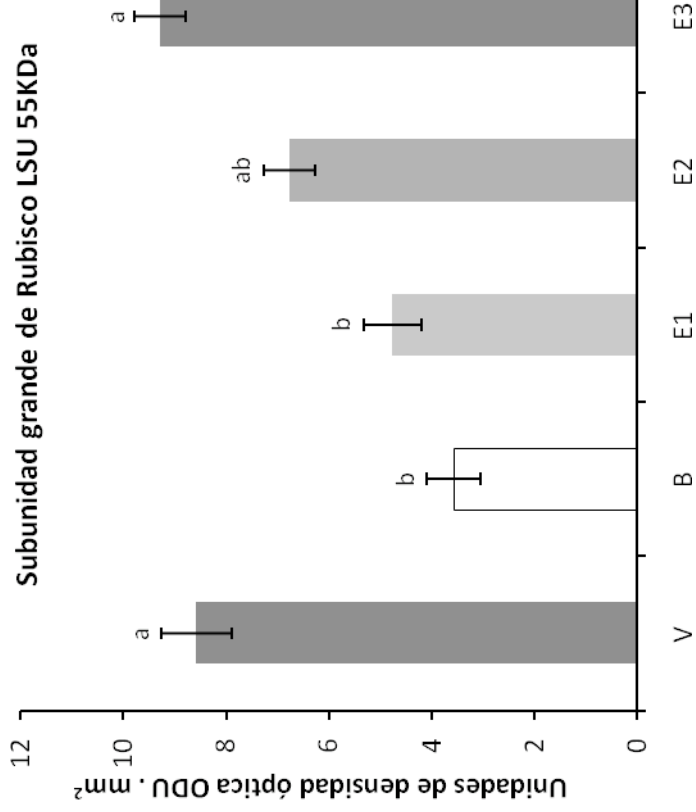


Figura 19. Relación gráfica del contenido relativo de LSU Rubisco expresado en unidades de densidad óptica por·mm². Los datos son promedio± E.S. (n=4) de hojas verdes del follaje (V), espatas blancas (B), etapas de envejecimiento de las espatas (E1, E2 y E3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P≤0.05).

6.6.1 Fluorescencia inicial (F_o)

Las espatas blancas presentaron valores de fluorescencia bajos (<0.012); sin embargo, se puede señalar que conforme aumentó la concentración de clorofila en el tiempo se observó un incremento del 90 % de los niveles de la F_o (Fig. 20). Los valores de F_o de las espatas enverdecidas, cuando alcanzaron concentraciones de clorofila de alrededor de un $1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$ fueron significativamente similares a los valores de F_o de V con un rango de 0.035 a 0.045, a pesar de que las espatas presentaron sólo 50 % de clorofila en comparación con V, y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las F_o de las espatas E3 y V.

6.6.2 Fluorescencia variable (F_v)

La F_v , es equivalente a la diferencia de ($F_m - F_o$), se relaciona con la capacidad del PSII para reducir químicamente QA (el primer aceptor de electrones de la cadena fotosintética). Los valores obtenidos mostraron que la F_v de las espatas blancas fueron bajos (<0.06), los cambios observados a través del tiempo en las espatas presentaron diferencias significativas $p < 0.05$ (Fig. 21). Los valores del F_v presentaron la misma tendencia que F_o cuando se alcanzó la concentraciones de $1 \mu\text{g Chl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, y las diferencias respecto a las hojas V no fueron significativas $p > 0.05$, éstas presentaron valores entre 0.14 a 0.18 intervalos de fluorescencia.

6.6.3 Fluorescencia máxima (F_m)

La emisión de fluorescencia aumenta en un tiempo breve hasta su nivel máximo. La excitación a partir de F_m se asocia a procesos fotoquímicos, por lo que existe una transformación de energía del PSII. Para esta variable se observó la misma tendencia que en la F_o y F_v , los niveles de F_m de las espatas B presentan solo un 10 % de los valores de las hojas V, mientras las espatas enverdecidas presentaron valores de F_m significativamente

similares a los de las hojas V (Fig. 22), por lo que entre E3 y V las diferencias no fueron significativas ($p>0.05$), ambas presentaron un rango de F_m entre 0.20 a 0.23.

6.6.4 Relación de la fluorescencia variable entre la fluorescencia media (F_v/F_m)

La relación F_v/F_m es proporcional al rendimiento cuántico de las reacciones fotoquímicas. Las espatas en proceso de enverdecimiento presentaron valores iniciales de esta relación F_v/F_m cercanos a 0.70 a pesar de tener concentración de $0.4 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, equivalente a 31 % de la concentración de las espatas enverdecidas, y 13 % de las hojas V; sin embargo, a pesar de la diferencia amplia y significativa del contenido de clorofila entre espatas y hojas presentaron valores del índice F_v/F_m similares (Fig. 23). Este resultado indica que las espatas verdes son fotosintéticamente activas y sanas ya que ambas presentaron un rango de 0.70 a 0.80 el cual se considera como intervalo óptimo de la relación F_v/F_m .

6.7 Microscopia de epifluorescencia

Las espatas blancas mostraron ausencia de clorofila en el mesófilo; sólo se detectó clorofila en las células oclusivas de los estomas del haz y envés de lámina foliar (Fig 24 A y B). En la etapa E1 la clorofila, mostrada por la epifluorescencia, se acumuló en las células cercanas a los haces vasculares y en las células del parénquima, cercanas a la epidermis adaxial de la espata (Fig. 24 C y D). Las etapas con enverdecimiento más avanzado (E2 y E3) incrementaron la cantidad de clorofila, respecto a las espatas blancas (B) y las E1 (con enverdecimiento incipiente); la clorofila en las espatas E2 y E3 se localizó en los cloroplastos de las células del resto del mesófilo (Fig. 24 E, F y Fig. 25 A, B). Las hojas verdes del follaje (V) presentaron un color rojo intenso en el mesófilo; evidencia de una concentración elevada de clorofila relativamente mayor a la observada en la espata E3 (Fig. 25).

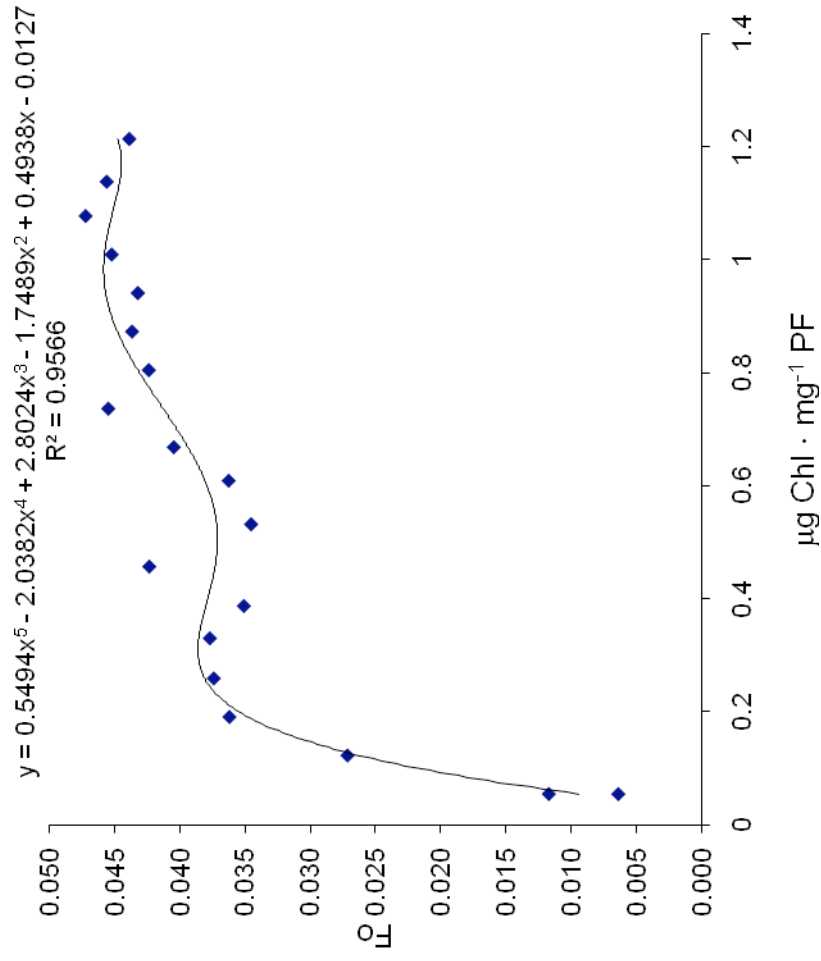


Figura 20. Niveles de fluorescencia inicial (F_o) en relación con la cantidad de clorofila en las espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. ($n=10$). El valor de F_o en el follaje fue en promedio de 0.049 ($n=10$).

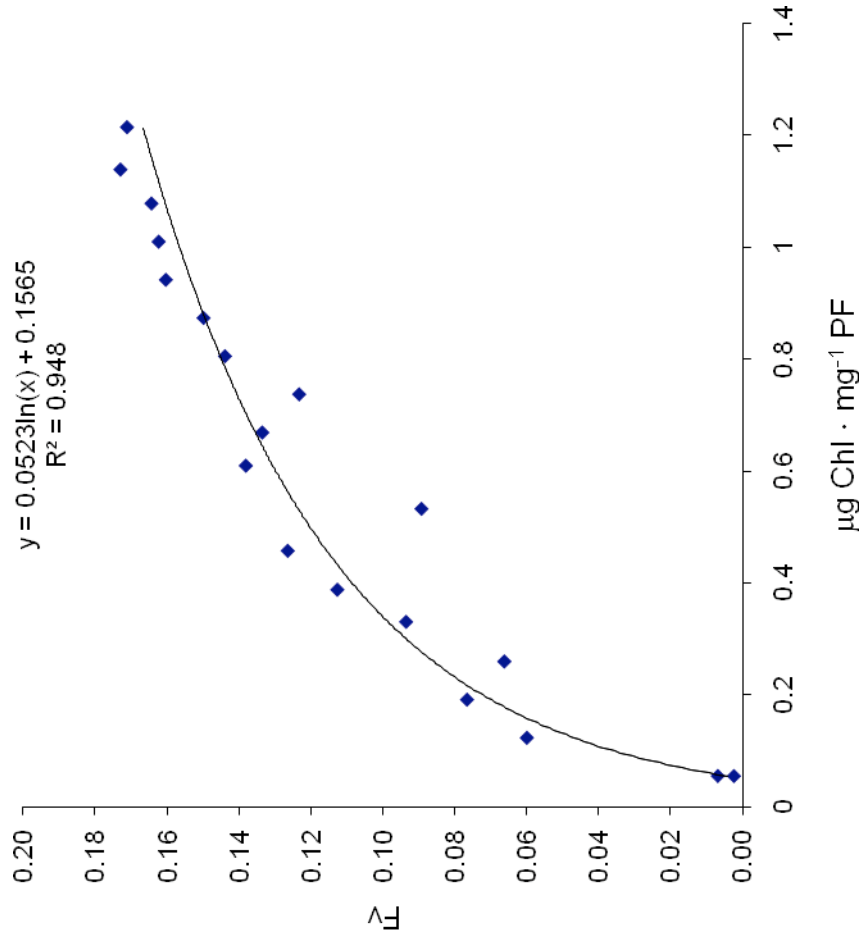


Figura 21. Niveles de fluorescencia variable (F_v) en relación con la cantidad de clorofila. Los valores son promedio ($n=10$) espadas. El valor de F_v en el follaje fue de 0.174 ($n=10$).

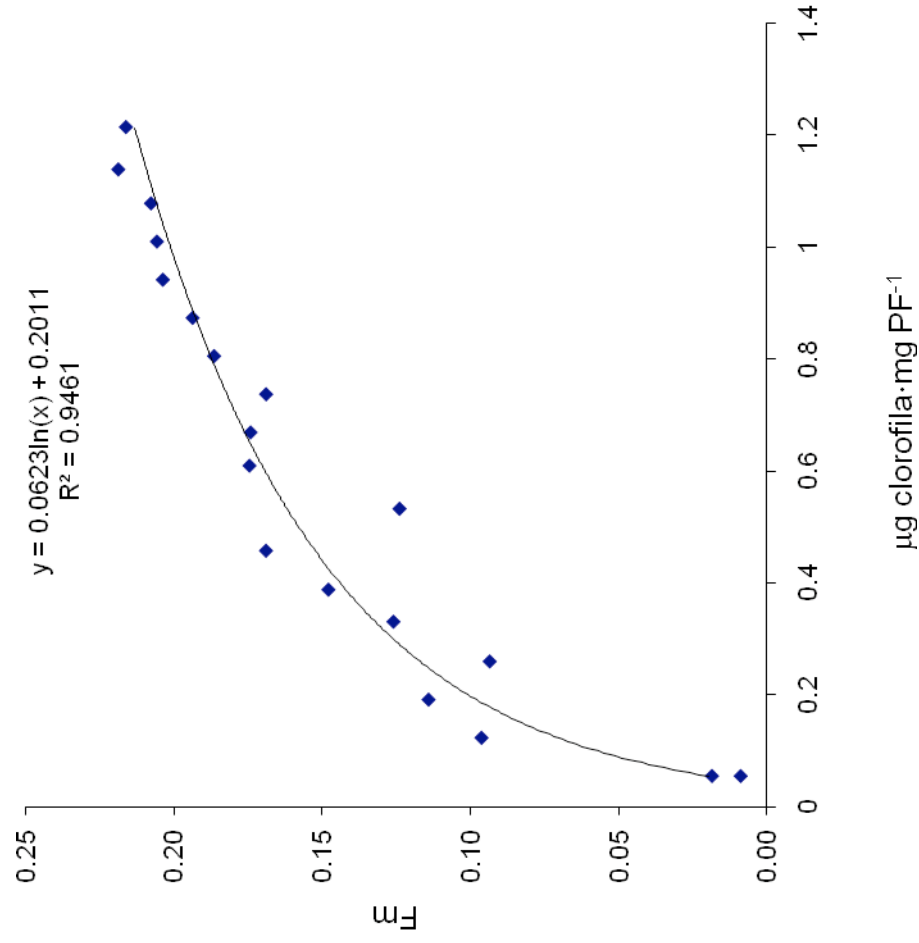


Figura 22. Niveles de fluorescencia máxima (Fm) en relación con la cantidad de clorofila de espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. (n=10). El valor de Fm en el follaje fue de 0.222 (n=10).

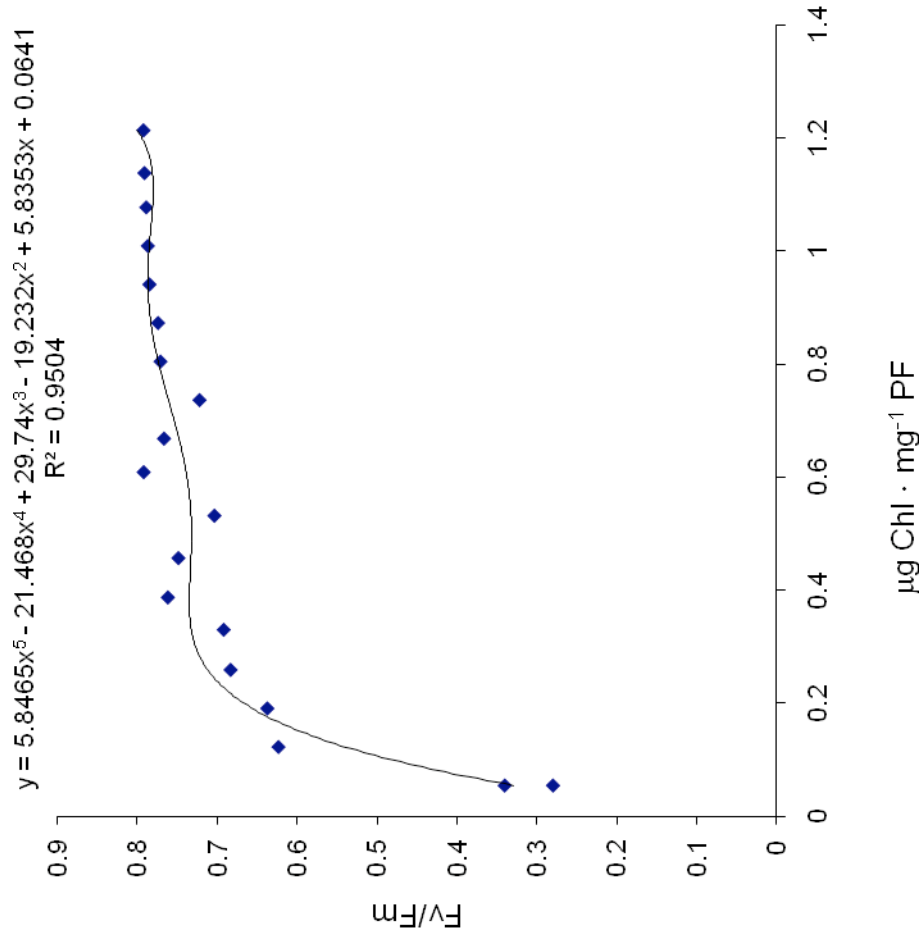


Figura 23. Índice F_v/F_m (fluorescencia máxima/fluorescencia variable) y su dependencia con la cantidad de clorofila de espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. (n=10). El valor del índice F_v/F_m en el follaje fue en promedio de 0.781 (n=10).

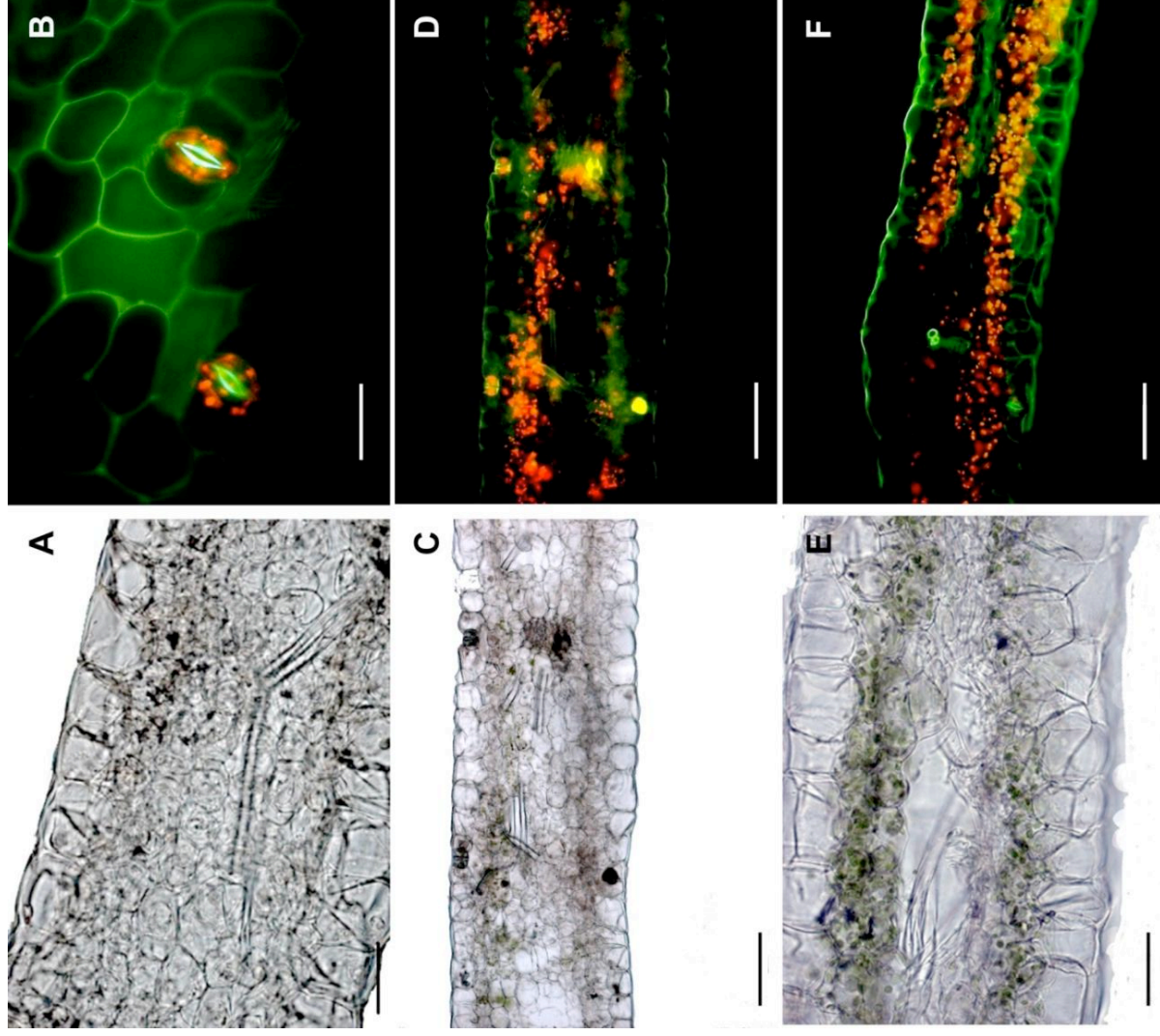


Figura 24. Microscopia de campo claro (A, C, E). Microscopia de epifluorescencia de espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. (B, D, F). La clorofila se observa en color rojo; la espata blanca presenta clorofila en las células de los estomas (A y B). Espata con enverdecimiento inicial, en etapa E1, aparece la clorofila en el parénquima cercano a la epidermis y alrededor de los haces (C y D) 100 μ m. Espata con enverdecimiento intermedio, en etapa E2, la clorofila se encuentra en casi todo el mesófilo del corte (E) 50 μ m, (F) 100 μ m.

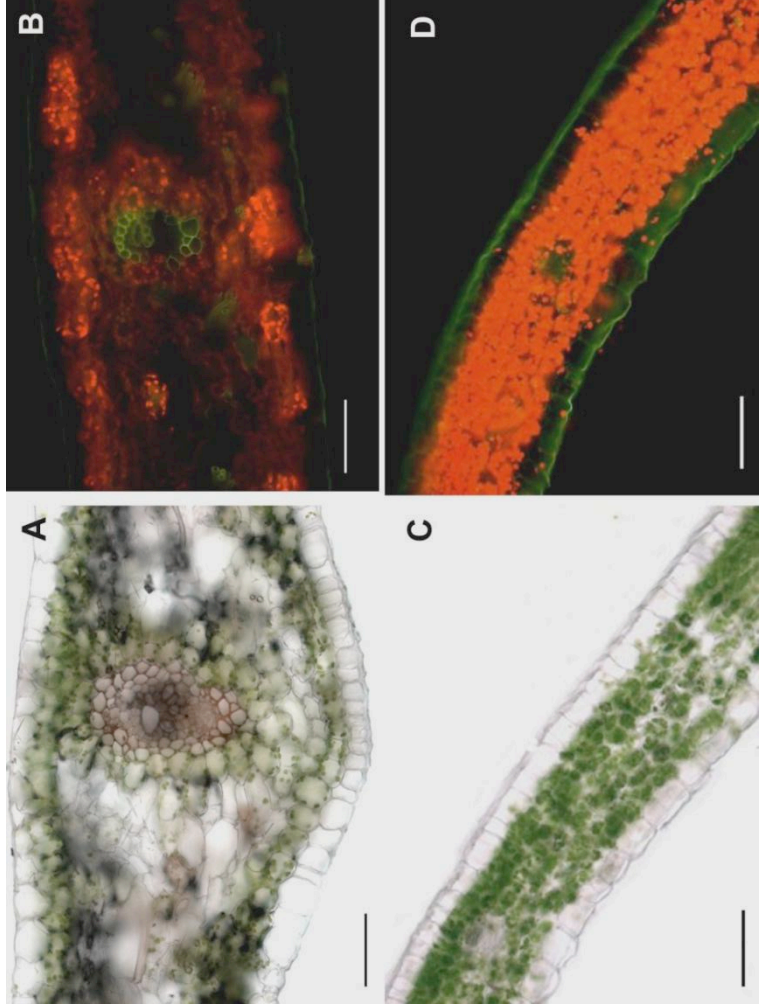


Figura 25. Microscopia de epifluorescencia y campo claro, barra 100 μ m. Corte de espata E3 (A y B), se observa abundante clorofila en el m \acute{e} sófilo, semejante a la hoja verde del follaje (C y D).

7. DISCUSIÓN

El proceso de enverdecimiento ha sido descrito por diversos investigadores con base en la diferenciación de los etioplastos a cloroplastos; los cuerpos prolamelares (PLBs) de los etioplastos originan las membranas tilacoidales, en ellas se incorpora la clorofila, con lo que quedan integrados los plastidios verdes llamados cloroplastos (Barthelemy *et al.*, 2000; Guseinova *et al.*, 2000; Pollmann *et al.*, 2007; Blomqvist *et al.*, 2008). Los cloroplastos también pueden originarse por el enverdecimiento de cromoplastos, este es el caso de los cromoplastos de algunos frutos, como la naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; al respecto, se conoce que el enverdecimiento en los cítricos es causado por diversos patógenos, como el psilido *Diaphorina citri* (Da Graca, 1991); también, el enverdecimiento puede ocurrir en órganos subterráneos de las plantas, éste es el caso de la papa, que al exponerse a la luz modifican sus plastidios a cloroplastos (Grunenfelder *et al.*, 2006). En el caso de otras estructuras, como las hojas, se cuenta con el ejemplo del enverdecimiento del hipsofilo de *Heliconia aurantiaca* Ghiesbr., *Guzmania* cf. *X magnifica* Ritcher y *Spathiphyllum wallisii* Regel, las que presentan la conversión de plastidios a cloroplastos; sin embargo, los procesos de transformación son diferentes entre especies (Weidner *et al.*, 1985). Los resultados obtenidos con este trabajo indican un enverdecimiento de la espata debido a la acumulación de clorofilas totales, equivalente al 35.7 % del que contiene las hojas del follaje. Aunque no se realizó el estudio ultraestructural para observar la conversión de los plastidios, es posible que suceda una conversión de plastidios a cloroplastos.

En las espatas blancas de *S. wallisii* R. el SPAD-meter indicó ausencia de clorofila (Fig. 13); sin embargo, la cuantificación con espectrofotómetro, en los extractos acetónicos, demostraron que las espatas blancas sí contienen cantidades pequeñas de estos pigmentos, pues se cuantificó una concentración relativamente baja de ellas (0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso fresco) (Cuadro 1). Además, los cortes histológicos, observados con microscopio de

epifluorescencia, revelaron la presencia de la clorofila por el color rojo en las observaciones, (Fig. 24), en las células oclusivas de los estomas tanto del haz como del envés del hipsofilo.

Spathiphyllum sp. se considera como planta que requiere luz limitada para su mantenimiento y desarrollo, estudios de fotoaclimatación en hojas del follaje mostraron que la capa de células del mesófilo es delgada cuando es iluminada con longitudes de luz baja, la hoja presenta mayor cantidad de estomas en la región abaxial que en la adaxial (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2004). Aunque, las hojas verdes y las espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. tienen mayor número de estomas en la región adaxial que en la abaxial (Weidner *et al.*, 1985). En el presente estudio se observó que los estomas de ambas caras de las espatas blancas contienen clorofila, aunque en concentraciones bajas; debe suponerse que la presencia de los pigmentos fotosintéticos en estas estructuras es importante para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis y su ubicación en los estomas puede tener un papel específico e importante para la planta.

En este estudio se observó la correlacionaron directa entre los niveles de clorofila y las unidades SPAD; así, fue posible inferir las concentraciones de clorofila (en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tejido fresco) a lo largo del proceso de enverdecimiento de las espatas por medio de un método no destructivo. Varios estudios han demostrado que las unidades SPAD representan un valor proporcional al contenido de clorofila y nitrógeno en diferentes especies, como maíz *Zea mays* L. (Krugh *et al.*, 1994), trigo *Triticum aestivum* L. (Follet *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1994, Martínez 2008), algodón *Gossypium hirsutum* l. (Wood *et al.*, 1992), arroz *Oryza sativa* L. (Turner y Jund, 1991), tomate *Lycopersicon esculentum* L. cultivar Río grande (Rodríguez *et al.*, 1998), y papa *Solanum tuberosum* L. (Arregui, 2000, Edwards y Cobb, 1997).

En el presente trabajo se obtuvo una correlación alta ($r^2 = 0.938$) entre las unidades SPAD y la concentración de clorofilas totales ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso fresco). Con el SPAD-meter se puede hacer un seguimiento no destructivo de los cambios del contenido de clorofilas, en procesos fisiológicos que involucren cambios en los pigmentos verdes, ya sea durante la

senescencia, estrés o enverdecimiento de las estructuras de las plantas. Con los datos obtenidos se analizó el incremento de las clorofilas totales durante el enverdecimiento, estos permitieron calcular, por medio de la correlación, la cantidad de clorofila en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tejido fresco de las espatas para dar seguimiento de los cambios en los niveles de fluorescencia. Así, este estudio confirmó que el uso de las unidades SPAD es confiable para cuantificar los niveles relativos de clorofila y evaluar los parámetros de la fluorescencia de la clorofila.

La hoja verde del follaje de *S. wallisii* R. presentó un contenido de clorofila total de $2.99 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$, y la espata enverdecida acumuló valores de $1.07 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$. Así, bajo las condiciones del presente estudio, la concentración de clorofila de la espata incrementó, en un período de ocho semanas hasta alcanzar un 35.7 % de la concentración de clorofilas totales de V. Después de ese tiempo inició la disminución acelerada de estos pigmentos. Es conveniente señalar que la acumulación y síntesis de clorofila en la espata, durante el enverdecimiento, fue heterogénea, y tanto en la base como en el ápice el incremento de los pigmentos fotosintéticos fue sucediendo a tasas diferentes respecto a la región central de la espata. Además, la acumulación máxima de clorofila en las tres zonas se detectó en tiempos diferentes, cuatro semanas para la zona apical, siete semanas para la base y ocho para la región central de la espata. Otro aspecto sobresaliente en la acumulación de clorofila total, es que en la región apical la máxima cantidad de clorofila representó cerca de la mitad de la clorofila total del resto de la espata (Fig. 13).

La concentración de los pigmentos fotosintéticos incrementó en las espatas enverdecidas; sin embargo, los valores máximos de todos los pigmentos fotosintéticos cuantificados alcanzaron concentraciones cercanas a un tercio de las contenidas en las hojas V. Así la Chl *a* representó sólo 37.2 %, la Chl *b* 30.3 %, las Chl totales 35.7 %, y los carotenoides (*x+c*) 43.1 % de los contenidos en el follaje (Cuadro 1). En el presente estudio las clorofilas totales alcanzaron $2.8 \mu\text{gChl}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$ en hojas verdes, $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$ en

espadas blancas y 2.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{PF}$ en espadas con el enverdecimiento máximo. En su caso, Weidner *et al.* (1985) obtuvieron concentración de clorofilas totales en las hojas verdes de 2.69 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$, y en el hipsofilo blanco la concentración que estos autores señalaron fue de 0.80 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. La relación Chl *a/b* en *S. wallisii* se reporta con valores de 2.50 en hoja y 2.40 en el hipsofilo (Weidner *et al.*, 1985), y en hojas de *Spathiphyllum* sp. la relación es de 2.9 (Akoumianaki-Ioannidou, *et al.*, 2004). En este estudio se tuvieron relaciones semejantes, por ejemplo en hojas verdes el valor fue de 2.8 en espadas blancas de 2.19, y en las diversas etapas de enverdecimiento se observó una relación alrededor de 3.0, valores que se asemejan al de hojas verdes. Cabe destacar que en ninguno de los estudios se encontraron diferencias significativas en la relación Chl *a/b*.

La relación Chl *a/b* cambia en dependencia de la cantidad y calidad de luz a la que es expuesta la planta, en *Spathiphyllum* sp. la modulación de la luz es parte de la fotoaclimatación. En general, existe reducción de la actividad del PSI y PSII cuando la cantidad de luz disminuye, e incrementa el tamaño de la antena; mientras que con luz alta hay incremento de la actividad del PSI y PSII y se reduce el tamaño de la antena (Akoumianaki-Ioannidou, *et al.*, 2004). Durante el proceso de senescencia foliar la relación Chl *a/b* disminuye, principalmente como resultado de la degradación de la Chl *a* (Gay y Thomas, 1996); en el enverdecimiento o reverdecimiento inducido, esta relación se mantiene estable o incrementa, tal es el caso de *Nicotiana rustica*, bajo condiciones particulares, el BAP puede promover la síntesis de nuevas clorofilas en tejido senescente (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999).

Las plantas requieren luz para la síntesis de clorofila a través de la reducción de protocloroflide (Howard, 1997). Otros estudios de enverdecimiento establecen diversos marcadores para el desarrollo funcional del complejo fotosintético (Marder *et al.*, 1998). En el reverdecimiento inducido las citocininas pueden modular la expresión de genes que codifican proteínas del complejo cosechador de luz (LHCP) y de enzimas como la protocloroflide

óxido reductasa (POR) que participa activamente en la ruta biosintética de la Chl *a* y *b* (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso de plantas que presentan enverdecimiento en forma natural pueden intervenir otro tipo de compuestos que induzcan la producción de clorofila.

En la maquinaria fotosintética hay diversas proteínas fundamentales desde los primeros estadios de desarrollo del cloroplasto, pues ellas formarán parte de los fotosistemas. Una de las proteínas que interviene en la síntesis de la clorofila es POR (Plücken *et al.*, 2002). Existe la posibilidad de que esta proteína sea una de las que se observó que incrementó con el enverdecimiento, en el gel de poliacrilamida: Al respecto, con base en el dato del Rf una de las proteínas tuvo un PM aproximado de 32 kDa, el peso es semejante al de los dos péptidos que forman POR y al de una subunidad del PSII, de 31 kDa en este último caso (Blomqvist *et al.*, 2008); además, la proteína de LHClI antena es de 27 kDa (Akoumianaki-Ioannidou, *et al.*, 2004).

El núcleo de las células codifica la proteína POR, y es sintetizada en el citosol. El precursor de POR es aproximadamente de 44 kDa y se encuentra en plastidios (Lebedev y Timko 1998). POR se compone por dos polipeptidos con peso de 38 y 36 kDa, son fáciles de localizar en los primeros estadios de enverdecimiento de etioplastos, cuando están continuamente expuestos a la luz, estos polipeptidos corresponden a dos isoenzimas PORA y PORB, se encuentran en cebada *Hordeum vulgare* y en *Arabidopsis thaliana* (Armstrong *et al.*, 1995; Reinbothe *et al.*, 1996). PORB está presente y activa durante el tiempo de vida de la planta, PORA aparece y funciona sólo durante las primeras horas de enverdecimiento (Masuda *et al.*, 2003; Pollman *et al.*, 2006). Una tercer isoenzima PORC caracterizada en *A. thaliana* es inducida por altas irradiaciones de luz (Masuda *et al.*, 2003); posiblemente POR se localice también en otro tipo de plastidios como los de *Spathiphyllum* y lleve a cabo un proceso similar al de los etioplastos; en contraste con los etioplastos, los plastidios aparentemente no presentan membranas en las que este embebida la proteína, para

comprobar si la proteína que se encontró en los geles es POR se podrían hacer pruebas de inmunolocalización u otro análisis molecular para identificar la proteína, está se encontró con más concentración en B , mientras que en V disminuyó (Fig, 17).

El contenido de POR y Pchl_{ide} en membranas en desarrollo es bajo sobre los niveles de proteínas totales durante las primeras etapas de enverdecimiento (Barthélemy *et al.*, 2000), en *Spathiphyllum* no hay etioplastos, por lo cual las proteínas pueden estar localizadas en otra parte del plastidio.

La luz induce en el núcleo la codificación de proteasas que comienzan a degradar el complejo POR-Chl_{ide} de los etioplastos. Estas enzimas se localizan principalmente en el estroma del cloroplasto (Reinbothe *et al.*, 1996; Barthélemy *et al.*, 2000). Se ha demostrado que para proporcionar protección contra daño foto-oxidativo interviene la asociación de Pchl_{ide} con POR (Spreitzer, 2003) esto sucede durante el proceso de enverdecimiento (Barthélemy *et al.*, 2000). NADPH-protoclorofila-oxidoreductasa (POR) solamente se cataliza por acción de la luz, para dar pasó a la síntesis de clorofila en las plantas: La reducción de Pchl_{ide} a Chl_{ide} (Howard, 1997; Beale, 1999; Blomqvist *et al.*, 2008). Se ha observado que la regulación de luz en los estudios de la enzima POR, la proteína pasa de PORA a una segunda proteína PORB, después de unas horas de enverdecimiento la proteína POR es formada (Reinbothe *et al.*, 1996, Howard, 1997).

En los etioplastos POR forma parte de las proteínas de las membranas. La fototransformación de Pchl_{ide} a Chl_{ide} inicia por la translocación de POR de los cuerpos prolamelares a los tilacoides (Ryberg y Sundqvist, 1991; Howard, 1997), como los cuerpos prolamelares contienen a Pchl_{ide} esta proteína es rápidamente reducida y esterificada bajo iluminación para sintetizar la clorofila (Ryberg y Sundqvist, 1991). El enverdecimiento induce cambios en la forma, tamaño y organización interna de las membranas del plastidio, los PLBs son precursores de los tilacoides (Ryberg *et al.*, 1993; Reinbothe *et al.*, 1996; Blomqvist *et al.*, 2008), debido a estos cambios, que implican la formación de membranas

tilacoidales de los cloroplastos existe un incremento en las proteínas. La cantidad de proteínas totales de las espatas aumentó hasta alcanzar el doble de proteínas que la hoja del follaje. El proceso de enverdecimiento demanda un apreciable incremento en la proteínas, Weidner *et al.*, 1985 encontró en tres especies de aráceas un contenido doble de proteínas durante el enverdecimiento en comparación con el hipsofilo blanco.

Los cloroplastos contienen altos niveles de proteínas en el estroma, entre ellas está la Rubisco y otras proteínas asociadas a las membranas tilacoidales (LHCP, Cyt_t, entre otras) (Buchanan *et al.*, 2000). En hojas de *Spathiphyllum* el incremento del tamaño de la antena del PSI, es seguido por un incremento de clorofila y de los complejos de la proteína-pigmentos (Akoumianaki-Ioannidou, *et al.*, 2004). Se conocen alrededor de 64 proteínas, que intervienen en la biosíntesis de pigmentos, reacciones fotosintéticas dependientes de luz, proteínas del ciclo de Calvin y síntesis de proteínas identificadas en etioplastos en proceso de enverdecimiento (Blomqvist *et al.*, 2008). Debido a la transformación de plastidios a cloroplastos existe síntesis de diversas proteínas que participan en la fotosíntesis, por lo cual se incrementa su cantidad durante el enverdecimiento. Efectivamente, en el presente estudio se observó mayor concentración de proteína totales en la espata en etapa E3 (Fig. 17); además de las proteínas que se requieren para formar los cloroplastos, posiblemente se encuentre en estas plantas algunas otras proteínas que intervenga en el enverdecimiento o en algún otro proceso fisiológico.

Durante el desarrollo de las membranas POR incrementa, principalmente se encuentra en membranas del tilacoide en etapas tempranas de enverdecimiento (Barthelemy *et al.*, 2000), la biosíntesis de clorofila en hojas en estadio de enverdecimiento está asociada con los cuerpos PLBs del plastidio (Blomqvist *et al.*, 2008). En estudios de *Spathiphyllum* puede observarse la formación del grana empezando por la división de vesículas, éstas son de diferente origen, la mayoría son pliegues formados por membranas, también derivan desde la parte interna del plastidio, posiblemente deriven de un PLB (Weidner *et al.*, 1985),

se propone que las vesículas transporten lípidos para formación de membranas, así como el transporte de proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Kroll *et al.* 2001, Sherameti *et al.*, 2004, Blomqvist *et al.*, 2008). Los proplastidios son precursores de los cloroplastos, se desarrollan bajo la luz de día. Los etioplastos son organelos que carecen de clorofilas y de proteínas acompañantes de la clorofila y cuando son expuesto a la luz ocurren cambios estructurales y funcionales en ellos (Barthélemy *et al.*, 2000). En los plastidios de aráceas posiblemente se sintetizan proteínas por efecto de la luz, pero de manera diferente a los etioplastos, pues en ellas no se observa un plastidio con PLBs.

En el presente estudio, otra proteína localizada en los geles tuvo un PM aproximado de 120 kDa (Fig. 17 y 18); proteínas más cercanas a este peso es Rpoβ (RNA polimerasa subunidad beta), está se encuentra en PLBs de etioplastos en proceso de enverdecimiento (Blomqvist *et al.*, 2008), aunque en los plastidios de *Spathiphyllum* no se observa PLBs como en los etioplastos, existe la posibilidad de que contengan esa proteína u otras para propiciar el enverdecimiento.

Rubisco es una de las proteínas solubles más abundante en las plantas y en la naturaleza, representa un 50 % de las proteínas del cloroplasto (Buchanan-Wollstone *et al.*, 2003). En la presente investigación la subunidad grande de Rubisco (LSU) incrementó durante el enverdecimiento hasta alcanzar la misma concentración de las hojas verdes del follaje, las espigas blancas solo contenían una concentración del 40 % de la que tenían las hojas verdes del follaje (Fig. 17). Esta proteína es importante en el proceso de la fotosíntesis. Está demostrado que las citocininas retardan la degradación de Rubisco y de otras proteínas que participan en la fotosíntesis en *Nicotiana tabacum* (Wingler *et al.*, 2004) y *Triticum aestivum* (Věčková *et al.*, 2006, Martínez, 2008).

Las diferentes proteínas que forman parte del complejo cosechador de luz y del PSII, presentan PM pequeño, por lo cual fue imposible observarlas en los geles de poliacrilamida en el presente estudio, ya que para separar proteínas con PM bajo deberían utilizarse geles

con tamaño de poro varias veces menor a los usados. Las proteínas que forman parte del LHC presentan PM entre 18 y 30 kDa, y se encuentran en cloroplastos maduros. En etioplastos de *Triticum durum* se ha encontrado un incremento de estas proteínas durante el proceso de enverdecimiento y a la vez se encontró que los niveles de fluorescencia aumentan hasta alcanzar los valores de los cloroplastos maduros (Guseinova *et al.*, 2000). Un análisis para cuantificar la cantidad del PSII nos permitiría un panorama amplio para explicar los cambios en la fluorescencia.

In vivo la fluorescencia evaluada proviene de la Chl *a*, ya que la Chl *b* transfiere su estado excitado a la Chl *a* (Walker, 1987; Seaton y Walker, 1990). En los extractos de acetona se observó que en las espatas enverdecidas la concentración de Chl *a* fue mayor que la de Chl *b*, mientras que en espatas blancas los valores fueron similares entre sí; al incrementar la concentración de los pigmentos fotosintéticos, especialmente de Chl *a*, aumentaron los niveles de la fluorescencia hasta alcanzar valores similares a los de hojas del follaje (Fig. 20 a 23).

La fluorescencia es parte de la energía liberada por moléculas de clorofila excitadas por la luz, si la energía se disipa en otra forma no se emite fluorescencia, en la mayoría de los casos la energía es utilizada para conducir las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis (Baker, 1991). Es probable que la clorofila en las células oclusivas de los estomas en las espatas blancas y en la etapa inicial de enverdecimiento (Fig. 24) hayan intervenido en la emisión de la fluorescencia detectada en *Spathiphyllum* en el presente estudio (Fig. 21 a 23); además, también podría participar en el proceso fotosintético. Para comprobar lo anterior, podría hacerse un estudio más detallado que demostrara la actividad fotosintética de las espatas blancas y durante el proceso de enverdecimiento incipiente.

De acuerdo con Weidner *et al.* (1985) las espatas verdes de *Spathiphyllum* sobrepasan la fijación de CO₂ en comparación con las hojas del follaje verde. Durante la antítesis las espatas blancas exhiben nivel bajo de fluorescencia de la clorofila, el pico de

fluorescencia del PSII empieza a pronunciarse y el curso del enverdecimiento, alcanza al PSI gradualmente. Así, las espatas verdes de *Spathiphyllum* exhiben actividad fotosintética considerable; en contraste, *Heliconia* la presenta en proporción baja (Weidner *et al.*, 1985). En el presente estudio se observó el incremento de la fluorescencia de las espatas, hasta alcanzar valores similares a los de las hojas verdes del follaje; en las espatas blancas los valores de fluorescencia sólo representaban alrededor del 10% del valor total de las hojas verdes, conforme incrementó la concentración de los pigmentos los niveles de fluorescencia de las espatas presentaron valores semejantes a los de las hojas verdes; es decir, no existieron diferencias significativas en los valores de ninguno de los parámetros de la fluorescencia (F_o , F_v , F_m , F_v/F_m) entre la etapa E3 y las hojas del follaje (Fig. 20 a 23).

El nivel de F_o corresponde a la excitación de las moléculas de clorofila en el PSII y es emitida antes de que los excitones hayan migrado a los centros de reacción (Walker, 1988). F_o también depende de la organización estructural que facilita o afecta la transferencia de energía del excitación entre los pigmentos antena y centros de reacción del PSII (Kraus y Weis, 1984). En las espatas blancas, debido a que la concentración de pigmentos es baja y se localizan sólo en células estomáticas de las espatas blancas, existe la posibilidad de que los niveles bajos de F_o se deban a la organización incipiente de la “maquinaria” fotosintética en esas células. En este estudio se observó que durante el enverdecimiento incrementó la fluorescencia hasta alcanzar valores semejantes a los de las hojas del follaje, independientemente de su contenido significativamente menor de pigmentos fotosintéticos (Cuadro 1, Fig. 20 a 23).

La F_v se relaciona con el inicio de la fotólisis del agua y la liberación de O_2 en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis (Irizar-Garza y Peña-Valdivia, 2000). Más que el incremento de la concentración de los pigmentos fotosintéticos, las cantidades significativamente mayores de proteínas solubles totales (entre las que abunda la Rubisco) y la mayor cantidad de cloroplastos en las espatas enverdecidas, pueden ayudar a explicar el incremento de los

niveles de F_v . Pues como se demostró, la concentración de clorofilas no explica por sí sola la actividad fotoquímica (Cuadro 1, Fig. 20 a 23), debe considerarse que el incremento de proteínas solubles y seguramente las intrínsecas a las membranas tilacoidales incrementaron en cantidad, en consecuencia el PSII, PSI, ATPsintetasa, y en organización estructural, esto permite que se lleven a cabo los eventos inicial de la fotosíntesis, que incluyen liberando O_2 y con ello el incremento de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila, hasta alcanzar valores semejantes a los de las hojas del follaje, independientemente de la cantidad de pigmentos fotosintéticos en el tejido.

La excitación de las moléculas de clorofila a , con la consecuente emisión de fluorescencia incluye el parámetro F_m , asociado a procesos fotoquímicos, originados por la transformación de energía en los centros de reacción del PSII, y un proceso no fotoquímico que representa la emisión de calor (Barrantes, 2001). Los valores de F_m que se encontraron en las espatas enverdecidas debe estar relacionados con el incremento de la actividad fotosintética de la espata ya que como es el caso de los otros parámetros de la fluorescencia de la clorofila, en las espatas blancas o con enverdecimiento mínimo, la síntesis, ensamblaje y organización de proteínas y pigmentos en las membranas tilacoidales que conducen a su máxima funcionalidad parece tomar varias semanas en las espatas (Fig. 13 y 14).

El índice de F_v/F_m es proporcional al rendimiento cuántico de las reacciones fotoquímicas, este índice alcanza valores entre 0.70 y 0.85 en plantas sanas (Björkman y Demming, 1987). Se ha señalado que en hojas de *Spathiphyllum* la relación F_v/F_m tiene valores entre 0.73 y 0.78 (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2004). En el presente estudio los valores de la relación F_v/F_m variaron entre 0.70 y 0.80 en las espatas enverdecidas y las hojas del follaje verde. Este resultado además de indicar que tanto espatas como follaje de las plantas estudiadas estaban sanos, indica que las espatas enverdecidas (E3) alcanzaron rendimientos cuánticos similares al follaje, y que ese rendimiento cuántico también es independiente de la

concentración de clorofila en la espata, y que como en el follaje seguramente es dependiente de la funcionalidad y actividad sincrónica y óptima de toda su maquinaria fotosintética.

Los estudios relacionados con la fluorescencia de la clorofila en plantas intactas y su modificación por diferentes condiciones inductoras de estrés son abundantes (Barrantes, 1997; Irizar-Garza y Peña-Valdivia, 2000; Müller *et al.*, 2001; Zuñiga 2003). En esos estudios los parámetros de la fluorescencia muestran el incremento neto de la fluorescencia, debido al daño en la maquinaria fotosintética, en las estructuras y funciones fotoquímicas, en la fase bioquímica o en ambas. Es decir, si la condición generadora del estrés afecta el rendimiento cuántico, el uso de los fotones en las reacciones fotoquímicas, una gran parte de la energía incidente en las estructuras fotosintéticas es disipada en forma de fluorescencia; aunque en ciertas condiciones puede también haber disminución de la fluorescencia. En contraste con los efectos del estrés en las plantas, en el presente trabajo se observaron los cambios de los niveles de fluorescencia durante el proceso de enverdecimiento, y los valores bajos de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila mostraron que en las espatas blancas la estructura y organización de los plastidios era inadecuada e insuficiente para desarrollar la actividad fotosintética plena, conforme enverdecían llegaron a presentar valores de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila similares a los de las hojas del follaje.

La cinética de inducción de la fluorescencia de la clorofila, es dependiente de los factores y el rendimiento de la fluorescencia. La clorofila puede visualizarse como un indicador, generador de la fluorescencia (Irizar-Garza y Peña-Valdivia, 2000). La forma del espectro de emisión de fluorescencia lo determinan el contenido de clorofila y la actividad fotosintética; a su vez dependen de la condición ambiental en la que se desarrolla la planta (Lichtenthaler 1987). Se considera que a menor fluorescencia emitida por la hoja mayor eficiencia de su maquinaria fotosintética. El rendimiento o inducción de la fluorescencia de la clorofila es alterado por números factores de manera muy compleja (Irizar-Garza y Peña-Valdivia, 2000). A pesar de que se menciona que a menor fluorescencia emitida es mayor la

eficiencia de su maquinaria fotosintética, la mayor fluorescencia en las espatas de *Spathiphyllum* tiene otra interpretación. El desarrollo correcto del proceso completo de la fotosíntesis involucra la participación de cientos de proteínas, acarreadores de electrones, sustratos y productos por lo que la fluorescencia puede ser un parámetro fotoquímico que señale el funcionamiento de un grupo de componentes que intervienen en el proceso global, específicamente PSII, si está en proceso de integración o si está en proceso de degradación, y será, bajo ciertas condiciones, independiente de la concentración de pigmentos fotosintéticos. El incremento en las clorofilas, puede explicar el aumento en la fluorescencia y con ello un aumento probable de la fotosíntesis. Los resultados confirman las observaciones realizadas en *Spathiphyllum* por medio de análisis con C_{14} , se vió que las espatas verdes sobrepasaron la fijación del CO_2 de las hojas verdes del follaje (Weidner, 1985). En los cortes observados bajo epifluorescencia en el presente estudio, se observó clorofila en las células oclusivas de los estomas, debido a los cloroplastos se encontraron pigmentos fotosintéticos en los extractos de acetona, conforme enverdecieron las espatas se encontraron cloroplastos alrededor de los haces vasculares, cerca de las epidermis, tanto de la cara abaxial y adaxial, en comparación, las hojas verdes contenían abundante clorofila; el tejido se observó de color rojo. Estas observaciones también confirman que con el enverdecimiento de la espata existió incremento de cloroplastos funcionales relacionados con la disipación de energía en forma de fluorescencia durante el funcionamiento del PSII. De los cloroplastos que presentaron las células oclusivas de los estomas de las espatas, los valores incrementaron conforme enverdeció la espata hasta alcanzar valores de fluorescencia similares a los de hojas del follaje, a pesar de presentar una concentración menor de clorofilas. En *Spathiphyllum* y *Guzmania*, la fijación de CO_2 por el hipsofilo enverdecido se puede considerar como un eficiente aportador de materia orgánica. Se puede asumir que las plantas tienen establecido un medio auxiliar de producción de carbono que es usado para el desarrollo del fruto y semillas durante el periodo post floral de la inflorescencia

(Weidner *et al.*, 1985). El incremento de la concentración de proteínas totales, la subunidad grande de Rubisco (LSU), los distintos niveles de fluorescencia y la acumulación de pigmentos fotosintéticos principalmente de clorofila *a* pueden considerarse como parte del medio auxiliar para la producción de carbohidratos en *Spathiphyllum*, la inflorescencia se localiza junto a la espata, esta necesita una mayor fuente de nutrientes para completar su desarrollo que la espata le proporciona por lo cual se comienza a llevar a cabo el proceso de enverdecimiento donde la espata llega a presentar algunos patrones fisiológicos semejantes a los de las hojas del follaje cuando comienza la maduración de la inflorescencia.

La relevancia del proceso de reverdecimiento es discutido desde el punto de vista fisiológico, pero también presenta un aspecto ecológico relacionado con la polinización de la planta (Weidner *et al.*, 1985). La mayoría de estudios de enverdecimiento que se conocen se enfocan a la diferenciación de etioplastos a cloroplastos, la información de otro tipo de plastidios es escasa y al parecer poco conocida, por lo cual los estudios de este tipo de enverdecimiento pueden ser importantes, con estudios más detallados podrían conocerse la localización de las diversas proteínas que participan en la formación de cloroplastos y comparar con el proceso que se lleva a cabo en los etioplastos.

Los resultados de la presente investigación indicaron que el enverdecimiento de la espata de *Spathiphyllum wallisii* R., que tomó cerca de ocho semanas, se dio por la síntesis y acumulación de pigmentos fotosintéticos en las células del mesófilo, y que simultáneamente se llevó a cabo la síntesis, acumulación y organización de todos “actores” de la fotosíntesis. Además, con el enverdecimiento el índice Fv/Fm indicó que se alcanzó el rendimiento cuántico adecuado para asegurar que las reacciones fotoquímicas se realizan óptimamente y parecen estar apoyando correctamente el desarrollo de las reacciones bioquímicas. Aunque faltaría cuantificar la tasa de la fotosíntesis neta de las espatas de *Spathiphyllum wallisii* R. puedes inferirse que la espata debe tener un papel sobresaliente en el aporte de fotoasimilados a las estructuras reproductivas de esta especie.

8. CONCLUSIONES

Las espatas enverdecidas E3 presentaron la mitad de la concentración de clorofila total encontrada en las hojas verdes del follaje (V).

El enverdecimiento en la espata de *Spathiphyllum wallisii* R. está asociado al incremento de pigmentos fotosintéticos, en mayores magnitudes la Chl *a*.

La espata enverdecida E3 presentó mayor concentración de proteínas solubles totales que las hojas verdes del follaje (V); ambas presentaron niveles similares de LSU Rubisco, lo que podría explicar las similitudes observadas en fluorescencia.

Los valores de fluorescencia similares en E3 y V podrían indicar similitud en la fotoactividad del PSII a pesar de una menor concentración de pigmentos fotosintéticos en E3.

La presencia de clorofila solo en las células oclusivas de los estomas en espatas B evidencian los valores de fluorescencia y de los pigmentos fotosintéticos detectados en los análisis.

El aumento de pigmentos fotosintéticos, LSU de Rubisco y de la fluorescencia durante las diferentes etapas de enverdecimiento sugieren una reactivación de la actividad fotosintética.

9. LITERATURA CITADA

- Adams W.W., Demmig-Adams B., Winter K., Schreiber U. 1990. The ratio of variable to maximum chlorophyll fluorescence from photosystem II, measured in leaves at ambient temperature and at 77K as an indicator of the photon yield of photosynthesis. *Plant* 180:166-174.
- Akoumianaki-Ioannidou A., Georgakopoulos J.H., Fasseas C., Argyroudi-Akoyunoglou J.H. 2004. Photoacclimation in *Spathiphyllum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 73: 149-158.
- Arregui L.M., Merina M., Mingo-Castel A.M. 2000. Aplicación del medidor portátil de clorofila en los programas de fertilización nitrogenada en patata siembra 1. Depto. de producción agraria, Universidad Pública de Navarra. Pascualena J, Ritter E. Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. España. 157-170 p.
- Armstrong G.A., Runge S., Frick G., Sperling U., Apel K. 1995. Identification of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B: A Branched Pathway for Light-Dependent Chlorophyll Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 4: 1505-1517.
- Baker N.R., Horton P. 1987. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. *Topics in Photosynthesis* 9: 145-168.
- Baker N.R. 1991. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiology Plant* 81: 563-570.
- Barbata C, Lino-Neto T., Piques M.C., Sousa M.F., Tavares R.M., Pais M.S. 2004. Identification of *Zantedeschia aethiopica* Cat1 and Cat2 catalase genes and their expression analysis during spathe senescence and regreening. *Plant Science* 167: 889-898.
- Barthélemy X., Gwénaëlle B., Alfons R., Sarah D., Georg H.S., Fabrice F. 2000. Localization of NADPH-protochlorophyllide reductase in plastids of barley at different greening stages. *Photosynthesis Research* 64: 63-76.
- Barrantes O. 2001. Efectos del dióxido de azufre y del ozono en *Pinus halepensis* Mill en cámaras abiertas. Departamento de biología animal, biología vegetal I, ecología. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). España. Tesis doctoral en línea. [<http://www.tesisenxarxa.net/index.html>]
- Beale S.I. 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 60: 43-73.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman & Co.
- Bidwell, R.G.S. 2002. *Fisiología Vegetal*. México. 784 p
- Biswal U.C., Biswal B. 1988. Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. *International Review of Cytology*. 133: 271-321.

- Biswal U.C., Biswal B., Kumar M.R. 2003. Chloroplast Biogenesis: From Proplastid to Gerontoplast. Ed. Springer. 353 p.
- Björkman O., Demmig B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and Chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Plant* 170: 489-504.
- Blomqvist L., Ryberg M. 2008. Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development. *Photosynthesis Research* 96: 37-50.
- Bogner J.S., Nicolson D.H. 1991. A revised classification of Araceae with dichotomous keys. *Willdenowia* 21: 35-50.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. 1158-1203 pp.
- Bunting G.S. 1960. A revision of *Spathiphyllum* (Araceae). *Memoris of the New York Botanical Garden* 10:1-53.
- Crafts-Brandner S.J., Below F.E., Wittenbach V.A., Harper J.E., Hageman R.H. 1984. Differential senescence of maize hybrids following ear removal II. Selected leaf. *Plant Physiology* 74:368-373.
- Curtis H., Barnes N.S., Schnek A., Flores G. 2000. *Biología*. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29: 109-136.
- Doorn Van W.G. 2005. Plant programmed cell death ant the point of no return. *Plant Science*. 10: 478-483.
- Edwards E.J., Cobb A.H. 1997. Effect of temperature on glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potatoes (*Solanum tuberosum* L. cv. King Edward) stored at low photon flux density, including preliminary modeling using an artificial neural network. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1032-1038.
- Ei-Ichiro O., González G.S. 1985. *Química bioinorgánica: Una introducción*. Editorial Reverte. 532 p.
- Ellis R.J. 1979. The most abundant protein in the world. *Trends Biochemistry Science* 4: 241-244.
- Evans J.R., Seemann J.R. 1989. Differences between wheat genotypes in specific activity of RuBP carboxylase and the relationship to photosynthesis. *Plant Physiology* 74: 759-765.
- Ferreira R.B., Esquivel M.G., Teixeira A.R. 2000. Catabolism of ribulose bisphosphate carboxylase from higher plants. *Current Topics in Phytochemistry* 3:129-165.
- Follett R.H., Follet R.F., Halvorson A.D. 1992. Use of a chlorophyll meter to evaluate the nitrogen status of dryland winter wheat. *Soil-plant Nutrient Reserch. Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 23: 687-697.

- Font Quer P. 1979. Diccionario de botánica. Labor S.A. Barcelona. 1244 pp.
- Fox R.H., Piekielek W.P., Macneal K.M. 1994. Using a chlorophyll meter to predict nitrogen fertilizer needs of winter wheat. Community Soil Science Plant Annual. 25: 171-181.
- Frachebound Y., Haldimann P., Leipner J., Stamp P. 1999. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*zea mays* L.). Journal of Experimental Botany 50: 1533-1540.
- Gay A.P., Thomas H. 1996. Leaf development in *Lolium temulentum* L.: photosynthesis in relation to growth and senescence. New Phytologist 130: 159-168.
- Gilbert W.C., Costas M.E.B., Amador B.C., Amador R.F., Rodríguez F.M. 2000. 2ª ed. Físicoquímica. Editorial Pearson Educación. 1057 pp.
- Griffiths G., Stobart A.K., Stymne S. 1985. The acylation of sn-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. Biochemistry Journal 230: 379-388.
- Grimm B. 2001. Chlorophyll: "Structure and Function". Encyclopedia of Life Sciences. Nature publishing.
- Grunenfelder L.A., Knowles L.O., Hiller L.K., Knowles N.R. 2006. Glycoalkaloid development during greening of fresh market potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 5847-5854.
- Guiament. 2004. La senescencia foliar: incógnitas del desmantelamiento celular. Instituto de fisiología vegetal. [<http://www.safv.com.ar/Giamet101004.pdf>].
- Guseinova I.M., Suleimanov S.Y., Zulfugarov L.S., Aliev J.A. 2000. Assembly of the Lightharvesting Complexes during plastid development. Journal of Fluorescence 10: 255-259.
- Hall M.A. 1977. Ethylene involvement in senescence processes. Annals of Applied Biology 85: 424-428.
- Hans-Walter H. 1997. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford.
- Howard T. 1996. Chlorophyll: a symptom and a regulator of plastid development. Tansley Review No. 92. New Phytology 136: 163-181.
- Ireland C.R., Long N.R., Baker N.R. 2004. The relationship between carbon dioxide fixation and chlorophyll a fluorescence during induction of photosynthesis in maize leaves at different induction of photosynthesis in maize leaves at different temperatures and carbon dioxide concentrations. Planta, editorial Springer Berlin 550-558 p.
- Irizar-Garza M.B.G, Peña-Valdivia C.B. 2000. Chlorophyll and photo-synthetic oxygen evolution in water-stressed triticale (Tricosecale wittmack) and wheat (*Triticum aestivum* L.) during vegetative stage. Cereal Research Communications 28: 387-394

- Kannagara C.G., Gough S.P. 1978. Biosynthesis of d-aminolevulinic acid in greening barley leaves. Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. Carlsberg Research Communications 43: 185–194.
- Karp G. 1998. Biología Celular y Molecular. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México.
- Kautsky H., Hirsch A. 1931. Neue versuche zur kohlenstoffassimilation. Naturwissenschaften 19: 964-967.
- Kim J., Mullet J.E. 2003. A mechanism for light-induced translation of the *rbcL* mRNA encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in barley chloroplasts. Plant Cell Physiology 44: 491-499.
- Krause G.H., Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:313-349.
- Kroll D., Meierhoff K., Bechtold N., Kinoshita M., Westphal S., Votchknecht U.C., Soll J., Westhoff P. 2001. VIPPI, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylacoid membrane formation. Proceeding of the National Academy of Science USA 98: 4238-4242.
- Krugh B.W., Bickham L., Miles C.D. 1994. The solid-state chlorophyll meter: a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize Genetics Cooperation News Letter 68: 25–27.
- Lebedev N.N., Timko M.P. 1998. Protochlorophyllide photoreduction. Photosynthetic Research 58:5-23.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350–382.
- Lichtenthaler H., Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemistry Society Transaction 603: 591-592.
- Lodish H., Damell J., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D. 2001. Biología molecular de la célula. 4a ed. Madrid: Editorial Panamericana.
- Marder J.B., Droppa M., Caspi V., Raskin V.I., Horváth G. 1998. Light-independent thermoluminescence from thylakoids of greenings barley leaves. Evidence for involvement of oxygen radicals and free chlorophyll. Physiologia Plantarum 104: 713-719.
- Martínez G.R., Zavaleta H.A., Del Mar Ruíz P.L., Delgado A.H., Vaca P.R. 2008. Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por la citocinina BAP. Interciencia 33: 140-145.
- Masuda T., Fusada N., Oosawa N., Takamatsu K., Yamamoto Y.Y., Ohto M., Nakamura K., Goto K., Shibata D., Shirano Y., Hayashi H., Kato T., Tabana S., Shimada H., Ohia H., Takamiya K. 2003. Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 44: 963-974.

- Mathews C.K., Van Holde K.E., Ahern K.G. 2002. Bioquímica. 3ª. Ed. Editorial Pearson.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluoresce – a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-668.
- Mayo S.J., Bogner J., Boyce P.C. 1997. The Genera of Araceae. Royal Botanic Gardens, Kew 67-71 pp.
- Muhlbauer S.K., Eichacker L.A. 1999. The stromal protein large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase is translated by membrane bound ribosomes. European Journal of Biochemistry 261: 784-788.
- Müller P., Li X-P., Niyogi K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125: 1558-1566.
- Murría G.M. 2006. Regulación redox de la Rubisco: Contribución estructural y funcional del par de residuos conservados Cys172 y Cys192. Tesis de doctorado en bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.
- Nicolson D.H. 1968. The genus *Spathiphyllum* in the east Malesian and west Pacific Islands (Araceae). Nationaal Herbarium Nederlands- Publications: Blumea 16: 119-121.
- Öquist G. 1987. Environmental stress and photosynthesis. In: Progress in Photosynthesis Research. Vol IV. Biggins J. (ed.) Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht 1-10 pp.
- Parry M.A., Andralojc P.J., Mitchel R.A., Madgwick P.J., and Keys A.J. 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. Journal of Experimental Botany 54: 1321-1333.
- Plücken H., Müller B., Grohmann D., Westhoff P., Eichacker L.A. 2002. The HCF136 protein is essential for assembly of photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 532:85-90.
- Pollman S., Springer A., Buhr F., Lahroussi A., Samol I., Bonneville J., Tichtinsky G., von Wettstein D., Reinbothe C., Reinbothe S. 2007. A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 2019-2023.
- Ravishankar P., Lada R.R., Caldwell C.D., Asiedu S.K., Adams A. 2007. The effects of light, rehillng, and mulching on greenshoulder and internal greening in carrots. Crop Science 47:1151-1158.
- Reinbothe S., Reinbothe C., Lebedev N., Apel K. 1996. PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll Biosynthesis. Plant Cell 5: 763-769
- Rizza F., Pagani D., Stanca A.M., Cattivelli L. 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and oats. Plant Breeding 120:389-396.

- Rodríguez M.N., Alcántar G.G., Aguilar S.A., Etchevers B.J.D., Santizó R.J.A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra latinoamericana. Universidad Autónoma de Chapingo 16:135-141.
- Rost T.L., Barbour M.G., Stocking C.R., Murphy T.M. 1997. Plant Biology. Wadsworth Publishing Company. California.
- Ryberg M., Sundqvist C. 1991. Structural and functional significance of pigment-protein complexes of chlorophyll precursors. In: Scheer H (ed) Chlorophylls. CRS press, Boca Raton 587-612pp.
- Ryberg M., Lindsten A., Wiktorsson B., Sundqvist C. 1993. Chlorophyll synthetase activity is relocated from transforming prolamellar bodies to developing thylakoids during irradiation of dark-grown wheat. *Physiologia Plantarum* 88: 29-36.
- Salisbury F.B., Ross C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill, México.
- Salvador M.L., Klein U. 1999. The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 121: 1367-1374.
- Salvador M.L., Suay L., Anthonisen I.L., Klein U. 2004. Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcl* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 45: 176-182.
- Seaton G.G.R. y Walker D.A. 1990. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of the Royal Society of London* 242: 29-35.
- Sheramati I., Shahollari B., Landsberger M., Westermann M., Cherepneva G., Kusnetsov V., Oelmüller R. 2004. Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplast of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the CF1 moiety located towards the stromal space. *Plant Journal* 38: 578-593.
- Smart C.M. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytology* 126: 419-448
- Spreitzer R.J., Salvucci M.E. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53: 449-475.
- Spreitzer R.J. 2003. Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Elsevier 414:141-149.
- Starr C. 2008. *Biología: La unidad y diversidad de la vida*. Ed. Cengage Learning Editores. 1064 pp.
- Strasburger E. 1994. *Tratado de Botánica*. 8a. Ed. castellana. Ediciones Omega S.A.
- Suay L., Salvador M.L., Abesha E., and Klein U. 2005. Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 33: 4754-4761.
- Taiz L. & Zeiger E. 2002. *Plant Physiology* (3rd. ed.). Sinauer, New York

- Tavares R.M., Morais F., Melo N., Pais M.S.S. 1998. Thylakoid membrane reorganization during *Zantedeschia aethiopica* spathe regreening: consequences of the absence of DELTA3-trans-hexadecenoic acid in photochemical activity. *Phytochemistry* 47: 979–984
- Taylor T.C., Andersson I. 1997. Structure of a product complex of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* 36: 4041–4046.
- Thomas H., Stoddart J.L. 1980. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 83–111
- Turner F.T., Jund M.F. 1991. Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semidwarf rice. *Agronomy Journal* 83:926-928.
- Vícková A., Spundová M., Kotabová E., Novotný R., Dolezal K., Naus J. 2006. Protective cytokinin actions switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267.
- Walker D. 1987. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. *Oxygraphics Limited, U S A.* 203 p
- Waz B.D., Karowski J., Diercksen G.H.F. 2001. Spectra of confined two-electron atoms. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* 34: 1987-2000.
- Weaver L.M., Amasino R.M. 2001. Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* 127: 876-886.
- Weidner M., Frandz A., Napp-Zinn K. 1985. Plastid ultrastructure and photosynthesis in greening petaloid hypsophylls. *Plant* 163: 164-174.
- Wingler A., Mares M., Pourtau N. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* 161:781-789.
- Wood C.W., Tracy P.W., Reeves D.W., Edmisted K.L. 1992. Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *Journal of Plant Nutrition.* 15: 1435-1448.
- Yoshida S. 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Plant Biology* 6: 79-84.
- Zavaleta H.A., Franklin K.A., Ougham H.J., Thomas H., Scott I.M. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana glauca* leaves I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 1677-1682.
- Zuñiga R.E. 2003. Cambios en la eficiencia fotoquímica primaria del PSII en “Deschampsia Antarctica Desv.” bajo condiciones de estrés frío y lumínico. Tesis de grado. Instituto de Biología, Facultad de ciencias de Valdivia Chile. Tesis en línea [<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/icz.95c/html/index-frames.html>]