

## DEGRADACION DE CLOROFILA EN CLOROPLASTOS INCUBADOS EN MEDIO ISOTONICO CON LA FRACCION CELULAR EXTRACLOROPLASTICA

J. Cuello\*, A. Lahora\* y B. Sabater\*\*

\* *Dpto. de Biología Vegetal. Facultad de Biología.  
Univ. de Murcia. 30100 Espinardo, Murcia.*

\*\* *Dpto. de Biología Vegetal. Facultad de Ciencias.  
Univ. de Alcalá de Henares. Aptdo. 20. Alcalá de Henares. Madrid.*

### RESUMEN

Partiendo de hojas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), se estudió la degradación de clorofila en cloroplastos incubados en medio isotónico con la fracción celular extracloroplástica. En estas condiciones la fracción celular extracloroplástica estimula la degradación de clorofila, al menos en parte, no de forma enzimática sino a través de algún agente(s) termoestable actuando, probablemente, como un detergente sobre las membranas del cloroplasto y/o suministrando efectores enzimáticos. Este efecto de la fracción extracloroplástica no depende del estado fisiológico de las hojas. Además, en estas condiciones de incubación de cloroplastos, los reguladores más importantes que afectan al envejecimiento no tienen efecto sobre la degradación de clorofila. Los resultados sugieren que los agentes responsables directos de la degradación de clorofila son, al menos en parte, intracloroplásticos. Las enzimas "clorofila oxidasa", dependiente de ácido linolénico, y clorofila peroxidasa, cuyas actividades están presentes en los tilacoides, podrían ser responsables de tal degradación.

Palabras clave: "Clorofila oxidasa". Cloroplastos. Degradación de clorofila. Ensayos *in vitro*. Fitohormonas. Peroxidasa.

### SUMMARY

#### CHLOROPHYLL BREAKDOWN IN CHLOROPLASTS INCUBATED IN ISOTONIC MEDIUM WITH THE EXTRACHLOROPLASTIC CELLULAR FRACTION

Starting from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, chlorophyll breakdown has been studied in isolated chloroplasts incubated with isotonic extrachloroplasmic subcellular fraction. An extrachloroplasmic subcellular fraction stimulated chlorophyll breakdown, at least partially through some nonenzymatic thermoestable factor(s), behaving, probably, as a detergent on chloroplast membranes and/or supplying enzymatic effectors. This effect did not depend on the physiological stage of leaves. Under incubation conditions, the main growth regulators effectors of senescence did not affect chlorophyll

Este trabajo ha sido financiado por la CAICYT. (Proyecto PB85-0318).

breakdown. The results suggest that factors responsible for chlorophyll breakdown are, at least in part, intrachloroplastic. Linolenic acid-dependent chlorophyll oxidase and chlorophyll peroxidase, whose activities occur in thylakoids, could be responsible for this chlorophyll breakdown.

Key words: Chlorophyll breakdown. Chlorophyll oxidase. Chloroplasts. *In vitro* assays. Peroxidase. Phytohormones.

## INTRODUCCION

Los procesos degradativos que ocurren durante el envejecimiento foliar, y particularmente en los cloroplastos, dependen de la síntesis de proteínas en el citoplasma (Thomas y Stoddart, 1980) y en los cloroplastos (Cuello *et al.*, 1984; Martín *et al.*, 1986) durante la inducción de este proceso del desarrollo.

Choe y Thimann (1974) encontraron una gran estabilidad en los cloroplastos aislados, medida a través de las pérdidas de clorofila y proteína, en comparación con la de cloroplastos en secciones foliares incubadas en las mismas condiciones. Esto sugiere que algún factor citoplásmico ligado a la síntesis de proteínas debe ser responsable de la degradación de los cloroplastos durante el envejecimiento foliar. Sin embargo, entre los varios enzimas descritos

responsables de la degradación de la clorofila (Sabater y Rodríguez, 1978; Hendry *et al.*, 1987), al menos dos de ellos, una clorofila peroxidasa y una "clorofila oxidasa", son proteínas constituyentes de los tilacoides (Martinoia *et al.*, 1982; Lüthy *et al.*, 1984; Thomas *et al.*, 1985).

En este trabajo se hace una primera aproximación al estudio del origen y naturaleza de los factores responsables de la degradación de clorofila en cloroplastos aislados e incubados en un medio isotónico con la fracción extracloroplástica cruda procedente de secciones foliares en distinto estado de envejecimiento. También se estudió el posible efecto directo de los reguladores del crecimiento más importantes que afectan al envejecimiento así como los efectos de algunos activadores e inhibidores enzimáticos.

## MATERIAL Y METODOS

Se usaron plántulas de cebada (*Hordeum vulgare* L., 1753, var. Hassan) que crecieron usualmente durante 14 días como se describió por Cuello *et al.* (1987).

Para los tratamientos que afectan al envejecimiento foliar, muestras de 2 g de secciones de 2.5 cm de la

primera hoja, descartando la base y el ápice, se incubaron durante 72 h en oscuridad a 25 °C en 100 mL de agua destilada o de disolución 14  $\mu$ M de quineta.

La obtención de los cloroplastos y de la fracción extracloroplástica (FE) se realizó como describieron

García *et al.* (1983). Partiendo de 2 g de secciones de hojas y 12.5 mL de tampón de extracción (TE) conteniendo 0.35 M sacarosa, 25 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA y 2 mM isoascorbato sódico, pH 7.6. El sobrenadante de la centrifugación del extracto a 2500 xg constituyó lo que llamamos FE. El sedimento de cloroplastos se lavó dos veces, con 5 mL de TE cada una, y finalmente se resuspendió suavemente en 2.5 mL de TE. Según Calle *et al.* (1986) esta preparación de cloroplastos está relativamente libre de contaminación por proteínas de citoplasma (< 1 %) y de mitocondrias (< 5 %). Además, la integridad de los cloroplastos aislados fue de al menos el 70 %, medida con el ensayo de reducción del ferricianuro (Berkowitz y Gibbs, 1985). Sin embargo, medida por el nivel de ribulosa difosfato carboxilasa, la FE está contaminada por proteínas estromales de cloroplastos (Cuello *et al.*, 1991). En su caso, la fracción membranosas de cloroplastos se preparó según García *et al.* (1983), resuspendiendo el sedimento de membranas final, procedentes de 4 g de secciones, en 1 mL de tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4 o TE sin sacarosa.

La incubación de cloroplastos en medio isotónico se realizó en un tubo con 0.5 mL de suspensión de cloroplastos más, usualmente, 1 mL de FE, o diluciones de la misma con TE. La mezcla se mantuvo durante 48 o 72 h, en oscuridad y a 25 °C, con agitación en un agitador ATOM-85 a 85 o 120 rpm. Para la incubación de cloroplastos con reguladores del crecimiento se usó la preparación obtenida resuspendiendo el sedimento de cloroplastos lavados

en 2.5 mL de disolución del correspondiente regulador en TE.

Las medidas de "clorofila oxidasa" y clorofila peroxidasa asociadas con tilacoides se hicieron como indicaron Thomas *et al.* (1985), por disminución de absorbancia a 672 nm a 20 °C en un espectrofotómetro Hitachi, modelo 150-20. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 3 mL, indistintamente, en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4 o en TE, sin o con 0.35 M sacarosa, con concentración inicial de clorofila de 0.02 g L<sup>-1</sup>. En su caso, el medio de "clorofila oxidasa" contuvo 0.5 mM dietil ditiocarbamato (DIECA) o 1.4 mM ácido oléico (OA) (Lüthy *et al.*, 1984), mientras que el de peroxidasa contuvo 1 mM KCN o 850000 unidades de catalasa (C-10 de Sigma) L<sup>-1</sup> (Martinoia *et al.*, 1982). Se estudió el efecto de 0.05 % dodecil sulfato sódico (SDS), 1.4 mM ácido linolénico (LNA), 1 mM 2,4-diclorofenol (DCP), 0.75 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5 mM DIECA y 850000 UL<sup>-1</sup> de catalasa (efectores), sobre la degradación de clorofila en ensayos con cloroplastos aislados y en las actividades oxidasa y peroxidasa. El SDS, DCP y DIECA se incorporaron al medio disolviéndolos previamente en la FE o TE usados. Por otra parte, los volúmenes de disoluciones de LNA (20 g L<sup>-1</sup> en clorformo o etanol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y catalasa (40 g L<sup>-1</sup> en agua), que se adicionaron directamente al medio de reacción, fueron insignificantes (< 2 %) en comparación con el volumen total de éste.

Además de que en lo posible se trabajó en condiciones de esterilidad, se estudió la posible contaminación de los medios de reacción usando FE

calentada durante 5 min a 100 °C o filtrada con filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

La cantidad de clorofila, tanto en los medios de incubación de

cloroplastos o suspensiones de tilacoides como en secciones foliares intactas, se determinó por el método de Arnon (1949).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra los porcentajes de clorofila remanente, después de 48 y 72 h, en cloroplastos de hojas de 14 días recién cortadas incubados con FE procedente de: las mismas hojas, secciones incubadas previamente durante 72 h en agua y oscuridad, y secciones incubadas durante 72 h en 14  $\mu\text{M}$  quinetina y oscuridad. Como controles, se incubaron en las mismas condiciones cloroplastos en tampón isotónico exclusivamente y secciones foliares intactas en agua destilada. Se observa una disminución significativa de

clorofila a las 72 h en todas las incubaciones con FE, en comparación con cloroplastos incubados en tampón isotónico que durante el mismo tiempo retuvieron casi el 100 % de clorofila. Además, la cantidad de clorofila perdida es similar con todas las FEs (aproximadamente el 20 % a las 72 h), independientemente del estado de envejecimiento de las secciones origen de la FE, pérdida muy inferior a la que se produce en secciones intactas durante el mismo tiempo (65 %). La estimulación de la pérdida de cloro-

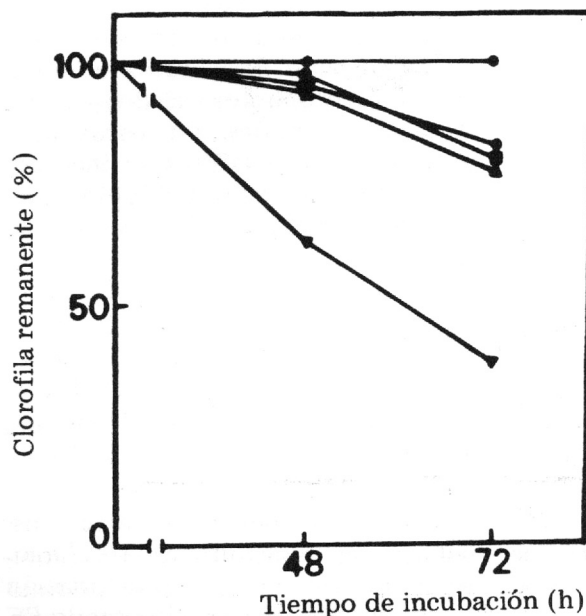


FIG. 1.—Porcentaje de clorofila remanente a las 48 y 72 h en cloroplastos incubados con FE aislada de: hojas recién cortadas (■), secciones incubadas en agua (▲) e incubadas en quinetina (●). Para comparación se muestran los controles de incubación de cloroplastos en TE (\*) y de secciones intactas en agua (▼). Las incubaciones con cloroplastos, realizadas a 85 rpm, contenían 0.07 g L<sup>-1</sup> de clorofila a tiempo 0. Los valores son medias de 3-10 ensayos independientes y en ningún caso el ES > 2.5.

TABLA 1

Porcentajes de clorofila remanente a las 48 y 72 h en cloroplastos de hojas de 8 y 14 días recién cortadas incubados con las FEs de las mismas hojas. Las incubaciones se hicieron a 120 rpm. Los valores son medias  $\pm$ ES de 3-9 experimentos. La concentración de clorofila a tiempo 0 fue: 0.05 y 0.07 g L<sup>-1</sup>, en los medios de cloroplastos de 8 y 14 días respectivamente.

Tiempo de incub. (h)	Edad de clorop. (días)	% de clorofila remanente	
		FE de 14 días	FE de 8 días
48	14	71 $\pm$ 1.3	70 $\pm$ 3.2
72	14	60 $\pm$ 0.7	63 $\pm$ 3.4
48	8	63 $\pm$ 1.3	59 $\pm$ 0.6
72	8	50 $\pm$ 3.3	50 $\pm$ 0.3

filas en secciones intactas en comparación con cloroplastos aislados es más destacable a las 48 h. Estos resultados confirman que la clorofila en los cloroplastos aislados es más estable que en secciones (Choe y Thimann, 1974) y sugieren la presencia en la FE de algún agente estimulador de la degradación de clorofilas, independientemente del estado de envejecimiento de las secciones.

Ante la posibilidad de que el efecto de la FE fuera dependiente del estado de desarrollo de las hojas, se incubaron todas las combinaciones posibles entre cloroplastos de hojas de 8 o 14 días recién cortadas y sus respectivas FEs (Tabla 1). De nuevo no se encontraron diferencias significativas entre los efectos de las FEs de hojas de 8 y 14 días sobre los cloroplastos de 14 días a 48 y 72 h de incubación. No obstante, las mayores pérdidas de clorofilas con FE de 14 días, con respecto a las obtenidas en la figura 1, indican que son muy importantes las condiciones de agitación (120 rpm en la

Tabla 1). Se obtienen resultados similares con cloroplastos de 8 días, aunque estos pierden más clorofila (aproximadamente 10 %) para cualquier FE y tiempo de incubación, a pesar de que los cloroplastos de 8 días fueron tan estables en tampón isotónico (en 4 determinaciones el % de clorofila remanente  $\pm$  ES a 72 h fue de 99  $\pm$  1.9) como los cloroplastos de 14 días (Fig. 1). Las hojas primarias de plántulas de cebada de 8 y 14 días están, respectivamente, en la etapa de expansión y de envejecimiento (Martín *et al.*, 1986). Según ésto los efectos cuantitativamente similares de FEs de hojas de 8 y 14 días (Tabla 1) concuerdan con los de FEs de secciones incubadas (Fig. 1) ya que en ningún caso su efecto depende del estado de envejecimiento de las secciones origen de la FE, sea este envejecimiento natural o inducido artificialmente. Sin embargo, el efecto de la FE depende, al menos en parte, del estado de desarrollo de los cloroplastos (Tabla 1).

Para ensayar una posible conta-

minación bacteriana se hicieron controles usando FEs de diferentes orígenes, filtradas previamente a través de filtro Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  o calentadas durante 5 min a  $100^\circ\text{C}$ . Tanto en ensayos con FEs filtradas o FEs calentadas, resultados no mostrados indicaron que cualquier FE conserva la mayor parte o toda su capacidad degradativa de clorofila medida a las 72 h. Esto confirmó la estimulación de la degradación de clorofila por la FE y, lo que es más llamativo, que el factor extracloroplástico responsable es en su mayor parte termoestable.

Se ensayaron también los posibles efectos directos sobre los cloroplastos de los reguladores más importantes y a concentraciones que afectan al envejecimiento. Se midieron concretamente los niveles de clorofila remanente, a las 48 y 72 h, en cloroplastos incubados con FE más  $14 \mu\text{M}$  quinetina,  $34 \mu\text{M}$  ácido abscísico,  $69 \mu\text{M}$  etileno,  $45 \mu\text{M}$  jasmonato de metilo o  $1000 \mu\text{M}$  espermidina. Resultados no mostrados indicaron que, con excepción de la espermidina, ningún regulador tuvo efecto significativo sobre la degra-

dación de clorofila a cualquier tiempo de incubación, lo que sugiere que sus efectos sobre el envejecimiento de cloroplastos en secciones intactas son indirectos. Weidhase *et al.* (1987) tampoco encontraron efecto alguno de benciladenina o jasmonato de metilo sobre cloroplastos de cebada incubados en medio isotónico. Sorprendió, sin embargo, la ligera estimulación de la degradación de clorofila por espermidina (a las 72 h baja de 60 a 54%) ya que, como otras poliaminas, se describió que retrasa el envejecimiento de hojas (Noodén, 1988).

Por su estabilidad térmica, es improbable una naturaleza enzimática del factor extracloroplástico principal responsable de la degradación de clorofila. Además, ensayando el efecto de diferentes concentraciones de FE (Fig. 2) los resultados tampoco sugieren que actúe como enzima puesto que no se observa la proporcionalidad típica entre cantidad de efector y efecto producido. Únicamente se observan degradaciones significativas a las dos concentraciones superiores de FE (0.8 y 1.0 mL de FE en el medio). Una posibilidad de

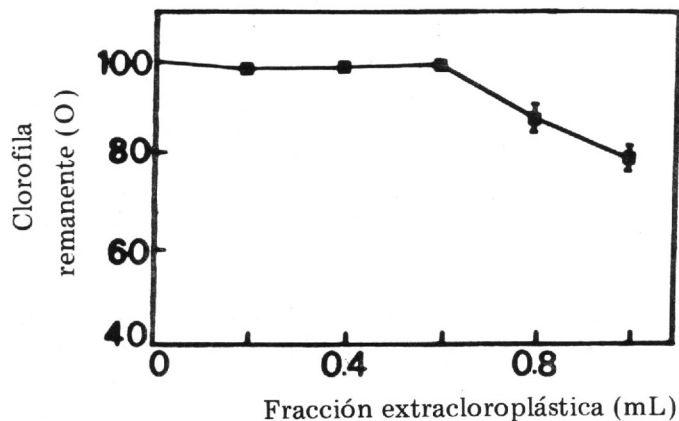


FIG. 2.—Porcentaje de clorofila remanente a las 72 h en cloroplastos incubados en medio isotónico con concentraciones variables de FE. Cloroplastos y FE, ambos de hojas de 14 días recién cortadas se incubaron a 85 rpm. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4-9 ensayos independientes y sólo se representan ES  $> 1$ .

TABLA 2

Porcentaje de clorofila remanente a las 72 h en cloroplastos incubados en medio isotónico con diferentes efectores enzimáticos. Cloroplastos y FE, ambos de hojas de 14 días recién cortadas, se incubaron a 85 rpm. Los valores son medias  $\pm$  ES de 4-9 ensayos independientes.

Control (TE)	FE	SDS	FE+SDS	FE + SDS + DIECA
99.2 $\pm$ 0.9	78.9 $\pm$ 2.3	84.6 $\pm$ 2.1	75.0 $\pm$ 2.9	84.3 $\pm$ 3.1
Cloroformo	LNA	SDS + LNA	FE+SDS+LNA	FE + SDS + LNA + DIECA
69.7 $\pm$ 2.4	51.8 $\pm$ 0.7	52.5 $\pm$ 0.8	49.3 $\pm$ 1.5	50.0 $\pm$ 1.4
FE + SDS + Catalasa	DCP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SDS + DCP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FE + SDS + DCP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FE + SDS + DCP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Catalasa
44.1 $\pm$ 0.5	90.7 $\pm$ 2.6	71.2 $\pm$ 2.0	84.0 $\pm$ 1.4	89.1 $\pm$ 2.5

explicación de estos resultados podría ser, al menos parcialmente, a través de una acción de detergente de FE, que por la rotura de membranas de cloroplastos podría hacer accesible la clorofila a enzimas degradativos intracloroplásticos, acción que, como se vio antes, no depende del estado fisiológico de las secciones origen del extracto.

Dos posibles enzimas degradativas son clorofila peroxidasa y "clorofila oxidasa" (Martinoia *et al.*, 1982). Para comparar con las actividades enzimáticas, se ensayaron los efectos del SDS y de los efectores enzimáticos de "clorofila oxidasa" (LNA) y clorofila peroxidasa (DCP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), además del inhibidor DIECA y el enzima catalasa sobre la degradación de la clorofila con cloroplastos

incubados en medio isotónico (Tabla 2). El SDS tiene una acción similar a la FE, lo que de nuevo sugiere la posible acción detergente de ésta. El efecto conjunto de ambos es ligeramente inhibido por DIECA. Por otra parte, a pesar de que el cloroformo (disolvente de LNA en los primeros ensayos) estimula la degradación de clorofila, ésta aún es estimulada por LNA, en presencia o ausencia de FE o SDS, aunque en nuestras condiciones de ensayo este efecto no es inhibido por DIECA, como observaron Lüthy *et al.* (1984) con tiempos de reacción cortos. Finalmente, DCP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulan también la degradación, aunque ligeramente actuando sólo y más intensamente en presencia de SDS. Además, con FE + SDS la catalasa inhibe

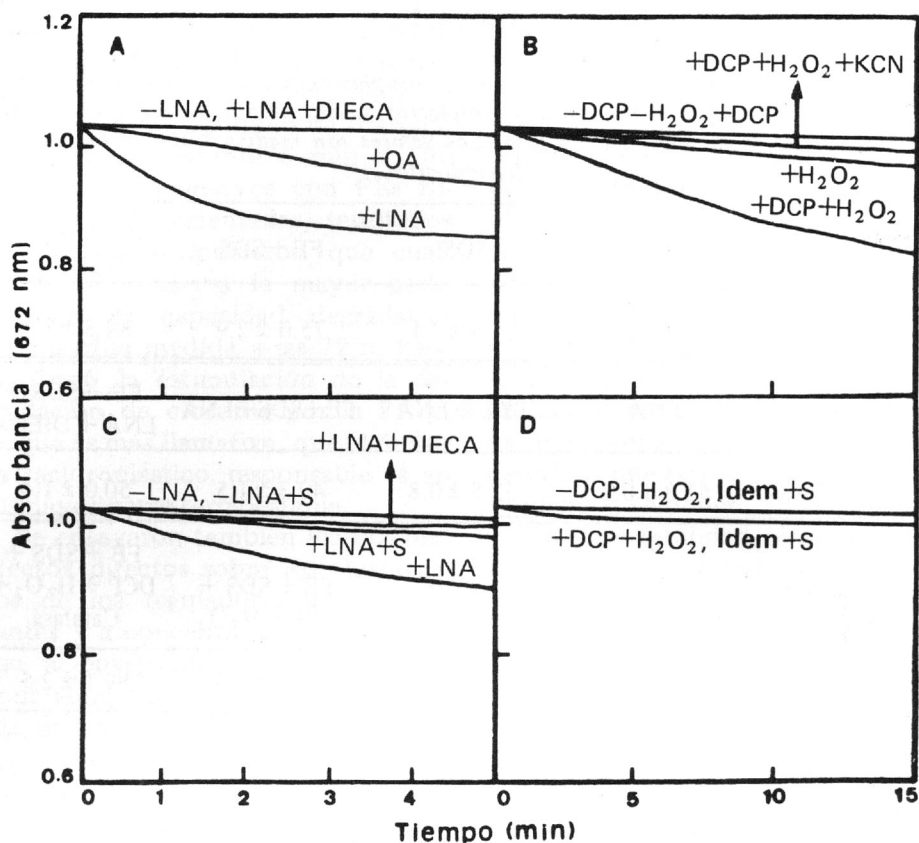


FIG. 3.—Degradación de clorofila con el tiempo de reacción en tilacoides incubados con 0.05 % SDS en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4 (A y B) y en TE sin sacarosa (C y D). Las reacciones se realizaron en ausencia y en presencia de los efectores enzimáticos indicados, incluyendo la sacarosa (S). No se consideraron las pequeñas variaciones iniciales de absorbancia. Para más detalles experimentales ver el texto.

algo la acción de los efectores de peroxidasa. Sin embargo, es llamativo el fuerte efecto estimulador de catalasa en presencia de FE + SDS, aunque un aumento de pérdida de clorofila por catalasa ya lo indicaron Wagenknecht y Lee (1958).

Conociendo los resultados de Martinoia *et al.* (1982) y los de la Tabla 2, una posibilidad de explicación de la degradación de clorofila en cloro-

plastos incubados en medio isotónico es a través de un enzima dependiente de LNA, presumiblemente “clorofila oxidasa”, y una clorofila peroxidasa, ambos localizados en el cloroplasto. Para ensayar esta posibilidad se midieron ambos enzimas según los métodos propuestos por Thomas *et al.* (1985). En este caso las reacciones se realizaron, partiendo de preparaciones de tilacoides, en tampón



0.1 M fosfato sódico pH 7.4 conteniendo 0.05 % SDS, según se indicó en Material y Métodos. Resultados representativos obtenidos de ensayos de "clorofila oxidasa" y clorofila peroxidasa se muestran en la figura 3 (A y B). Los resultados de la figura 3A indican la existencia de "clorofila oxidasa", ya que la degradación de la clorofila tiene lugar en presencia de LNA y es inhibida completamente por DIECA (complejante de Cu y Fe) (Martinoia *et al.*, 1982). Con menor intensidad que LNA, OA estimula también la degradación de clorofila, conociéndose que en presencia de OA es activa la "clorofila oxidasa" pero no la lipoxigenasa (Lüthy *et al.*, 1984). Sin embargo, y en contraste con los resultados de Martinoia *et al.* (1982), LNA también estimula la degradación de clorofila en tilacoides calentados a 75 °C durante 10 min aunque la actividad disminuye a menos de la mitad (resultados no mostrados). En estos ensayos y en los siguientes, OA y LNA se usaron disueltos en etanol, disolvente sin efecto apreciable hasta, al menos, las 2 h de incubación. Aunque las condiciones de ensayo de la figura 3A son muy diferentes a las de la Tabla 2, es posible que la causa principal de la aparente ausencia de inhibición por DIECA sobre la estimulación de la degradación de clorofila por LNA, observada en la Tabla 2, sea el tiempo de incubación relativamente tan grande (72 h en Tabla 2 frente a 5 min en Fig. 3A). Los resultados de la figura 3B indican inequívocamente la presencia de clorofila peroxidasa en tilacoides, ya que la degradación de la clorofila se estimula fuertemente con DCP +

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo inhibida casi completamente por adición de KCN. Además, resultados no mostrados indicaron que DCP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tuvieron, por una parte ningún efecto degradativo sobre tilacoides calentados a 75 °C durante 10 min, y por otra un efecto muy pequeño sobre tilacoides no calentados en presencia de catalasa. El efecto débil de DCP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de FE y SDS, observado en la Tabla 2, podría explicarse fácilmente por el acceso limitado del DCP al enzima en incubaciones con cloroplastos intactos.

Puesto que la degradación de clorofila observada en cloroplastos incubados en medio isotónico ocurría en TE, se ensayaron a continuación los enzimas "clorofila oxidasa" y clorofila peroxidasa en tilacoides en estas condiciones. La figura 3 (C y D) muestra resultados representativos obtenidos teniendo lugar las reacciones en TE sin y con sacarosa. En cuanto a "clorofila oxidasa" (Fig. 3C), se observa la estimulación de degradación de clorofila por LNA, aunque esta estimulación es inferior a la obtenida en tampón fosfato sódico (Fig. 3A). Además, en tampón HEPES la degradación también es fuertemente inhibida por DIECA así como por sacarosa. Con respecto a clorofila peroxidasa (Fig. 3D), se observa su baja actividad con o sin sacarosa, en comparación con la reacción en tampón fosfato (Fig. 3B). Los resultados demuestran que en las condiciones de cloroplastos incubados en TE (Tabla 2) las degradaciones de clorofila por clorofila peroxidasa y "clorofila oxidasa" están atenuadas en comparación con las degradaciones por estos mismos enzimas en las condiciones de Tho-

mas *et al.* (1985).

Los resultados expuestos sugieren que, en las condiciones de cloroplastos incubados en tampón isotónico usadas en este trabajo, al menos gran parte de la acción degradativa de clorofila provocada por la FE no ocurre a través de enzimas presentes en ella sino, probablemente, por algún agente(s) con acción probable de detergente y/o de efector enzimático, termoestable e independiente del estado fisiológico de las hojas. Por el contrario, los enzimas clorofila peroxidasa y "clorofila oxidasa" de tilacoides (Martinoia *et al.*, 1982), inactivos en ausencia de FE, podrían ser los responsables directos de esta degradación en presencia de FE, que podría suministrar los agentes para romper los cloroplastos y/o los efectores enzimáticos necesarios. Muchos resultados indican que el ácido linolénico es producido por degradación de lípidos de membranas senescentes mientras que  $H_2O_2$  y una amplia gama de fenoles

naturales están presentes en las células vegetales. Si la degradación de cloroplastos durante el envejecimiento foliar ocurre por deterioro del tonoplasto y liberación resultante de enzimas vacuolares activos (Thimann, 1987), éstos no incluirían, por tanto, a los responsables directos de la degradación de clorofilas. Según esto, la estabilidad de clorofilas en cloroplastos incubados en ausencia de FE (Fig. 1) no se debería a la ausencia de enzimas extracloroplásticas degradativas de pigmentos, como sugirió Panigrahi y Biswal (1987), sino posiblemente al mantenimiento de la integridad de los tilacoides en estas condiciones y/o a la falta de efectores enzimáticos. Aunque la degradación de clorofila estimulada por LNA podría estar catalizada por un enzima específico, es posible que el efecto de LNA sobre tilacoides hervidos sea un proceso no enzimático producido por radicales libres formados a partir de LNA (Lüthy *et al.*, 1984).

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la degradación de clorofila en cloroplastos aislados incubados en medio isotónico con la fracción celular extracloroplástica podría ocurrir, al menos en parte, por reacciones catalizadas por los enzimas "clorofila oxidasa", dependiente de LNA, y peroxidasa, cuyas actividades están presentes en los tilacoides. En las

condiciones de ensayo de este trabajo, la fracción extracloroplástica estimula la degradación de clorofila a través de algún agente(s) termoestable, que podría actuar como un detergente sobre las membranas del cloroplasto, y/o suministrando los efectores enzimáticos necesarios. Este efecto no depende del estado fisiológico de las hojas.

## BIBLIOGRAFIA

- ARNON, D. J., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.
- BERKOWITZ, G. A. and GIBBS, M., 1985. Chloroplasts as a Whole. In: *Modern Methods of Plant Analysis, New Series*. Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (Eds.). 1. 152-181. Springer-Verlag. Berlín.
- CALLE, F., MARTIN, M. and SABATER, B., 1986. Cytoplasmic and mitochondrial localization of the glutamate dehydrogenase induced by senescence in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 66: 451-456.
- CHOE, H. T. and THIMANN, K. V., 1974. The senescence of Isolated Chloroplasts. *Planta*, 121: 201-203.
- CUELLO, J., QUILES, M. J. and SABATER, B., 1984. Role of protein synthesis and light in the regulation of senescence in detached barley leaves. *Physiol. Plant.* 60: 133-138.
- CUELLO, J., QUILES, M. J. and SABATER, B., 1987. Control by phytochrome of the synthesis of protein related to senescence in chloroplasts of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 71: 341-344.
- CUELLO, J., GARCIA, C. and QUILES, M. J., 1991. Light and growth substances effects on polypeptide pattern of senescent leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bot. Bull. Academia Sinica*, 32: 43-48.
- GARCIA, S., MARTIN, M. and SABATER, B., 1983. Protein synthesis by chloroplasts during the senescence of barley leaves. *Physiol. Plant.* 57: 260-266.
- HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D. and BROWN, S. B., 1987. The degradation of chlorophyll-a biological enigma. *New Phytol.*, 107: 255-302.
- LUTHY, B., MARTINOIA, E., MATILE, P. and THOMAS, H., 1984. Thylakoid-associated "Chlorophyll Oxidase": Distinction from Lipoxxygenase. *Z. Pflanzenphysiol.*, 113: 423-434.
- MARTIN, M., URTEAGA, B. and SABATER, B., 1986. Chloroplast protein synthesis during barley leaf growth and senescence: effect of leaf abscission. *J. Exp. Bot.*, 37: 230-237.
- MARTINOIA, E., DALLING, M. J. and MATILE, P., 1982. Catabolism of Chlorophyll: Demonstration of Chloroplast-localized Peroxidative and Oxidative Activities. *Z. Pflanzenphysiol.*, 107: 269-279.
- NOODEN, L. D., 1988. Abscisic Acid, Auxin, and Other Regulators of Senescence. In: *Senescence and Aging in Plants*. Noodén, L. D. and Leopold, A. C. (Eds.). 329-368. Academic Press. San Diego.
- PANIGRAHI, P. K. and BISWAL, U. C., 1979. Ageing of chloroplasts in vitro I. Quantitative analysis of the degradation of pigments, proteins and nucleic acids. *Plant and Cell Physiol.*, 20: 775-779.
- SABATER, B. and RODRIGUEZ, M. T., 1978. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. *Physiol. Plant.*, 43: 274-276.
- THIMANN, K. V., 1987. Plant senescence: a proposed integration of the constituent processes. In: *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. Thompson, W. W., Nothnagel, E. A. and Huffaker, R. C. (Eds.). 1-19. Am. Soc. Plant Physiol. Rockville.
- THOMAS, H. and STODDART, J. L., 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 83-111.

- THOMAS, H., LUTHY, B. and MATILE, P., 1985. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis* Huds. Oxidative chlorophyll bleaching by thylakoid membranes during senescence. *Plant.*, 164: 400-405.
- WAGENKNECHT, A. C. and LEE, F. A., 1958. Enzyme action and off-flavor in frozen peas. *Food Res.*, 23: 25-35.
- WEIDHASE, R. A., LEHMANN, J., KRAMELL, H., SEMBDER, G. and PARTHIER, B., 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiol. Plant.*, 69: 161-166.

*Recibido: 10-5-91.*

*Aceptado: 2-1-92.*