

EFEITOS DE GENES LETAIS NA ULTRAESTRUTURA DOS CLOROPLASTOS,  
PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E SÍTIOS DE ATIVIDADE DO FOTOSSIS-  
TEMA II EM ALGUNS MUTANTES DE MILHO DEFICIENTES EM CLOROFILA

LAUDENIR MARIA PRIOLI

Orientador: Prof. Dr. WILLIAM JOSÉ DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Área: Biologia Vegetal

C A M P I N A S

Estado de São Paulo - Brasil

1981

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: Laudenir Maria Prioli

Nº de Identificação: 785200

Endereço para Correspondência: Depto. Genética e Evolução - IB - UNICAMP

Curso: Biologia Vegetal

Nome do Orientador: Dr. William José da Silva

Título da Dissertação ou Tese: Efeitos de genes letais na ultraestrutura dos cloroplastos, pigmentos fotossintéticos e sítios de atividade do fotossistema II em alguns mutantes de milho deficientes em clorofila.

Data proposta para a Defesa: 04/dezembro/1981

---

( O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo )

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir des ta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

20/11/81

Data

  
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1/1  
Data

\_\_\_\_\_  
assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in teressados.

1/1  
Data

\_\_\_\_\_  
assinatura do aluno

  
De acordo

Orientador

Ao Osmar

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. WILLIAM JOSÉ DA SILVA, pela confiança, estímulo, orientação consciente e pelas lições de atitude científica que tanto têm contribuído para a minha formação no campo da pesquisa.
- Ao Dr. JAMES ANTHONY LAURITIS, pela minha iniciação no campo da pesquisa, estímulo e orientação segura na área da microscopia eletrônica.
- À Dra. DÉLIA B. RODRIGUEZ, pela valiosa ajuda nos estudos com carotenóides e pelas críticas e sugestões apresentadas na revisão dos originais deste trabalho.
- Ao Dr. ANTONIO CELSO N. MAGALHÃES, por permitir o uso do laboratório de Fisiologia Vegetal durante a realização de alguns experimentos, pelo estímulo, críticas e sugestões apresentadas durante a realização deste trabalho e revisão dos originais.
- Ao Dr. MARO R. SÜNDAHL, pela participação como membro da banca examinadora e pelas críticas e sugestões apresentadas.
- Ao Dr. ROLF DIETER ILLG, pela revisão dos originais.
- Ao Dr. WALTER AUGUST HADLER, pelo apoio e por permitir o uso do laboratório de Histologia durante a realização de alguns experimentos.

- Ao Coordenador do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia - UNICAMP, Dr. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL, por permitir, sempre prontamente, o uso deste laboratório durante a realização do presente trabalho.
- À MARIA TEREZA DE PAULA e à MARIA APARECIDA HARTUNG, funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica, pela colaboração, amizade e excelente convivência durante o desenvolvimento desta pesquisa.
- Ao OSMAR, companheiro de todos os momentos, pelo estímulo, pela paciência e pelas críticas e sugestões apresentadas durante a realização deste trabalho.
- Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética e Evolução e a todos os amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO DA LITERATURA . . . . .	03
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	34
3.1. Material biológico e condições de crescimento . . . . .	34
3.2. Microscopia . . . . .	37
3.2.1. Ultraestrutura dos cloroplastos . . . . .	37
3.2.2. Citoquímica . . . . .	
3.3. Determinação de pigmentos fotossintéticos . . . . .	42
3.3.1. Protoclorofila e clorofila . . . . .	42
3.3.2. Análise de carotenóides . . . . .	43
4. RESULTADOS . . . . .	50
4.1. Distribuição dos cloroplastos . . . . .	50
4.2. Ultraestrutura dos cloroplastos . . . . .	50
4.2.1. Plastídeos das plantas normais . . . . .	50
4.2.2. Plastídeos do mutante albino . . . . .	53
4.2.3. Plastídeos do mutante luteus I . . . . .	55
4.2.4. Plastídeos do mutante luteus II . . . . .	57
4.3. Sítios de fotorredução do ferricianeto . . . . .	58
4.4. Pigmentos fotossintéticos . . . . .	61
4.4.1. Protoclorofila e clorofila . . . . .	61
4.4.2. Carotenóides . . . . .	64
5. DISCUSSÃO . . . . .	72
6. RESUMO . . . . .	93

	Página
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	98
8. FIGURAS E TABELAS . . . . .	131

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação do efeito de genes na estrutura e fisiologia dos cloroplastos é fundamental para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na sua organização e auto-replicação, sua herança e variabilidade, assim como do processo de diferenciação dessas organelas e desenvolvimento de sua atividade funcional. Por outro lado, o melhor conhecimento dos fatores genéticos, fisiológicos, morfológicos e também dos fatores ambientais que controlam o processo fotossintético poderá gerar meios para se aumentar a eficiência fotossintética e a produtividade em plantas de valor econômico.

É evidente que a investigação dos aspectos genéticos da fotossíntese requer uma combinação de abordagens genética,

fisiológica e morfológica e este é um problema que tem atraído a atenção de pesquisadores de diferentes áreas da biologia. Estudos utilizando mutantes que apresentam inibição da síntese ou acúmulo de clorofila têm contribuído bastante para a compreensão do controle genético da diferenciação dos cloroplastos e do papel dos pigmentos fotossintéticos na organização do sistema de membranas internas desses plastídeos. Tem sido evidenciado um envolvimento de genes nucleares e citoplasmáticos na diferenciação do sistema lamelar dos cloroplastos e em especial na diferenciação dos sistemas de pigmentos fotossintéticos. Além disso, tem sido estabelecido que os pigmentos fotossintéticos desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento normal dos cloroplastos, mas ainda há muitas interpretações em conflito no que se refere às alterações estruturais e fisiológicas que ocorrem durante a diferenciação dessas organelas em relação à biossíntese de clorofila e dos carotenóides.

No presente trabalho foram investigados alguns aspectos ultraestruturais e funcionais dos cloroplastos em três mutantes de genes nucleares em milho que apresentam deficiência em clorofila, com o objetivo de estudar alguns efeitos desses genes na estrutura e fisiologia dos cloroplastos correlacionando alterações ultraestruturais no desenvolvimento dessas organelas com o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e sítios de atividade do fotossistema II.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Um grande número de mutantes deficientes em clorofila tem sido utilizado para investigações do controle genético da diferenciação dos cloroplastos a nível ultraestrutural e fisiológico (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; WETTSTEIN, 1961; BOYNTON, 1966 a, b; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; ROSINSKI and ROSEN, 1972; ANDERSON, 1975; SAGROMSKY, 1975; TRAVIS *et al.*, 1975; GILLHAM, 1978; MASCIA and ROBERTSON, 1978; SHORTESS and AMBY, 1979; GYURJÁN *et al.*, 1980 a, b). Sabe-se que tanto genes nucleares como genes do próprio plastídeo contribuem para a biogênese dos cloroplastos e que os mutantes deficientes em clorofila podem se originar a partir de mutações em genes nucleares ou mutações em genes extranucleares (PREER, 1971; LEVINE, 1972; WILDMAN *et al.*, 1973; WONG-STAAAL and WILDMAN, 1973;

TRAVIS *et al.*, 1975; HAGEMANN *et al.*, 1975; GILLHAM, 1978 ; NASYROV, 1978). São também conhecidos sistemas onde genes nucleares induzem mutação em genes citoplasmáticos, possivelmente genes do cloroplasto (RHOADES, 1943; EPP, 1973; RÉDEI , 1973). As mutações no DNA do cloroplasto permitem o aparecimento de quimeras e podem ser mantidas através de polinização apropriada das flores em ramos variegados (BURK *et al.* , 1964; STEWART, 1965; WONG-STAAAL and WILDMAN, 1973; NASYROV , 1978). Por outro lado, os mutantes deficientes em clorofila resultantes de mutações em genes nucleares podem apresentar apenas uma cor variando entre branco, amarelo e verde-claro, podem ser variegados de duas ou mais cores e alguns, ainda, durante a ontogênese mudam a cor das folhas de verde-claro para amarelo ou de verde-claro para verde-escuro (WALLES , 1972). Muitos desses mutantes são letais quando os locos mutados se encontram em estado de homozigose (WALLES, 1963 ; VELEMINSKI *et al.*, 1969; GENEBAACH *et al.*, 1970), entretanto os genes letais podem ser mantidos através de autofecundação de plantas heterozigotas. Quando o bloqueio genético afeta apenas o processo fotossintético é possível obter-se o crescimento do mutante letal até a maturidade em meio suplementado com açúcar (WALLES, 1963). Alguns autores conseguiram o desenvolvimento, até a maturidade, de alguns poucos mutantes deficientes em clorofila em milho (SPOEHR, 1942; GORHAM, 1950; GERMAN and BOWEN, 1951), arabidopsis (LANGRIDGE, 1955, 1958) e trigo (SUGINO, 1961), em meio contendo sacarose. Sabe-se também que os mutantes deficientes em clorofila podem apre-

sentar bloqueios em diferentes vias biossintéticas e que as mutações podem afetar a estrutura dos cloroplastos, síntese de clorofila e carotenóides, síntese de compostos da cadeia de transporte eletrônico fotossintético ou enzimas envolvidas na fixação do carbono (LEVINE, 1969). Além disso, alguns mutantes deficientes em clorofila são auxotróficos para tiamina, como descrito em *Arabidopsis* (LANGRIDGE, 1955, 1958; RÉDEI, 1965) e em *Lycopersicon* (LANGRIDGE and BROCK, 1961; BOYNTON, 1966 a, b). Na alga *Chlamydomonas reinhardtii* foi identificado um mutante que requer arginina para preservar a clorofila sintetizada (LEVINE and EBERSOLD, 1960). Em 1963 WALLEES descreveu alguns mutantes em cevada que requerem ácido aspártico e outro que requer leucina para se tornarem verdes. Sabe-se que, em milho, o mutante "yellow stripe" pode tornar-se fenotipicamente normal através do fornecimento de íons ferrosos (BELL *et al.*, 1958 - citado em WALLEES, 1963). Assim, o efeito primário da mutação que leva à deficiência em clorofila pode também estar em compostos de baixo peso molecular, tais como aminoácidos e vitaminas, e também em íons. A resposta desses mutantes a metabólitos específicos fornece informações úteis para a localização dos bloqueios genéticos e subsequente elucidação do passo metabólito controlado pelo gene. Embora na maioria dos mutantes conhecidos, deficientes em clorofila, o passo metabólito bloqueado não tenha sido identificado, muitas informações sobre a estrutura e função dos cloroplastos e o papel dos pigmentos fotossintéticos na diferenciação dessas organelas têm sido obtidas a partir

de estudos utilizando-se esses mutantes.

Quanto à estrutura e função, os cloroplastos de plantas consideradas normais apresentam aspectos característicos que têm sido discutidos em várias revisões (PARK and SANE , 1971; MUHLETHALER, 1971; ANDERSON, 1975; ARNTZEN and BRIAN - TAIS, 1975; BRADBEER, 1977; BOARDMAN, 1977; MILLER, 1979). O cloroplasto é delimitado por uma membrana dupla, o envelope . Numerosos estudos com cloroplastos isolados indicam que o envelope atua como uma barreira para o transporte seletivo de metabólitos para dentro ou para fora do cloroplasto (MURAKAMI *et al.*, 1975). Além disso, sabe-se que essa membrana dupla difere em função e composição do sistema interno de membranas do cloroplasto (HELDT and SAUER, 1971; DOUCE *et al.*, 1973; POINCELOT, 1973; MACKENDER and LEECH, 1974; COBB and WELLBURN - citado em FEIERABEND *et al.*, 1980; SPREY and LAETSCH, 1975 ; JOY and ELLIS, 1975; SPREY and LAETSCH, 1976). Por outro lado, vários pesquisadores observaram invaginações na membrana interna do envelope que resultaram na formação de vesículas dentro do cloroplasto. Acredita-se que essas vesículas se fundem para formar as lamelas (HODGE *et al.*, 1956; WETTSTEIN , 1958; MUHLETHALER and FREY-WYSSLING, 1959; MENKE, 1962; VIRGIN *et al.*, 1963; LAETSCH and PRICE, 1969; GILLHAM, 1978; THOMSON and WHATLEY, 1980). No entanto, estudos realizados em um mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* não evidenciam esta hipótese (OHAD *et al.*, 1967; GOLDBERG and OHAD, 1970) e tem sido considerado que o problema requer investigação em outros sistemas (ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975).

Em plantas  $C_4$ , que formam ácidos dicarboxílicos, como produtos primários da fixação do  $CO_2$ , os cloroplastos observados possuem um sistema de vesículas e túbulos anastomosados contíguo com a membrana interna do envelope do cloroplasto, denominado retículo periférico (LAETSCH, 1968; 1974; LAETSCH and PRICE, 1969; LAETSCH and KORTSCHAK, 1972). A sua ocorrência também tem sido relatada em algumas plantas  $C_3$ , tais como trigo (BISALPUTRA *et al.*, 1969) *Dactylis glomerata* e *Thypha latifolia* (HILLIARD and WEST, 1970; GRACEN *et al.*, 1972) e também em plantas de soja sujeitas à baixa temperatura (TAYLOR and CRAIG, 1971). Tem sido admitido que o retículo periférico estabelece uma conexão entre o sistema lamelar interno e o envelope do cloroplasto (ROSADO-ALBERTO *et al.*, 1968), mas ainda não está bem claro se esta conexão realmente existe, considerando-se principalmente algumas evidências que sugerem que a composição das membranas do retículo periférico difere das membranas do envelope e das membranas internas dos cloroplastos (LAETSCH, 1974). Tem sido sugerido por alguns autores que o retículo periférico pode estar envolvido com o transporte de solutos entre o cloroplasto e o citoplasma (SLACK *et al.*, 1969; GRACEN *et al.*, 1972; LAETSCH and KORTSCHAK, 1972; LAETSCH, 1974).

O estroma do cloroplasto, que é uma matriz proteinácea, contém fibrilas de DNA, ribossomos, plastoglôbulos e amido, que podem ser observados ao microscópio eletrônico (ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975). Material fibrilar e estruturas cristalinas ocorrem sob várias condições (PRICE *et al.*, 1966; SHUMWAY *et al.*, 1967; BAIN, 1968; STEIN and BISALPUTRA, 1969; BURGESS,

1970; PERRIN, 1970; BEHNKE, 1971; PYLIOTIS and GOODCHILD, 1975). O DNA em cloroplastos foi primeiramente detectado em 1951 por CHIBA, como citado por KUNH (1977). Alguns anos depois a descoberta foi confirmada (RIS and PLAUT, 1962; CHUN *et al.*, 1963) e a partir dessa época as propriedades físico-químicas do DNA do cloroplasto, bem como a expressão do genoma do cloroplasto em plantas superiores e em algumas algas têm sido investigadas e discutidas em várias revisões (KUNG, 1977; ELLIS, 1977; NASYROV, 1978; GILLHAM, 1978; BEDBROOK and KOLODNER, 1979). Ao microscópio eletrônico as fibrilas de DNA são observadas em regiões de baixa densidade eletrônica dentro do cloroplasto e não são visualizadas quando as secções são previamente tratadas com desoxirribonuclease (RIS and PLAUT, 1962). Atualmente está bem claro que existe uma complementação entre o genoma do cloroplasto e o genoma nuclear no processo de biogênese do cloroplasto, isto é, na formação das proteínas lamelares, biossíntese da clorofila e carotenóides, dos compostos da cadeia de transporte eletrônico e enzimas envolvidas na fixação do CO<sub>2</sub>. Os cloroplastos possuem todo o sistema requerido para a transcrição de seu genoma e tradução dos mRNAs resultantes. Além disso, os rRNAs dos ribossomos do cloroplasto e, provavelmente, todos os tRNAs são transcritos a partir do genoma da organela (KUNG, 1977; ELLIS, 1977; GILLHAM, 1978). Por outro lado, o crescimento e a divisão dos cloroplastos têm sido relacionados com diferentes funções celulares que precedem ou ocorrem durante a divisão celular e/ou durante a expansão máxima da célula, como por exemplo a replicação do DNA nuclear e, possivelmente,

do DNA do plastídeo, síntese mRNA nuclear e síntese proteica citoplasmática (POSSINGHAM and SAURER , 1969; GILES and TAYLOR, 1971; POSSINGHAM and ROSE, 1976; POSSINGHAM, 1980). Além disso, como discutido por POSSINGHAM (1980), a divisão e o crescimento dos cloroplastos podem ser afetados por fatores ambientais, tais como luz, temperatura e nutrição, por alguns antibióticos e por inibidores químicos da síntese de DNA, RNA e proteínas.

Os ribossomos do cloroplasto foram isolados pela primeira vez por LYTTLETON (1962). Esses ribossomos ocorrem livres na matriz do cloroplasto ou associados aos tilacóides , formando polissomos (CHUA *et al.*, 1973; TAO and JAGENDORF , 1973; MARGULIES and MICHAELS, 1974, 1975; GILLHAM, 1978). Sabe-se que nos polissomos do cloroplasto são sintetizados polipeptídeos codificados pelo genoma da organela, como por exemplo a sub-unidade maior da ribulose bisfosfato carboxilase (CHAN and WILDMAN, 1972; KAWASHIMA and WILDMAN, 1972; BLAIR and ELLIS, 1973; GRAY and KEKWICK, 1974; ROY *et al.*, 1976; VASCONCELOS, 1976; GILLHAM, 1978), e provavelmente, alguns polipeptídeos das lamelas do cloroplasto (HOOBER *et al.*, 1969 ; HOOBER, 1970, 1972; EYTAN and OHAD, 1972 a, b; MACHOLD and AURICH, 1972; HOOBER and STEGEMAN, 1973; ELLIS, 1975; CHUA and GILLHAM, 1977; GILLHAM, 1978). Nos mutantes que apresentam plastídeos com deficiência ou ausência de ribossomos o desenvolvimento do sistema lamelar é defeituoso, apresentando poucas ou nenhuma lamela (SHUMWAY and WEIER, 1967; HARRIS *et al.*, 1974; GYURJÁN *et al.*, 1978, 1980 b; WALBOT and COE, 1979).

Na matriz do cloroplasto frequentemente ocorrem glóbulos osmiófilos denominados plastoglóbulos, que variam em tamanho e número. Estudos utilizando plastoglóbulos separados da fração lamelar (LICHTENTHALER and SPREY, 1966; BARR *et al.*, 1967) têm mostrado serem constituídos principalmente por plastoquinonas, vitaminas K<sub>1</sub>,  $\alpha$  - tocoferolquinona e  $\alpha$  - tocoferilquinona. Além disso, contêm muitos lipídios que são encontrados no sistema lamelar do cloroplasto (BAILEY and WHYBORN, 1963; GREENWOOD *et al.*, 1963; LICHTENTHALER, 1964, 1966, 1968, 1969 a, b; LICHTENTHALER and SPREY, 1966). Nos proplastídeos os plastoglóbulos são menores e em menor número (LICHTENTHALER, 1966) e aumentam em número e tamanho com o desenvolvimento do cloroplasto (GREENWOOD *et al.*, 1963; LICHTENTHALER, 1966, 1968, 1969 a). Em plantas desenvolvidas no escuro os plastoglóbulos aumentam em número e decrescem durante a síntese das membranas em presença de luz (SPREY and LICHTENTHALER, 1966; BARR and ARNTZEN, 1969). Um dos sintomas que podem ser observados durante a degeneração dos cloroplastos em processos que levam à destruição do sistema lamelar, como por exemplo deficiência em Mg (HALL *et al.*, 1972) e senescência (LICHTENTHALER, 1969b; DODGE, 1970, DE VECCHI, 1971; MLODZIANOWSKI and KWINTKIEWICZ, 1973; KHODASEVICH *et al.*, 1978), é o aumento no tamanho e número dos plastoglóbulos. Alguns mutantes deficientes em clorofila que possuem cloroplastos com sistema lamelar pouco desenvolvido apresentam aumento no número de plastoglóbulos, como observado por BACKMANN *et al.* (1967) e VALANNE e VALANNE (1972). Parece, portanto, que os plastoglóbulos podem funcionar como

reservatórios de lipídios e de outros compostos que são utilizados durante a biossíntese das membranas do cloroplasto ou que se acumulam durante a degradação das membranas (GREENWOOD *et al.*, 1963; SPREY and LICHTENTHALER, 1966; LICHTENTHALER, 1968; KHODASEVICH *et al.*., 1978).

O sistema lamelar interno do cloroplasto maduro pode apresentar configuração variável dependendo do organismo, como algas, briófitas ou plantas vasculares, do tipo e estágio de desenvolvimento do tecido e, além disso, modificações estruturais podem ser induzidas por mutações ou por variações das condições ambientais. Um cloroplasto maduro típico de plantas superiores, como visualizado ao microscópio eletrônico, apresenta o sistema lamelar interno constituído por numerosos discos membranosos que se encontram empilhados uns sobre os outros constituindo os grana, os quais são interconectados por um sistema de lamelas simples. Cada granum é constituído por dois ou mais discos achatados denominados tilacóides. A região onde dois tilacóides estão firmemente aderidos é a partição e o volume interior do tilacóide é o lóculo. Tem sido admitido que cada lamela intergrana é contínua com vários tilacóides dentro de um granum e também com tilacóides de outros grana (HESLOP-HARRISON, 1963; WEHREMEYER, 1964; WEIER *et al.*., 1966; PAOLILLO, 1970). Esta interligação extensiva sugere que o lóculo dos tilacóides e o espaço interno das lamelas intergrana fazem parte de uma câmara interna anastomosada única que facilitaria a difusão dos vários substratos fotossintéticos (WEIER *et al.*., 1966).

Análises de fragmentos de lamelas internas do cloroplasto têm mostrado que essas membranas contêm clorofila, carotenóides e uma variedade de quinonas, citocromos, ferro não heme (ferredoxina), proteínas e lipídios (LICHTENTHALER and PARK, 1963; PARK and BIGGINS, 1964; BENSON, 1971; ANDERSON, 1975). Sabe-se também que os pigmentos fotossintéticos estão organizados em dois grupos ou conjuntos funcionais para captação da energia radiante - fotossistemas I e II - que, por sua vez, se ligam com as cadeias de transporte de elétrons (GOVINDJEE and GOVINDJEE, 1975; AVRON, 1975; ANDERSON, 1975). Investigações visando a caracterização bioquímica, a caracterização da sub-estrutura das membranas internas do cloroplasto e a localização citoquímica da atividade dos fotossistemas I e II têm sido realizadas. Estes estudos têm levado os pesquisadores a concluir que o fotossistema I é ativo nas lamelas intergrana e nos grana (JACOBI and LEHMANN, 1969; NIR and SELIGMAN, 1970; SANE *et al.*, 1970; ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975), enquanto que ainda não está bem esclarecido se o fotossistema II ocorre apenas nos grana ou se ocorre também nas lamelas intergrana (ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975).

Cloroplastos apresentando configuração ultraestrutural e características funcionais que diferem, em alguns aspectos, do descrito anteriormente podem ser observados nas plantas  $C_4$ , nas quais essas organelas apresentam um dimorfismo ultraestrutural descrito pela primeira vez por HODGE *et al.* em 1955, citado por LAETSCH (1974). Esses autores observaram que os cloroplastos das células do mesófilo em milho, atualmente

conhecida como uma planta  $C_4$  típica, eram semelhantes aos encontrados nas outras plantas superiores analisadas até a época, enquanto que as células da bainha vascular apresentavam cloroplastos que foram descritos como sendo desprovidos de grana. Estudos posteriores, no entanto, demonstraram a ocorrência de grana rudimentares nos cloroplastos das células da bainha vascular de milho e de outras gramíneas (SHUMWAY and WEIER, 1967; ROSADO-ALBERIO *et al.*, 1968; LAETSCH, 1969; KIRCHANSKI, 1975). Em outras espécies, no entanto, esses grana são perdidos durante a maturação dos cloroplastos (LAETSCH and PRICE, 1969; DOWNTON and PYLIOTIS, 1971; HORVÁTH *et al.*, 1975), o que indica que o dimorfismo estrutural dos cloroplastos das células do mesófilo e bainha vascular deve ser devido a uma diferença no padrão de desenvolvimento das membranas (ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975). HORVÁTH *et al.* (1975) sugeriram que a divergência na diferenciação dos cloroplastos da bainha vascular e mesófilo começa em fases iniciais da fotomorfogênese, no período em que ocorre uma rápida síntese de clorofila e formação de tilacóides. Segundo esses autores, os cloroplastos da bainha vascular são inferiores aos do mesófilo na organização molecular de seu sistema interno de membranas. Evidências de diferenças na atividade do transporte eletrônico em cloroplastos dimorfos foram obtidas por muitos investigadores (ANDERSON *et al.*, 1971; ARNTZEN *et al.*, 1971; SMILLIE *et al.*, 1971, 1972; BAZZAZ and GOVINDJEE, 1973; RATHNAM and DAS, 1977).

Sabe-se, por outro lado, que fatores ambientais po

dem afetar a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e a ultraestrutura dos cloroplastos. A luz, por exemplo, é um fator limitante para o desenvolvimento normal dos cloroplastos. Sabe-se que a luz controla o desenvolvimento dos plastídeos devido ao seu efeito na síntese de substâncias que constituem os cloroplastos, como por exemplo clorofila e carotenóides (POSSINGHAM *et al.*, 1975; KIRK and TILNEY-BASSETT, 1978 - citado em POSSINGHAM, 1980). Plantas desenvolvidas em completa ausência de luz acumulam protoclorofilídeo e possuem cloroplastos desprovidos de sistema lamelar apresentando uma estrutura vesicular denominada corpo pró-lamelar. Este parece ser constituído por uma complexa rede de membranas tubulares interconectadas e muitos autores se referem a ele como um corpo paracristalino (ROSINSKI and ROSEN, 1972; LUTZ and KLEIN, 1979). Embora o corpo pró-lamelar seja extensivamente estudado (WETTSTEIN, 1958; GUNNING, 1965 a, b; WEIER and BROWN, 1970; KOHN and KLEIN, 1976; LUTZ and KLEIN, 1979), não se sabe exatamente como ele se desenvolve. WEIER e BROWN (1970) consideraram o corpo pró-lamelar como um acúmulo de produtos de membranas devido ao bloqueio das reações dependentes de luz, que normalmente ocorreriam durante o processo de desenvolvimento do cloroplasto em presença de luz. Tem sido sugerido que o corpo pró-lamelar é formado a partir de vesículas derivadas da membrana interna do envelope do plastídeo (WETTSTEIN, 1958; BLACKWELL *et al.*, 1969). Entretanto isto não tem sido diretamente demonstrado e nem têm sido apresentadas evidências quantitativas ou morfológicas que reforcem esta hipótese (THOMSON

and WHATLEY, 1980). Alguns autores têm considerado que os túbulos do corpo pró-lamelar não podem ser definidos como membranas biológicas (WRISCHER, 1978; LUTZ and KLEIN, 1979; WELLBURN and HAMP, 1979). Aos túbulos da estrutura paracristalina do corpo pró-lamelar ligam-se membranas denominadas pró-tilacóides ou tilacóides primários. Esses pró-tilacóides lembram os túbulos do corpo paracristalino em certos aspectos de sua composição macromolecular e estados fisiológicos. KAHN (1968) sugeriu que o aparecimento do corpo pró-lamelar poderia estar associado com o acúmulo de protoclorofilídeo nos plastídeos das plantas desenvolvidas no escuro. HENNINGSEN e BOYNTON (1969, 1970) sugeriram que o protoclorofilídeo poderia ser requerido para a formação do corpo pró-lamelar. No entanto, acúmulo de protoclorofilídeo pode ser encontrado em ausência do corpo pró-lamelar, como em um mutante de milho que acumula esta substância em baixas temperaturas, mas não forma corpo pró-lamelar (MILLERD *et al.*, 1969). Além disso, têm-se evidências que a fotorredução do protoclorofilídeo e as alterações estruturais iniciais resultantes da desorganização do corpo pró-lamelar em presença de luz não ocorrem simultaneamente (VIRGIN *et al.*, 1963). Investigações realizadas em *Avena sativa* por LUTZ e KLEIN (1979) indicam que a maioria ou talvez todos os pigmentos dos plastídeos das plantas desenvolvidas no escuro podem estar localizados nos pró-tilacóides e não nos túbulos do corpo pró-lamelar. O corpo pró-lamelar é uma estrutura típica de plantas desenvolvidas no escuro, não sendo normalmente encontrado em plantas desenvolvidas em presença de

luz. Se as folhas estioladas, que se desenvolveram no escuro, são iluminadas, o corpo pró-lamelar se desorganiza e um número de lamelas forma-se ao seu redor (MUHLETHALER, 1971; KOHN and KLEIN, 1976).

Por outro lado, plantas desenvolvidas em condições de excesso de iluminação, seja por alta intensidade luminosa ou por luz contínua, apresentam uma diminuição no conteúdo de clorofila, alterações na relação clorofila  $a/b$  e na taxa de fixação de  $CO_2$ , com tem sido observado em algumas plantas superiores (BALLANTINE and FORDE, 1970; LEWANDOWSKA *et al.*, 1976). Estudos realizados por VALANNE (1977) em um musgo, *Ceratodon purpureus*, mostraram um aumento considerável no tamanho dos grana das plantas desenvolvidas sob luz contínua, independente de intensidade luminosa ser alta ou baixa. Por outro lado, tem sido observado que o tratamento de plantas com luz intermitente pode retardar o desenvolvimento dos plastídeos (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU *et al.*, 1976).

Outro fator ambiental que pode afetar o desenvolvimento normal dos cloroplastos é a temperatura. A síntese de vários compostos que participam da estrutura e fisiologia dos cloroplastos, particularmente a clorofila, é afetada por temperatura (POSSINGHAM, 1980). Temperaturas altas (acima de  $32^{\circ}C$ ) induzem o desenvolvimento anormal dos cloroplastos em *Euglena* (PRINGSHEIM and PRINGSHEIM, 1952) e em plantas superiores (FEIERABEND and SCHRADER-REICHHARDT, 1976; FEIERABEND and MIKUS, 1977; SMILLIE *et al.*, 1978 a). Em plantas de cen- teio desenvolvidas a  $32^{\circ}C$  a síntese de clorofila, carotenói-

des, ribulose bisfosfato carboxilase e ribossomos é inibida e, no entanto, ribossomos citoplasmáticos e muitas enzimas do ciclo de Calvin são produzidas (FEIERABEND and SCHRADER - REICH-HARDT, 1976; FEIERABEND *et al.*, 1980). A síntese de rRNA dos plastídeos é reduzida a baixos níveis em temperaturas elevadas (32-34°C) em várias plantas, incluindo centeio, trigo, cevada, feijão e aveia (POSSINGHAM, 1980). A atividade de várias enzimas dos cloroplastos é dependente de temperatura, com o valor da temperatura ótima variando com o genótipo da planta (SMILLIE *et al.*, 1978 b). Foram observadas alterações no desenvolvimento, ultraestrutura e atividade dos cloroplastos de plantas de cevada desenvolvidas em condições de altas temperaturas (acima de 32°C) e baixas temperaturas (2°C e 5°C) (SMILLIE *et al.*, 1978 a). Baixas temperaturas (10-16°C) também podem inibir o desenvolvimento dos cloroplastos em plantas sensíveis ao frio, tais como cana-de-açúcar (FARIS - citado em SMILLIE *et al.*, 1978 a), sorgo (SLACK *et al.*, 1974) e milho (McWILLIAM Jr. and NAYLOR, 1967). PARK e TSUNODA (1979) observaram desorganização do sistema lamelar dos cloroplastos e excesso de amido em amostras de folhas de alguns cultivares de arroz sensíveis ao frio, desenvolvidas em condições dia/noite de 17/12°C.

Além de luz e temperatura, outros fatores ambientais, como por exemplo a nutrição mineral (SPENCER and POSSINGHAM, 1960; BASZYŃSKI *et al.*, 1972), podem influenciar o desenvolvimento dos cloroplastos induzindo alterações em sua estrutura e levando à formação de plantas cloróticas. O trabalho de HALL *et al.* (1972) mostrou alterações ultraestruturais em cloroplas

tos de plantas de milho desenvolvidas em condições de deficiência de macronutrientes (nitrogênio, magnésio, cálcio, potássio, fósforo e enxofre) relacionando essas alterações à mudanças na atividade fotossintética e no conteúdo de galactolipídios e sulfolipídios. As maiores alterações ultraestruturais foram observadas em condições de deficiência de magnésio com a desintegração das membranas internas dos cloroplastos. Concomitantemente foi observado um acúmulo de plastoglôbulos nesses cloroplastos. Estudos posteriores mostraram que deficiência em magnésio também afeta a atividade fotoquímica dos cloroplastos (BASZYŃSKI *et al.*, 1980). Nos cloroplastos das plantas deficientes em enxofre ou nitrogênio ocorreu um aumento no tamanho dos grana acompanhado de um aumento na atividade do fotossistema II, uma alteração na distribuição das proteínas e redução no conteúdo de sulfolipídios. Deficiência em cálcio, potássio e fósforo também provocou alterações na morfologia dos cloroplastos, porém não foram observadas alterações funcionais. Por outro lado, estudos realizados em *Cucumis sativus* com plantas cultivadas em areia contendo altos níveis de cálcio ou pré-incubação das sementes com soluções de 10-100 mM desse nutriente, mostraram que esse íon é capaz de inibir o acúmulo de clorofila nessas plantas e que esse efeito pode ser completamente bloqueado pela presença de  $K^+$  (KNYPL, 1969; KNYPL and RENNERT, 1970; TANAKA and TSUJI, 1980). O excesso de cálcio inibe a acumulação de clorofila em plantas nos estágios iniciais de enverdecimento por inibição da formação de ácido  $\delta$ -aminolevulínico em presença de luz e por acele

ração da destruição da clorofila recém-sintetizada (TANAKA and TSUJI, 1980). Sabe-se que a deficiência em outros nutrientes, tais como manganês, boro, ferro e cobre também resulta em deficiência no conteúdo de clorofila e de outros componentes das membranas do cloroplasto, concomitantemente à alterações ultraestruturais nessas organelas (STOCKING, 1975 ; HUDÁK and HERICH, 1976; BASZYŃSKI *et al.*, 1978). Deficiência em manganês ou ferro, por exemplo, além de induzir a formação de cloroplastos anormais em espinafre, também reduz o número de cloroplastos por células (POSSINGHAM *et al.*, 1964 ; VESK *et al.*, 1966).

Assim sendo, o desenvolvimento dos cloroplastos pode ser afetado por variações ambientais e também por mutação em genes nucleares ou citoplasmáticos. Muitas informações sobre o desenvolvimento dos cloroplastos têm sido obtidas por meio de análises ultraestruturais e bioquímicas dos plastídeos de plantas desenvolvidas no escuro ou em diferentes condições de intensidade luminosa e também dos cloroplastos defeituosos sob o controle de genes nucleares ou citoplasmáticos em plantas deficientes em clorofila. Os mutantes que apresentam inibição de síntese ou acúmulo de clorofila e carotenóides, além de serem adequados para investigação do papel desses pigmentos fotossintéticos na organização do sistema lamelar do cloroplasto, também fornecem informações sobre o papel de genes nucleares ou citoplasmáticos no desenvolvimento dos plastídeos. Embora tenha sido estabelecido que a síntese de clorofila ocorre simultaneamente com a formação

da estrutura lamelar do cloroplasto (NASYROV *et al.*, 1975), ainda há muitas interpretações em conflito no que se refere às alterações estruturais que ocorrem durante a diferenciação dos cloroplastos em relação à biossíntese da clorofila, que parece ser controlada principalmente pelo núcleo (NASYROV, 1978). De acordo com WETTSTEIN, citado em ROSINSKY e ROSEN (1972), os processos básicos envolvidos na diferenciação do sistema lamelar de plantas desenvolvidas em presença de luz seriam: (1) síntese de vesículas, (2) fusão das vesículas para formar discos achatados, (3) arranjo dos discos lamelares em camadas paralelas, (4) multiplicação das lamelas, (5) crescimento e fusão dos discos para formar um sistema lamelar contínuo e (6) diferenciação em regiões dos grana e lamelas intergrana. O papel da clorofila na diferenciação das membranas tem sido amplamente investigado e ainda não foram obtidas respostas para muitas questões, como por exemplo: (1) Como a clorofila se associa com o seu sítio funcional nas membranas? (2) A síntese da clorofila controla o desenvolvimento das lamelas do cloroplasto? (3) A síntese dos constituintes das membranas do cloroplasto exerce controle sobre a acumulação da clorofila?

É conhecido que cloroplastos deficientes em clorofila possuem poucos ou nenhum granum ou possuem grana anormais (ROSINSKY and ROSEN, 1972; ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975; NASYROV *et al.*, 1975; NASYROV, 1978). Têm-se evidências de que a síntese das enzimas chaves da biossíntese da clorofila é determinada pelo núcleo, enquanto que as enzimas não limitan-

tes são sintetizadas no cloroplasto e são controladas pelo sistema transcrição-tradução do próprio cloroplasto (NASYROV *et al.*, 1975; NASYROV, 1978). Existem dois tipos de clorofila nas plantas superiores e algas verdes, clorofila *a* e clorofila *b*, sendo que a clorofila *a* é o pigmento presente em maior quantidade nesses organismos (GOVINDJEE and GOVINDJEE, 1975). Uma discussão detalhada a respeito da estrutura e propriedades das clorofila *a* e *b* é apresentada por JACKSON (1976). A possível via biossintética da clorofila é muito bem discutida por BOGORAD (1976). Segundo esse autor, tem sido demonstrado que os passos finais da biossíntese da clorofila *a* seguem a seqüência: protoclorofilídeo *a* → clorofilídeo *a* → clorofila *a*. Quanto à biossíntese da clorofila *b*, existem fortes evidências de que ela é sintetizada a partir da clorofila *a*, mas alguns autores consideram a possibilidade da existência de um composto que poderia ser transformado tanto em clorofila *a* como em clorofila *b*. NASYROV *et al.* (1975) apresentaram um esquema da possível regulação genética da biossíntese da clorofila, baseado em estudos de vários mutantes que apresentam bloqueio na síntese desse pigmento. De acordo com esse esquema os genes nucleares exercem controle sobre as reações da transformação do ácido  $\delta$ -aminolevulínico até protoclorofilídeo, bem como da síntese da clorofila *b* a partir da clorofila *a*.

Como discutido por ANDERSON (1975), quando os compostos das membranas do sistema lamelar dos cloroplastos são submetidos a eletroforese em sistema gel poliacrilamida-dode

cil sulfato de sódio, são identificados dois complexos pigmentos proteínicos denominados complexo I e complexo II. Os estudos originais de THORNER *et al.* (1967) mostraram que o complexo I tem um alto conteúdo de clorofila *a* (clorofila *a/b* = 12:1) enquanto que o complexo II tem um conteúdo de clorofila *b* relativamente alto (clorofila *a/b* = 1:1). Os estudos de fracionamento de membranas realizados por esses autores mostraram que o complexo II é restrito principalmente à fração correspondente aos grana, enquanto que o complexo I é encontrado na fração correspondente aos grana e na fração correspondente às lamelas integrana.

A formação de grana parece estar correlacionada não somente com o conteúdo de clorofila presente no cloroplasto (WETTSTEIN, 1958; MACLACHLAN and ZALIK, 1963; SCHMID, 1967; DALE and HEYES, 1970), mas também com a relação clorofila *a/b* (WOO *et al.*, 1971). Investigações realizadas por ARGYROUDI - AKOYUNOGLU *et al.* (1976), em plastídeos de *Phaseolus vulgaris* desenvolvido no escuro e posteriormente exposto à luz, mostraram que a clorofila *b* é sintetizada mais intensamente nos grana do que nas lamelas intergrana. Esses autores consideraram que esse pigmento é importante para a formação dos grana. Além disso, NIELSEN *et al.* (1970) analisaram alguns mutantes de cevada deficientes em clorofila e constataram que a relação clorofila *a/b* era maior do que o normal para os mutantes cujos cloroplastos possuíam poucos grana, enquanto que para os mutantes em que quase todas as lamelas eram organizadas em grana, a relação clorofila *a/b* era mais baixa do que o nor

mal. Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos por SMILLIE *et al.* (1977) para um mutante de cevada deficiente em clorofila cujos cloroplastos também apresentaram grana gigantes e poucas lamelas simples. Por outro lado, entre os mutantes analisados por SMILLIE *et al.* (1977) foi encontrado que um deles possuía alguns grana gigantes, porém com espaços intertilacoidais não uniformes, cuja relação clorofila  $a/b$  foi maior do que a observada para as plantas normais. PRIOLI *et al.* (1978) também observaram uma relação clorofila  $a/b$  mais alta do que o normal em um mutante virescente de milho, cujos cloroplastos apresentavam grana gigantes com junção anormal dos tilacóides, aparentando um "empacotamento" das membranas. Existem, portanto, evidências de que a clorofila  $b$  deve estar associada com o desenvolvimento de grana normais. Entretanto, observações realizadas por GOODCHILD *et al.* (1966) em um mutante de cevada deficiente em clorofila  $b$  levaram esses autores a considerarem que a clorofila  $b$  não desempenha um papel crítico na formação dos grana. Havia porém a indicação de que os cloroplastos desse mutante possuíam grana menores e em menor número do que o normal. Outros mutantes deficientes em clorofila  $b$  que apresentam desenvolvimento de grana têm sido descritos (ROSINSKI and ROSEN, 1972; SAGROMSKY, 1975). O papel da clorofila na formação dos grana ainda não está totalmente esclarecido e, além disso, tem sido sugerido que a formação dos grana pode estar mais relacionada com o conteúdo total de clorofila do que com uma baixa relação clorofila  $a/b$  (ANDERSON *et al.*, 1973).

A organização estrutural das membranas internas do cloroplasto parece estar relacionada com a eficiência da captação de energia luminosa na membrana. O funcionamento normal das membranas fotossintéticas requer uma organização estrutural específica da clorofila e dos carotenóides, possivelmente em complexos pigmentos-proteínas (BROWN, 1972; THORNER, 1975; ARMOND *et al.*, 1976; NASYROV, 1978). Os carotenóides são pigmentos amarelos, alaranjados ou avermelhados que nos tecidos verdes das plantas superiores estão localizados nos cloroplastos e são, provavelmente, sintetizados nessas organelas. Existem duas classes de carotenóides: os carotenos, que são hidrocarbonetos, e seus derivados oxigenados que são as xantofilas (DAVIES, 1976; MOSS and WEEDON, 1976). Segundo GOODWIN (1976), os carotenóides que ocorrem em maior quantidade nos tecidos fotossintéticos são, normalmente, o  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina, sendo os três últimos xantofilas.

Tem sido admitido que o complexo I e o complexo II de pigmentos-proteínas podem corresponder, respectivamente, aos fotossistemas I e II na fotossíntese (ANDERSON, 1975; GILLHAM, 1978; MACHOLD *et al.*, 1979; GARNIER *et al.*, 1979; MULLET *et al.*, 1980) e tem sido constatada uma distribuição diferencial dos pigmentos fotossintéticos nesses dois complexos (HORVÁTH and FALUDI-DÁNIEL, 1971; ANDERSON, 1975; GOVINDJEE and GOVINDJEE, 1975; MACHOLD and MEISTER, 1980). O complexo I apresenta um alto conteúdo de clorofila  $a$ ,  $\beta$ -caroteno e traços de luteína enquanto que no complexo II o conteúdo de

clorofila *a* é mais ou menos equivalente ao de clorofila *b* e os carotenóides que ocorrem em maior quantidade são as xantofilas. Tem sido sugerido que o complexo II é necessário para a formação de grana (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU *et al.*, 1971; ARGYROUDI-AKOYUNOGLU and AKOYUNOGLU, 1973; ANDERSON and LEVINE, 1974; THORNER and HIGHKIN, 1974). A função dos carotenóides nos tecidos fotossintéticos das plantas superiores ainda não está bem estabelecida. Eles certamente funcionam como pigmentos acessórios na fotossíntese captando energia radiante e transferindo esta energia, com algumas perdas, para moléculas de clorofila *a* (BURNETT, 1976; WHITTINGHAM, 1976; SESTÁK, 1978, KRINSKY, 1979). Além disso, é conhecido que os carotenóides têm um importante papel de proteger a clorofila contra fotodestruição (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; BURNETT, 1976; HARBOUR and BOLTON, 1978; KRINSKY, 1979).

Cloroplastos com um baixo conteúdo de carotenóides apresentam capacidade de sintetizar clorofila, mas a clorofila é perdida por fotodestruição quando as plântulas são desenvolvidas sob condições normais de luz (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; FALUDI *et al.*, 1960; FROSCH *et al.*, 1979). Este é um fato que tem sido comprovado não apenas em mutantes de carotenóides, mas também através do uso de alguns herbicidas que inibem a síntese dos carotenóides. Como discutido por MORELAND (1980), o tratamento com esses herbicidas resulta no acúmulo de precursores não coloridos de carotenos, denominados fitoeno e fitoflueno, com predominância do fitoeno. O sistema lamelar apresenta-se degenerado. Muitos dos passos da via biossintética

ca dos carotenóides são controlados pelo núcleo, entretanto a síntese completa dos carotenóides supõe-se ocorrer dentro dos cloroplastos (MORELAND, 1980).

Mutantes deficientes em carotenóides que apresentam uma alta concentração de precursores desses pigmentos não são capazes de formar ou manter grana normais e as folhas desenvolvem um fenótipo albino ou amarelo (FALUDI-DÁNIEL, 1975). Alguns desses mutantes têm sido bem caracterizados tais como o mutante  $w_3$  em milho (ANDERSON and ROBERTSON, 1960) e dois outros mutantes, também em milho, isolados por ANDRÉ em 1951 (citado por NIELSEN, 1974), denominados  $\zeta$ -carotênico e licopênico. Esses mutantes são recessivos e apresentam herança mendeliana do tipo monofatorial. O mutante  $w_3$  acumula precursores de carotenóides, fitoeno e fitoflueno, e  $\zeta$ -caroteno, apresentando fenótipo albino quando desenvolvido em condições normais de luz, porém acumula clorofila quando desenvolvido em condições de baixa intensidade luminosa (5,4 lux) sem, no entanto, sintetizar carotenóides (ANDERSON and ROBERTSON, 1960). As plantas desenvolvidas no escuro apresentaram corpo pró-lamelar e protilacóides, tal qual o normal, e quando o mutante era desenvolvido em condições de luz os plastídeos apresentavam deficiência de grana (BACHMANN *et al.*, 1967, 1969). Os mutantes  $\zeta$ -carotênico e licopênico de milho apresentam biossíntese de carotenóides defeituosa, alterações nos cloroplastos e acumulam clorofila quando desenvolvidos em condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux), como determinado por FALUDI-DÁNIEL *et al.*, (1968), WALLS (1971), HORVÁTH e FALUDI-

DÁNIEL (1971), WALLEs e HUDÁK (1975) e FALUDI-DÁNIEL (1975). O mutante  $\zeta$ -carotênico apresenta  $\zeta$ -caroteno, fitoeno e fitoflueno como principais carotenóides e os seus cloroplastos possuem sistema lamelar pouco desenvolvido. O outro é denominado mutante licopênico porque acumula licopeno, além de fitoeno e fitoflueno. O sistema lamelar dos cloroplastos desse mutante também é pouco desenvolvido. Alguns plastídeos são cromoplastos contendo cristalóides que se encontram depositados dentro de tilacóides expandidos. BRITTON (1976) considerou que esses mutantes constituem uma evidência genética de que a dessaturação do fitoeno e a reação de ciclização dos carotenos nos tecidos verdes estão sob o controle de genes nucleares. Por outro lado, GYURJÁN *et al.* (1978) constataram que os mutantes  $\zeta$ -carotênico e licopênico são deficientes em ribossomos 70S e rRNA e consideraram que é difícil determinar se essa deficiência é um efeito primário ou secundário da mutação. Segundo esses autores, anormalidades na síntese de pigmentos, síntese de ácidos nucleicos e baixos níveis de atividade de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase nesses mutantes são possivelmente efeitos pleiotrópicos da deficiência na formação de ribossomos. Também são conhecidos mutantes em cevada que apresentam alterações na biossíntese de carotenóides e alguns outros que apresentam os mesmos carotenóides encontrados no normal, porém com conteúdo bastante reduzido (NIELSEN and GOUGH, 1974). Esses mutantes também apresentam alterações ultraestruturais nos cloroplastos e cromoplastos que contêm cristalóides (NIELSEN, 1974). Dois mutantes de girassol deficientes em  $\beta$ -caroteno apresentam

plastídeos com forma amebóide e grana desintegrados (WALLES, 1965, 1966). Tem sido considerado que o  $\beta$ -caroteno é necessá-  
rio para a formação de grana normais (WALLES, 1971; ROSINSKI  
and ROSEN, 1972; GYURJÁN *et al.*, 1980 a) e existem evidências  
de que o  $\beta$ -caroteno está intimamente associado com o funcio-  
namento dos centros dos fotossistemas I e II (KNAFF *et al.* ,  
1977; SEARLE and WESSELS, 1978; OQUIST *et al.*, 1980).

Cristalóides também têm sido observados em plastí-  
deos do pericarpo de frutos de plantas de diferentes espécies  
como, por exemplo, os observados em frutos maduros de tomatei-  
ro, que acumulam licopeno (ROSSO, 1968; BEN-SHAUL and NAFTALI,  
1969; HARRIS and SPURR, 1969 b). Cristalóides da corona de  
*Narcissus poeticus* foram isolados e caracterizados por KHUN  
(1970) como sendo cristais de  $\beta$ -caroteno. Segundo NIELSEN  
(1974), os cristalóides são derivados de membranas ou de glô-  
bulos com composição específica de carotenóides dos plastí-  
deos e são produzidos como resultado de mutação genética, tra-  
tamento com herbicidas ou diferenciação de cromoplastos em  
frutos. Além disso, de acordo com esse autor, cristalóides com  
a mesma morfologia podem ser originados da acumulação de dife-  
rentes carotenóides.

Algumas proteínas lamelares também são importantes  
para a organização molecular dos sistemas de pigmentos fotos-  
sintéticos e estão sob o controle de genes nucleares e do clo-  
roplasto (NASYROV *et al.*, 1975; GILLHAM, 1978). Sabe-se que  
mutações do genoma do cloroplasto ou do genoma nuclear podem  
afetar a atividade dos fotossistemas I e II (NASYROV, 1978) .

No entanto, o controle genético da diferenciação dos fotossistemas I e II ainda não está esclarecido. Por outro lado, tem sido admitido que as unidades dos fotossistemas I e II consistem de entidades funcionalmente organizadas compostas por um centro fotoquímico associado com uma antena coletora de fótons, esta apresentando clorofila e carotenóides (GOVINDJEE and GOVINDJEE, 1975). Considerando-se o fotossistema II, tem sido demonstrado que, na maioria dos organismos, durante a diferenciação das membranas fotossintéticas o desenvolvimento do fotossistema II parece ocorrer pela adição progressiva de moléculas de clorofila recém-sintetizadas aos centros de reação previamente formados (HERRON and MAUZERALL, 1972; EGNEUS *et al.*, 1972; HENNINGSEN and BOARDMAN, 1973; DUBERTRET and JOLIOT, 1974; CAHEN *et al.*, 1976; MELIS and AKOYUNOGLU, 1977; AKOYUNOGLU, 1977). Segundo MELIS e AKOYUNOGLU (1977) a formação desses centros precede a formação dos grana em plastídeos em desenvolvimento. Também tem sido bastante discutida a localização da atividade desses sistemas de pigmentos nas membranas internas do cloroplasto, principalmente em relação ao fotossistema II. Estudos realizados por HOMANN e SCHMIDE (1967) em um mutante amarelo de *Nicotiana tabacum* que não apresenta grana nos cloroplastos mostraram alta atividade do fotossistema I, mas fotossistema II inativo. Esses autores sugeriram que a atividade do fotossistema II requer a junção de tilacóides. Iniciando-se com os dados de HOMANN e SCHMIDE (1967), que estão entre os primeiros pesquisadores a levantarem a hipótese de que a atividade do fotossistema II está associada

com a formação de grana, numerosos trabalhos foram realizados nesta área utilizando cloroplastos de plantas normais e mutantes. Entretanto, esta correlação ainda não está totalmente esclarecida. Alguns mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* mostraram uma correlação direta entre a atividade do fotossistema II e a ocorrência de grana (SEMENOVA *et al.*, 1977). Entretanto, um outro mutante dessa mesma espécie, estudado por GOODENOUGH e LEVINE (1969), no qual não foi observada a ocorrência de grana, mostrou atividade de fotossistema II nos cloroplastos. Em um mutante de cevada que não possui clorofila *b* existe atividade de fotossistema II, embora tenham sido observados poucos grana nos cloroplastos (BOARDMAN and HIGHKIN, 1966). HIGHKIN *et al.* (1969) observaram que um mutante de ervilha (*Pisum sativum*) que possuía uma alta relação clorofila *a/b* apresentava alta atividade de fotossistema II, entretanto, o fotossistema II mostrou-se mais reduzido nesse mutante do que o fotossistema I. Os cloroplastos desse mutante apresentaram poucos grana e poucos tilacóides por grana. Por outro lado, nos mutantes de cevada ricos em grana, estudados por NIELSEN *et al.* (1979), não foi observada correlação entre a quantidade de grana e a atividade do fotossistema II. Numerosos trabalhos com cloroplastos em diferenciação têm revelado interrelações estruturais-funcionais e têm-se evidências de que a sequência de desenvolvimento que ocorre durante a biossíntese das membranas inclui o aparecimento primeiramente da atividade do fotossistema I e posteriormente do fotossistema II, tendo sido sugerido que as lamelas intergrana representam

regiões incompletamente diferenciadas das membranas do cloroplasto (SESTÁK, 1969; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1970; PHUNG-NHUNG *et al.*, 1970; HILLER and BOARDMAN, 1971; PARK and SANE, 1971; EGNÉUS *et al.*, 1972; KARAPETYAN *et al.*, 1975; ARNTZEN and BRIANTAIS, 1975). Quando os cloroplastos são fragmentados por meios mecânicos, a fração leve de membranas correspondente às lamelas intergrana, apresentam uma atividade muito baixa de fotossistema II, em contraste com a fração pesada, que é considerada correspondente aos grana, onde a atividade é alta (SANE *et al.*, 1970; PARK and SANE, 1971; ARNTZEN *et al.*, 1972; GAZANCHYAN *et al.*, 1975; ARMOND *et al.*, 1977; ARMOND and ARNTZEN, 1977). Análises da sub-estrutura das membranas do sistema lamelar do cloroplasto, utilizando a técnica "freeze-fracture" para microscopia eletrônica, têm mostrado a ocorrência de partículas intramembranas, possivelmente envolvidas com a atividade fotoquímica. Têm sido observadas diferenças entre o padrão de organização das membranas das lamelas intergrana e dos tilacóides. Correlacionando os resultados obtidos através de análises da sub-estrutura das membranas com dados obtidos por meio de análises bioquímicas dos fragmentos de membranas dos cloroplastos, tem-se tentado associar algumas dessas partículas com o fotossistema II e sua antena de pigmentos-proteínas (MILLER *et al.*, 1976, 1977; ARNTZEN *et al.*, 1974; ARMOND and ARNTZEN, 1977). Tem sido observado um padrão de distribuição não uniforme das partículas intramembranas nas lamelas examinadas pela técnica de "freeze-fracture". A maioria das partículas, possivelmente associadas

com o fotossistema II, está localizada nas regiões de junção dos tilacóides e, além disso, nessas regiões essas partículas são consideravelmente maiores do que aquelas das lamelas simples (ARMOND and ARNTZEN, 1977). Por outro lado, MILLER *et al.* (1977) sugeriram que a junção de tilacóides para formar os grana requer uma concentração crítica de partículas na face das lamelas do cloroplasto onde supõe-se estar localizado o fotossistema II. Esses dados evidenciam a hipótese de que as lamelas do estroma representam regiões incompletamente diferenciadas das membranas do cloroplasto e justificariam a baixa atividade do fotossistema II observada na fração leve dos fragmentos de membranas. Alguns autores consideraram que possivelmente a junção dos tilacóides aumenta a eficiência da transferência de energia entre os fotossistemas I e II (SUN and SAUER, 1972; WANG and PACKER, 1973; STAEHELIN, 1975).

Vários pesquisadores têm realizado estudos citoquímicos utilizando a técnica do ferricianeto como aceitador de elétrons (KERPEL-FRONIUS and HAJÓS, 1968), a qual tem sido utilizada para localizar a atividade do fotossistema II em cloroplastos normais de espinafre (HALL *et al.*, 1971; NIR and PEASE, 1973; KIRCHANSKI, 1976), de *Ceratodon purpureus* (VALANNE, 1976) e de milho (LAURITIS and PRIOLI, 1979). A reação de Hill é desenvolvida em presença de ferricianeto e sulfato de cobre e é possível observar que o ferrocianeto formado pela fotorredução se precipita como ferrocianeto de cobre em depósitos grandes, visíveis em preparações para microscopia eletrônica. HALL *et al.* (1971) observaram esses depósitos nos

grana e nas lamelas intergrana e concluíram que o fotossistema II apresenta atividade em ambas as regiões lamelares. No entanto, esses autores ressaltam também a possibilidade do ferrocianeto de cobre se deslocar de seu sítio inicial de redução para um outro ponto da membrana. Entretanto, os resultados obtidos por NIR and PEASE (1973), KIRCHANSKI (1976), VALLANNE (1976) e por LAURITIS and PRIOLI (1979) não concordam com os obtidos por HALL *et al.* (1971) e sustentam a hipótese de que a atividade do fotossistema II está associada com a formação de granum (HOMANN and SCHMIDE, 1967; SANE *et al.*, 1970; PARK and SANE, 1971; GAZANCHYAN *et al.*, 1975). No entanto, apesar dos numerosos estudos realizados nesta área, a questão da localização da atividade funcional do fotossistema II ainda é discutida.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico e condições de crescimento

Foram utilizadas duas classes de mutantes deficientes em clorofila, selecionadas pelo Prof. Dr. William José da Silva, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas. Esses mutantes apresentam segregação mendeliana do tipo monofatorial, são letais, sobrevivendo até aproximadamente quinze dias após a emergência, quando estão no estágio de terceira ou quarta folha. Tais mutantes são mantidos através de autofecundação de plantas heterozigotas e são denominados: (1) *Albino* - mutante branco. Foi selecionado a partir de uma progênie  $S_1$  da variedade sintética *Asteca prolífico*, de endosperma dentado, produzida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, designada *Ast.329-1*. (2) *Luteus* - Foram utilizadas duas linhagens diferentes dessa classe de mutantes

denominadas *luteus I*, que possui cor amarela, (Figura 2) e *luteus II*, que é amarelo-esverdeado (Figura 3). O mutante *luteus I* foi selecionado a partir de uma progênie  $S_1$  de uma variedade sintética denominada Composto Duro, de endosperma flint, produzida pelo Instituto de Genética de Piracicaba, designada CD-1-3. O *luteus I* foi selecionado a partir de uma progênie  $S_1$  de uma variedade sintética, de endosperma semi-dentado, denominada WP-12, produto do cruzamento de tipos Tuxpenões e flints da América Latina, selecionado no Instituto de Genética de Piracicaba, designada WP-12-32-7. As linhagens isogênicas, segregando apenas para o loco que condiciona alterações nos cloroplastos, foram mantidas por autofecundação, desde 1974, na Área Experimental da Universidade Estadual de Campinas. Em cada geração, antes do plantio no campo, retirava-se uma amostra de 10 sementes que eram plantadas em copos plásticos na câmara de germinação. Isso foi sempre feito para identificação das espigas provenientes de plantas heterozigotas para o loco em questão. De cada uma dessas espigas eram então amostradas 75 sementes para o plantio de uma progênie em linhas de 10 m de comprimento no campo, onde novamente as plantas eram autofecundadas.

Utilizando-se essa técnica pudemos comparar, nos três casos, o mutante deficiente em clorofila e o respectivo normal com o restante do genótipo comum para os dois tipos, pois tratavam-se de linhas isogênicas, segregando apenas para o loco que condiciona alterações nos cloroplastos. As plântulas foram desenvolvidas em copos plásticos contendo uma mistura

de terra/areia na proporção de 3:1 e regadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland diluída com água destilada (1:3) para prevenir possível deficiência mineral. As plântulas foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1$  (dia) e  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  (noite), fotoperíodo de 12 horas e iluminação artificial proveniente de 16 lâmpadas fluorescentes 40 W e 4 lâmpadas incandescentes 40 W. Diferentes intensidades luminosas foram obtidas através de sombreamento utilizando-se gaze branca. As amostras foram coletadas de plântulas em estágio de terceira folha, dez dias após emergência.

Numa fase preliminar foram utilizadas várias condições de luminosidade na expectativa de se encontrar um possível efeito da intensidade luminosa no desenvolvimento dos cloroplastos a nível de conteúdo de clorofila e alterações ultraestruturais e, então, estabelecer uma condição de crescimento para as análises subsequentes. Assim, algumas plântulas foram desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux, outras sob intensidades luminosa de 1000 lux e outras, ainda, sob intensidade luminosa de 10000 lux. Esses pontos foram escolhidos porque correspondem a intensidades luminosas que têm sido utilizadas em vários estudos de mutantes deficientes em clorofila (FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; HORVÁTH and FALUDI-DÁNIEL, 1971; WÁLLES, 1971; TRAVIS *et al.*, 1975; SMILLIE *et al.*, 1977; PRIOLI *et al.*, 1978; SHORTESS and AMBY, 1979). Isso foi feito para garantir uma melhor comparação dos mutantes estudados no presente trabalho com os descritos na literatura. As plântulas desenvolvidas nessas condições de crescimento foram

utilizadas para análises da ultraestrutura dos cloroplastos e determinações de protoclorofila e clorofila. Considerando-se que os resultados obtidos foram bastante semelhantes para todas as condições de crescimento utilizadas, foi escolhida a intensidade luminosa de 1000 lux para as análises de carotenóides e determinação citoquímica dos sítios de fotorredução de ferricianeto em todos os tipos mutantes e normais correspondentes. As plântulas do mutante luteus II desenvolvidas em condições de 25-30 lux apresentaram coloração das folhas tão semelhantes às plântulas normais desenvolvidas nessa mesma condição de luminosidade, ao ponto de tornar-se difícil distinguir um tipo do outro. Quando esse mutante é transferido para intensidades luminosas mais altas (1000 lux e 10000 lux) as plântulas normais adquirem cor verde intensa, enquanto que o mutante mantém-se amarelo-esverdeado. Assim sendo, julgou-se de interesse analisar a ultraestrutura dos cloroplastos e o conteúdo de pigmentos fotossintéticos desse mutante desenvolvido em uma condição de luminosidade bastante alta para favorecer maior produção e também maior fotodestruição da clorofila. Para tanto foram utilizadas plântulas cultivadas no campo. Em todos os experimentos a coleta das amostras somente foi efetuada após um período de iluminação de aproximadamente 4 horas. Todas as folhas de cada plântula foram utilizadas para as análises químicas e ultraestruturais.

### 3.2 Microscopia

#### 3.2.1 Ultraestrutura dos cloroplastos

Para uma análise dos vários estágios de desenvolvimento dos cloroplastos dos mutantes, comparados com os das plântulas normais correspondentes, foram coletadas amostras para microscopia eletrônica de folhas desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Para tanto, o coleoptilo e a primeira folha foram retirados e as amostras foram coletadas das regiões basal, mediana e ponta da segunda folha (LEECH *et al.*, 1973), considerando-se que estudos realizados em milho mostraram uma sequência de desenvolvimento desde proplastídeos até cloroplastos maduros nas folhas em crescimento, iniciando-se nas células mais jovens, que são as da base da folha, até as mais velhas, que são as da ponta da folhas (ANDERSEN *et al.*, 1972; LEECH *et al.*, 1973). Para a análise das plântulas desenvolvidas nas outras condições de intensidade luminosa, foram retiradas amostras da região de 1 a 2,5 cm da ponta das folhas das plântulas normais e mutantes albino, luteus I e luteus II. Essas plântulas foram desenvolvidas sob intensidades luminosas de 25-30 lux e 10000 lux, além do mutante luteus II e normal correspondente desenvolvidas no campo. Para esta análise foi escolhida a região da ponta das folhas considerando-se que é o local onde os cloroplastos já estão mais maduros (ANDERSEN *et al.*, 1972; LEECH *et al.*, 1973). Os espécimes (1-2 mm<sup>2</sup>) foram fixados com glutaraldeído 4% (SABATINI *et al.*, 1963) em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,4) contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM, durante 2-3 horas a 4°C. Nos primeiros 30 min. os espécimes foram mantidos sob vácuo para facilitar a penetração da solução fixadora. A seguir, foram

lavados durante 45 min. (3 x 15 min.) em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,4) contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM e então pós-fixados com  $\text{OsO}_4$  2% no mesmo tampão por 2 horas a 25°C. Posteriormente os espécimes foram lavados com água destilada durante 1 hora (3 x 20 min.) e desidratados em gradiente de acetona, como se segue: 30% - 10 min., 50% - 10 min., 70% - 15 min. e 100% 3 x 20 min.. A inclusão foi feita em mistura Epon/Araldite (MOLLENHAUER, 1964) seguindo-se a composição: Epon 812 25%, anidrido dodecenilsuccínico (DDSA) 55%, Araldite-6005 15%, dibutil ftalato (DBP) 0,5% e benzildimetilamina (BDMA) 4,5%. Como solvente para essa mistura utilizou-se acetona nas seguintes proporções (resina:acetona): 1:3 - 15 min., 1:1 - 50 min. e 3:1 aproximadamente 12 horas. Os espécimes foram então incluídos em resina pura e deixados durante 24 horas a 38°C, sendo posteriormente mantidos em estufa a 60°C por 48 horas.

Cortes finos (1  $\mu\text{m}$ ) para microscopia óptica e ultrafinos (60-90 nm) para microscopia eletrônica foram obtidos com navalhas de vidro em um ultramicrotomo Porter-Blum MT-1. Os cortes finos foram corados com azul de toluidina 0,5% em solução de bórax 1% e os ultrafinos, montados em telinhas de cobre, foram contrastados com acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) seguido por citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As micrografias eletrônicas foram obtidas em um microscópio Zeiss, modelo EM 9S-2.

### 3.2.2. Citoquímica

Com o objetivo de localizar a atividade funcional do

fotossistema II, sítios de fotorredução nos cloroplastos foram detectados com ferricianeto como aceitador de elétrons utilizando a mistura de reação formulada por KERPEL-FRONIUS and HAJÓS (1968), modificada por HALL *et al.* (1971) e esta por LAURITIS e PRIOLI (1979). A mistura de reação básica constituiu dos seguintes componentes em concentrações finais de: tartarato de sódio-potássio 0,3 M, tampão fosfato Sorensen (pH 7,4) 20 mM, sulfato de cobre 20 mM, ferricianeto de potássio 2 mM e dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v). Os compostos foram adicionados na ordem citada completando um volume final de 5 ml. DMSO foi adicionado à mistura de reação para aumentar a permeabilidade das membranas e penetração dos reagentes (GARREN, 1967; LEONARD, 1967), além de aumentar o fluxo de elétrons (HANKER, 1975). Os controles consistiram de incubação dos espécimes em: (a) tampão fosfato Sorensen (pH 7,4) 0,1M, (b) mistura de reação básica sem ferricianeto de potássio, (c) mistura de reação básica mantida no escuro e (d) mistura de reação básica contendo 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurêia (DCMU), conhecido como um inibidor do transporte eletrônico a nível de fotossistema II.

Foram utilizadas amostras coletadas da região da ponta das folhas de todos os tipos mutantes e plântulas normais correspondentes, desenvolvidas em intensidade luminosa de 1000 lux. A epiderme inferior das folhas foi cuidadosamente removida antes da fixação para facilitar a penetração dos reagentes (NIR and PEASE, 1973). Os espécimes foram fixados com glutaraldeído 4% (Polyscience, Inc. - EM grade) (SA-

BATINI *et al.*, 1963) em tampão fosfato Sorensen 0,1 M (pH 7,4) por 2 horas a 4°C. A estabilização das membranas dos tilacóides através da fixação com glutaraldeído aparentemente mantém o grau de integridade estrutural necessária para o fluxo de elétrons (ARNTZEN *et al.*, 1974; GIAQUINTA *et al.*, 1974). Nos primeiros 30 min. a infiltração foi feita sob vácuo em presença de luz e, posteriormente, os espécimes foram mantidos no escuro. Após fixação, em câmara escura contendo uma lâmpada com filtro de segurança verde (VALANNE, 1976) localizada a uma distância aproximada de dois metros do local de trabalho e com os recipientes envoltos em papel preto, os espécimes foram lavados por 30 min. (3 x 10 min.) em tampão fosfato Sorensen 0,1 M (pH 7,4). A seguir, ainda no escuro, os espécimes foram imersos na mistura de reação onde permaneceram por 30 min. para que ocorresse a penetração dos reagentes. A fotorredução foi feita com os espécimes imersos na mistura de reação em recipiente de vidro transparente colocados sobre o vidro de um visor de slides com lâmpada fluorescente e iluminados de cima (30 cm) com uma lâmpada incandescente de 100 W. Os espécimes foram levemente agitados enquanto expostos à luz por 30 min. (LAURITIS and PRIOLI, 1979) e, após a iluminação, foram lavados durante 90 min. (3 x 30 min.) no escuro com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) para prevenir possível contração dos tilacóides (NIR and PEASE, 1973). A seguir os espécimes foram fixados com OsO<sub>4</sub> 2% no mesmo tampão por 2 horas a 4°C e depois lavados com água destilada por 30 min. (3 x 10 min.). A desidratação e a inclusão foram realizadas como descrito no ítem anterior. As

secções foram obtidas com navalhas de vidro em um ultramicrotomo Porter-Blum MT-1 e examinadas, sem contrastação posterior, em um microscópio eletrônico Zeiss, modelo EM 9S-2.

### 3.3. Determinação de pigmentos fotossintéticos

Foram realizadas determinações de protoclorofila e clorofila em todos os mutantes e normais correspondentes desenvolvidos sob intensidades luminosas de 25-30 lux, 1 000 lux e 10 000 lux e também do mutante luteus II desenvolvido em condições de campo. Para as análises de carotenóides foram utilizados todos os mutantes e normais desenvolvidos sob intensidade luminosa de 1 000 lux e também o mutante luteus II desenvolvido sob intensidade luminosa de 25-30 lux e no campo.

#### 3.3.1 Protoclorofila e clorofila

As folhas coletadas foram pesadas e cada amostra, consistindo de aproximadamente 0,5 g, foi homogeneizada em acetona fria 80% (v/v), utilizando um homogeneizador de vidro em banho de gelo. O extrato foi filtrado utilizando-se papel de filtro em um funil Buchner, submetido à pressão de vácuo. O resíduo no filtro foi lavado com o solvente por duas vezes e o filtrado submetido a centrifugação a 150 xg durante 5 min.. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para as medidas de absorbância a 663 nm, 645 nm e 626 nm, realizadas em um espectrofotômetro Zeiss DMR-21. Sabe-se que o protoclorofilídeo é um composto que difere da protoclo-

rofila apenas pela presença de fitol na molécula deste último e ambos absorvem energia luminosa nos mesmos comprimentos de onda. Fenômeno semelhante ocorre com o clorofilídeo em relação à clorofila *a*, compostos estes que diferem entre si apenas pela presença de fitol na molécula de clorofila *a*, absorvendo energia luminosa nos mesmos comprimentos de onda (BOGORAD, 1976). Assim sendo, no presente trabalho o conteúdo de protoclorofila foi considerado juntamente com o de protoclorofilídeo e o conteúdo de clorofila juntamente com o de clorofilídeo, uma vez que esses compostos não foram separados para uma quantificação individual. As determinações do conteúdo de protoclorofila foram feitas de acordo com as equações de ANDERSON e BOARDMAN (1964) e para as determinações do conteúdo de clorofila total, clorofila *a* e clorofila *b* foram utilizadas as equações de ARNON (1949), como se seguem:

$$\text{Protoclorofila (mg/l)} = 29,60 D_{626} - 3,99 D_{663} - 6,76 D_{645}$$

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 20,2 D_{645} + 8,02 D_{633}$$

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/l)} = 12,7 D_{633} - 2,69 D_{645}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/l)} = 22,9 D_{645} - 4,68 D_{663}$$

As extrações foram realizadas em câmara escura utilizando-se uma lâmpada de segurança verde para evitar fotooxidação desses pigmentos e os recipientes contendo os extratos centrifugados foram protegidos contra a luz até serem realizadas as leituras espectrofotométricas.

Folhas frescas (10-15 g) foram homogeneizadas em acetona fria p.a. utilizando-se um homogeneizador de vidro em banho de gelo. A seguir, a amostra foi filtrada em papel de filtro em um funil Buchner sob pressão de vácuo. O procedimento de extração e filtração foi repetido até o resíduo adquirir cor cinzenta evidenciando ausência de pigmentos. Os filtrados foram combinados e o filtrado resultante foi adicionado, aos poucos, a aproximadamente 30 ml de hexano contido em um funil de separação. Com a adição de água destilada foram formadas duas fases e os pigmentos transferidos para o hexano. A mistura acetona/água, totalmente livre de pigmentos, foi descartada e o extrato lavado por várias vezes com água destilada para eliminar completamente os resíduos de acetona.

O extrato assim obtido foi saponificado em solução metanólica de KOH 10% (1:1) por um período de 16-18 horas à temperatura ambiente (25-28°C) (RODRIGUEZ *et al.*, 1976), no escuro, em atmosfera de nitrogênio. O procedimento de saponificação representa uma purificação preliminar quando são eliminadas clorofilas e também substâncias não identificadas que poderiam interferir na posterior cromatografia de adsorção, além de ocorrer a hidrólise de ésteres de carotenóides hidroxilados (DAVIES, 1976). Após a saponificação o extrato foi lavado com água destilada até eliminar completamente a solução alcalina. Os pigmentos dissolvidos em hexano foram então secados com sulfato de sódio anidro, utilizando-se aproximadamente 5-10 g desse composto por 100 ml de solução (DAVIES, 1976). A seguir, o volume do extrato foi reduzido a aproxima-

damente 5 ml utilizando-se um evaporador rotatório à vácuo ou um fluxo contínuo de nitrogênio quando o volume do extrato já era pequeno (10-20 ml).

Os carotenóides foram separados por cromatografia de adsorção em coluna. Foram utilizadas colunas de vidro (1 x 25 cm ou 2 x 25 cm) como suporte para o adsorvente que consistiu de uma mistura de óxido de magnésio e Hyflo Super Cel (Fisher Scientific Co.) na proporção 1:2 (RODRIGUEZ *et al.*, 1976). Antes de adicionar o extrato foram depositados 4-5 g de sulfato de sódio anidro na superfície do adsorvente para remover algum possível traço de água presente na solução de pigmentos. O extrato concentrado (5 ml) foi aplicado no topo da coluna que foi eluída sucessivamente com 50 ml de cada um dos seguintes solventes, na seqüência: hexano 100%, éter etílico 1, 2 e 5% em hexano, acetona 2, 5, 8, 10 e 12% em hexano (RODRIGUEZ *et al.*, 1976). Imediatamente após a cromatografia as soluções foram lavadas com água destilada para retirar a acetona. Todos os experimentos envolvendo carotenóides foram efetuados com proteção contra luz direta para evitar fotooxidação desses pigmentos.

Os pigmentos foram identificados com base na ordem de eluição da coluna de cromatografia, espectro de absorção em hexano, etanol e clorofórmio na faixa do espectro visível, valores de R<sub>f</sub> em cromatografias de camada delgada analisados em várias "corridas", co-cromatografia com padrão de β-caroteno (Sigma Chemical Co.) e resposta a testes químicos de acetilação, metilação, desidratação e identificação de epóxidos.

Para a determinação do espectro de absorção dos carotenóides utilizou-se um espectrofotômetro Zeiss DMR-21. A ocorrência de fitoflueno, precursor de carotenóides (GOODWIN, 1976), incolor, foi verificada por exposição dos cromatogramas e das colunas de cromatografia, logo no início da eluição, a uma lâmpada de radiação ultravioleta de comprimento de onda longo, uma vez que esse composto pode ser assim detectado por sua fluorescência (DAVIES, 1976). Para determinações dos valores de Rf foram realizadas cromatografias de camada delgada utilizando-se placas de sílica gel 60, 20 x 20 cm, com 0,25 mm de espessura (cromatoplasas Merck-5721), em cubas previamente saturadas por 30 min.. Os sistemas de solvente utilizados foram metanol 3% em benzeno (RODRIGUEZ *et al.*, 1973) e mistura de benzeno, acetato de etila e metanol (75:20:5), sendo este último sistema adequado para a separação de xantofilas em plantas superiores (DAVIES, 1976). Os testes químicos foram realizados de acordo com DAVIES (1976) utilizando isoladamente os carotenóides já separados através da cromatografia em coluna.

Para a identificação de grupos hidroxila primários e secundários foi realizado um teste de acetilação pela adição de 0,2 ml de anidrido acético ao pigmento dissolvido em 2 ml de piridina. A mistura de reação permaneceu no escuro em atmosfera de nitrogênio por 18-20 horas à temperatura ambiente (20-28°C). A seguir, foram adicionados 2 ml de hexano à solução e o pigmento foi transferido para o hexano através da adição de água destilada e então submetido à cromatografia de

camada delgada. A esterificação dos carotenóides hidroxilados causa um acentuado decréscimo na afinidade de adsorção. Este teste de acetilação é específico para grupos hidroxila primários e secundários, mas não terciários.

Para identificar grupos hidroxila alílicos secundários foi utilizado um teste de metilação que consistiu da adição de 1-2 gotas de ácido clorídrico 0,2 N em metanol a 5 ml de solução do carotenóide em metanol. A mistura de reação foi mantida à temperatura ambiente (20-28°C) por 3 horas. A seguir, o pigmento foi transferido para hexano com a adição de água e cromatografado em placa de camada delgada. Quando ocorre um aumento no valor do Rf significa que ocorreu a metilação dos grupos hidroxila alílicos secundários, sendo que este teste é específico para este tipo de hidroxila.

Para identificação de grupos hidroxila alílicos primários, secundários e terciários conjugados foi utilizado um teste de desidratação por adição de 1 ou 2 gotas de clorofórmio acidificado ao pigmento diluído em clorofórmio. O clorofórmio foi acidificado com ácido clorídrico concentrado, ficando a concentração final do ácido na mistura de reação em torno de 0,005 N. Após 30 min. determinou-se o espectro de absorção do carotenóide na faixa visível. A desidratação introduz uma ligação dupla no cromatóforo e essa alteração, que pode ser acompanhada de um rearranjo dos grupos alílicos, resulta na transferência da absorção máxima para comprimentos de onda mais longos. Quando a desidratação é 100% eficiente a alteração da absorção máxima é de 10-16 nm por grupo hidroxila

alílico. Além disso, a reação positiva provoca um aumento no valor do Rf do carotenóide, o que foi testado em cromatografia de camada delgada.

Os testes para identificação de 5,6 e 5,8 epóxidos basearam-se em sua reação com ácido clorídrico. Para a identificação de 5,6 epóxidos, um dos experimentos consistiu da adição de 2-3 gotas de ácido clorídrico 0,1 N à 5 ml de solução etanólica do pigmento. Após 3 min. o espectro de absorção na faixa visível foi determinado. Os 5,6-monoepóxidos são caracterizados por uma alteração no espectro de absorção para comprimentos de onda mais curtos (17-22 nm), assim como os 5,6, 5',6'-diepóxidos (40 nm). Um outro teste consistiu da exposição dos carotenóides em placa de sílica gel 60, após cromatografia, à vapores de ácido clorídrico por 2-5 min.. Para tanto, o ácido clorídrico fumegante (3-5 ml) foi mantido em um becker pequeno dentro de uma cuba onde se encontrava a placa de cromatografia.

As determinações quantitativas foram baseadas na absorção máxima dos carotenóides diluídos em hexano, logo após a cromatografia em coluna. Para calcular a quantidade do carotenóide contido na solução foi utilizada a fórmula abaixo, segundo DAVIES (1976):

$$x = \frac{E Y}{E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times 100}$$

onde  $x$  é a quantidade do carotenóide em gramas,  $E$  é a extinção,  $Y$  é o volume da solução em ml e  $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$  é o coeficiente

de extinção específico do carotenóide. Para a quantificação do  $\beta$ -caroteno utilizou-se o coeficiente de extinção específico igual a 2592 em hexano e para luteína (3,3-dihidroxi- $\alpha$ -caroteno) utilizou-se o coeficiente de extinção do  $\alpha$ -caroteno em hexano, igual a 2800 (DAVIES, 1976). Para as xantofilas não identificadas foi utilizado o coeficiente de extinção específico do  $\beta$ -caroteno, considerando-se que possivelmente tratam-se de carotenóides sintetizados a partir do  $\beta$ -caroteno.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Distribuição dos cloroplastos

Nas amostras da ponta das folhas das plântulas normais e mutantes analisadas podem ser reconhecidos cloroplastos distribuídos nas células da bainha vascular e mesófilo. (Figuras 4 - 9 ). Esses cloroplastos são numerosos nas plântulas normais, enquanto que nos mutantes, aparentemente, são um pouco menores e ocorrem em menor número do que nos normais correspondentes. A redução no número dessas organelas parece ser mais acentuada no mutante albino (Figuras 8 e 9 ).

### 4.2 Ultraestrutura dos cloroplastos

#### 4.2.1 Plastídeos das plantas normais

A ultraestrutura dos plastídeos normais de milho tem sido estudada por muitos pesquisadores, como por exemplo,

HODGE *et al.* - citado em LAETSCH, 1974; JACOBSON *et al.*, 1963; KLEIN, 1960; ANDERSEN *et al.*, 1972; LEECH *et al.*, 1973; KIRCHANSKI, 1975. Não foram observadas diferenças entre os cloroplastos das plântulas normais utilizadas como controle para os mutantes em estudo, sendo que apresentaram aspectos ultraestruturais semelhantes aos citados na literatura.

Nas secções das amostras da região basal da folha os proplastídeos apareceram como corpos pequenos, alguns com a matriz relativamente não diferenciada onde ocorrem poucas lamelas, desenvolvimento de alguns grana rudimentares, algumas vesículas e plastoglôbulos (Figuras 16, 45 e 71). Como é conhecido, os proplastídeos podem se diferenciar em cloroplastos durante o desenvolvimento da folha (WHATLEY, 1978).

Nas células da região mediana da folha a maioria dos cloroplastos apresentaram sistema lamelar bem desenvolvido, tendo sido possível observar cloroplastos da bainha vascular e do mesófilo já dimorfos. Os cloroplastos presentes nas células da bainha vascular são alongados, com sistema lamelar constituído por lamelas simples e, ocasionalmente, alguns grana rudimentares consistindo geralmente de 2-4 tilacóides (Figura 72). Os cloroplastos do mesófilo apresentaram grana bem desenvolvidos, interconectados por lamelas intergrana (Figuras 17, 46 e 72). Em ambos os tipos de cloroplastos foram observados alguns plastoglôbulos distribuídos no estroma, além do retículo periférico que se apresenta como um sistema de túbulos anastomosados.

dos aparentemente contíguo à membrana interna do envelope do cloroplasto (Figura 46).

Nas células da região da ponta da folha das plântulas normais desenvolvidas em condições de 1000 lux os grana dos cloroplastos da bainha vascular se mantiveram, como é característico, com poucos tilacóides (Figuras 20, 47 e 73), enquanto que nos cloroplastos do mesófilo (Figuras 18, 19, 47, 48 e 73) os grana apresentaram, aparentemente, maior número de tilacóides em relação aos da região mediana da folha. Esta observação foi comum para todos os normais analisados. As plântulas desenvolvidas sob intensidade luminosa de 10000 lux também apresentaram sistema lamelar bem desenvolvido, como mostrado nas Figuras 32, 65, 80 e 81. Quando desenvolvidas em condições de 25-30 lux, as plântulas apresentaram-se verdes, porém com folhas estreitas e longas, o que é um sintoma característico de deficiência de luz. Os cloroplastos dessas plântulas também apresentam sistema lamelar bem desenvolvido (Figuras 10, 37-40, 66 e 69), mas entre eles foram observados vários cloroplastos um pouco menos diferenciados (Figuras 11 e 41) e alguns apresentando corpo pró-lamelar (Figuras 10, 39, 40 e 67). Os cloroplastos também mostraram-se bem diferenciados nas plântulas normais utilizadas como controle para o mutante luteus II quando desenvolvidas no campo (Figuras 83 e 84). Foi possível visualizar retículo periférico, ribossomos, plastoglôbulos e grãos de amido em vários cloroplastos, como mostrado, por exemplo, nas Figuras

#### 4.2.2. Plastídeos do mutante albino

Os plastídeos do mutante albino não são uniformes em sua ultraestrutura. Muitos deles são muito pequenos e quase não apresentaram organização interna, enquanto que outros mostraram sistema lamelar desenvolvido, porém defeituoso (Figuras 12-15, 21-31 e 33-36).

Nas amostras da base da folha das plântulas desenvolvidas em condições de 1000 lux, os proplastídeos observados são muito semelhantes aos observados nesta mesma região nas amostras das folhas das plântulas normais. Em sua maioria eles são pouco diferenciados, possuindo poucas lamelas com desenvolvimento de grana rudimentares (Figura 25).

Nas células da região mediana da folha desse mutante e nas células da ponta das folhas das plantas desenvolvidas nas diferentes intensidades luminosas, a maior parte dos plastídeos quase não apresentou organização interna, possuindo apenas algumas vesículas ou poucas lamelas simples (Figuras 14, 21-23, 26, 27, 30, 33 e 34). Alguns desses plastídeos possuem lamelas distribuídas na região periférica do estroma e não são uniformes em densidade contendo regiões mais densas aos elétrons, como mostrado na Figura 15. Alguns poucos cloroplastos desse mutante apresentaram lamelas bem desenvolvidas, porém com organização alterada. A alteração ultraestrutural mais característica é a formação de grana aberrantes resultantes de um aumento na extensão e, muitas vezes, no número dos tilacóides (Figuras 13, 28, 29, 31 e 35). Em quase todos os cloroplastos desse mutante os tilacóides que se encontram su-

perpostos parecem não apresentar uma sinapse perfeita para formar partições normais nos grana, como mostrado nas Figuras 13, 15, 24, 28, 29, 31 e 35. Além disso, foram ocasionalmente observadas descontinuidades nos tilacóides desses grana aberrantes (Figuras 15 e 24), aparentemente resultantes da degeneração dos mesmos. Algumas vesículas e lamelas simples também podem ser observadas nesses cloroplastos com grana aberrantes (Figuras 13, 28, 29, 31 e 35). As lamelas geralmente se estendem longitudinalmente ao longo do cloroplasto e são descontínuas em alguns pontos. Em algumas regiões, pode-se observar superposição de duas lamelas, porém sem formar um granum típico (Figuras 13 e 29). Alguns cloroplastos apresentaram lamelas distendidas, muitas vezes superpostas, porém sem formar granum (Figuras 12 e 36). Plastoglôbulos foram observados distribuídos pelo estroma ou acumulados em uma ou mais regiões do cloroplasto, como mostrado nas Figuras 12, 23, 26, 28 e 30. Em vários plastídeos com sistema lamelar pouco desenvolvido o número de plastoglôbulos observados foi consideravelmente maior do que o observado nos cloroplastos normais. Fibrilas densas aos elétrons, possivelmente DNA, ocorrem nas áreas menos densas do estroma (Figura 15). Alguns plastídeos amebóides ocorreram nas amostras das folhas desse mutante. Ocasionalmente foram observadas invaginações contendo mitocôndrias nesses plastídeos (Figura 22). Alguns plastídeos das plantas albinas desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux apresentaram uma estrutura que poderia ser identificada como um corpo pró-lamelar, aparentemente não muito diferenciado ou

em degeneração, uma vez que é semelhante ao corpo pró-lamelar de alguns mutantes deficientes em clorofila, como o japônica 2 (ORSENIGO *et al.*, 1976) (Figura 15).

#### 4.2.3. Plastídeos do mutante luteus I

A principal característica observada para a maioria dos plastídeos do mutante luteus I foi a ausência de grana (Figuras 42, 44, 55-59, 60 e 64). Em todas as condições de luminosidade os cloroplastos desse mutante apresentaram lamelas simples que, em sua maioria, atravessam longitudinalmente o plastídeo sem formar grana. Algumas dessas lamelas se organizam paralelamente mantendo, entre si, espaços mais ou menos uniformes (Figuras 42, 57, 58, 61 e 63). Entretanto, foi observada a ocorrência de junção de duas ou mais lamelas com a formação de grana rudimentares em alguns cloroplastos do mesófilo, como observado nas Figuras 42, 43, 61, 63, 107 e 108. Ocasionalmente foram observadas lamelas concêntricas nos cloroplastos da bainha vascular, com espaço intertilacoïdal uniforme (Figuras 58 e 59). Lamelas descontínuas são comuns em ambos os tipos de cloroplastos, aparentemente com maior frequência no mesófilo, como mostrado nas Figuras 42, 43, 57 e 58. Além disso, retículo periférico, ribossomos, fibrilas densas aos elétrons, possivelmente DNA, e plastoglôbulos foram observados nos cloroplastos desse mutante, tendo sido comum a ocorrência de plastoglôbulos acumulados em uma ou mais regiões do estroma (Figuras 44, 56, 58, 60, 64 e 108). Em alguns cloroplastos com sistema lamelar pouco desenvolvido o número de

plastoglôbulos observados foi aparentemente um pouco maior do que o observado nas amostras das plantas normais (Figuras 56 e 64).

Quando as plântulas do mutante luteus I foram desenvolvidas sob intensidades luminosas de 25-30 lux e 1000 lux observou-se plastídeos semelhantes aos encontrados nas plantas desenvolvidas nas outras condições de intensidade luminosa, mas alguns plastídeos contendo corpo pró-lamelar também foram observados (Figuras 43, 51 e 52). Nas amostras das plântulas normais, ou mesmo dos outros mutantes, analisadas não foram observados plastídeos com corpo pró-lamelar quando desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux.

Na base das folhas desse mutante foram observados proplastídeos semelhantes aos encontrados nesta mesma região das folhas das plântulas normais, muitos deles contendo corpo pró-lamelar e algumas lamelas simples (Figuras 49-51). Os plastídeos observados na região mediana da folha são pouco desenvolvidos e muitos deles apresentam corpo pró-lamelar (Figuras 52, 53 e 54). Em todas as condições de luminosidade foram observados plastídeos amebóides, contendo ou não mitocôndrias nas invaginações, de modo semelhante ao observado no mutante albino I (Figuras 59 e 60). Alguns plastídeos contendo numerosas vesículas (Figura 55) foram observados nesse mutante.

Em amostras de folhas do mutante luteus I, desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux foram observados cromoplastos nas células da bainha vascular, como mostrado na Figura 62. Esses cromoplastos são do tipo em que os carote-

nóides ocorrem como cristalóides que são dissolvidos durante a preparação para microscopia eletrônica e apenas a membrana do tilacóide enrugado permanece. Esses cromoplastos são bastante raros e não foram observados nas células do mesófilo. Também não foram observados nas amostras das plantas desse mutante desenvolvidas nas outras intensidades luminosas.

#### 4.2.4 Plastídeos do mutante luteus II

Dos três mutantes estudados o luteus II foi o que mostrou, comparado ao normal, menores alterações ultraestruturais nos cloroplastos quando desenvolvido sob as diferentes intensidades luminosas em câmara de ambiente controlado. Os cloroplastos das células da bainha vascular são, aparentemente, normais (Figuras 75, 77 e 82). Nas células do mesófilo os cloroplastos observados apresentaram sistema lamelar bem desenvolvido, porém os tilacóides que formam os grana não são uniformes em extensão e, como consequência, quase todos os grana mostraram-se um pouco diferentes em aparência quando comparados com os cloroplastos das plantas utilizadas como controle (Figuras 78, 79 e 82). Além disso, muitos grana pequenos possuindo apenas 2-4 tilacóides pequenos em extensão ocorreram nesses cloroplastos (Figura 78). Os grana desse mutante apresentaram partições aparentemente normais ao microscópio eletrônico, como pode ser observado na Figura 79. As lamelas intergrana mostraram-se, em geral, descontínuas. Retículo periférico, ribossomos e plastoglôbulos foram observados. Quando as plântulas do mutante luteus II foram desenvolvidas em

condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux), os grana apresentaram, com algumas exceções, um menor número de tilacóides do que os das plântulas desenvolvidas em condições de 1000 lux e 10000 lux (Figura 68). Alguns cloroplastos apresentaram acúmulo de plastoglôbulos, como pode ser observado na Figura 70.

Os cloroplastos das plântulas desenvolvidas no campo, sob intensidade luminosa bem mais alta do que as utilizadas nas condições de laboratório, apresentaram sistema lamelar pouco desenvolvido, com uma considerável redução no número de grana e lamelas intergrana (Figuras 85 e 86).

Os cloroplastos da região mediana das folhas desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux parecem ter estrutura semelhante aos observados nas amostras da ponta da folha (Figuras 75 e 76). Os proplastídeos encontrados na base da folha mostraram-se semelhantes aos observados nas plântulas normais (Figura 74).

#### 4.3 Sítios de fotorredução do ferricianeto

As amostras de tecido foliar das plântulas de milho normais utilizadas como controle para os três tipos de mutantes apresentaram, quando analisadas ao microscópio eletrônico, resultados semelhantes entre si e aos obtidos para esta espécie por LAURITIS and PRIOLI (1979). Nos espécimes das plântulas normais incubados em mistura de reação completa com exposição à luz por 30 min. foram observados depósitos densos aos elétrons, em geral arredondados, localizados nos grana dos cloroplastos (Figuras 87 - 90). Ocorreram também alguns depósitos grandes não específicos no estroma dos cloroplastos

e, com menor frequência, no citoplasma (Figuras 87, 88 e 90 ). Não foram observados depósitos semelhantes, específicos ou não específicos, nos controles com tampão fosfato e mistura de reação sem ferricianeto de potássio, como mostrado nas Figuras 93 e 94 . Os cloroplastos incubados por 30 min. na mistura de reação sem exposição à luz (Figura: 92 ) não apresentaram depósitos específicos, o que confirma as observações feitas por outros autores (HALL *et al.*, 1971; NIR and PEASE, 1973; KIRCHANSKI, 1976; VALANNE, 1976; LAURITIS and PRIOLI, 1979) de que a deposição de ferrocianeto cúprico nos grana é uma reação dependente de luz. Os depósitos não específicos ocorreram no estroma dos cloroplastos e no citoplasma após incubação na mistura de reação completa, tanto na presença de luz como no escuro. Segundo KIRCHANSKI (1976) e HALL *et al.* (1971) esses depósitos não específicos provavelmente são formados por algum redutor endógeno do estroma. Os depósitos não específicos que ocorreram fora dos cloroplastos possivelmente foram produzidos também por reação com agentes redutores presentes neste local. A deposição de ferrocianeto de cobre nos grana dos cloroplastos foi inibida pelo DCMU (Figura 91 ), indicando que esses depósitos estão associados com atividade do fotossistema II.

Os resultados obtidos para a fotorredução do ferricianeto foram semelhantes para todos os mutantes e semelhantes aos obtidos para as plântulas normais. Quando incubados com mistura de reação completa com exposição à luz por 30 min. os cloroplastos dos mutantes albino, luteus I e luteus

II apresentaram produto de reação específica somente nos grana. No mutante albino, esses depósitos específicos ocorreram nos grana grandes como mostrado na Figura 95. Entretanto, em muitos cloroplastos desse mutante não foram observados depósitos de ferrocianeto de cobre nos grana grandes (Figuras 96 e 97). Não foi observado produto de reação específica nos grana dos cloroplastos desse mutante que apresentam sinápse imperfeita dos tilacóides. Também observou-se produto de reação específica nos grana rudimentares dos cloroplastos do mutante luteus I, como pode ser observado na Figura 104. Esses depósitos específicos não foram observados nas lamelas simples dos cloroplastos do albino e do luteus I. Além disso, quando os plastídeos desses mutantes eram desprovidos de granum, apresentando apenas lamelas simples, não se observou nessas lamelas a ocorrência de depósitos de ferrocianeto de cobre (Figuras 98 e 103), ocorrendo apenas os depósitos não específicos. Também nos cloroplastos do mutante luteus II foi observado produto de reação específica somente nos grana, como mostrado nas Figuras 109 e 110. De modo semelhante ao observado para os tipos normais, no estroma dos plastídeos de todos os mutantes ocorreram depósitos grandes não específicos, que também foram observados com menor frequência fora dos cloroplastos (Figuras 95-98, 103, 104, 109 e 110). Esses depósitos não específicos também foram observados nos espécimes incubados na mistura de reação completa sem exposição à luz e mistura de reação com DCMU, quando não ocorreram depósitos de ferrocianeto de cobre nos grana (Figuras 99, 100, 105, 106, 111 e 112). Nos controle com mistura de reação sem ferrícianeto de

potássio e com tampão fosfato não ocorreram os depósitos não específicos e nem os depósitos específicos, descritos para as outras condições de incubação (Figuras 101, 102, 107, 108, 113 e 114). Assim, os resultados obtidos para os estudos da localização citoquímica do fotossistema II utilizando ferricianeto como aceitador de elétrons mostraram, tanto para os cloroplastos das plântulas normais como para os cloroplastos do mutante, sítios de fotorredução de ferricianeto limitados aos grana.

#### 4.4 Pigmentos fotossintéticos

##### 4.4.1 Protoclorofila e clorofila

Todos os mutantes sintetizam clorofilas *a* e *b*, porém apresentam uma redução significativa no conteúdo de protoclorofila e clorofila em relação aos normais correspondentes, como relacionado nas Tabelas 1-4. A redução no conteúdo desses pigmentos ocorreu nos mutantes desenvolvidos nas diferentes condições de luminosidade utilizadas nesse estudo.

Nas plântulas desenvolvidas em condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux) a redução de protoclorofila foi menos acentuada do que naquelas desenvolvidas sob intensidades luminosas mais altas. Comparados às plântulas normais correspondentes, os mutantes albino, luteus I e luteus II apresentaram, respectivamente, uma redução no conteúdo de protoclorofila de aproximadamente 80%, 70% e 35%, quando desenvolvidos em condições de 25-30 lux, passando para aproximadamente 90%, 95% e 60% em intensidades luminosas de 1000 lux e

e 10000 lux. O mutante luteus II quando desenvolvido em condições de campo mostrou uma redução ainda mais acentuada no conteúdo de protoclorofila, ao redor de 80%.

A redução no conteúdo de clorofila permaneceu mais ou menos constante para as plântulas dos mutantes albino e luteus I desenvolvidas nas diferentes intensidades luminosas, ficando ao redor de 90% e 97%, respectivamente. O conteúdo de clorofila no luteus II variou consideravelmente em quase todas as condições de crescimento. Quando as plântulas desse mutante foram desenvolvidas em condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux) o conteúdo de clorofila foi reduzido em aproximadamente 20%, passando para aproximadamente 60% em 1000 e 10000 lux e aproximadamente 87% em condições de campo, níveis estes que parecem estar correlacionados aos observados para protoclorofila. Quando se compara o conteúdo de clorofila das plântulas do mutante luteus II desenvolvidas em 25-30 lux com as plântulas desenvolvidas em 1000 lux e 10000 lux, observa-se um considerável aumento, de aproximadamente 1,6 vezes, no total de clorofila dessas últimas, passando de 0,202 para 0,331 e 0,325 mg/g peso fresco, respectivamente. Porém nas plântulas desse mutante desenvolvidas no campo, com condições para uma maior síntese e também maior fotooxidação desse pigmento, o conteúdo total baixou para 0,131 mg/g peso fresco, nível inferior ao observado para a condição de 25-30 lux. As plântulas normais utilizadas como controle para o luteus II, quando desenvolvidas no campo, apresentaram o conteúdo mais elevado de clorofila total, 1,002 mg/g peso fresco.

Quanto ao conteúdo de clorofilas *a* e *b*, o mutante al bino apresentou aproximadamente 12 vezes menos clorofila *a* e cerca de 9,6 vezes menos clorofila *b* do que o normal, em todas as condições de luminosidade. Uma vez que esse mutante mostrou-se mais deficiente em clorofila *a* do que em clorofila *b*, a relação clorofila *a/b* foi aproximadamente 1,25 vezes mais baixa para o mutante, comparado ao normal correspondente. Não ocorreram diferenças significativas na relação clorofila *a/b* entre as plântulas do mutante luteus I e normais correspondentes desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux, uma vez que a redução de clorofila *a* foi aproximadamente 43 vezes e a de clorofila *b* foi de 46 vezes. No entanto, nas intensidades luminosas mais altas a relação clorofila *a/b* desse mutante foi aproximadamente 1,4 vezes maior do que o normal. Para o mutante luteus II e normal correspondente (Tabela 4), desenvolvidos em condições de 25-30 lux, foram observados valores de clorofila *a/b* de 2,1 e 1,77, respectivamente. Portanto, 1,2 vezes maior para o mutante. Também para as plantas desenvolvidas no campo esta relação foi aproximadamente 1,2 vezes maior para o mutante. Entretanto, para condições de 1000 lux e 10000 lux o mutante luteus II apresentou aproximadamente 2,5 vezes menos clorofila *a* e 2,6 menos clorofila *b* em relação ao normal, portanto uma diferença não significativa. Assim, o que se pode observar é que o mutante luteus II apresentou um decréscimo mais acentuado no conteúdo de clorofila *b* exatamente nas condições de crescimento em que a redução de grana nos cloroplastos também foi mais acentuada.

#### 4.4.2. Carotenóides

De modo semelhante à clorofila e protoclorofila não foi observada nenhuma diferença qualitativa na composição dos carotenóides das plantas normais e mutantes. Na cromatografia em coluna dos extratos das plântulas normais e mutantes os carotenóides foram separados em quatro bandas distintas, como indicado na Figura 115. Não foi detectada presença de fitoflueno por fluorescência quando a coluna de cromatografia foi exposta à radiação ultravioleta logo no início da eluição com hexano puro. A banda seguinte, de cor amarela, foi eluída com acetona 8% e as bandas 3 e 4 eluídas com acetona 10% e 12%. Essas duas últimas bandas mostraram-se amareladas, bem mais claras do que as bandas anteriores e permaneceram muito próximas, tornando-se difícil uma separação nítida. Pelo fato de não ter ocorrido uma boa separação desses pigmentos nesse sistema de cromatografia e também por terem sido separados em quantidades insuficientes para uma análise qualitativa e quantitativa mais acurada, os pigmentos das bandas 3 e 4 foram combinados e separados posteriormente em cromatografia de camada delgada.

Os espectros de absorção dos carotenóides extraídos das folhas das plântulas normais e mutantes, diluídos em hexano, estão apresentados nas Figuras 116 - 130 e os picos de absorção máxima estão relacionados na Tabela 5. Os carotenóides cromatografados mostraram espectros de absorção idênticos para todos os tipos mutantes e normais. O pigmento correspondente à primeira banda da coluna de cromatografia apresentou pi-

cos de absorção máxima característicos de  $\beta$ -caroteno, com o espectro de absorção coincidente com a amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.) utilizada como padrão (Figuras 116, 119, 122, 125 e 128 ). O espectro de absorção da banda 2 foi característico de luteína (DAVIES, 1976). A mistura das bandas 3 e 4 apresentou três picos de absorção máxima principais a 472, 443 e 415 nm e um outro menos evidente a 395 nm. Como representado nas Figuras 131 - 134, os carotenóides das bandas 1 e 2 diluídos em etanol e clorofórmio também apresentaram espectros de absorção idênticos para todos os tipos mutantes e normais, característicos de  $\beta$ -caroteno e luteína, respectivamente. Os picos de absorção máxima estão relacionados na Tabela 5. O espectro de absorção dos carotenóides das bandas 3 e 4 combinadas e diluídas em etanol também não apresentou diferenças entre os tipos mutantes e normais e está representado na Figura 135 .

Não foram encontradas diferenças entre os valores de  $R_f$  dos carotenóides dos tipos mutantes e normais submetidos aos dois sistemas de cromatografia de camada delgada e esses valores estão representados na Tabela 5. Os carotenóides previamente separados por cromatografia em coluna e depois recromatografados em camada delgada, bem como os que foram detectados nos extratos antes e após saponificação apresentaram valores de  $R_f$  coincidentes entre si. Esses resultados evidenciam a não ocorrência de carotenóides esterificados nos tipos mutantes e normais, uma vez que carotenóides esterificados apresentam menor afinidade de adsorção e, conseqüentemente, maior

valor de Rf em cromatografia de adsorção (DAVIES, 1976). O pigmento correspondente à banda 1 da coluna de cromatografia, apresentou-se também como uma banda única ao ser recromatografado, resultado este que indica ser apenas um carotenóide. Esse pigmento apresentou valor de Rf idêntico ao  $\beta$ -caroteno utilizado como padrão na co-cromatografia. Considerando-se esse resultado, aliado aos obtidos para os outros sistemas de cromatografia e espectro de absorção, o carotenóide contido na banda 1 foi identificado como  $\beta$ -caroteno. A banda 2 se manteve como uma banda única nas cromatografias de camada delgada e apresentou Rf bem mais baixo que a primeira banda, o que seria característico de carotenóide hidroxilado (xantofila). No sistema em que foi utilizada a mistura benzeno, acetato de etila e metanol (75:20:5) como solvente, ocorreu a separação dos carotenóides presentes na mistura das bandas 3 e 4 da cromatografia em coluna em apenas duas bandas, o que indica tratar-se apenas de dois carotenóides diferentes, uma vez que esse sistema é adequado para a separação de xantofilas (DAVIES, 1976). Essas duas bandas apresentaram valores de Rf de 0,28 e 0,13, respectivamente, valores esses bem mais baixos do que para os outros pigmentos, demonstrando uma maior afinidade de adsorção, característica de carotenóides hidroxilados. Não foi detectada presença de fitoflueno quando as placas foram expostas à radiação ultravioleta após cromatografia.

Nos testes químicos para identificação do número, natureza e posição de grupos funcionais também não foram encontradas diferenças entre os carotenóides dos tipos mutantes e

normais. O carotenóide que constituiu a banda, 1 identificado como  $\beta$ -caroteno, apresentou resultados negativos para os testes de acetilação, metilação e desidratação, uma vez que, após reação, não foram observadas alterações nos valores de Rf (Tabela 6) e também não foram observadas alterações no espectro de absorção após desidratação (Figura 131). Esses resultados demonstram a não ocorrência de grupos hidroxila nesse pigmento. Os resultados para o teste de identificação de epóxidos também foram negativos, uma vez que não foram observadas alterações no espectro de absorção após a reação com ácido clorídrico (Figura 133) e também não houve modificação da cor desse carotenóide na placa de cromatografia quando exposto aos vapores de ácido clorídrico (Tabela 7). Esses resultados demonstram tratar-se realmente de um carotenóide não hidroxilado e não epóxido, confirmando tratar-se de  $\beta$ -caroteno. Após acetilação, o pigmento correspondente à banda 2 mostrou um sensível aumento no valor do Rf de 0,14 para 0,60. No cromatograma também foi observada uma banda com cor amarela bem fraca apresentando Rf 0,28 e que, possivelmente, trata-se do pigmento parcialmente acetilado. Esse resultado demonstra a ocorrência de grupos hidroxila primários e/ou secundários no pigmento em questão. Também foi constatada a ocorrência de um grupo hidroxila alílico através da reação de metilação, uma vez que observou-se um aumento do Rf de 0,14 para 0,32. Após a metilação ocasionalmente também foi observada uma banda muito fraca com Rf 0,67, tratando-se, possivelmente, de algum produto de degradação do pigmento durante a reação. Uma vez

que o carotenóide em questão não apresentou alteração na afinidade de adsorção (Tabela 6) e no espectro de absorção (Figura 132) após desidratação, ficou demonstrado que não possui grupos alílicos conjugados. Os resultados foram negativos para os testes de identificação de epóxidos, uma vez que não houve alteração da cor desse carotenóide para azul ou azul-esverdeado ao ser exposto aos vapores de ácido clorídrico na placa de cromatografia e também não houve alterações no espectro de absorção desse pigmento diluído em etanol, após reação com ácido clorídrico (Figura 134). Com base nos resultados obtidos para esses testes químicos, no espectro de absorção e também nos valores de Rf nos diferentes sistemas de cromatografia, o carotenóide da banda 2 foi identificado como luteína. Os pigmentos correspondentes às bandas 3 e 4 mostraram reação positiva para os testes de acetilação (Tabela 6) demonstrando que realmente tratam-se de carotenóides hidroxilados. Levando-se em conta a baixa concentração obtida para esses carotenóides, a sua resposta aos testes de metilação e desidratação não foi considerada. Esses pigmentos apresentaram resposta positiva aos testes de identificação de epóxidos, com alteração da cor amarela dos carotenóides para cor azulada. Também ocorreu uma alteração no espectro de absorção da mistura desses carotenóides para comprimentos de onda mais curtos, aproximadamente 20 nm, após reação com ácido clorídrico (Figura 135). Esses resultados demonstram que os carotenóides das bandas 3 e 4 são epóxidos, além de serem hidroxilados e, como não foi feita uma identificação mais acurada, foram considerados como "xantofilas não identificadas".

Os resultados das determinações quantitativas dos carotenóides estão relacionados nas Tabelas 8 e 9. Todos os mutantes apresentaram reduções consideráveis no conteúdo total de carotenóides, quando comparados com as plantas normais correspondentes. Nas plântulas desenvolvidas em condições de 1000 lux, o mutante albino apresentou aproximadamente 4% do conteúdo total de carotenóides apresentado pelo normal correspondente, enquanto que o luteus I apresentou 16% e o luteus II 33%. Quando desenvolvido no campo e em condições de 25-30 lux o mutante luteus II apresentou, respectivamente, cerca de 23% e 33% do conteúdo total de carotenóides observados para o normal. No mutante albino o decréscimo no conteúdo de  $\beta$ -caroteno, luteína e xantofilas não identificadas foi bastante acentuado, principalmente para  $\beta$ -caroteno, sendo de aproximadamente 27, 10 e 8 vezes, respectivamente. O luteus I, por sua vez, apresentou um decréscimo de cerca de 8,5, 2,5 e 2,5 vezes para  $\beta$ -caroteno, luteína e xantofilas não identificadas, respectivamente. A redução no conteúdo desses carotenóides nas plântulas do mutante luteus II desenvolvidas em condições de 1000 lux foi de aproximadamente 3,0, 3,2 e 2,0 vezes, respectivamente. Como pode ser observado o  $\beta$ -caroteno foi o carotenóide mais reduzido em todos os mutantes desenvolvidos sob intensidade luminosa de 1000 lux. A acentuada redução no conteúdo de  $\beta$ -caroteno foi ainda mais evidente para o mutante luteus II quando as plantas foram desenvolvidas em condições de campo (5,7 vezes). Quando essas plântulas foram desenvolvidas em condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux) a redu

ção no conteúdo de  $\beta$ -caroteno foi semelhante ao observado para as xantofilas não identificadas, enquanto que não foi observado um decréscimo significativo para o conteúdo de luteína.

Pode-se notar que existe uma correlação entre a redução de clorofila e a redução de carotenóides, pois todos os mutantes apresentaram deficiências significativas para essas duas classes de pigmentos. As plântulas do mutante luteus I desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux, assim como as do luteus II desenvolvidas no campo, apresentaram um decréscimo mais acentuado no conteúdo de clorofila em relação aos carotenóides (Tabelas 8 e 9). Para o luteus I a relação carotenóides totais/clorofila total foi de 0,305, enquanto que para o normal foi de 0,060, portanto aproximadamente 5,0 vezes maior para o mutante. O luteus II, por sua vez, quando desenvolvido no campo, apresentou uma relação carotenóides totais/clorofila total aproximadamente 1,7 vezes maior do que a apresentada pelo normal. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as plântulas do mutante luteus II e normais desenvolvidas sob intensidades luminosas de 25-30 lux e 1000 lux. O único mutante a apresentar uma relação carotenóides totais/clorofila total menor, aproximadamente 2,0 vezes do que o normal, foi o albino.

Como pode ser observado, todos os mutantes apresentaram reduções significativas no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, embora não tenham sido observadas diferenças qualitativas para esses pigmentos entre as plântulas normais e mutan

tes através da metodologia utilizada. Além disso, é evidente que a redução no conteúdo de clorofila, carotenos e xantofilas e as alterações ultraestruturais e funcionais encontradas para os mutantes estão correlacionadas.

## 5. DISCUSSÃO

Embora não se tenha feito nenhum estudo quantitativo sobre o número e tamanho dos cloroplastos, notou-se que os mutantes albino, luteus I e luteus II parecem apresentar uma pequena redução no número e tamanho dessas organelas quando comparados às plantas normais. Aparente redução no número e tamanho dos cloroplastos tem sido relatada para outros mutantes em genes nucleares que causam deficiência em clorofila (WEIDNER *et al.*, 1976; PRIOLI *et al.*, 1978), mas não tem sido verificado se a mutação realmente afeta o mecanismo de controle da divisão dos plastídeos ou se é apenas a diferenciação dos proplastídeos até cloroplastos que é limitada. Embora não se tenha muitas informações a respeito é possível que este seja um efeito indireto da mutação, uma vez que, como discutido por POSSINGHAM (1980), os processos de divisão e crescimento dos

cloroplastos estão interligados com o metabolismo celular e, possivelmente, do próprio cloroplasto. Em plantas superiores tem sido constatado que a divisão dos plastídeos que contêm clorofila é o processo mais importante para a formação de novos cloroplastos durante o desenvolvimento das folhas de plantas expostas à luz (POSSINGHAM, 1980), mas a capacidade de divisão do plastídeo é independente de seu estágio de desenvolvimento (WHATLEY, 1980).

Foram observados plastídeos amebóides com invaginações contendo mitocôndria nas folhas das plântulas dos mutantes albino e luteus I desenvolvidas em todas as condições de luminosidade utilizadas. Interrelações entre cloroplastos e mitocôndrias têm sido relatadas. Observações ao microscópio eletrônico de cloroplasto da bainha vascular de milho e cloroplastos do mesófilo de *Hyptis suaveolens* mostraram a ocorrência de mitocôndrias em invaginações do cloroplasto sob condições de baixa intensidade luminosa ( $0,16 \text{ mW. cm}^{-2}$ ). No entanto as mitocôndrias desapareciam das invaginações após transferência das plantas para condições de intensidade luminosa elevada ( $5 \text{ mW. cm}^{-2}$ ) (MONTES and BRADBEER, 1976). Entretanto, para o albino e o luteus I foram feitas observações de inter-relação plastídeo mitocôndria em condições de intensidade luminosa relativamente alta, aproximadamente  $10 \text{ mW/cm}^2$ . Parece que esses mutantes estão respondendo como se estivessem se desenvolvendo sob condições de baixa intensidade luminosa, resultando em mudanças conformacionais no plastídeo possivelmente devidas a um sistema de captação de energia bastante defi-

ciente. WILDMAN *et al.* em 1962 (citado por WELLBURN and WELLBURN, 1979) observaram, ao microscópio de fase, a ocorrência de fusão entre mitocôndrias e cloroplastos no parênquima paladico de *Nicotiana excelsior* e foi sugerido que a mitocôndria interage com o cloroplasto para iniciar a formação de grãos de amido (WILDMAN *et al.*, 1974). WELLBURN e WELLBURN (1979) relataram a ocorrência de fusão de plastídeos e mitocôndrias em um mutante de cevada. A associação dessas organelas não foi observada, entretanto, nas amostras de folhas analisadas no presente estudo.

Os três mutantes, com fenótipos branco, amarelo e amarelo-esverdeado, apresentaram plastídeos que possuem sistema lamelar com diferentes graus de diferenciação. Foram observados plastídeos com poucas vesículas ou com lamelas simples (albino e luteus I), cloroplastos com grana rudimentares (luteus I) ou com sistema lamelar contendo vários grana, mas diferindo do normal em alguns aspectos (luteus II), e também cloroplastos com grana aberrantes (albino). É, portanto, evidente que o desenvolvimento do sistema lamelar dos cloroplastos é bloqueado em diferentes estágios intermediários nos mutantes utilizados nesse estudo e, em alguns casos, levando a um desenvolvimento anormal do cloroplasto. Os proplastídeos presentes na base da folha dos mutantes são muito semelhantes em sua organização ultraestrutural aos proplastídeos dessa mesma região nas folhas das plantas normais, o que sugere que o bloqueio deve se iniciar em estágios um pouco mais avançados da diferenciação dos cloroplastos, tanto que, na região

mediana das folhas já são observadas alterações ultraestruturais. Plastídeos com sistema lamelar pouco desenvolvido e, até mesmo, com apenas poucas vesículas têm sido observados em outros mutantes em genes nucleares que apresentam folhas com coloração branca ou amarela, semelhantes aos mutantes albino e luteus II aqui utilizados. Esses plastídeos têm sido observados em mutantes deficientes em clorofila, tais como os que acumulam precursores de carotenóides (BACHMANN *et al.*, 1967, 1969; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; WALLEs, 1971; HORVÁTH and FALUDI-DÁNIEL, 1971; WALLEs and HORVATH, 1975), mutantes deficientes em  $\beta$ -caroteno (WALLEs, 1965, 1966), mutantes deficientes em  $\beta$ -caroteno e xantofilas (NIELSEN, 1974; WALLEs, 1963) e também em mutantes que acumulam precursores de clorofila (RO SINSKI and ROSEN, 1972; NASYROV, 1978).

Em plastídeos do mutante luteus I observou<sup>se</sup> a ocorrência de lamelas com arranjo concêntrico. Tem sido verificada a ocorrência de lamelas concêntricas em outros mutantes com baixo conteúdo de clorofila como em *Nicotiana* (SCHMID, 1967), em milho (BACHMANN *et al.*, 1967) e em cevada (SMILLIE *et al.*, 1977). Este arranjo das lamelas também foi detectado em outras situações em que ocorre quebra da organização do sistema lamelar do cloroplasto, tais como tratamento com herbicida (PALLET and DODGE, 1980) e durante o desenvolvimento de cromoplastos em frutos (LABORDE and SPURR, 1973). Dados semelhantes foram obtidos em cloroplastos de plantas desenvolvidas em condições normais de luz e mantidas a 30°C durante 24 horas (KLEIN, 1960), ou mesmo sob intensidade luminosa muito baixa por 24 ho

ras (EILAM and KLEIN, 1962). Em ambos os casos a síntese de clorofila e, possivelmente de outros compostos, foi limitada. Os autores sugeriram que as camadas concêntricas das lamelas são resultantes de um rearranjo das membranas em condições onde a síntese de alguns compostos é inibida. No presente trabalho as lamelas concêntricas foram observadas no mutante luteus I, que apresenta conteúdo de pigmentos muito baixo, o que também sugere uma correlação entre a ocorrência dessas lamelas e limitação na síntese ou acúmulo de pigmentos fotossintéticos.

Foi observado que cloroplastos dos mutantes albino e luteus I, com sistema lamelar pouco desenvolvido, parecem apresentar um aumento no número dos plastoglôbulos. Aumento no número de plastoglôbulos tem sido observado em plantas desenvolvidas no escuro (SPREY and LICHTENTHALER, 1966; LICHTENTHALER, 1969; BARR and ARNTZEN, 1969), nos cloroplastos em degeneração durante a senescência (LICHTENTHALER, 1969 b; DODGE, 1970; DE VECCHI, 1971; MLODZIANOWSKI and KWINTKIEWICZ, 1973; KHODASEVICH *et al.*, 1978), em condições de deficiência de magnésio (HALL *et al.*, 1972) e em alguns mutantes deficientes em clorofila cujos cloroplastos apresentam sistema lamelar pouco desenvolvido (BACHMANN *et al.*, 1967; VALANNE and VALANNE, 1972) de modo semelhante ao observado para o albino e o luteus I. Tem sido sugerido que os plastoglôbulos podem funcionar como reservatórios de lipídios e outros compostos de membranas que são utilizados durante a biossíntese das membranas do cloroplasto ou que se acumulam durante a degradação das membranas (GREENWOOD *et al.*, 1963; SPREY and LICHTENTHALER, 1966; LICHTENTHA-

LER, 1968; KHODASEVICH *et al.*, 1978).

Além dos cloroplastos com sistema lamelar pouco desenvolvido ou com ausência de lamelas, o mutante albino apresentou cloroplastos que possuem grana aberrantes com tilacóides grandes e, muitas vezes, com sinapse aparentemente imperfeita. Provavelmente esses grana são semelhantes em estrutura aos grana aberrantes de outros mutantes deficientes em clorofila citados por SUSALLA e MAHLBERG (1975) e aos observados por outros autores, tais como JHAMB e ZALIK (1975), MILLERD *et al.* (1979), TRAVIS *et al.* (1975), SMILLIE *et al.* (1977), SEMENOVA *et al.* (1977), PRIOLI *et al.* (1978) e NIELSEN *et al.* (1979). Eles não têm sido interpretados como grana típicos e têm recebido diferentes denominações: "lamellar packages", "large grana", "grandigrana", "magnograna", "spindle-form grana", "giant grana", "dense bundles of lamellae", "compound grana", "membrane stacks", "super-extended grana" e "powerful grana". Esses grana atípicos também têm sido observados em células infectadas pelo vírus do mosaico do tabaco (ARNOTT *et al.*, 1969), vírus do vira-cabeça do tomateiro (GASPAR *et al.*, 1981), induzidos por antibióticos (SRIVASTAVA *et al.*, 1971; CONDE *et al.*, 1975), herbicidas (NIELSEN, 1974), mutagênicos químicos (TRAVIS *et al.*, 1975), mutações em genes do cloroplasto (CONDE *et al.*, 1975) e, como citado anteriormente, também são induzidos por mutações em vários genes nucleares. Os grana observados no mutante albino são considerados atípicos principalmente pelo fato de apresentarem sinapse imperfeita, uma vez que, segundo BACHMANN *et al.* (1969), o empilhamento ou superposição de tilacóides não é o único pré-requisito para a formação de grana normais. Por outro lado, alguns grana desse mutan

te apresentam partições aparentemente normais.

Numerosos trabalhos relacionam a expressão de mutações genéticas com alterações específicas na estrutura e no conteúdo de pigmentos nos cloroplastos. Existe, por exemplo, uma correlação entre o conteúdo de clorofila e o desenvolvimento do sistema lamelar do cloroplasto (WETTSTEIN, 1958; MACLACHLAN and ZALIK, 1963; SCHMID, 1967; DALE and HEYES, 1970; NASYROV *et al.*, 1975). Nos mutantes analisados no presente estudo essa correlação foi claramente observada. O mutante luteus II, que entre os mutantes analisados foi o que apresentou o maior conteúdo de clorofila em todas as condições de crescimento, aproximadamente 80% e 40% do conteúdo apresentado pelo normal quando desenvolvido em condições de 25-30 lux e 1000 e 10000 lux, respectivamente, possui cloroplastos com sistema lamelar bem mais desenvolvido do que o albino e o luteus I, desenvolvidos nas mesmas condições de crescimento, quando apresentaram aproximadamente 10% e 3%, respectivamente, do conteúdo de clorofila apresentado pelos normais correspondentes. Além disso, no luteus II o teor de clorofila foi mais baixo quando desenvolvido sob intensidade luminosa de 25-30 lux e no campo, aproximadamente 0,202 e 0,131 mg/g peso fresco, respectivamente, condições em que os cloroplastos também apresentaram sistema lamelar pouco desenvolvido, com poucos grana. A deficiência em clorofila em mutantes pode ser um efeito primário ou secundário da mutação. São conhecidos mutantes que apresentam bloqueio em passos metabólicos da biossíntese de clorofila, enquanto que em outros o efeito primário da mutação pode estar em uma via biossintética diferen-

te que leva, indiretamente, à deficiência em clorofila (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; WALLEES, 1963; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; FALUDI-DÁNIEL, 1975; NASYROV *et al.*, 1978; GILLHAM, 1978). Inibição na biossíntese de clorofila leva à formação de cloroplastos com sistema lamelar defeituoso (WETTSTEIN, 1963; ROSINSKI and ROSEN, 1972; NASYROV *et al.*, 1975). Por outro lado, alguns mutantes com cloroplastos defeituosos são capazes de sintetizar clorofila e, no entanto, não acumulam esse pigmento, a não ser em condições de intensidade luminosa muito baixa (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; FALUDI *et al.*, 1960; WALLEES, 1963; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968). Uma vez que esses mutantes apresentam bloqueios na biossíntese de carotenóides, tem sido admitido que os carotenóides têm um papel de proteção contra a fotodestruição da clorofila (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; FALUDI *et al.*, 1960). Por outro lado, tem sido demonstrado que a ausência de outros compostos das membranas, tais como proteínas e lipídios, pode também levar à perda da clorofila (NASYROV, 1978; GILLHAM, 1978; SHORTESS and AMBY, 1975). Segundo MANETAS and AKOYUNOGLU (1980) a clorofila livre é mais sensível à fotodestruição, sendo que a incorporação nas membranas faz com que se torne menos sensível. Nos mutantes albino, luteus I e luteus II a redução no conteúdo de clorofila foi acompanhada de uma redução mais ou menos equivalente no conteúdo de protoclorofila(ideo), mas não foi determinado se a redução no conteúdo desses pigmentos foi devida a uma inibição na síntese ou no acúmulo dos mesmos. É evidente que no mutante II ocorre síntese de clorofila, embo-

ra o conteúdo desse pigmento seja bastante reduzido, o que poderia ser devido a uma inibição parcial na síntese ou no acúmulo desse pigmento. Os mutantes albino e luteus I não acumularam clorofila quando desenvolvidos em condições de baixa intensidade luminosa (25-30 lux), o que poderia indicar um possível bloqueio na síntese de clorofila, uma vez que mutantes capazes de sintetizar clorofila acumulam esse pigmento quando desenvolvidos sob esta intensidade luminosa, ou semelhante, como é o caso dos mutantes  $w_3$  (ANDERSON and ROBERTSON, 1960), licopênico e  $\beta$ -carotênico (FALUDI-DÂNIEL *et al.*, 1968; WALLEES, 1971; FALUDI-DÂNIEL, 1975) em milho.

Tem sido admitido que a relação clorofila  $a/b$  também está associada com a agregação de tilacóides para formar grana (WOO *et al.*, 1971). A relação clorofila  $a/b$  no mutante luteus II não foi muito diferente da observada para as plântulas normais. Apenas quando as plântulas do luteus II foram desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux e no campo a relação clorofila  $a/b$  foi um pouco maior, aproximadamente 1,2 vezes, do que a observada para o normal desenvolvido nessas condições de crescimento. Analisando a ultraestrutura dos cloroplastos do luteus II observa-se que nas condições onde a relação clorofila  $a/b$  foi maior, ou seja, sob intensidade luminosa de 25-30 lux e no campo ocorreu pouca agregação de lamelas para formar grana. Assim, a relação clorofila  $a/b$  manteve-se mais próxima do normal quando o mutante apresentou sistema lamelar com vários grana e mostrou-se um pouco mais alta quando houve desenvolvimento de poucos grana. Esses dados es-

tão de acordo com as observações de que a clorofila *b* está associada principalmente com os grana, enquanto que a clorofila *a* encontra-se distribuída nas lamelas simples e nos tilacóides (THORNER *et al.*, 1967; ARGYROUDI-AKOYUNOGLU *et al.*, 1976). A correlação entre o conteúdo de clorofila *b* e a junção de tilacóides para formar grana ainda é duvidosa. GOODCHILD *et al.* (1966) consideraram que a clorofila *b* não tem papel crítico na formação de grana. Havia porém a indicação de que o mutante de clorofila *b* utilizado por esses autores possuía grana menores e em menor número do que o normal. Alguns outros mutantes deficientes em clorofila *b* também apresentaram desenvolvimento de grana (ROSINSKI and ROSEN, 1972; SAGROMSKY, 1975). Entretanto, proplastídeos em desenvolvimento não possuem clorofila *b* quando ainda não contêm grana (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU and AKOYUNOGLU, 1970; ARGYROUDI-AKOYUNOGLU *et al.*, 1971). Em algumas plantas  $C_4$  analisadas por WOO *et al.* (1975) foi demonstrado que a junção de lamelas para formar grana é altamente dependente da relação clorofila *a/b*. As investigações realizadas por ARGYROUDI-AKOYUNOGLU *et al.* (1976) evidenciam uma correção entre a síntese de clorofila *b* e a formação de grana em cloroplastos em desenvolvimento. NIELSEN *et al.* (1979) analisaram a composição e a atividade das lamelas de alguns mutantes de cevada ricos em grana e de outros mutantes desta mesma espécie contendo poucos grana e constataram uma correlação inversa entre a quantidade de grana e o valor da relação clorofila *a/b*. Apesar dos numerosos estudos, ainda existem dúvidas quanto ao possível papel da

clorofila *b* na formação dos grana. A pequena redução no conteúdo de clorofila *b* encontrada para o mutante luteus II associada à redução no conteúdo de grana quando desenvolvido no campo e sob intensidade de 25-30 lux parece evidenciar a hipótese de que a clorofila *b* está associada com o desenvolvimento dos grana. Embora tenha sido observada uma correlação entre a formação de grana e o conteúdo de clorofila *b* nos mutantes albino e luteus I, é difícil levar este fato em consideração, uma vez que o conteúdo de clorofila é muito baixo nesses mutantes e a relação poderia variar muito com números pequenos.

É difícil atribuir o não desenvolvimento do sistema lamelar ou o sistema lamelar pouco diferenciado, assim como a formação de grana aberrantes nos cloroplastos dos mutantes analisados, apenas à deficiência em clorofila, uma vez que os resultados também mostraram uma significativa redução no conteúdo de carotenóides. Mutantes deficientes em carotenóides e que acumulam precursores desses pigmentos, tais como os mutantes w3, ζ-carotênico e licopênico em milho, também possuem cloroplastos com poucos grana ou com grana anormais, além de um conteúdo muito baixo de clorofila devido a fotodestruição desse pigmento (ANDERSON and ROBERTSON, 1960; WALLS, 1965, 1966, 1971; BACHMANN *et al.*, 1967; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; HORVÁTH and FALUDI-DÁNIEL, 1971; WALLS and HUDÁK, 1975; GYURJÁN *et al.*, 1978). Sabe-se que a inibição na síntese dos carotenóides através do uso de herbicidas também leva à fotodestruição da clorofila com conseqüente alteração ultra

estrutural nos cloroplastos (MORELAND, 1980). Por outro lado, são conhecidos mutantes de cevada deficientes em clorofila e que apresentam os mesmos carotenóides encontrados nas plantas normais, porém com conteúdo bastante reduzido, cujos cloroplastos também apresentam alterações ultraestruturais (NIELSEN, 1974; NIELSEN e GOUGH, 1974). Analisando esses mutantes, NIELSEN e GOUGH (1974) consideraram que mutações afetando várias etapas na síntese de protoclorofilídeo podem estar, mas não necessariamente, associadas com defeitos na síntese de carotenos. Esses autores sugeriram que moléculas de pigmentos e proteínas se associam nas membranas de modo a levar a uma parcial desrepressão de enzimas envolvidas na síntese de clorofila, além de uma conservação de precursores específicos da síntese de  $\beta$ -caroteno. Nos mutantes albino, luteus I e luteus II aqui analisados não foram detectadas diferenças qualitativas para carotenóides em relação às plantas normais, ou seja, esses mutantes acumulam os mesmos carotenóides apresentados pelas plantas normais, embora bastante reduzidos em seu conteúdo. Essa observação sugere que os locos em estudo não devem ter efeito de bloqueio em etapas da biossíntese dos carotenóides, como sugerido para os mutantes que acumulam precursores desses pigmentos (ANDERSON e ROBERTSON, 1960; FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968, 1975), porém uma análise mais acurada para os precursores de carotenóides se faz necessária.

Nos três mutantes analisados o carotenóide que mostrou-se mais reduzido foi o  $\beta$ -caroteno, principalmente para o albino e o luteus I, que apresentaram apenas cerca de 3% e

10%, respectivamente, do conteúdo desse pigmento apresentado pelos normais correspondentes. Por sua vez, o albino e o luteus I foram os mutantes que apresentaram as maiores alterações na organização ultraestrutural dos cloroplastos. Também o mutante luteus II, quando desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux e principalmente quando desenvolvido no campo, apresentou redução considerável no conteúdo de  $\beta$ -caroteno, contendo apenas 33% e 15%, respectivamente, do conteúdo de  $\beta$ -caroteno apresentado pelo normal. Embora as condições de desenvolvimento no campo sejam diferentes, em muitos aspectos, das condições em câmara de ambiente controlado, os cloroplastos das plântulas normais utilizadas como controle para o luteus II desenvolvidas no campo apresentaram-se semelhantes em ultraestrutura aos cloroplastos dessas plântulas desenvolvidas nas condições de laboratório. Entretanto, os cloroplastos do mutante luteus II apresentaram uma considerável redução no número e tamanho dos grana comparados aos cloroplastos desse mutante desenvolvido nas condições de ambiente controlado com intensidades luminosas relativamente baixas se comparadas às condições de campo. Essas alterações possivelmente não são devidas apenas à intensidade luminosa muito mais elevada nas condições de campo, mas este fator deve ter influenciado o desenvolvimento dos cloroplastos desse mutante. Paralelamente às alterações na ultraestrutura dos cloroplastos do luteus II desenvolvido no campo, observou-se que a clorofila e os carotenóides são quantitativamente bastante reduzidos. No entanto, a relação carotenóides totais/clorofila total sofreu um

aumento significativo quando esse mutante foi desenvolvido no campo, aproximadamente 1,8 vezes maior do que o normal, enquanto que nas outras condições de crescimento essa relação foi muito semelhante ao normal, como pode ser observado nas tabelas 8 e 9. Além disso, comparando-se os resultados obtidos para os carotenóides totais no luteus II desenvolvido sob intensidade luminosa 25-30 lux e no campo, não há uma alteração significativa, tendo sido encontrado o conteúdo de 16,8  $\mu\text{g/g}$  peso fresco e 15,9  $\mu\text{g/g}$  peso fresco, respectivamente. Para a clorofila, no entanto, a redução foi mais acentuada em condições de campo do que em 25-30 lux, tendo sido observado o conteúdo de 0,202 mg/g peso fresco e 0,131 mg/g peso fresco, respectivamente. Por outro lado, o normal utilizado como controle para o luteus II apresentou um conteúdo de clorofila de 0,255 mg/g peso fresco quando desenvolvido em condições de 25-30 lux, enquanto que no campo o conteúdo desse pigmento foi de 1,002 mg/g peso fresco. Esses dados sugerem uma maior fotodestruição da clorofila no mutante luteus II quando desenvolvido no campo. Observou-se também que entre os carotenóides do luteus II desenvolvido no campo, o  $\beta$ -caroteno foi o mais reduzido, sendo que o mutante apresentou apenas cerca de 15% do conteúdo desse pigmento apresentado pelo normal desenvolvido nessa mesma condição de crescimento. Nas plantas desenvolvidas em condições de 25-30 lux e 1000 lux a redução no conteúdo de  $\beta$ -caroteno no mutante luteus II foi de aproximadamente 50% e 70%, respectivamente. Considerando-se que o  $\beta$ -caroteno é necessário para a formação de grana normais (WALLES, 1971; ROSINSKI and ROSEN,

1972; GYURJÁN *et al.*, 1980), o baixo conteúdo desse pigmento sem dúvida afeta a formação dos grana nos mutantes estudados.

Alguns autores consideraram que a deficiência em carotenóides poderia também causar destruição dos ribossomos 70 S e conseqüentemente dos tilacóides (ROSINSKI and ROSEN, 1972). Por outro lado, GYURJÁN *et al.* (1978) confirmaram a ausência de ribossomos 70S no mutante de milho que acumula  $\beta$ -caroteno e no mutante que acumula licopeno e consideraram que é difícil determinar se essa deficiência é um efeito primário ou secundário da mutação. Apesar de não terem sido observados precursores de carotenóides em nossos mutantes, a significativa redução no conteúdo de carotenóides poderia ser um indício de uma inibição parcial da síntese de polipetídeos, principalmente no albino e no luteus I, cujos cloroplastos possuem sistema lamelar com organização semelhante, em muitos aspectos, aos cloroplastos incapazes de sintetizar proteínas em mutantes deficientes em clorofila e carotenóides (WALLES, 1971; CONDE *et al.*, 1975; GYURJÁN *et al.*, 1978). Inibição parcial na síntese de proteínas de cloroplasto pode afetar a organização dos complexos pigmentos-proteínas e a organização estrutural das membranas do cloroplasto (NASYROV, 1978).

Foi observada uma significativa diferença no conteúdo de clorofila e carotenóides entre as plântulas normais utilizadas como controle para os mutantes albino e luteus I e as plântulas utilizadas como controle para o luteus II, sendo que essas últimas apresentaram 1,3 vezes mais clorofila e 2,0 vezes mais carotenóides do que as outras plântulas normais.

Essa diferença no conteúdo desses pigmentos mostra a importância de se utilizar plantas isogênicas para se estudar o efeito fisiológico de genes específicos.

O mutante luteus I apresentou apenas cerca de 15% do conteúdo total de carotenóides apresentado pelo normal correspondente. Por outro lado, a relação carotenóides totais/clorofila total foi aproximadamente 5 vezes maior para o mutante, o que indica que a inibição na síntese ou acúmulo de clorofila é mais acentuada do que para carotenóides. Os cloroplastos desse mutante apresentam sistema lamelar pouco desenvolvido, tendo sido observados, muito raramente, alguns plastídeos da bainha vascular que acumulam carotenóides. De acordo com a sua ultraestrutura os cromoplastos têm sido divididos em três grupos (BEN-SHAUL and NAFTALI, 1969; KUHN, 1970): (1) cromoplastos em que os carotenóides ocorrem na forma de glóbulos, (2) cromoplastos em que os carotenóides provavelmente estão associados a proteína e ocorrem em filamentos e (3) cromoplastos em que os carotenóides são cristalizados. No mutante luteus I os cromoplastos são do tipo em que os carotenóides são cristalizados. Cromoplastos com morfologia semelhante têm sido observados para outros mutantes deficientes em clorofila que acumulam carotenos altamente saturados, como por exemplo licopeno, em milho (FALUDI-DÁNIEL *et al.*, 1968; WALLEES, 1971) e em cevada (NIELSEN, 1974; NIELSEN and GOUGH, 1974). Também foram observados na corona de *Narcissus poeticus*, cujos cristaloídes foram caracterizados como sendo  $\beta$ -caroteno (KUHN, 1970). Eles são formados dentro do lóculo do tilacóide (ROS-

SO, 1967, 1968; HARRIS and SPURR, 1969 a, b; WALLEES, 1971; WALLEES and HUDÁK, 1975). A acumulação de carotenóides dentro do tilacóide de cromoplastos do tipo cristalino pode ser resultado do movimento de carotenóides não polares do estroma aquoso para o lóculo do tilacóide (THOMSON and WHATLEY, 1980). Segundo NIELSEN (1974) esses cristalóides são produzidos como resultado de mutação gênica, tratamento com herbicidas ou diferenciação de cromoplastos em frutos e apresentam composição específica de carotenóides do plastídeo. O sistema lamelar pouco desenvolvido nos cloroplastos do mutante luteus I e a alta relação carotenóides totais/clorofila total observada sugerem que as moléculas de carotenóides não associadas estruturalmente às membranas se acumulam dentro do tilacóide. Segundo NIELSEN (1974), cristalóides com mesma morfologia podem se originar da acumulação de diferentes carotenóides. É possível que os cristalóides observados no mutante luteus I sejam constituídos por  $\beta$ -caroteno que é o pigmento presente em maior quantidade nos plastídeos dessas plantas, do mesmo modo que o observado em *Narcissus poeticus* estudado por KUHN (1970), mas é óbvio que a elucidação da natureza dos cristalóides em questão depende de serem isolados e analisados.

Por outro lado, a questão sobre a necessidade ou não da presença do fotossistema II para haver formação de grana típicos não é fácil de ser respondida. Entretanto, algumas investigações utilizando diferentes metodologias indicam uma correlação direta entre a formação de grana e a atividade do fotossistema II (HOMANN and SCHMIDE, 1967; SANE *et al.*, 1970;

PARK and SANE, 1971; NIR and PEASE, 1973; GAZANCHYAN *et al.*, 1975; KIRCHANSKI, 1976; VALANNE, 1976; SEMENOVA, 1977; LAURITIS and PRIOLI, 1979). O método do ferricianeto como aceitador de elétrons tem sido utilizado para a determinação citoquímica da atividade do fotossistema II em espinafre (HALL *et al.*, 1971; NIR and PEASE, 1973; KIRCHANSKI, 1976), *Ceratodon purpureus* (VALANNE, 1976) e milho (LAURITIS and PRIOLI, 1979), utilizando cloroplastos isolados ou tecido foliar fixados ou não antes da reação de fotorredução. Esses autores relataram algumas limitações inerentes a esse método citoquímico: dificuldade de penetração dos reagentes nos grana (HALL *et al.*, 1971; KIRCHANSKI, 1976), formação de precipitados não específicos (NIR and PEASE, 1973; VALANNE, 1976; KIRCHANSKI, 1976; LAURITIS and PRIOLI, 1979), possível migração de produtos de reação (HALL *et al.*, 1971) e formação de depósitos arredondados que dificultam a localização precisa dos sítios do PS II (NIR and PEASE, 1973). No entanto, apesar das limitações, o método da fotorredução do ferricianeto é o único conhecido até o momento para associar citoquimicamente a atividade do fotossistema II com grana e lamelas intergrana (HALL *et al.*, 1971) ou somente com grana (NIR and PEASE, 1973; KIRCHANSKI, 1976; VALANNE, 1976; LAURITIS and PRIOLI, 1979). Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram os depósitos de ferrocianeto cúprico relacionados com a atividade do fotossistema II limitados aos grana, tanto nas plantas normais como nos mutantes. Não foram observados produtos de reação nas lamelas simples.

No mutante luteus I, cujos cloroplastos possuem muitas lamelas simples e apenas alguns grana rudimentares, a associação dos produtos específicos de reação com os grana foi ainda mais evidente do que para as outras plantas analisadas. Nas lamelas simples, mesmo quando em grande número, bastante próximas e com distribuição paralela, não foram observados depósitos específicos de ferrocianeto de cobre. Resultados semelhantes foram obtidos por LAURITIS e PRIOLI (1979) em cloroplastos da bainha vascular de milho normal, que também possuem grande número de lamelas simples com desenvolvimento de apenas alguns grana rudimentares. Nos cloroplastos do mutante albino foi possível observar depósitos de ferrocianeto de cobre em alguns grana com partições aparentemente normais. O fato de não terem sido encontrados esses depósitos em todos os grana com partições normais poderia ser decorrência de uma não penetração dos reagentes nesses grana grandes, considerando que esta é uma possível limitação do método utilizado (HALL *et al.*, 1971). Em nenhum granum com sinapse imperfeita dos tilacóides esses depósitos específicos foram observados, o que é uma indicação de que não apresentam atividade de fotossistema II, o qual estaria apenas associado com tilacóides de grana normais. No entanto, não se pode deixar de considerar a possibilidade de não ter ocorrido penetração dos reagentes nesses grana.

Raramente foi possível determinar precisamente o sítio da atividade do fotossistema II nos grana, uma vez que os depósitos de ferrocianeto de cobre quase sempre apresentaram

a forma de glóbulos (Figuras 87 e 89). Apenas nos grana rudimentares do mutante luteus I (Figura 104) e de alguns cloroplastos normais (Figura 90) foi possível observar, com relativa precisão, depósitos de ferrocianeto cúprico restritos às partições, tal qual observado em alguns cloroplastos do mesófilo de milho normal por LAURITIS e PRIOLI (1979).

Através do método de fotorredução do ferricianeto foi possível constatar a ocorrência de atividade do fotossistema II apenas nas regiões dos grana. Esses resultados, somados aos obtidos por outros autores que utilizaram a mesma técnica (NIR and PEASE, 1973; KIRCHANSKI, 1976; VALANNE, 1976; LAURITIS and PRIOLI, 1979), constituem uma forte evidência de que o fotossistema II é ativo apenas nos grana. Se houver atividade do fotossistema II nas lamelas simples, deve ser muito baixa ao ponto de não ter sido detectada através do método utilizado.

Nossos resultados sustentam a hipótese de que o fotossistema II está associado com a junção de lamelas (HOMANN and SCHMIDE, 1967; PARK and SANE, 1971). Assim, o mutante luteus I, cujos cloroplastos são desprovidos de grana ou possuem grana rudimentares, e o albino, que possui cloroplastos nos quais raramente são observados grana, devem ser bastante deficientes em atividade do fotossistema II, possivelmente bem mais deficientes do que o luteus II que apresenta vários grana nos cloroplastos. Entretanto, esta afirmação requer uma investigação bioquímica que permita uma medida quantitativa da atividade do fotossistema II nesses mutantes.

As mutações dos genes nucleares estudadas no presente trabalho afetam o desenvolvimento normal do sistema lamelar dos cloroplastos o que, por sua vez, está correlacionado com a redução no conteúdo de clorofila e carotenóides, com alterações na relação clorofila  $a/b$  e redução de sítios de atividade do fotossistema II. Esses mutantes mostraram-se adequados para estudos do efeito de genes nucleares na estrutura e fisiologia dos cloroplastos, uma vez que apresentam bloqueios em diferentes etapas do desenvolvimento dos cloroplastos, lamelas com arranjos alterados, possível diminuição da atividade fotossintética e a possibilidade de se utilizar plantas isogênicas como controle para cada mutante, o que permite a análise dos efeitos da mutação em um único "back-ground" genético resultando em uma maior precisão das medidas dos efeitos do loco no desenvolvimento dos cloroplastos. Assim, estudos posteriores visando a localização do efeito primário desses genes através da identificação do passo metabólico bloqueado e análises de outras possíveis alterações nos cloroplastos desses mutantes, como por exemplo em alguns aspectos da atividade fotoquímica, organização molecular dos pigmentos fotossintéticos nos complexos pigmentos-proteínas, organização e distribuição das partículas intramembranas, análise dos polipeptídeos das membranas, síntese protéica nos plastídeos e capacidade de fixação de  $CO_2$ , poderiam fornecer maiores informações sobre a determinação genética da estrutura e fisiologia dos cloroplastos.

## 6. - RESUMO

Efeitos de genes letais na ultraestrutura dos cloroplastos, pigmentos fotossintéticos e sítios de atividade do fotossistema II em alguns mutantes de milho deficientes em clorofila.

Três mutantes de milho deficientes em clorofila foram utilizados com o objetivo de estudar alguns efeitos de genes nucleares na estrutura e fisiologia dos cloroplastos, correlacionando alterações ultraestruturais na diferenciação dessas organelas com o conteúdo de diferentes pigmentos fotossintéticos e sítios de atividade do fotossistema II. Esses mutantes, denominados albino (branco), luteus I (amarelo) e luteus II (amarelo-esverdeado), apresentam segregação mendeliana do tipo monofatorial, são letais, sobrevivendo até aproximadamente quinze dias após a emergência, e são mantidos através de

autofecundação de plantas heterozigotas. Foram analisadas plântulas em estágio de terceira folha, dez dias após a emergência, desenvolvidas em câmara de crescimento com temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo controlados. Também foram utilizadas plântulas do mutante luteus II desenvolvidas no campo. Para cada tipo de mutante utilizou-se como controle plântulas normais isogênicas correspondentes, segregando apenas para o loco em estudo. Em estudos preliminares foram utilizadas folhas de plântulas desenvolvidas sob diferentes intensidades luminosas para análises ultraestruturais dos cloroplastos e determinações de clorofila e protoclorofila. Plântulas de todos os mutantes e normais correspondentes desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux e do luteus II e normal desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux e no campo foram utilizadas para análises quantitativas e qualitativas de carotenóides e estudos citoquímicos para localização de atividade funcional do fotossistema II. Todos os mutantes apresentaram alterações ultraestruturais nos cloroplastos associadas a consideráveis reduções no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, em todas as condições de crescimento utilizadas. Nos mutantes albino e luteus I foram observados cloroplastos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo comum a ocorrência de plastídeos desprovidos de grana, contendo apenas poucas lamelas simples. No albino foram também observados alguns cloroplastos contendo grana aberrantes, enquanto que no luteus I alguns plastídeos apresentaram desenvolvimento de grana rudimentares e outros apresentaram acúmulo de ca-

rotenóides na forma de cristalóides. Os cloroplastos do mutante luteus II apresentaram sistema lamelar com grana menos desenvolvidos do que os observados nos cloroplastos das plântulas normais. Em todos os mutantes e normais analisados a atividade do fotossistema II foi citoquimicamente detectada apenas nas regiões de grana, não tendo sido observada nas lamelas simples. Isso evidencia a hipótese de que a atividade funcional do fotossistema II está associada com a junção de tilacóides e indica que, uma vez que os cloroplastos desses mutantes são deficientes em grana, devem apresentar baixa atividade do fotossistema II. As mutações dos genes nucleares estudadas no presente trabalho afetam o desenvolvimento normal do sistema lamelar dos cloroplastos o que, por sua vez, está correlacionado com a redução no conteúdo de clorofila e carotenóides e redução de sítios de atividade do fotossistema II. Esses mutantes constituem um excelente sistema para investigações da determinação genética da estrutura e fisiologia dos cloroplastos.

#### ABSTRACT

Effects of lethal genes on the chloroplast ultrastructure, photosynthetic pigments, and sites of photosystem II activity of some chlorophyll-deficient mutants of maize.

Three chlorophyll-deficient mutants of maize were used to study some effects of nuclear genes on the structure

and physiology of chloroplasts. The ultrastructure alterations on the development of these organelles was correlated with the content of different photosynthetic pigments and sites of photosystems II activity. These mutants were named albina (white), luteus I (yellow) and luteus II (yellow-green). They exhibit monofactorial mendelian segregation, are lethals, surviving until approximately fifteen days after emergency, and are maintained through selfing of heterozygote plants. Seedlings of three leaf stage, ten days after emergency, were studied. They were grown in environmental control chambers. Seedlings of luteus II grown in the field were also used for experimental analyses. The check treatments were normal seedlings, isogenic for each mutant type, segregating only at that locus. In a preliminary study leaves of seedlings grown under different light intensities were used for ultrastructural analyses of chloroplasts and protochlorophyll and chlorophyll determinations. Normal and mutants seedlings were grown under 1000 lux. Besides luteus II and control were grown under 25-30 lux and also at that field for quantitative and qualitative carotenoids analyses and ultrastructural cytochemical localization of functional photosystem II activity. All the mutants showed ultrastructural plastid alterations associated to significant reduction on the photosynthetic pigment content under the above mentioned growth conditions. Chloroplasts in different stages of development were observed. In the albina and luteus I mutants the most common plastids had some stroma lamellae, but no grana. The albina type showed some

chloroplasts with aberrant grana. In the luteus I type were observed some plastids with rudimentary grana and others with carotenoid crystalloid. The luteus II mutant type chloroplasts showed lamellar system with grana less developed than the ones found in the chloroplasts of normal seedlings. A cytochemical analysis in the mutants and normal seedlings indicated that the photosystem II activity occurred only in the grana and not in the stroma lamellae. This supports the hypothesis that functional photosystem II activity is associated with appression of at least two thylakoids which indicates that the mutants must present low photosystem II activity, as they are grana deficient. The nuclear gene mutations in the present work affect the normal development of chloroplast lamellar system and this is correlated with both reduction in chlorophyll, carotenoid content and photosystem II activity. These mutants appear to be an excellent system for investigations of gene control on structure and physiology of chloroplasts.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K.S., BAIN, J.M., BISHOP, D.G. and SMILLIE, R. M. 1972. Photosystem II activity in agranal bundle-sheath chloroplasts from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 49:461-466.
- ANDERSON, J.M. 1975. The molecular organization of chloroplast thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 416:191-235.
- ANDERSON, J.M. and BOARDMAN, N.K. 1964. Studies on the greening of dark-grown bean plants.II. Development of photochemical activity. *Aust. J. Biol. Sci.* 17:93-101.
- ANDERSON, J.M., GOODCHILD, D.J. and BOARDMAN, N.K. 1973. Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants. *Biochim. Biophys. Acta* 325:573-585.
- ANDERSON, J.M. and LEVINE, R.P. 1974. Membrane polypeptides of some higher plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 333:378-387.

- ANDERSON, I.C. and ROBERTSON, D.S. 1960. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiol.* 35:531-534.
- ANDERSON, J.M., WOO, K.C. and BOARDMAN, N.K. 1971. Photochemical systems in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C<sub>4</sub> plants. *Biochim. Biophys. Acta* 245: 398-408.
- AKOYUNOGLU, G. 1977. Development of the photosystem II unit in plastids of bean leaves greened in periodic light. *Arch. Biochem. Biophys.* 183:571-580.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H. and AKOYUNOGLU, G. 1970. Photoinduced changes in the chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio in young bean plants. *Plant Physiol.* 46:247-249.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H. and AKOYUNOGLU, G. 1973. On the formation of photosynthetic membranes in bean plants. *Photochem. Photobiol.* 18: 219-228.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H., FELEKI, Z. and AKOYUNOGLU, G. 1971. Formation of two chlorophyll-protein complexes during greening of etiolated bean leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45:606-614.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H., KONDYLAKE, S. and AKOYUNOGLU, G. 1976. Growth of grana from "primary" thylakoids in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 17:939-954.
- ARMOND, P.A. and ARNTZEN, C.J. 1977. Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamellae. *Plant Physiol.* 59: 398-404.
- ARMOND, P.A., ARNTZEN, C.J., BRIANTAIS, J.M. and VERNOTTE, C. 1976: Differentiation of chloroplast lamellae: Light harvesting efficiency and grana development. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:54-63.
- ARMOND, P.A., STAEHELIN, L.A. and ARNTZEN, C.J. 1977. Spatial relationship

- of photosystem I, photosystem II, and the light-harvesting complex in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* 73:400-418.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- ARNOTT, H.J., ROSSO, S.W. and SMITH, K.M. 1969. Modification of plastid ultrastructure in tomato leaf cells infected with tobacco mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.* 27:149-167.
- ARNTZEN, J.A. and BRIANTAIS, J.M. 1975. Chloroplast structure and function. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*. (GOVINDJEE, ed). Academic Press, New York, London. pp52-113.
- ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A. and NEUMANN, J. 1971. Localization of photophosphorilation and proton transport activities in various regions of the chloroplast lamellae. *Biochim. Biophys. Acta* 245:409-424.
- ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A., PETERS, G.A. and SHAW, E.R. 1972. Photochemical activity and structural studies of photosystems derived from chloroplast grana and stroma lamellae. *Biochim. Biophys. Acta* 256:85-107.
- ARNTZEN, C.J., VERNOTTE, C., BRIANTAIS, J.M. and ARMOND, P. 1974. Lactoperoxidase-catalyzed iodination of chloroplast membranes. II. Evidence for surface localization of photosystem II reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 368:39-53.
- AVRON, M. 1975. The electron transport in chloroplasts. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*. (GOVINDJEE, ed). Academic Press, New York, London. pp373-386.
- BACHMANN, M.D., ROBERTSON, D.S., BOWEN, C.C. and ANDERSON, I.C. 1967. Chloroplast development in pigment deficient mutants of maize. I. Structural anomalies in plastids of allelic mutants at the  $w_3$  locus. *J. Ultrastruct. Res.* 21:41-60.

4299/BC

- BACHMANN, M.D., ROBERTSON, D.S. and BOWEN, C.C. 1969. Thylakoids anomalies in relation to grana structure in pigment deficient mutants of *Zea mays*. *J. Ultrastruct. Res.* 28:435-451.
- BAILEY, J.L. and WHYBORN, A.G. 1963. The osmiophilic globules of chloroplasts. II. Globules of the spinach beet chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta.* 78:163-174.
- BAIN, J.M. 1968. A crystalline inclusion in the chloroplasts of the outer hypodermal cells of the banana fruit. *Aust. J. Biol. Sci.* 21:421-427.
- BALLANTINE, J.E.M. and FORDE, B.J. 1970. The effect of light intensity and temperature on plant growth and chloroplast ultrastructure in soyben. *Amer. J. Bot.* 57(10):1150-1159.
- BARR, R. and ARNTZEN, C.J. 1969. The occurrence of  $\delta$ -Tocopherylquinone in higher plants and its relation to senescence. *Plant Physiol.* 44:591-598.
- BARR, R., MAGREE, L. and CRANE, F.L. 1967. Quinone distribution in horse-chestnut chloroplasts, globules, and lamellae. *Amer. J. Bot.* 54:365-368.
- BASZYŃSKI, T., BRAND, J., BARR, R., KROGMAN, D.W. and CRANE, F. L. 1972. Some biochemical characteristics of chloroplasts from mineral deficient maize. *Plant Physiol.* 50:410-411.
- BASZYŃSKI, T., RUSZKOWSKA, M., KRÓL, M., TUKENDORF, A. and WOLIŃSKA, D. 1978. The effect of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 89:207-216.
- BASZYŃSKI, T., WARCHOŁOWA, M., KRUPA, Z., TUKENDORF, M.K. and WOLIŃSKA, D. 1980. The effect of magnesium deficiency on photochemical activities of rape and buckweat chloroplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 99:295-303.
- BAZZAZ, M.B. and GOVINDJEE. 1973. Photochemical properties of

- mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiol.* 52: 257-262.
- BEDBROOK and KOLODNER. 1979. The structure of chloroplast DNA. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30:593-620.
- BEHNKE, H.D. 1971. Fine structure of sieve-tube plastids of *Aristolochia* and *Asarum* (Aristolochiaceae). *Planta*: 97:62-69.
- BEN-SHAUL, Y. and NAFTALI, Y. 1969. The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of *Lycopersicon esculentum*. *Protoplasma* 67:333-344.
- BENSON, A.A. 1971. Lipids of chloroplasts. In: *Structure and Function of Chloroplasts*. (M. GIBBS, ed). Springer-Verlag, New York. pp129-148.
- BISALPUTRA, T., DOWNTON, W.J.S. and TREGUNNA, E.B. 1969. The distribution and ultrastructure of chloroplasts in leaves differing in photosynthetic carbon metabolism. I. Wheat, *Sorghum* and *Aristida* (Gramineae). *Can. J. Bot.* 47:15-21.
- BLACKWELL, S.J., LAETSCH, W.M. and HYDE, B.B. 1979. Development of chloroplast fine structure in aspen tissue culture. *Am. J. Bot.* 56: 457-463.
- BLAIR, G.E. and ELLIS, R.J. 1973. Protein synthesis in chloroplasts. I. Light driven synthesis of the large subunit of fraction 1 protein by isolated pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 319:223-234.
- BOARDMAN, N.K. 1977. Chloroplasts-structure and Photosynthesis. In: *The Molecular Biology of Plant Cells* (H. SMITH, ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. pp85-104.
- BOARDMAN, N.K. and HIGHKIN, H.R. 1966. Studies on a barley mutant lacking chlorophyll b.1. Photochemical activity of isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 126:189-199.

- BOGORAD, L. 1976. Chlorophyll biosynthesis. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. GOODWIN, ed) Vol. I 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York, London. pp64-147.
- BOYNTON, J.E. 1966a. Chlorophyll deficient mutants in tomato requiring vitamin B<sub>1</sub>. I. Genetics and physiology. *Hereditas* 56:171-199.
- BOYNTON, J.E. 1966b. Chlorophyll-deficient mutants in tomato requiring vitamin B<sub>1</sub>. II. Abnormalities in chloroplast ultrastructure. *Hereditas* 56:238-254.
- BRADBEER, J.W. 1977. Chloroplast-structure and development. In: *The Molecular Biology of Plant Cells*. (H. SMITH, ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. pp64-84.
- BRITTON, G. 1976. Biosynthesis of carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. GOODWIN, ed). Vol. I 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York, London. pp262-327.
- BROWN, J.S. 1972. Forms of chlorophyll in vivo. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:73-86.
- BURGESS, J. 1970. Fine structure of a crystal-containing plastid in *Colchicum autumnale*. *Planta* 90:32-42.
- BURK, L.G., STEWART, R.N. and DERMAN, H. 1964. Histogenesis and genetics of a plastid-controlled chlorophyll variegation in tobacco. *Amer. J. Bot.* 51(7):713-724.
- BURNETT, J.H. 1976. Functions of carotenoids other than in photosynthesis. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. GOODWIN, ed) . Vol. I.- 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York, London. pp655-679.
- CAHEN, D., MALKIN, S. SHOCHAT, S. and OHAD, I. 1976. Development of photosystem II complex during greening of *Chlamydomonas reinhardtii*  $\gamma$ -1. *Plant Physiol.* 58:257-267.

- CHAN, P.H. and WILDMAN, S.G. 1972. Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction 1 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 277:677-680.
- CHUA, N.H., BLOBEL, G., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G.E. 1973. Attachment of chloroplast polysomes to thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:1554-1558.
- CHUA, N.H. and GILLHAM, N.W. 1977. The sites of synthesis of the principal thylakoid membrane polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Biol.* 74:441-452.
- CHUN, E.H.L., VAUGHAN, M.H. Jr. and RICH, A. 1963. The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J. Mol. Biol.* 7:130-141.
- CONDE, M.F., BOYNTON, J.E., GILLHAM, N.M., HARRIS, E.H., TINGLE, C.L. and WANG, W.L. 1975. Chloroplast genes in *Chlamydomonas* affecting organelle ribosomes. Genetic and biochemical analysis of antibiotic-resistant mutants at several gene loci. *Molec. Gen. Genet.* 140:183-220.
- DALE, J.E. and HEYES, J.K. 1970. A virescens mutant of *Phaseolus vulgaris*. Growth, pigment and plastid characters. *New Phytol.* 69:733-742.
- DAVIES, B.H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. GOODWIN, ed). Vol. II. 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York, London, pp38-165.
- DE VECCHI, L. 1971. Fine structure of detached oak leaves senescing under different experimental conditions. *Isr. J. Bot.* 20:169-183.
- DODGE, J.D. 1970. Changes in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. *Ann. Bot.* 34:817-824.
- DOUCE, R., HOLTZ, R.B. and BENSON, A.A. 1973. Isolation and properties

- of the envelope of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 248(20): 7215-7222.
- DOWNTON, W.J.S. and PYLIOTIS, N.A. 1971. Loss of photosystem II during ontogeny of sorghum bundle sheath chloroplasts. *Can. J. Bot.* 49: 179-180.
- DUBERTRET, G.P. and JOLIOT, P. 1974. Structure and organization of system II photosynthetic units during greening of a dark-grown *Chlorella* mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 357:399-411.
- EGNÉUS, H., REFTEL, S. and SELLDÉN, G. 1972. The appearance and development of photosynthetic activity in etiolated barley leaves and isolated etio-chloroplasts. *Physiol. Plant.* 27:48-55.
- EILAM, Y. and KLEIN, S. 1962. The effect of light intensity and sucrose feeding on the fine structure in chloroplasts and on the chlorophyll content of etiolated leaves. *J. Cell. Biol.* 14:169-182.
- ELLIS, R.J. 1975. Inhibition of chloroplast protein synthesis by lincomycin and 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methylpropionamide. *Phytochemistry* 14:89-93.
- ELLIS, R.J. 1977. The genetic information of organelles and its expression. In: *The Molecular Biology of Plant Cells*. (H. SMITH ed.). Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, pp 280-305.
- EPP, M.D. 1973. Nuclear gene-induced plastome mutations in *Oenothera hookeri*. I. Genetic analysis. *Genetics* 75:465-483.
- EYTAN, G. and OHAD, I. 1972a. Biogenesis of chloroplast membranes. VII. The preservation of membrane homogeneity during development of the photosynthetic lamellar system in an algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii y-1*). *J. Biol. Chem.* 247:112-121.
- EYTAN, G. and OHAD, I. 1972b. Biogenesis of chloroplast membranes. VIII.

- Modulation of chloroplast lamellae composition and function induced by discontinuous illumination and inhibition of ribonucleic acid and protein synthesis during greening of *Chlamydomonas reinhardtii*  $\gamma$ -1 mutant cells. *J. Biol. Chem.* 247:122-129.
- FALUDI, B., FALUDI-DÁNIEL, A. and KELEMEN, G. 1960. Increased photosensitivity of leaf pigments and its relation to the respiratory system in albino mutants of corn. *Physiol. Plant.* 13:227-236.
- FALUDI-DÁNIEL, A. 1975. Pigment synthesis and photosynthetic activity in carotenoid deficient mutants of maize. In: *Genetics Aspects of Photosynthesis*. (Yu. E. NASYROV and A. SESTÁK, eds.). Dr. Junk: The Hague. pp239-245.
- FALUDI-DÁNIEL, A., AMEZ, J. and NAGY, A. H. 1970. P700 oxidation energy transfer in normal maize and carotenoid-deficient mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 197:60-68.
- FALUDI-DÁNIEL, A., FRIDVALSZKY, L. and GYURJÁN, J. 1968. Pigment composition and plastid structure in leaves of carotenoid mutant of maize. *Planta* 78:184-195.
- FEIERABEND, J., MESCHEDE, D. and VOGEL, K-D. 1980. Comparison of the polypeptide compositions of the internal membranes of chloroplasts, etioplasts and ribosome-deficient heat-bleached plastids from rye leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 98:61-78.
- FEIERABEND, J. and MIKUS, M. 1977. Occurrence of a high sensitivity of chloroplast ribosome formation in several higher plants. *Plant Physiol.* 59:863-867.
- FEIERABEND, J. and SCHRADER-REICHHARDT, U. 1976. Biochemical

- differentiation of plastids and other organelles in rye leaves with a high temperature-induced deficiency of plastids ribosomes. *Planta* 129: 133-145.
- FROSCH, S., JABBEN, M., BERGFELD, R., KLEINIG, H. and MOHR, H. 1979. Inhibition of carotenoid biosynthesis by the herbicide SAN 9789 and its consequences for the action of phytochrome on plastogenesis. *Planta* 145:497-505.
- GARNIER, J., GUYON, D. and PICAUD, A. 1979. Characterization of new strains of nonphotosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Fluorescence, photochemical activities, chlorophyll-proteins complexes. *Plant and Cell Physiol.* 20(6):1013-1027.
- GARREN, R. Jr. 1967. Uptake and distribution of labeled dimethyl sulfoxide and its influence on nutritive element transport in plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141:127-130.
- GASPAR, J.O., VEGA, J. and COSTA, A.S. 1981. Ocorrência de grana anormais em cloroplastos de células de folhas infectadas por um isolado do vírus de vira-cabeça (VVC). IV. Congresso Paulista de Fitopatologia - Campinas-SP-BRASIL.
- GAZANCHYAN, R.M., ABILOV, Z.K., ALIEV, Z.S.H. and GASANOV, R.A. 1975. Forms of chlorophyll and photochemical activities of photosystems 1 and 2 from grana and photosystem 1 from stroma lamellae in different ways. *Photosynthetica* 9(3):268-276.
- GENEBACH, B.G., GORTZ, H.T. and HASKINS, F.A. 1970. Genetics studies of induced mutants in *Melilotus alba*. II. Inheritance and complementation of chlorophyll-deficient mutants. *Crop Sci.* 10:154-156.
- GERMAN, F. and BOWEN, V. 1951. A technique for growing plants under sterile conditions. *Plant Physiol.* 26:840-842.

- GIAQUINTA, R.T., DILLEY, R.A., SELMAN, B.R. and ANDERSON, B.J. 1974. Chemical modification studies of chloroplast membranes. Water oxidation inhibition by diazonium-benzenesulfonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 162:200-209.
- GILES, K.L. and TAYLOR, A.O. 1971. The control of chloroplast division in *Funaria hygrometrica*. I. Patterns of nucleic acid, protein and lipid synthesis. *Plant and Cell Physiol.* 12:437-445.
- GILLHAM, N.W. 1978. *Organelle Heredity*. Raven Press Books Ltd., New York.
- GOLDBERG, I. and OHAD, I. 1970. Biogenesis of chloroplast membranes. IV. Lipid and pigment changes during synthesis of chloroplast membranes in mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 44:563-571.
- GOODCHILD, D.J., HIGHKIN, H.R. and BOARDMAN, N.K. 1966. The fine structure of chloroplasts in a barley mutant lacking chlorophyll *b*. *Exptl. Cell Res.* 43:684-686.
- GOODENOUGH, U.W. and LEVINE, R.P. 1969. Chloroplast ultrastructure in mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking components of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol.* 44:990-1000.
- GOODWIN, T.W. 1976. Distribution of carotenoides. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T.W. GOODWIN ed.). Vol. I - 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, London, New York. pp226-261.
- GORHAM, P.R. 1950. Heterotrophic nutrition of seed plants with particular reference to *Lemna minor* L.. *Can. J. Res.* 28:356-381.
- GOVINDJEE and GOVINDJEE, R. 1975. Introduction to photosynthesis. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*. (GOVINDJEE ed.). Academic Press, New York, London pp2-50.
- GRACEN, V.E.Jr., HILLIARD, J.H., BROWN, R.H. and WEST, S.H. 1972.

- Peripheral reticulum in chloroplasts of plants differing in  $\text{CO}_2$  fixation pathways and photorespiration. *Planta* 107:189-204.
- GRAY, J.C. and KEKWICK, R.G.O. 1974. The synthesis of the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxilase in the french bean *Phaseolus vulgaris*. *Eur. J. Biochem.* 44(2):491-500.
- GREENWOOD, A.D., LEECH, R.M., WILLIAMS, J.P. 1963. The osmiophilic globules of chloroplasts. I. Osmiophilic globules as a normal component of chloroplast and their isolation and composition in *Vicia faba*. *Biochim. Biophys. Acta* 78:148-162.
- GUNNING, B.E.S. 1965a. The greening process in plastids. I. The structure of the promellar body. *Protoplasma* 60:111-130.
- GUNNING, B.E.S. 1965b. The fine structure of chloroplast stroma following aldehyde osmium-tetroxide fixation. *J. Cell Biol.* 24:79-93.
- GYURJÁN, I., ERDOS, G., KERESZTES, A., SCHROTH, B.A. and SZIGETI, Z. 1980a. Photosynthetic functions and structure in pigment-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica* 14(1):12-16.
- GYURJÁN, I., NAGY, A.H. and RAKOVAN, J.N. 1978. Ribosome-deficient mutants of *Zea mays*. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 173:429-439.
- GYURJÁN, I., YURINA, N.P., TURISCHEVA, M.S., ODINTSOVA, M.S. and ALEXANDROVA, N.N. 1980b. Protein deficient chloroplast ribosomes in a yellow mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 147(4):287-294.
- HAGEMANN, R., HERMANN, F. and BÜRNER, Th. 1975. The use of plastid and gene mutants of higher plants in studying the genetic control of plastid functions. In: *Genetics Aspects of Photosynthesis*. (Yu.S. NASYROV and

- Z. SESTÁK eds.). Dr. Junk: The Hague. pp115-117.
- HALL, D.O., EDGE, H. and KALINA, M. 1971. The site of ferricyanide photoreduction in the lamellae of isolated spinach chloroplasts: A cytochemical study. *J. Cell Sci.* 9:289-303.
- HALL, J.D., BARR, R., AL-ABBAS, A.H. and CRANE, F.L. 1972. The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient maize leaves. *Plant Physiol.* 50:404-409.
- HANKER, J.S. 1975. Oxidoreductases. In: *Electron Microscopy of Enzymes.* (M.A. HAYAT ed.). Vol. 4. Van Nostran Reinhold Company. New York. pp1-139.
- HARBOUR, J.R. and BOLTON, J.R. 1978. The involvement of the hydroxyl radical in the destructive photooxidation of chlorophylls *in vivo* and *in vitro*. *Photochem. Photobiol.* 28:231-234.
- HARRIS, E.H., BOYNTON, J.E. and GILLHAM, N.W. 1974. Chloroplast ribosome biogenesis in *Chlamydomonas* selection and characterization of mutants blocked in ribosome formation. *J. Cell Biol.* 63:160-179.
- HARRIS, W.M. and SPURR, A.R. 1969a. Chromoplasts of tomato fruits. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants. Carotene analysis. *Amer. J. Bot.* 56:369-379.
- HARRIS, W.M. and SPURR, A.R. 1969b. Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Amer. J. Bot.* 56:380-389.
- HELDT, H.W. and SAUER, F. 1971. The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport. *Biochim. Biophys. Acta* 234:83-91.
- HENNINGSSEN, K.W. and BOARDMAN, N.K. 1973. Development of photochemical activity and the appearance of the high potential form of cytochrome b-559 in greening barley seedlings. *Plant Physiol.* 51:1117-1126.

- HENNINGSSEN, K.W. and BOYNTON, J.E. 1969. Macromolecular physiology of plastids. VII. The effect of a brief illumination on plastids of dark-grown barley leaves. *J. Cell Biol.* 5:757-793.
- HENNINGSSEN, K.W. and BOYNTON, J.E. 1970. Macromolecular physiology of plastids. VIII. Pigment and membrane formation in plastids of barley greening under low light intensity. *J. Cell Biol.* 44:290-304.
- HERRON, H.A. and MAUZERALL, D. 1972. The development of photosynthesis in a greening mutant of *Chlorella* and an analysis of the light saturation curve. *Plant Physiol.* 51:141-148.
- HESLOP-HARRISON, J. 1963. Structure and morphogenesis of lamellar systems in grana-containing chloroplasts. I. Membrane structure and lamellar architecture. *Planta* 60:243-260.
- HIGHKIN, H.R., BOARDMAN, N.K. and GOODCHILD, D.J. 1969. Photosynthetic studies on a pea-mutant deficient in chlorophyll. *Plant Physiol.* 44:1310-1320.
- HILLER, R.G. and BOARDMAN, N.K. 1971. Light driven redox changes of cytochrome *f* and the development of photosystems I and II during greening of bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 253:449-458.
- HILLIARD, J.H. and WEST, S.H. 1970. Starch accumulation associated with growth reduction at low temperatures in a tropical plant. *Science* 168:494-496.
- HODGE, A. J., McLEAN, J.D. and MERCER, F.V. 1956. A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:597-608.
- HOMANN, P.H. and SCHMIDT, G.H. 1967. Photosynthetic reactions of chloroplasts with unusual structures. *Plant Physiol.* 42:1619-1632.
- HOOBER, J.K. 1970. Sites of synthesis of chloroplast membrane poly

- peptides in *Chlamydomonas reinhardtii* y-1. *J. Biol. Chem.* 244:2621-2631.
- HOOBER, J.K. 1972. A major polypeptide of chloroplast membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for synthesis in the cytoplasm as a soluble component. *J. Cell Biol.* 52:84-96.
- HOOBER, J.K., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G.E. 1969. Formation of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* y-1. *J. Biol. Chem.* 244:2621-2631.
- HOOBER, J.H. and STEGEMAN, W.J. 1973. Control of the synthesis of a major polypeptide of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 56:1-12.
- HORVÁTH, G. and FALUDI-DÁNIEL, A. 1971. Formation and compartmentation of leaf carotenoids in normal and mutant maize. In: *Proc. 2nd Int. Congr. Photosynthesis Research, Stresa*. 3:2443-2449. Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague.
- HORVÁTH, G., GARAB, Gy. I., MUSTÁRDY, L.A., HALÁSZ, N. and FALUDI-DÁNIEL, A. 1975. The development of thylakoids and photochemical properties of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of greening maize leaves. *Plant Sci. Letters* 5:239-244.
- HUDÁK, J. and HERICH, R. 1976. Effect of boron on the ultrastructure of sunflower chloroplasts. *Photosynthetica* 10(4):463-465.
- JACKSON, A.H. 1976. Structure, properties and distribution of chlorophylls. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. GOODWIN, ed.) Vol. I. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, London pp1-63.
- JACOBI, G. and LEHMANN, H. 1969. Photochemical activities of chloroplast fragments. *Progr. Photosyn. Res.* 1:159-
- JACOBSON, A.B., SWIFT, H. and BOGORAD. 1963. Cytochemical studies concerning the occurrence and distribution of RNA in plastids of *Zea*

- mays*. *J. Cell Biol.* 17:557-570.
- JHAMB, S. and ZALIK, S. 1975. Plastid development in a virescens barley mutant and chloroplast microtubules. *Can. J. Bot.* 53(8):2014-2025.
- JOY, K.W. and ELLIS, R.J. 1975. Protein synthesis in chloroplasts. IV. Polypeptides of the chloroplasts envelopes. *Biochim. Biophys. Acta* 378:143-145.
- KAHN, A. 1968. Developmental physiology of bean leaf plastids. II. Negative contrast electron microscopy of tubular membranes in prolamellar bodies. *Plant Physiol.* 43:1769-1780.
- KARAPETYAN, N.Y., KLIMOV, U.V., LANG, F. and KRASNOVSKII, A.A. 1975. Fluorescence induction of normal and mutant maize seedlings. In: *Genetics Aspects of Photosynthesis*. (Yu. S. NASYROV and Z. SESTÁK eds). DR. Junk: The Hague. pp255-261.
- KAWASHIMA, N. and WILDMAN, S.G. 1972. Studies on fraction I protein. IV. Mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains the code for a chloroplast protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 262:42-49.
- KERPEL-FRONIUS, S. and HAJÓS, F. 1968. The use of ferricyanide for the light and electron microscopic demonstration of succinic dehydrogenase activity. *Histochemie* 14:343-351.
- KHODASEVICH, E.V., ARNAUTOVA, A.I. and MYSHKOVETS, E.N. 1978. Ultrastructural organization of the chloroplasts in connection with degradation of the pigment fund in conifers. *Soviet Plant Physiol.* 25(4<sup>2</sup>):635-641.
- KIRCHANSKI, S.J. 1975. The ultrastructural development of the dimorphic plastids of *Zea mays* L.. *Amer. J. Bot.* 62(7):695-705.
- KIRCHANSKI, S.J. 1976. Copper ferricyanide localization of photosystem II

- in glutaraldehyde fixed and unfixed chloroplasts. *J. Ultrastruct. Res.* 57:113-119.
- KLEIN, S. 1960. The effect of low temperature on the development of the lamellar system in chloroplasts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8:529-538.
- KNAFF, D.B., MALKIN, R., MYRON, J.C. and STOLLER, M. 1977. The role of plastoquinone and  $\beta$ -carotene in the primary reaction of plant photo system II. *Biochim. Biophys. Acta* 459:402-411.
- KNYPL, J.S. 1969. Inhibition of chlorophyll synthesis by growth retardants and coumarin, and its reversal by potassium. *Nature* 224:1025-1026.
- KNYPL, J.S. and RENNERT, A. 1970. Stimulation of growth and chlorophyll synthesis in detached cotyledons of cucumber by potassium. *Z. Pflanzenphysiol.* 62:97-107.
- KOHN, S. and KLEIN, S. 1976. Light induced structural changes during incubation of isolated maize etioplasts. *Planta* 132:169-175.
- KRINSKY, N.I. 1979. Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* 51:649-660.
- KUHN, H. 1970. Chemismus, struktur und entstehung der carotinkriställchen in der nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. var. "La Riante". *J. Ultrastruct. Res.* 33:332-355.
- KUNG, S.D. 1977. Expression of chloroplast genomes in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28:401-437.
- LABORDE, J.A. and SPURR, A.R. 1973. Chromoplast ultrastructure as affected by genes controlling grana retention and carotenoids in fruits of *Capsicum annum*. *Amer. J. Bot.* 60(8):736-744.
- LAETSCH, W.M. 1968. Chloroplast specialization in dicotyledon possessing the  $C_4$ -dicarboxylic acid pathway of photosynthetic  $CO_2$  fixation. *Amer.*

- J. Bot.* 55:875-883.
- LAETSCH, W.M. 1969. Relationship between chloroplast structure and photosynthetic carbon fixation pathways. *Sci. Progr.* (Oxf.) 57:323-351.
- LAETSCH, W.M. 1974. The C<sub>4</sub> syndrome: A structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:27-52.
- LAETSCH, W.M. and KORTSCHAK, H.P. 1972. Chloroplast structure and function in tissue cultures of a C<sub>4</sub> plant. *Plant Physiol.* 49:1021-1023.
- LAETSCH, W.M. and PRICE, I. 1969. Development of the dimorphic chloroplasts of sugarcane. *Amer. J. Bot.* 56:77-87.
- LANGRIDGE, J. 1955. Biochemical mutations in the crucifer *Arabidopsis thaliana* (L) HEYNH. *Nature* 176:260-261.
- LANGRIDGE, J. 1958. A hypothesis of developmental selection exemplified by lethal and semi-lethal mutants of *Arabidopsis*. *Aust. J. Biol. Sci.* 11: 58-68.
- LANGRIDGE, J. and BROCK, R.D. 1961. A thiamine-requiring mutant of the tomato. *Aust. J. Biol. Sci.* 14:66-69.
- LAURITIS, J.A. and PRIOLI, L.M. 1979. Ultrastructural localization of photosystem II in dimorphic plastids of *Zea mays* L. *Revta Brasil. Bot.* 2:91-96.
- LEECH, R.M., RUMSBY, M.G. and THOMSON, W.W. 1973. Plastid differentiation, acyl lipid, and fatty acid changes in developing green leaves. *Plant. Physiol.* 52:240-245.
- LEONARD, C.D. 1967. Use of dimethyl sulfoxide as a carrier for iron in nutritional foliar sprays applied to citrus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141: 148-158.
- LEVINE, R.P. 1969. The analysis of photosynthesis using mutant strains of algae and higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 20:523-540.

- LEVINE, R.P. 1972. Interactions between nuclear and organelle genetic systems. Evolution of genetic systems. *Brooklaven Symp. Biol.* 23:503-533.
- LEVINE, R.P. and EBERSOLD, W.T. 1960. The genetics and cytology of *Chlamydomonas*. *Ann. Rev. Microbiol.* 14:197-214.
- LEWANDOWSKA, M., HART, J.W. and JARVIS, P.G. 1976. Photosynthetic electron transport in plants of sitka spruce subjected to differing light environments during growth. *Physiol. Plant.* 37:269-274.
- LICHTENTHALER, H.K. 1964. Untersuchungen über die osmiophilen globuli der chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 79:111-117.
- LICHTENTHALER, H.K. 1966. Plastoglobuli und plastidenstruktur. *Der. dtsh. bot. Ges.* 79:82-88.
- LICHTENTHALER, H.K. 1968. Los plastoglóbulos y la estructura fina de los plastos. *Endeavour* 27:144-149.
- LICHTENTHALER, H.K. 1969a. The plastoglobuli of spinach: their size, isolation and lipoquinone composition. *Protoplasma* 68:65-77.
- LICHTENTHALER, H.K. 1969b. The plastoglobuli of spinach: their size and composition during chloroplast degeneration. *Protoplasma* 68:315-326.
- LICHTENTHALER, H.K. and PARK, R.B. 1963. Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. *Nature* 189:1070-1072.
- LICHTENTHALER, H.K. und SPREY, B. 1966. Über die osmiophilen globulären lipideinschlüsse der chloroplasten. *Z. Naturforsch.* 21B:690-697.
- LUTZ, C. and KLEIN, S. 1979. Biochemical and cytological observations on chloroplast development: VI Chlorophylls and saponins in promellar etioplasts of etiolated *Avena sativa* L. leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 95:227-237.

- LYTTLETON. 1962. Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts. *Exp. Cell Res.* 26:312-317.
- MACHOLD, O. and AURICH, O. 1972. Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia faba*. *Biochim. Biophys. Acta* 281:103-112.
- MACHOLD, O. and MEISTER, A. 1980. Chlorophyll-proteins of *Vicia faba*. *Photobiochem. Photobiophys.* 1:213-218.
- MACHOLD, O., SIMPSON, D.J. and MOLLER, B. L. 1979. Chlorophyll-proteins of thylakoids from wild-type and mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Carlsberg Res. Commun.* 44:235-254.
- MACKENDER, R.O. and LEECH, R.M. 1974. The galactolipid, phospholipid, and fatty acid composition of the chloroplast envelope membranes of *Vicia faba* L.. *Plant Physiol.* 53:496-502.
- MACLACHLAN, S. and ZALIK, S. 1963. Plastid structure, chlorophyll concentration, and free amino acid composition of a chlorophyll mutant of barley. *Can. J. Bot.* 41:1053-1062.
- MANETAS, Y. and AKOYUNOGLU, G. 1980. The conversion of  $\delta$ -aminolevulinic acid-induced protochlorophyll(ide) to chlorophyll(ide) and its incorporation into the developing thylakoids. *Photosynthetica* 14(1): 32-39.
- MARGULIES, M.M. and MICHAELS, A. 1974. Ribosomes bound to chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 60:65-77.
- MARGULIES, M.M. and MICHAELS, A. 1975. Free and membrane-bound chloroplast polyribosomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 402: 297-308.
- MASCIA, P.N. and ROBERTSON, D.S. 1978. Studies of chloroplast development in four maize mutants defective in chlorophyll biosynthesis. *Planta* 143:207-211.

- McWILLIAM Jr., A.W. and NAYLOR, A.W. 1967. Temperature and plant adaptation. I. Interaction of temperature and light in the synthesis of chlorophyll in corn. *Plant Physiol.* 42:1711-1715.
- MELIS, A. and AKOYUNOGLU, G. 1977. Development of the two heterogenous photosystem II units in etiolated bean leaves. *Plant Physiol.* 59: 1156-1160.
- MENKE, W. 1962. Structure and chemistry of plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13:27-44.
- MILLER, K.R. 1979. The photosynthetic membrane. *Scientific American* 241(4):100-111.
- MILLER, K.R., MILLER, J.G. and McINTYRE, K.T. 1976. The light-harvesting chlorophyll-protein complex of photosystem II. Its location in the photosynthetic membrane. *J. Cell Biol.* 71:624-638.
- MILLER, K.R., MILLER, G. J. and McINTYRE, K.R. 1977. Organization of the photosynthetic membrane in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 459:145-156.
- MILLERD, A., GOODCHILD, D.J. and SPENCER, D. 1969. Studies on a maize mutant sensitive to low temperature. II. Chloroplast structure, development, and physiology. *Plant Physiol.* 44:567-583.
- MLODZIANOWSKI, F. and KWINTKIEWICZ, M. 1973. The inhibition of kohlrabi chloroplast degeneration by kinetin. *Protoplasma* 76:211-226.
- MOLLENHAUER, H.H. 1964. Plastic embedding mixture for use in electron microscopy. *Stain Technol.* 39:111-114.
- MONTES, G. and BRADBEER, J.W. 1976. An association of chloroplasts and mitochondria in *Zea mays* and *Hyptis suaveolens*. *Plant Sci. Letters* 6:35-41.
- MORELAND, D.E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev.*

- Plant Physiol.* 31:597-638.
- MOSS, G.P. and WEEDON, B.C.L. 1976. Chemistry of the carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T. W. GOODWIN ed.). Vol. I 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London, New York. pp149-223.
- MUHLETHALER, K. 1971. The ultrastructure of plastids. In: *Structure and Function of Chloroplasts*. (M. GIBBS ed.). Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, pp7-49.
- MUHLENTHALER, K. und FREY-WYSSLING, A. 1959. Entwicklung und struktur der proplastiden. *J. Biophysic. Biochem. Cyt.* 6:507-512.
- MULLET, J.E., BURKE, J.J. and ARNTZEN, C.J. 1980. Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65:814-822.
- MURAKAMI, S., TORRES-PEREIRA, J. and PACKER, L. 1975. Structure of the chloroplast membrane: Relation to energy coupling and iron transport. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*. (GOVINDJEE ed.). Academic Press, New York, London. pp555-618.
- NASYROV, Yu.S. 1978. Genetic control of photosynthesis and improving of crop productivity. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:215-237.
- NASYROV, Yu.S., GILLER, Yu.E. and USMANOV, P.D. 1975. Genetic control of chlorophyll biosynthesis and formation of its forms in vivo. In: *Genetics Aspects of Photosynthesis*. (Yu. S. NASYROV and Z. SESTAK eds). The Hague: Dr. Junk. pp133-145.
- NIELSEN, O.F. 1974. Macromolecular physiology of plastids. II. *Tigrina* mutants in barley: genetic, spectroscopic and structural characterization. *Hereditas* 76:269-304.
- NIELSEN, O.F. and GOUGH, S. 1974. Macromolecular physiology of plastids. XI. Carotens in etiolated *tigrina* and *xantha* mutants in barley. *Physiol. Plant.* 30:246-254.

- NIELSEN, N.C., SMILLIE, R.M., HENNINGSEN, K.W., WETTSTEIN, D. von and FRENCH, C.S. 1979. Composition and function of thylakoid membranes from grana-rich and grana-deficient chloroplast mutants of barley. *Plant Physiol.* 63:174-182.
- NIR, I. and PEASE, D.C. 1973. Chloroplast organization and the ultrastructural localization of photosystems I and II. *J. Ultrastruct. Res.* 42:534-550.
- NIR, I. and SELIGMAN, A.M. 1970. Photooxidation of diaminobenzidine (DAB) by chloroplast lamellae. *J. Cell Biol.* 46:617-620.
- OHAD, I., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G.E. 1967. Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*). *J. Cell Biol.* 35:521-552.
- OQUIST, G., SAMUELSSON, G. and NORMAN, N.I. 1980. On the role of  $\beta$ -carotene in the reaction center chlorophyll *a* antennae of photosystem I. *Physiol. Plant* 50:63-70.
- ORSENIGO, M., RASCIO, N. and BONATTI, P.M. 1976. Fine structure of the etioplast in two mutants of maize. *J. Ultrastruct. Res.* 55:42-49.
- PALLET, K.E. and DODGE, A.D. 1980. Modifications of chloroplasts of flax cotyledons treated with monuron: myelinoid figures formed under low light conditions. *Plant Cell Environm.* 3: 183-188.
- PAOLILLO, D.J. 1970. The three dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts. *J. Cell Biol.* 46:243-
- PARK, R.B. and BIGGINS, J. 1964. Quantasome: size and composition. *Science* 144:1009.
- PARK, R.B. and SANE, P.V. 1971. Distribution of function and structure in chloroplast lamellae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22:395-430.
- PARK, I.K. and TSUNODA, S. 1979. Effect of low temperature on chloroplast structure in cultivars of rice. *Plant Cell Physiol.* 20(7):1449-1453.
- PERRIN, A. 1970. Diversité des formes d'accumulation de la phytoferritine dans les cellules constituant l'épithème des hydathodes de *Taraxacum*

- officinale* Weber et *Saxifraga aizoon* Jacq. *Planta* 93:71-81.
- PHUNG-NHU-HUNG, S., HOARAU, A. et MOYSE, A. 1970. Etude de l'évolution en chloroplastes des plastes étiolés d'orge. II. Photophosphorylation et photoréduction du NADP, formation de Ferrédoxine, en enclairement continu et par l'action d'éclairs. *Z. Pflanzenphysiol.* 62:245-258.
- POINCELOT, R.P. 1973. Isolation and lipid composition of spinach chloroplast envelope membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 169:134-142.
- POSSINGHAM, J.V. 1980. Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:113-129.
- POSSINGHAM, J.V., CRAN, D.G., ROSE, R.J. and LOVEYS, B.R. 1975. Effects of green light on the chloroplasts of spinach leaf discs. *J. Exp. Bot.* 26:33-42.
- POSSINGHAM, J.V. and ROSE, R.J. 1976. Chloroplast replication and chloroplast DNA synthesis in spinach leaves. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 193:295-305.
- POSSINGHAM, J.V. and SAURER, W. 1969. Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach. *Planta* 86:186-194.
- POSSINGHAM, J.V., VESK, M. and MERCER, F.V. 1964. The fine structure of leaf cells of manganese deficient spinach. *J. Ultrastruct. Res.* 11: 68-83.
- PREER, J.R. 1971. Extrachromosomal inheritance: Hereditary symbionts, mitochondria, chloroplasts. *Advan. Genet.* 5:361-406.
- PRICE, W.C., MARTINEZ, A.P. and WARMKE, H.E. 1966. Crystalline inclusions in chloroplasts of the coconut palm. *J. Ultrastruct. Res.* 14:618-621.
- PRINGSHEIM, E.G. and PRINGSHEIM, O. 1952. Experimental elimination of chromatophores and eyespot in *Euglena gracilis*. *New Phytol.* 51:65-76.
- PRIOLI, L.M., LAURITIS, J.A., SILVA, W.J. da, MAGALHÃES, A.C. 1978.

- Ultrastructure and pigment composition of a virescent mutant of *Zea mays* L.. *Revta Bras. Bot.* 1:97-106.
- PYLIOTIS, N.A. and GOODCHILD, D.J. 1975. Induced and normal crystalline inclusions in plastids revealed by freeze-fracturing. *Protoplasma* 85: 277-283.
- RATHNAM, C.K.M. and DAS, V.S.R. 1977. Biophysical characterization of mesophyll and bundle sheath chloroplasts isolated from the leaves of *Eleusine coracana*, an aspartate-type  $C_4$  plant. III. Photochemical activities of subchloroplast fragments including grana and stroma lamellae. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 170:321-331.
- RÉDEI, G.P. 1965. Genetic blocks in the thiamine synthesis of the angiosperm *Arabidopsis*. *Amer. J. Bot.* 52:834-841.
- RÉDEI, G.P. 1973. Extra-chromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *arabidopsis*. *Mutation Res.* 18:149-162.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- RHOADES, M.M. 1943. Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 29:327-329.
- RIS, H. and PLAUT, W. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 13:383-391.
- RODRIGUEZ, D.B., RAYMONDO, L.C., LEE, T-C., SIMPSON, K.L. and CHIECHESTER, C.O. 1976. Carotenoid pigment changes in ripening *Mimordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 40:615-624.
- RODRIGUEZ, D.B., SIMPSON, K.L. and CHIECHESTER, C.O. 1973. The biosynthesis of astaxanthin. XVII. Intermediates in a conversion of  $\beta$ -carotene. *Int. J. Biochem.* 4:213-222.
- ROSADO-ALBERIO, J., WEIER, T. and STOCKING, G. 1968. Continuity of the

- chloroplast membrane systems in *Zea mays*. L. *Plant Physiol.* 43:1321-1331.
- ROSINSKI, J. and ROSEN, W.G. 1972. Chloroplast development. Fine structure and chlorophyll synthesis. *Quart. Rev. Biol.* 47:160-191.
- ROSSO, S.W. 1967. An ultrastructural study of the mature chromoplasts of the tangerine tomato (*Lycopersicon esculentum* var. "Golden jubilee"). *J. Ultrastruct. Res.* 20:179-189.
- ROSSO, S.W. 1968. The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes. *J. Ultrastruct. Res.* 25:307-322.
- ROY, H., PATERSON, R. and JAGENDORF, A.T. 1976. Identification of the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxilase as a product of wheat leaf cytoplasmic ribossomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 172:64-73.
- SABATINI, D., BENCH, D.K. and BARNETT, R.J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17:19-58.
- SAGROMSKY, H. 1975. Mutants as objects for investigations on the function of chlorophylls. In: *Genetics Aspects of Photosynthesis*. (Yu.S. NASYROV and Z. SESTÁK eds). Dr. Junk Publishers, The Hague. pp247-253.
- SANE, P.V., GOODCHILD, D.J. and PARK, R.B. 1970. Characterization of photosystems I and II separated by a non-detergent method. *Biochim. Biophys. Acta.* 216:162-178.
- SCHMID, G.H. 1967. Photosynthetic capacity and lamellar structure in various chlorophyll deficient plants. *J. Microscop.* 6:485-498.
- SEARLE, G.F. and WESSELS, J.S.C. 1978. Role of  $\beta$ -carotene in the reaction centers of photosystems I and II of spinach chloroplasts prepared in non-polar solvents. *Biochim. Biophys. Acta.* 504:84-99.

- SEMEANOVA, G.A., LADYGIN, V.G. and TAGEEVA, S.V. 1977. Ultrastructural organization of the membrane system of the chloroplasts in mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with inactive photosystems. *Fiziologiya Rastenii* 24(1):18-22.
- SESTÁK, Z. 1969. Ratio of photosystems 1 and 2 particles in young and old leaves of spinach and radish. *Photosynthetica* 3:285-287.
- SESTÁK, Z. 1978. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 3. Carotenoids. *Photosynthetica* 12(1):89-109.
- SHORTESS, D.K. and AMBY, R.P. 1979. Pigment, free amino acid and chloroplast protein analysis of the pale green-13 mutant in maize. *Maydica* 24:215-221.
- SHUMWAY, L.K. and WEIER, T.E. 1967. The chloroplast structure of iojap maize. *Amer. J. Bot.* 54(6):773-780.
- SHUMWAY, L.K., WEIER, T.E. and STOCKING, C.P. 1967. Crystalline structures in *Vicia faba* chloroplasts. *Planta* 76:182-189.
- SLACK, C.R., HATCH, M.D. and GOODCHILD, D.J. 1969. Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 114:489-498.
- SLACK, C.R., ROUGHAM, P.G. and BASSETT, H.C.M. 1974. Selective inhibition of mesophyll chloroplast development in some C<sub>4</sub>-pathway species by low night temperature. *Planta* 118:57-73.
- SMILLE, R.M., ANDERSEN, K.S. and BISHOP, D.G. 1971. Plastocyanin-dependent photoreduction of NADP by agranal chloroplasts of maize. *Fed. Europ. Biochim. Soc. Lett.* 13:318-320.

- SMILLIE, R.M., ANDERSEN, K.S., TOBIN, N.F., ENTSCH, B. and BISHOP, D.G. 1972. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate photoreduction from water by agranal chloroplasts isolated from bundle-sheath cell of maize. *Plant Physiol.* 49:471-475.
- SMILLIE, R.M., CRITCHLEY, C., BAIN, J.M. and NOTT, R. 1978a. Effect of growth temperature on chloroplast structure and activity in barley. *Plant Physiol.* 62:191-196.
- SMILLIE, R.M., HENNINGSSEN, K.W., BAIN, J.M., CRITCHLEY, C., FESTER, T. and WETTSTEIN, D. von. 1978b. Mutants of barley heat-sensitive for chloroplast development. *Carlsberg Res. Commun.* 43:351-364.
- SMILLIE, R.M., NIELSEN, N.C., HENNINGSSEN, K.W. and WETTSTEIN, D. von. 1977. Development of photochemical activity in chloroplast membranes. I. Studies with mutants of barley grown under a single environment. *Aust. J. Plant Physiol.* 4(3):415-438.
- SPENCER, D. and POSSINGHAM, J.V. 1960. The effect of nutrient deficiencies on the Hill reaction of isolated chloroplasts from tomato. *Aust. J. Biol. Sci.* 13:441-445.
- SPOEHR, H.A. 1942. The culture of albino maize. *Plant Physiol.* 17:397-410.
- SPREY, B. and LAETSCH, W.M. 1975. Chloroplast envelopes of *Spinacia oleracea* L. I. Polypeptides of chloroplast envelopes and lamellae. *Z. Pflanzenphysiol.* 75:38-52.
- SPREY, B. and LAETSCH, W.M. 1976. Chloroplast envelopes of *Spinacia oleracea* L. II. Ultrastructure of chloroplast envelopes and lamellae. *Z. Pflanzenphysiol.* 78:146-163.

- SPREY, B. und LICHTENTHALER, H.K. 1966. Zur frage der beziehung  
zwischen plastoglobuli und thylakoidgenese in gerstenkeimlingen. *Z.  
Naturforsch.* 216:697-699.
- SRIVASTAVA, L.M. VESK, M. and SINGH, A.P. 1971. Effect of chloramphenicol  
on membrane transformations in plastids. *Can. J. Bot.* 49:587-593.
- STAEHELIN, L.A. 1975. Chloroplast membrane structure: Intramembranous  
particles of different sizes make contact in stacked membrane regions.  
*Biochim. Biophys. Acta* 408:1-11.
- STEIN, J.R. and BISALPUTRA, T. 1969. Crystalline bodies in an algal  
chloroplast. *Can. J. Bot.* 47:233-256.
- STEWART, R.N. 1965. The origin and transmission of a series of plastogene  
mutants in *Dianthus* and *Euphorbia*. *Genetics* 52:925-947.
- STOCKING, C.R. 1975. Iron deficiencies and the structure and physiology  
of maize chloroplasts. *Plant Physiol.* 55:626-631.
- SUGINO, M. 1961. Photoperiodic response of an albino mutant of einkorn  
wheat in aseptic culture. *Science* 134:1529-1530.
- SUN, A. and SAUER, K. 1972. Pigment systems and electron transport in  
chloroplasts. II. Emerson enhancement in broken spinach chloroplasts.  
*Biochim. Biophys. Acta* 256:409-427.
- SUSALLA, A.A. and MAHLBERG, P.G. 1975. Plastid organization in  
phenotypically green leaf tissue of a genetic albino strain of  
*Nicotiana* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 62(8):878-883.
- TANAKA, A. and TSUJI, H. 1980. Effects of calcium on chlorophyll synthe  
sis and stability in the early phase of greening in cucumber cotyledons.  
*Plant Physiol.* 65:1211-1215.
- TAO, K.S. and JAGENDORF, A.T. 1973. The ratio of free to membrane-bound  
chloroplast ribossomes. *Biochim. Biophys. Acta* 324:518-532.

- TAYLOR, A.O. and CRAIG, A.S. 1971. Plants under climatic stress. II. Low temperature and high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol.* 47:119-725.
- THOMSON, W.W. and WHATLEY, J.M. 1980. Development of nongreen plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:375-394.
- THORNER, J.P. 1975. Chlorophyll proteins: light harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 26:127-158.
- THORNER, J.P. , GREGORY, R.P.F., SMITH, C.A. and BAILEY, J. L. 1967. Studies on the nature of the chloroplast lamellae. I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes. *Biochemistry* 6: 391-396.
- THORNER, J.P. and HIGHKIN, H.R. 1974. Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 41:107-116.
- TRAVIS, D.M., KENNETH, D.S. and KENNETH, G.W. 1975. Nuclear and cytoplasmic chloroplast mutants induced by chemical mutagens in *Mimulus cardinalis*: Genetics and ultrastructure. *Theor. Appl. Genet.* 46:67-77.
- VALANNE, N. 1976. Development of chloroplast structure and photosynthetic competence in dark-adapted moss protonemata after exposure to light. *Protoplasma* 89:359-369,
- VALANNE, N. 1977. The combined effects of light intensity and continuous light on the CO<sub>2</sub> fixation, chlorophyll content and chloroplast structure of the protonema of *ceratodon purpureus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 83: 275-283.
- VALANNE, N. and VALANNE, T. 1972. Structure of plastids of a variegated *Betula pubescens* mutant. *Can. J. Bot.* 50(9): 1835-1839.
- VASCONCELOS, A.C. 1976. Synthesis of proteins by isolated *Euglena*

- gracilis* chloroplasts. *Plant Physiol.* 58:719-721.
- VELEMINSKY, J., SVACHULOVA, J. and STARZECKI, W. 1969. Photosynthesis of two chlorophyll mutants of *Arabidopsis thaliana* growing on a sucrose medium. *Photosynthetica* 3:97-103.
- VESK, M., POSSINGHAM, J.V. and MERCER, F.V. 1966. The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of leaf cells of tomato, spinach and maize. *Aust. J.Bot.* 14:1-18.
- VIRGIN, H.I., KAHN, A. and WETTSTEIN, D. von. 1963. The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 2:83-91.
- WALBOT, V. and COE Jr., E.H. 1979. Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(6):2760-2764.
- WALLES, B. 1963. Macromolecular physiology of plastids. IV. Amino acid requirements of lethal chloroplast mutants in barley. *Hereditas* 50: 317-344.
- WALLES, B. 1965. Plastid structures of carotenoid deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). I. The white mutant. *Hereditas* 53: 247-256.
- WALLES, B. 1966. Plastid structures of carotenoid-deficient mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.). II. The yellow mutant. *Hereditas* 56: 131-136.
- WALLES, B. 1971. Chromoplast development in a carotenoid mutant of maize. *Protoplasma* 73:159-175.

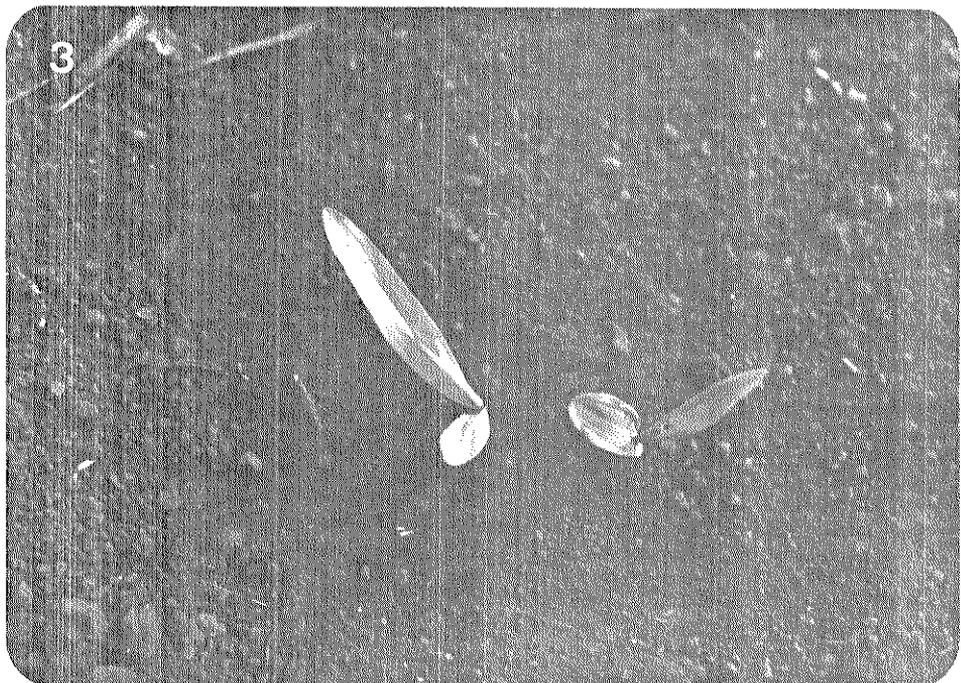
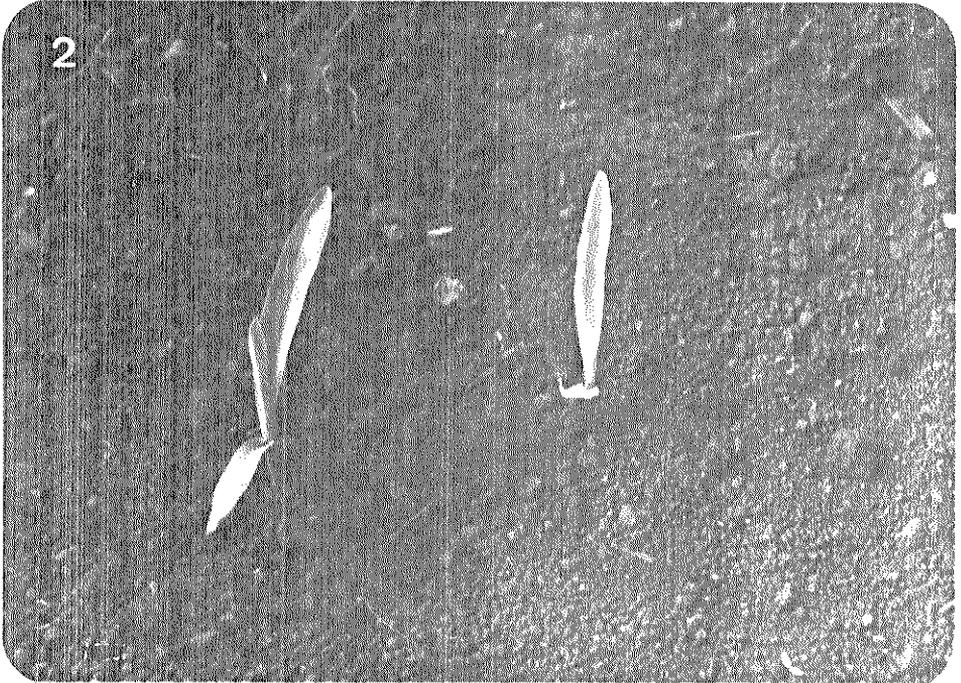
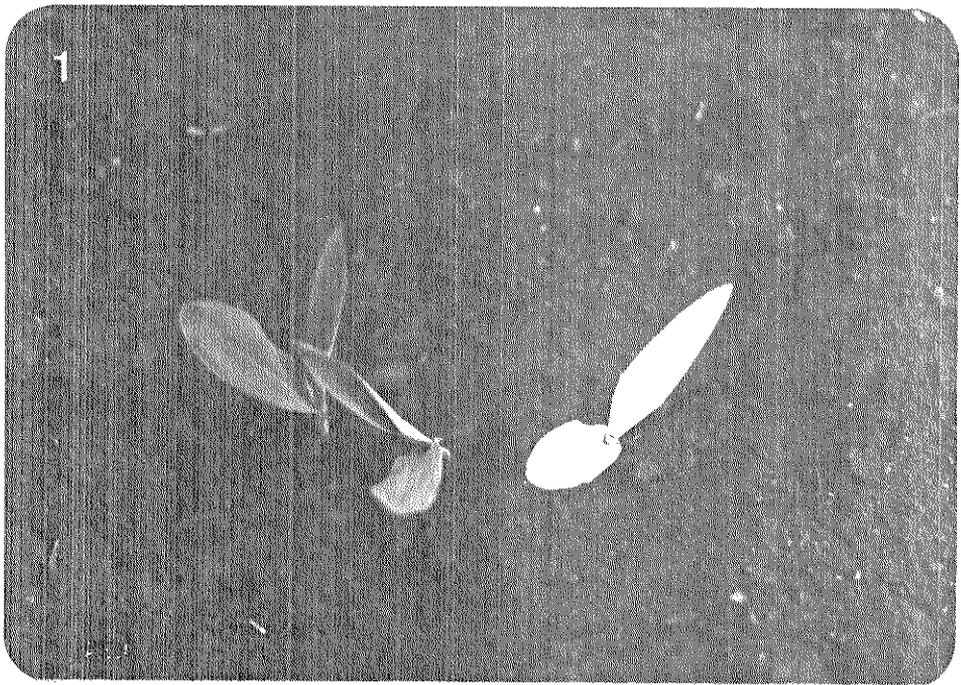
- WALLES, B. 1972. An electron microscope study on photodestruction of plastid ribosomes in  $\beta$ -carotene-deficient mutants of *Helianthus annuus* L. *Protoplasma* 75:215-277.
- WALLES, B. and HUDÁK, J. 1975. Etioplast and chromoplast development in lycopene mutant of maize. *J. Submicr. Cytol.* 7:325-334.
- WANG, A.Y.I. and PACKER, L. 1973. Mobility of membrane particles in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 305:488-492.
- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:475-478.
- WEHREMEYER, W. 1964. Zur klärung der strukturellen Variabilität der chloroplastengrana des spinats in profil und aufsicht. *Planta* 62: 272-293.
- WEIDNER, M., STEINBISS, H. and KREMER, B.P. 1976. Correlations between photosynthetic enzymes,  $\text{CO}_2$ -fixation and plastid structures in an albino mutant of *Zea mays* L. *Planta* 131:263-270.
- WEIER, T.E. and BROWN, D.L. 1970. Formation of the promellar body in 8-day, dark-grown seedlings. *Amer. J. Bot.* 57:267-275.
- WEIER, T.E., STOCKING, C.R. and SHUMWAY, L.K. 1966. The photosynthetic apparatus in chloroplasts of higher plants. *Brookhaven Symp. Biol.* 19:353-374.
- WELLBURN, A.R. and HAMPP, R. 1979. Appearance of photochemical function in prothylakoids during plastid development *Biochim. Biophys. Acta* 547:380-397.
- WELLBURN, F.A.M. and WELLBURN, A.R. 1979. Conjoined mitochondria and plastids in the barley mutant "Albostrians". *Planta* 147:178-179.
- WETTSTEIN, D. von. 1958. The formation of plastids structures. The photochemical apparatus. *Brookhaven Symp. Biol.* 11:138-159.

- WETTSTEIN, D. von. 1961. Nuclear and cytoplasmic factors in development of chloroplast structure and function. *Can. J. Bot.* 39:1537-1547.
- WETTSTEIN, D. von. 1963. On the physiology of chloroplast structures. *Brookhaven Symp. Biol.* 11:138-159.
- WHATLEY, J.M. 1978. A suggested cycle of plastid developmental interrelationships. *New Phytol.* 80:489-502.
- WHATLEY, S.M. 1980. Plastid growth and division in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* 86:1-16.
- WHITTINGHAM, C.P. 1976. Function in photosynthesis. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T.W. GOODWIN, ed.). Vol. I. 2<sup>o</sup> ed. Academic Press. New York, London. pp625-645.
- WILDMAN, S.G., LU-LIAO, C. and WONG-STAAAL, F. 1973. Maternal inheritance, cytology and macromolecular composition of defective chloroplasts in a variegated mutant of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 113:293-312.
- WILDMAN, S.G., JOPE, C. and ATCHINSON, B.A. 1974. Role of mitochondria in the origin of chloroplast starch grains. *Plant Physiol.* 54:231-237.
- WONG-STAAAL, F. and WILDMAN, S.G. 1973. Identification of a mutant in chloroplast DNA correlated with a formation of defective chloroplasts in a variegated mutant of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 113:313-326.
- WOO, K.C., PYLIOTIS, N.A. and DOWTON, W.J.S. 1971. Thylakoid aggregation and chlorophyll *a*/chlorophyll *b* ratio in C<sub>4</sub>-plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 64:400-413.
- WRISCHER, M. 1978. Ultrastructural localization of diaminobenzidine photooxidation in etiochloroplasts. *Protoplasma* 97:85-92.

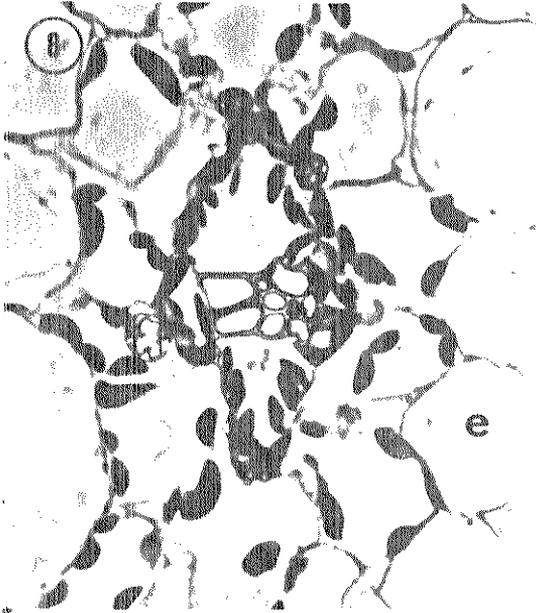
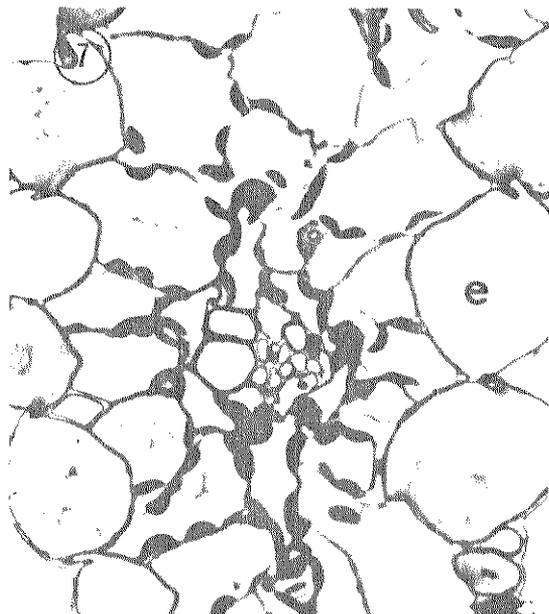
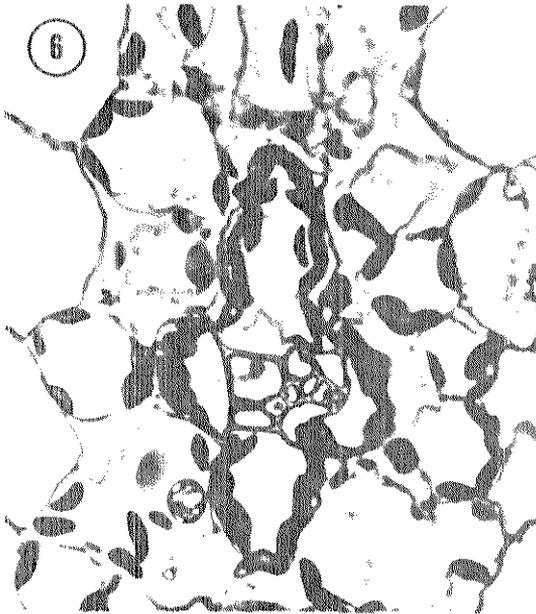
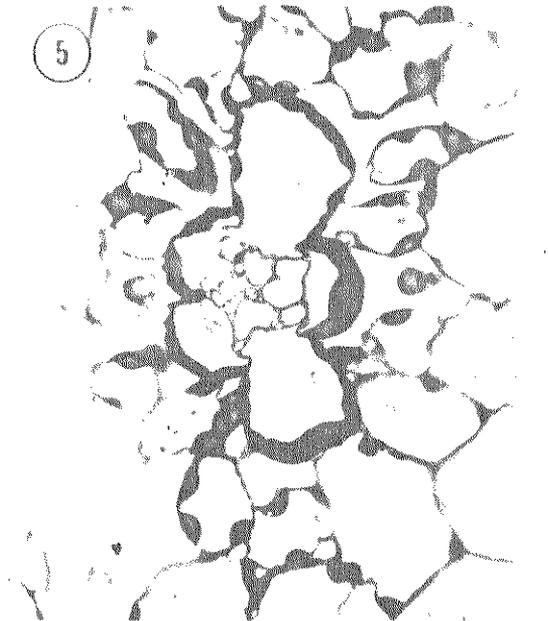
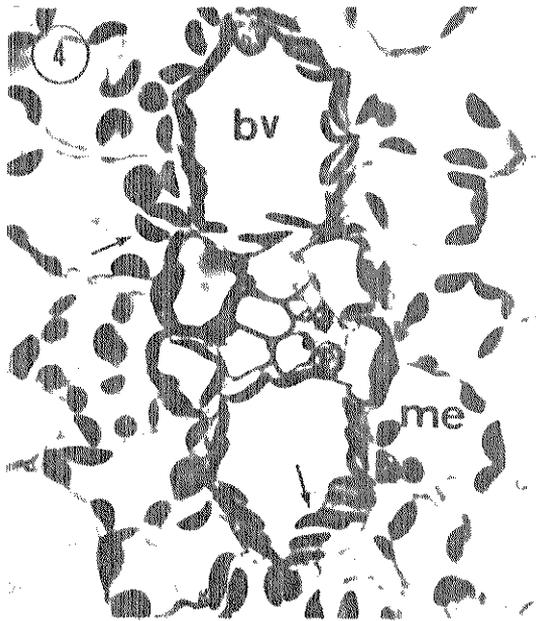
Figura 1. Mutante albino e plantas normais.

Figura 2. Mutante luteus I e plantas normais.

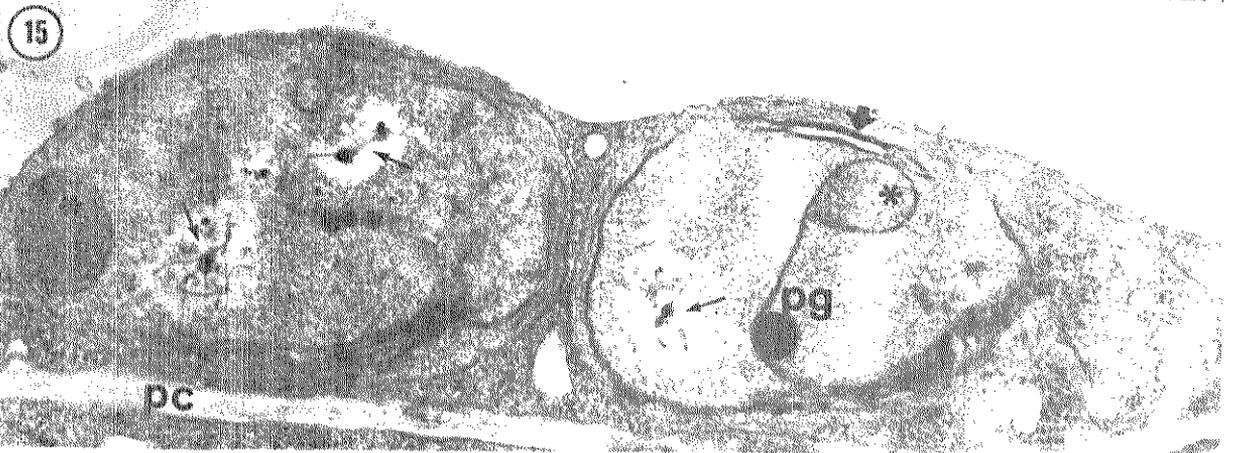
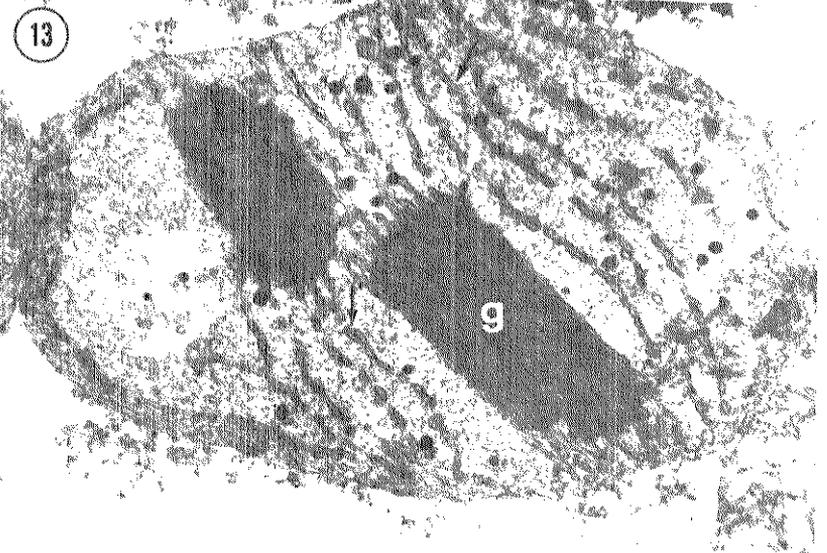
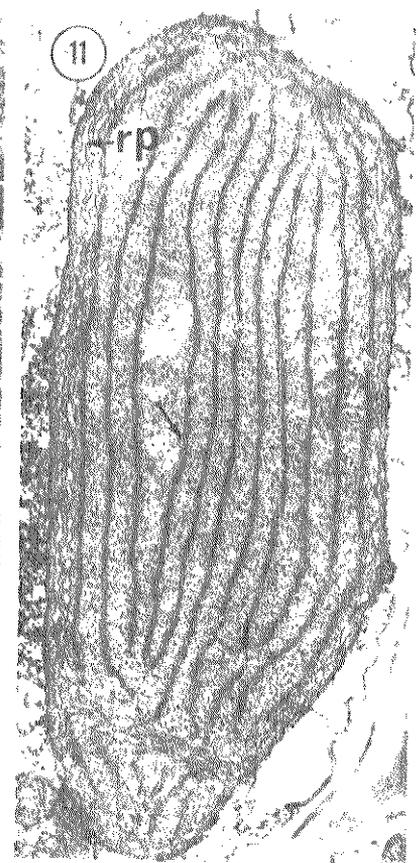
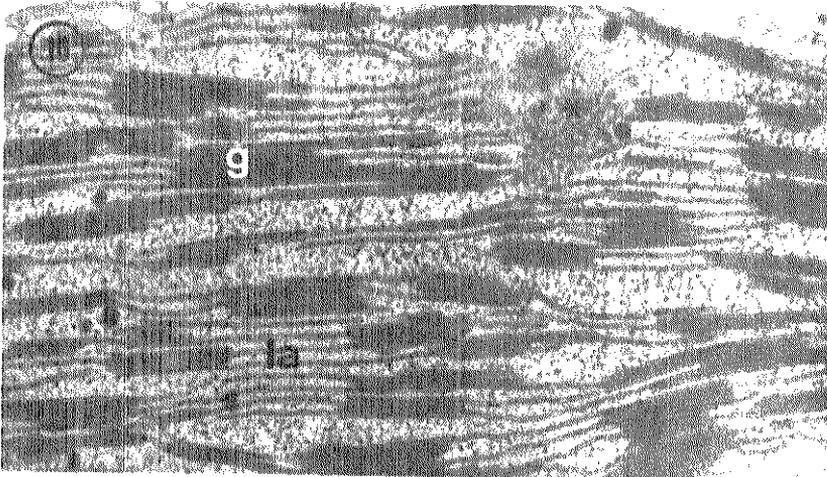
Figura 3. Mutante luteus II e plantas normais.



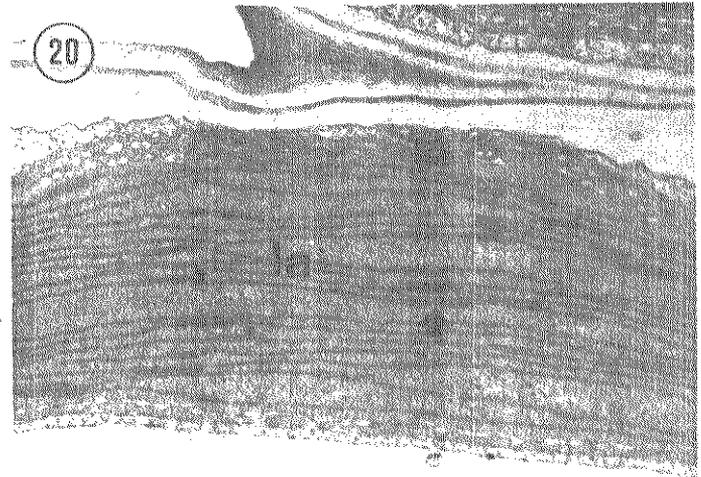
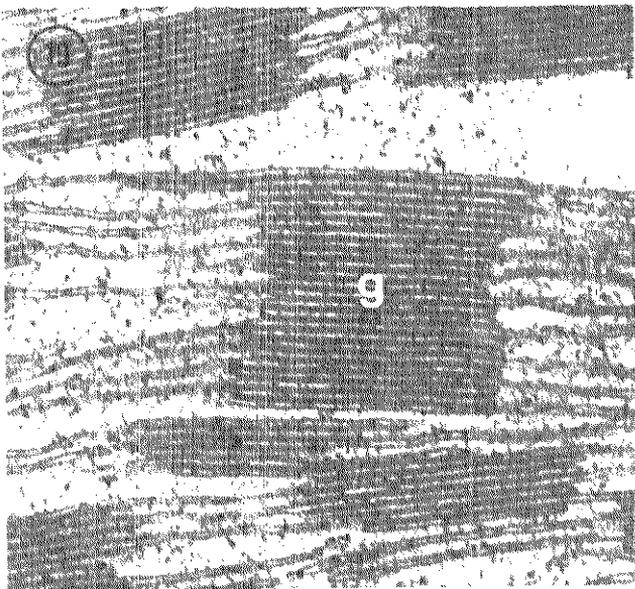
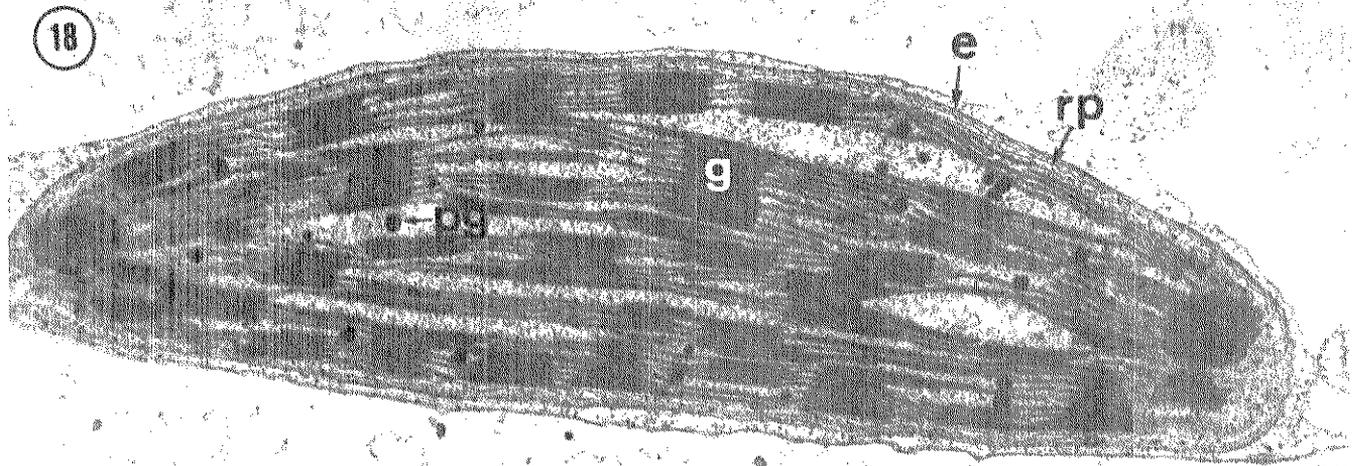
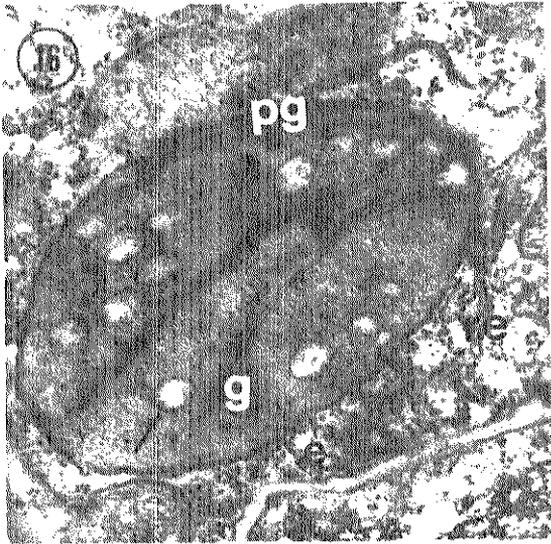
Figuras 4 - 9. Fotomicrografias de cortes da região da ponta das folhas de plantas normais e mutantes de milho desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux, mostrando células de epiderme (e), mesófilo (me) e bainha vascular (bv), e também número, tamanho e distribuição dos cloroplastos. 800 X. Figura 4. Milho normal da linhagem que segrega o mutante luteus II apresentando cloroplastos alongados na bainha vascular e cloroplastos com forma elipsóide no mesófilo (setas). Figura 5. Mutante luteus II mostrando redução no número e tamanho dos cloroplastos em células do mesófilo e bainha vascular. Figura 6. Milho normal utilizado como controle para o mutante luteus I. Numerosos cloroplastos distribuídos nas células do mesófilo e bainha vascular podem ser observados. Figura 7. Mutante luteus I apresentando cloroplastos distribuídos nas células do mesófilo e bainha vascular, porém com acentuada redução no número e tamanho dessas organelas. Figura 8. Milho normal utilizado como controle para o mutante albino. Podem ser observados numerosos cloroplastos nas células da bainha vascular e do mesófilo. Figura 9. Mutante albino mostrando acentuada redução no número e tamanho dos cloroplastos.



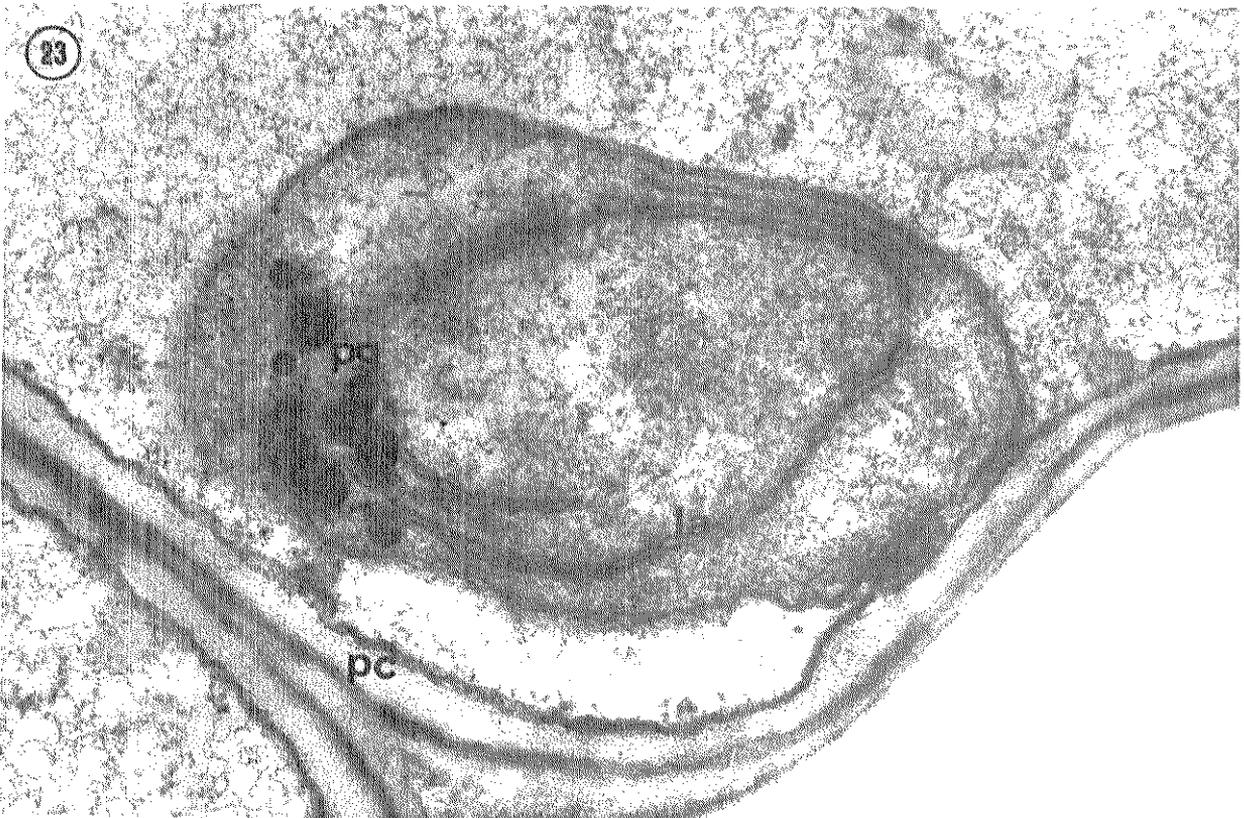
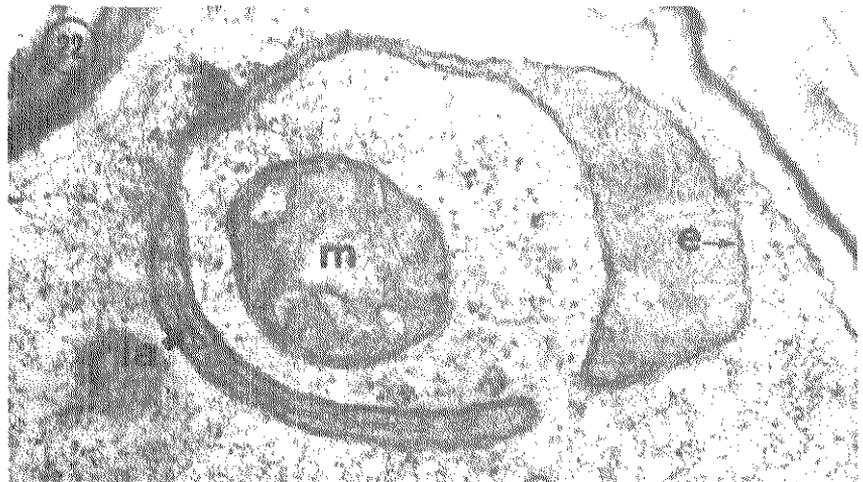
Figuras 10 - 15. Seções ultrafinas da região da ponta das folhas de plantas de milho normal e mutante albino desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux. Figura 10. Porção de um cloroplasto do mesófilo apresentando sistema lamelar bem desenvolvido com presença de lamelas intergrana (la) e grana (g). Notar presença de corpo pró-lamelar (\*). 44500 X. Figura 11. Cloroplasto da bainha vascular mostrando retículo periférico (rp) e lamelas simples que se distribuem longitudinalmente no plastídeo (seta). 22500 X. Figura 12. Plastídeo do mutante albino apresentando sistema lamelar pouco desenvolvido com lamelas dilatadas, em arranjo desordenado e sem formar granum típico (seta). Acúmulo de plastoglôbulos pode ser observado. Este tipo de plastídeo ocorre com frequência tanto em células do mesófilo como da bainha vascular. 42000 X. Figura 13. Cloroplasto do mesófilo do mutante albino mostrando desenvolvimento anormal do sistema lamelar com formação de grana aberrantes (g) e lamelas descontínuas distribuídas no estroma, as quais ocasionalmente se superpõem sem, porém, formar granum típico (setas). 30500 X. Figura 14. Plastídeos apresentando sistema lamelar pouco desenvolvido ou com apenas poucas vesículas (setas), muito comuns nas células do mesófilo e bainha vascular do mutante albino. 24500 X. Figura 15. Plastídeos do mutante albino apresentando uma estrutura semelhante a um corpo pró-lamelar em desenvolvimento ou em degeneração (\*), lamelas distribuídas na região periférica do plastídeo apresentando descontinuidades e aparentando degeneração em algumas regiões (setas). pc, parede celular. 16000 X.



Figuras 16 - 20. Micrografias eletrônicas de cloroplastos de plantas normais utilizadas como controle para o mutante albino, desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 16. Plastídeo da região basal da folha mostrando sistema lamelar pouco desenvolvido com formação de grana rudimentares (g), ocorrência de vesículas (seta) e plastoglôbulos (pg). Notar re tículo endoplasmático granular (re) no citoplasma. e, envelope. 31000 X. Figura 17. Cloroplasto da região mediana da folha apresentando sistema lamelar desenvolvido com presença de grana (seta). 15000 X. Figura 18. Cloroplasto típico de células do mesófilo da região da ponta da folha com sistema lamelar bem desenvolvido e ocorrência de numerosos grana (g). Notar plastoglôbulos (pg) distribuídos no estroma, retículo periférico (rp) e envelope (e). 26000 X. Figura 19. Detalhe ampliado do cloroplasto apresentado na figura anterior. g. granum. 75000 X. Figura 20. Secção de um cloroplasto da bainha vascular da região da ponta da folha apresentando numerosas lamelas simples (la) e alguns grana pouco desenvolvidos (seta). 29500 X.



Figuras 21 - 24. Micrografias eletrônicas de secções da ponta da folha de plantas do mutante albino desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 21. Proplastídeo sem diferenciação do sistema lamelar. A membrana dupla do envelope (seta) pode ser observada. 31000 X. Figura 22. Micrografia eletrônica mostrando interrelação entre plastídeo e mitocôndria (m), onde pode-se observar ocorrência de uma mitocôndria em uma invaginação do plastídeo. la, lamela; e, envelope. 42000 X. Figura 23. Plastídeo com desenvolvimento de algumas lamelas simples (la) e acúmulo de plastoglôbulos (pg). pc, parede celular. 53000 X. Figura 24. Porção de um cloroplasto do mutante albino apresentando lamelas descontínuas e dilatadas, aparentando possível degeneração (setas). 102500 X.



Figuras 25 - 31. Micrografias eletrônicas mostrando plastídeos de diferentes regiões da folha do mutante albino desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 25. Plastídeo da região basal da folha com sistema lamelar pouco desenvolvido e junção de algumas lamelas para formar grana rudimentares (seta). 34000 X. Figura 26. Plastídeo da bainha vascular da região mediana da folha. Notar sistema lamelar pouco desenvolvido e acúmulo de plastoglôbulos (pg). Figura 27. Plastídeo do mesófilo da região da ponta da folha com desenvolvimento de poucas lamelas que apresentam-se descontínuas (seta). 28500 X. Figura 28. Plastídeo do mesófilo da região da ponta da folha com desenvolvimento de granum aberrante resultante de um aumento na extensão dos tilacóides e aparentando superposição imperfeita dos mesmos. Notar lamelas descontínuas distribuídas no estroma e acúmulo de plastoglôbulos. 34000 X. Figura 29. Plastídeo do mesófilo da região da ponta da folha apresentando granum aberrante com tilacóides levemente dilatados (setas) e superposição frouxa. Lamelas descontínuas e plastoglôbulos ocorrem distribuídos no estroma. 32000 X. Figura 30. Plastídeos da bainha vascular da ponta da folha, apresentando sistema lamelar pouco desenvolvido e acúmulo de plastoglôbulos. 26000 X. Figura 31. Cloroplasto da bainha vascular da região da ponta da folha com grana aberrantes e lamelas descontínuas distribuídas no estroma. 36000 X.

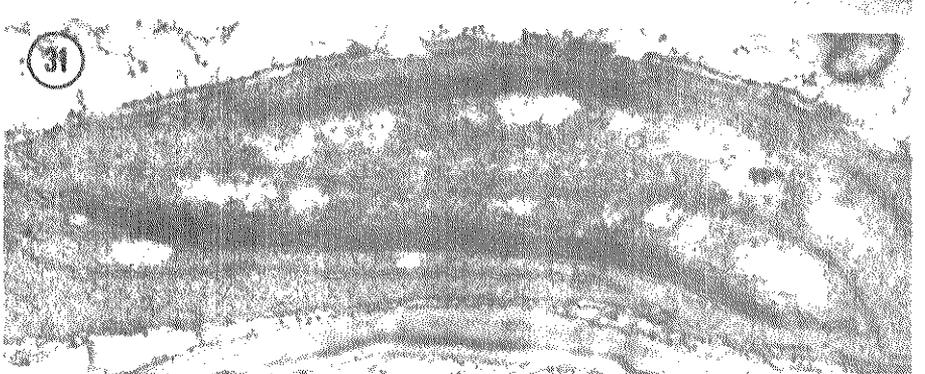
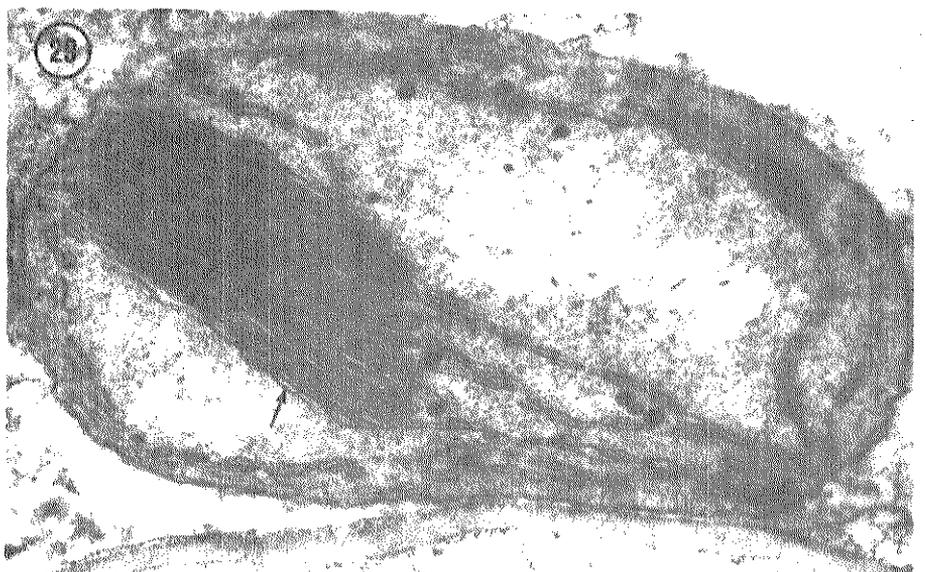
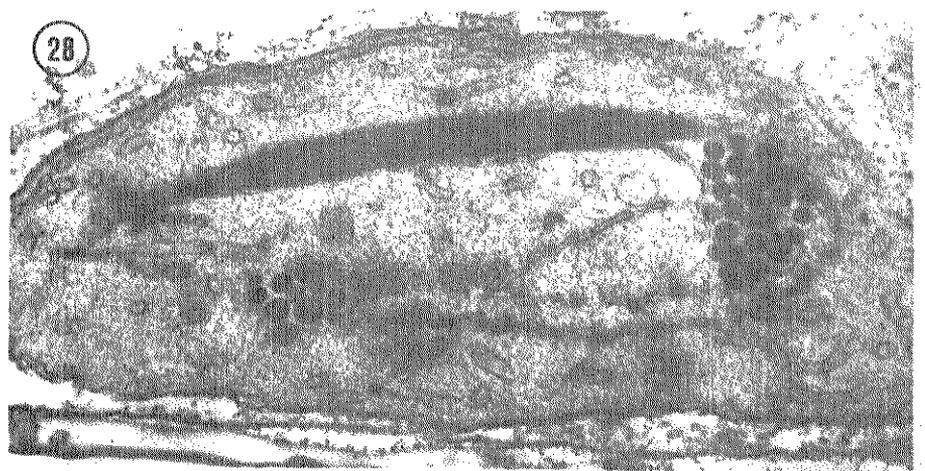
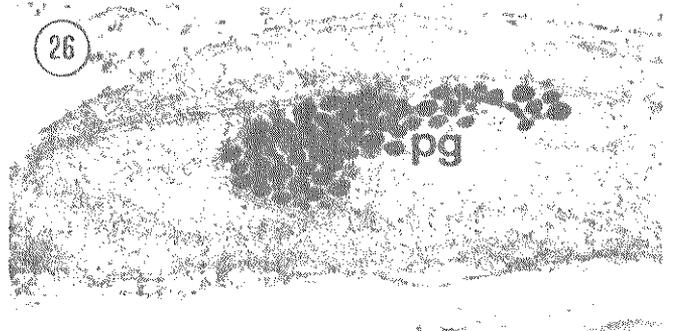
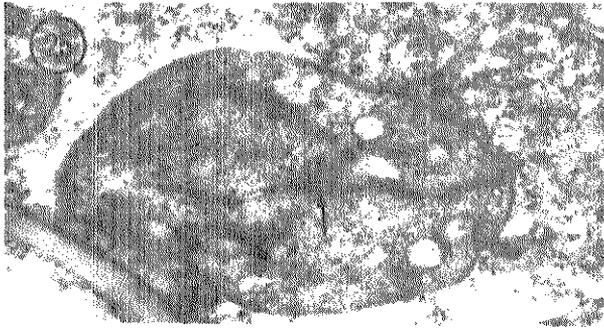
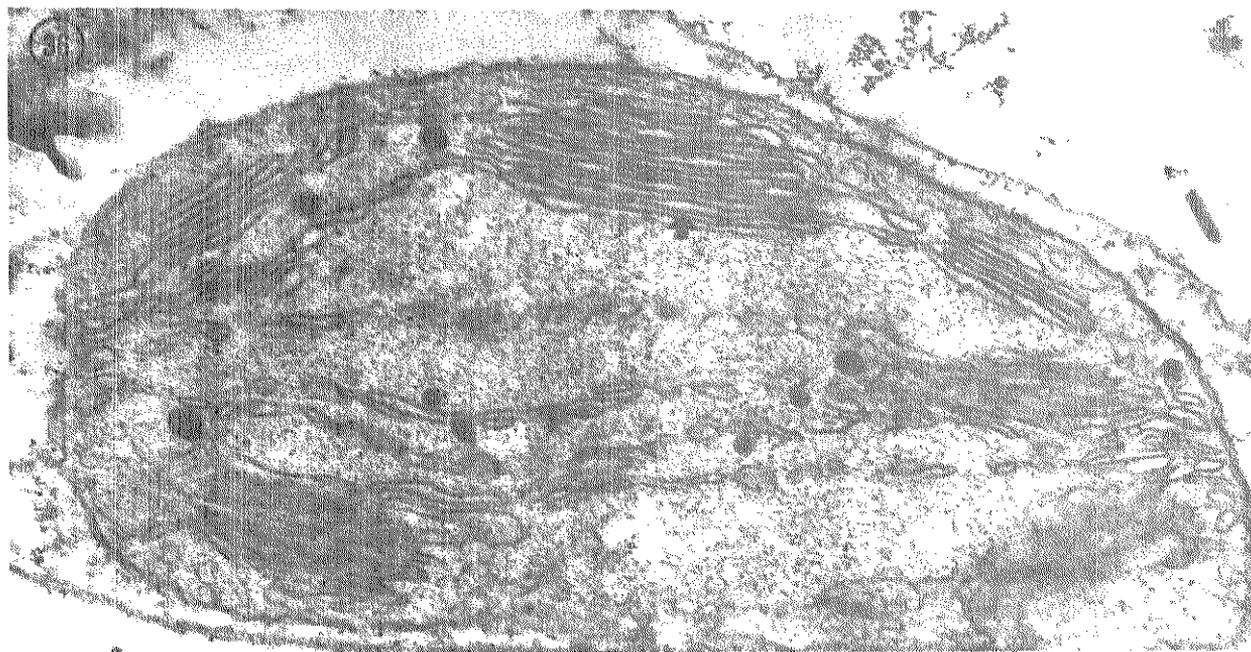
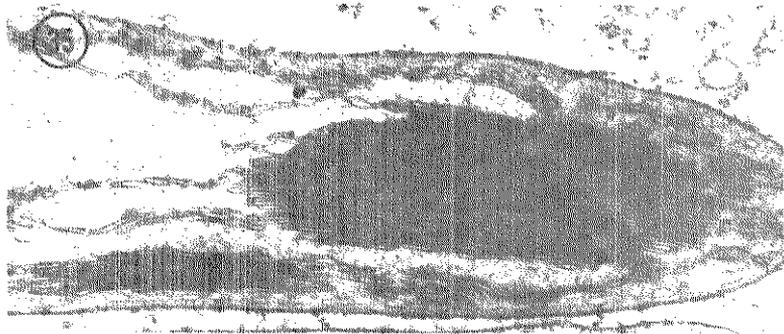
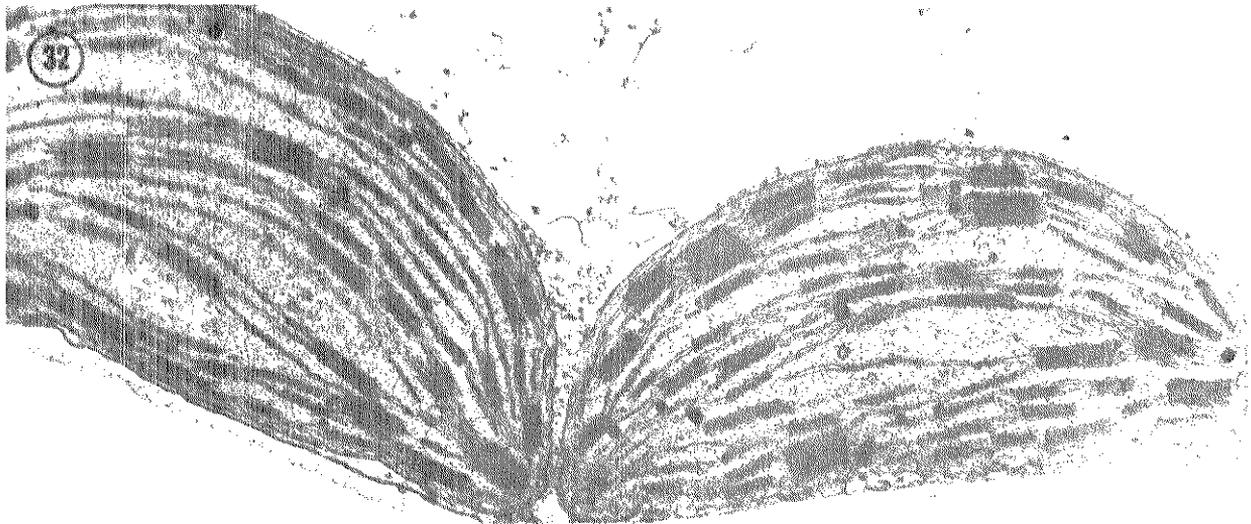


Figura 32. Secção de cloroplastos de planta normal da linhagem que segrega o mutante albino, desenvolvida sob intensidade luminosa de 10000 lux. Sistema lamelar bem desenvolvido com presença de numerosos grana e lamelas intergrana. Plastoglôbulos distribuídos no estroma. 18500 X.

Figuras 33 - 36. Micrografias eletrônicas de plastídeos do mutante albino desenvolvido sob intensidade luminosa de 10000 lux. Figura 33. Plastídeo da bainha vascular apresentando desenvolvimento de poucas lamelas e algumas vesículas. Notar invaginação no plastídeo com presença de ribossomos (\*). 32500 X. Figura 34. Plastídeo sem desenvolvimento de sistema lamelar apresentando algumas lamelas distendidas e algumas vesículas (seta). Este tipo de plastídeo é bastante comum em células da bainha vascular e do mesófilo do mutante albino. 35500 X. Figura 35. Cloroplasto do mesófilo com desenvolvimento anormal de grana. 34000 X. Figura 36. Cloroplasto do mesófilo mostrando lamelas inchadas superpostas (setas) sem formar granum típico. Plastoglôbulos distribuídos no estroma. 49500 X.

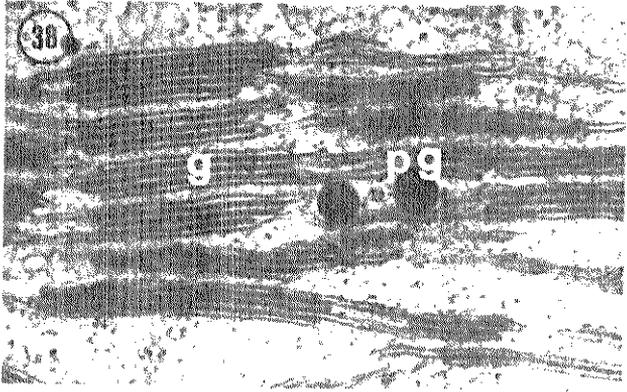


Figuras 37 - 41. Micrografias eletrônicas de secções de células de plantas de milho normal, controle do luteus I, desenvolvido sob intensidade luminosa de 25-30 lux. Figura 37. Cloroplasto com sistema lamelar bem desenvolvido apresentando grana e lamelas intergrana. Plastoglôbulos distribuídos no estroma, presença de retículo periférico e envelope. 27500 X. Figura 38. Detalhe da micrografia anterior mostrando a junção dos tilacóides para formar os grana (g). pg, plastoglôbulos. 67000 X. Figura 39. Detalhe ampliado do cloroplasto apresentado na Figura 40 mostrando a ocorrência de corpo pró-lamelar (seta) de onde aparentemente partem lamelas que se superpõem em algumas regiões para formar grana rudimentares. 70500 X. Figura 40. Cloroplasto da bainha vascular onde podem ser observados corpos pró-lamelares ( ➡ ), sistema lamelar bem desenvolvido com formação de grana contendo aproximadamente 2-4 tilacóides ( → ), retículo periférico (rp) e plastoglôbulos (pg). m, mitocôndrias. 22000 X. Figura 41. Cloroplasto da bainha vascular com desenvolvimento de grana rudimentares (seta) e retículo periférico (rp), no qual não se observa a ocorrência de corpo pró-lamelar. 31000 X.

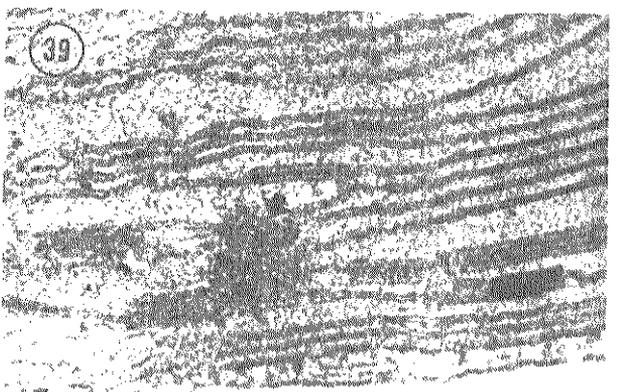
37



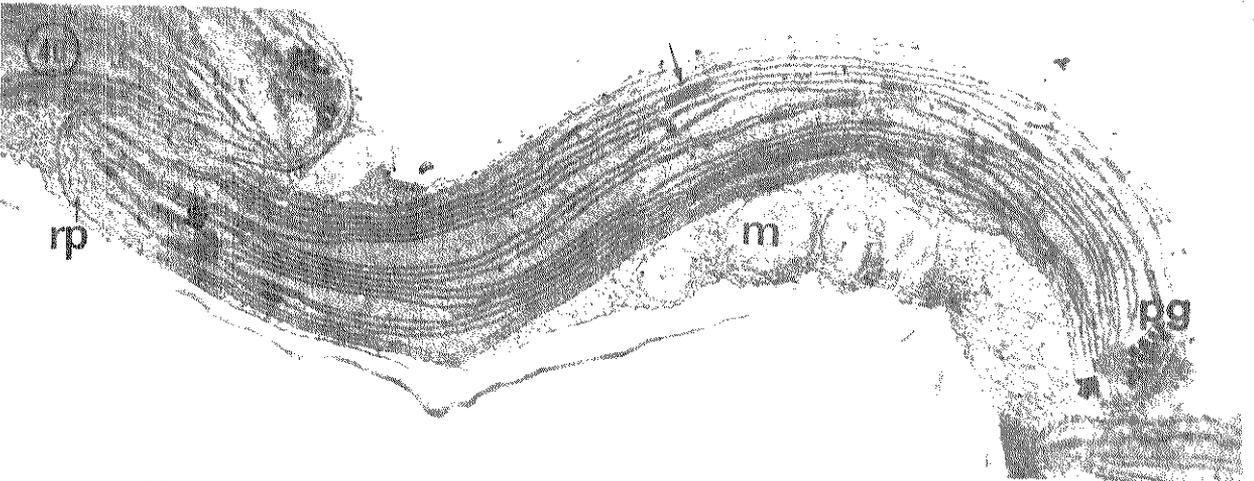
38



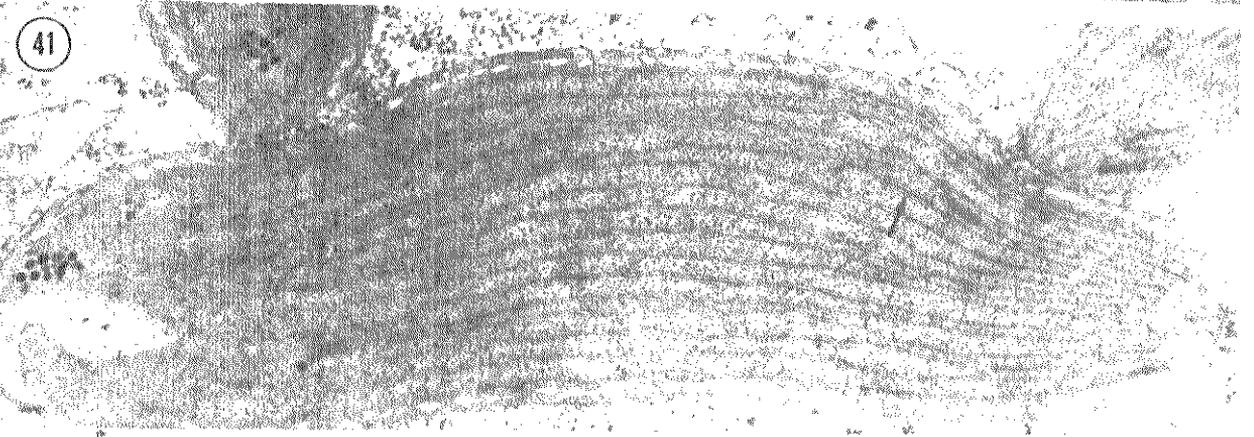
39



40

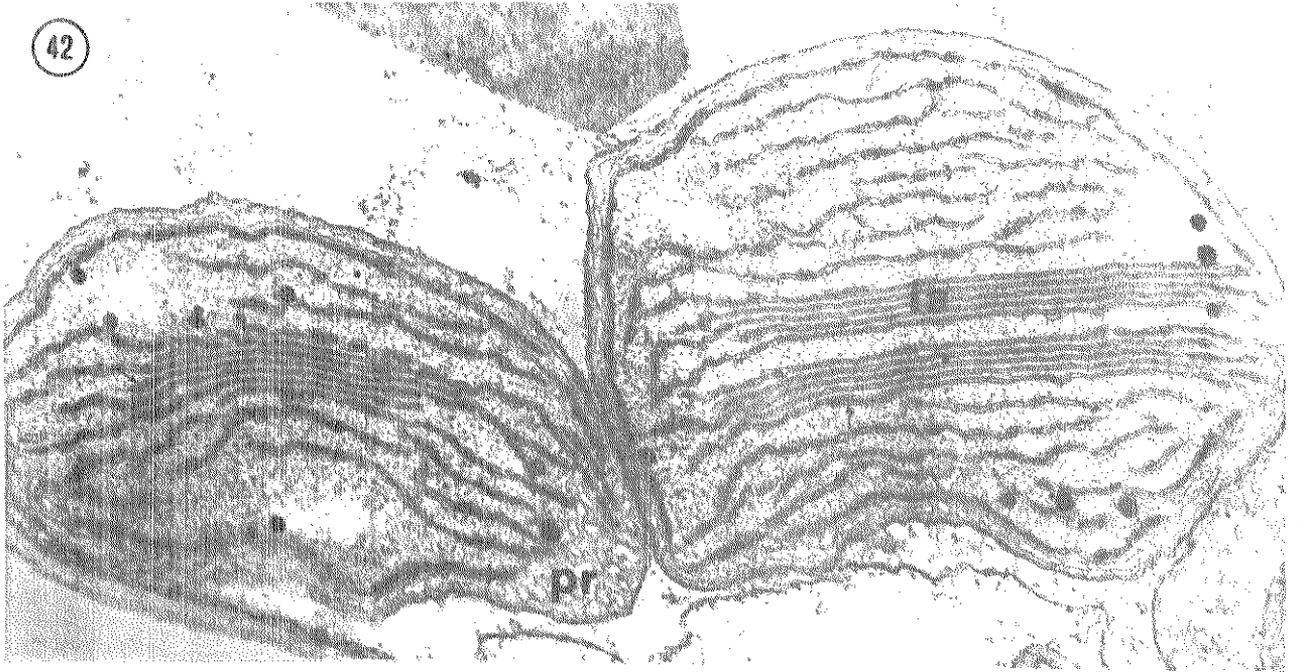


41

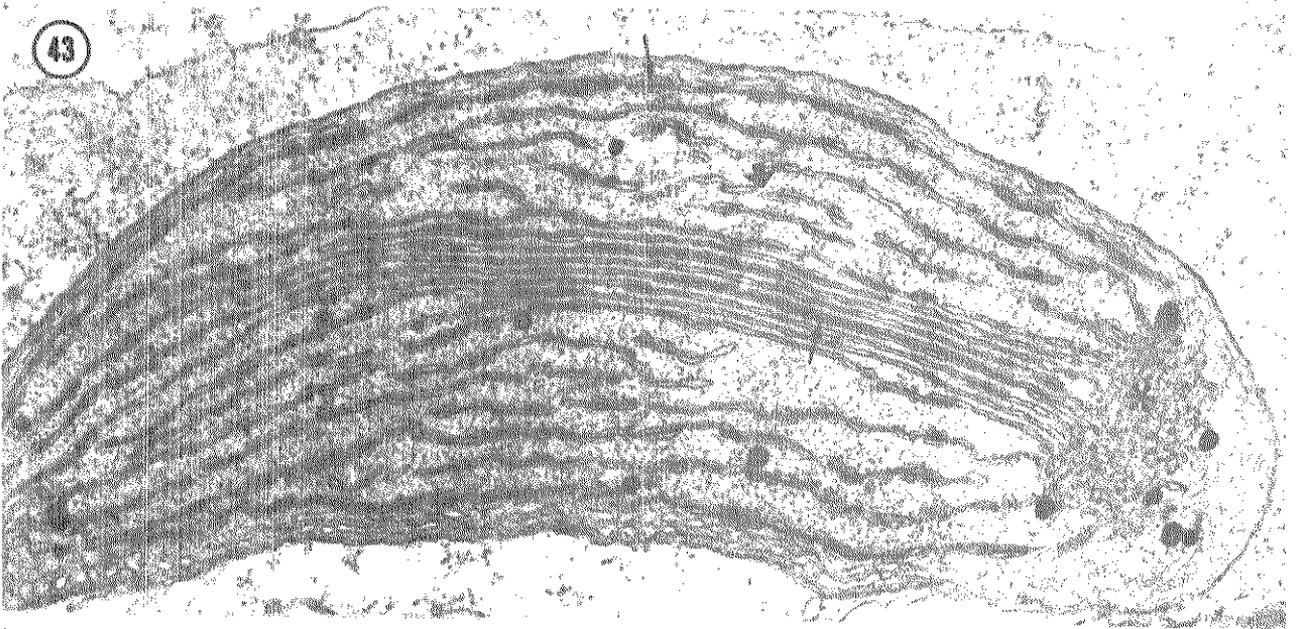


Figuras 42 - 44. Micrografias eletrônicas de plastídeos do mutante luteus I desenvolvido sob intensidade luminosa de 25-30 lux. Figura 42. Plastídeos do mesófilo apresentando lamelas que se distribuem longitudinalmente, muitas delas mantendo espaços mais ou menos regulares entre si (la). Em algumas regiões observa-se junção de dois ou mais tilacóides formando grana rudimentares ( → ). Notar descontinuidades em muitas lamelas ( ➡ ). Retículo periférico (rp) e plastoglôbulos presentes. 31000 X. Figura 43. Plastídeo do mesófilo mostrando ocorrência de corpo pró-lamelar (\*) do qual partem lamelas que se distribuem longitudinalmente ao longo do plastídeo. Observa-se ocorrência de grana rudimentares ( → ) e descontinuidades nas lamelas ( ➡ ). Plastoglôbulos e retículo periférico presentes. 37700 X. Figura 44. Plastídeo da bainha vascular não apresentando desenvolvimento de grana e com lamelas que não são necessariamente contínuas. Retículo periférico e plastoglôbulos (pg) presentes. 29500 X.

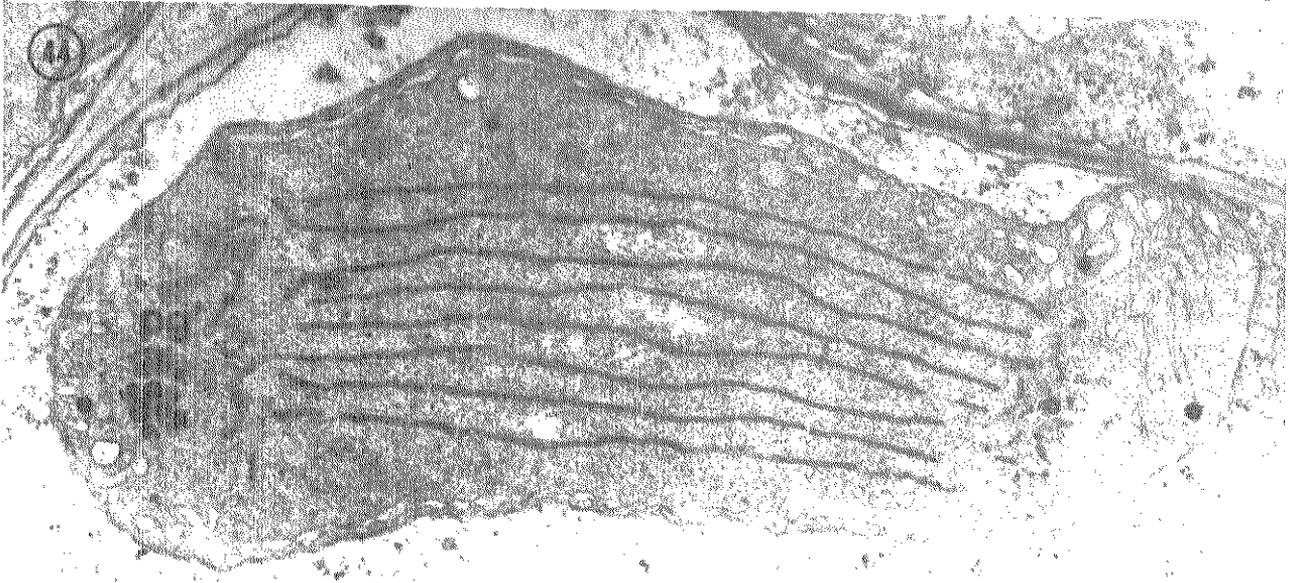
42



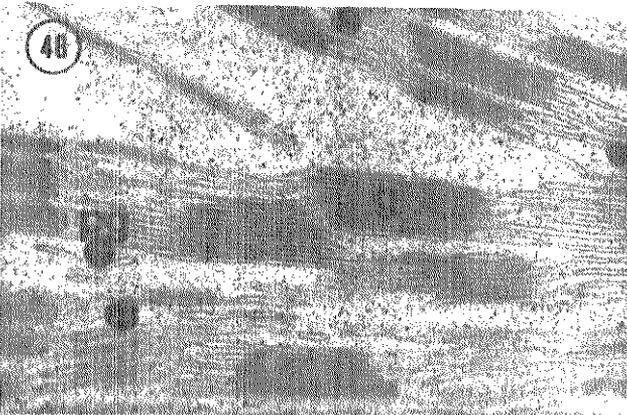
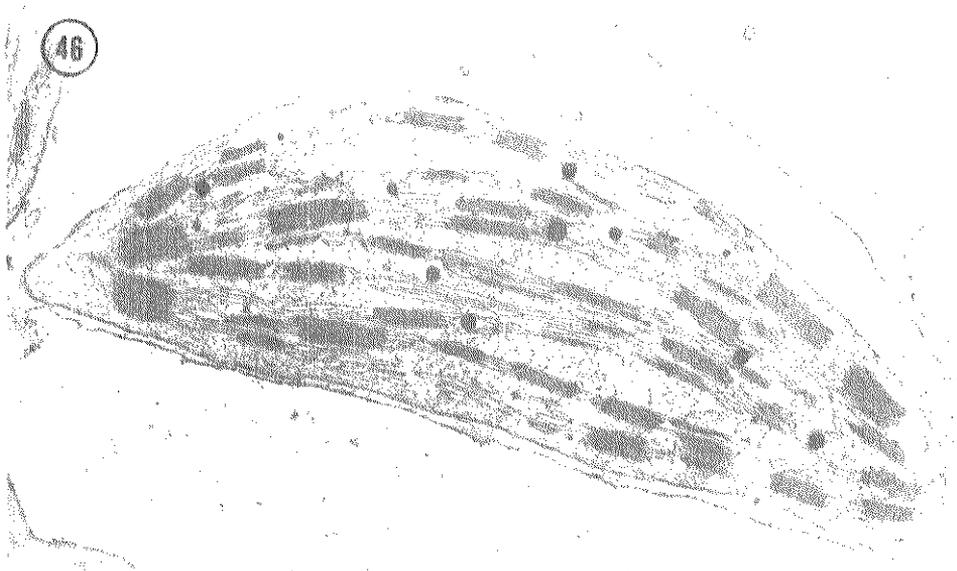
43



44

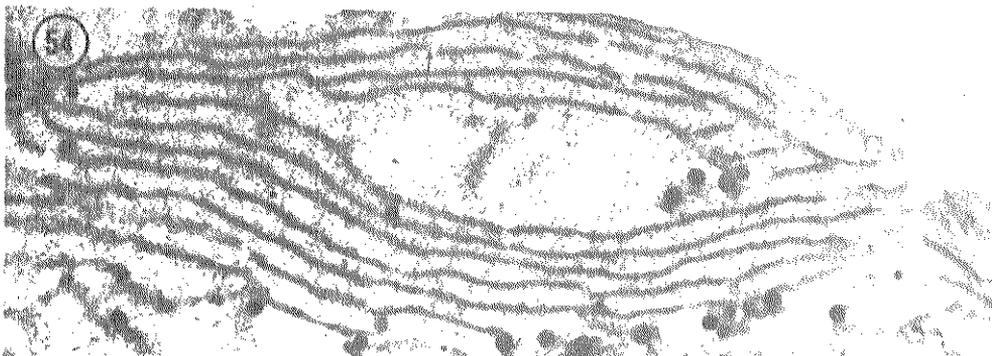
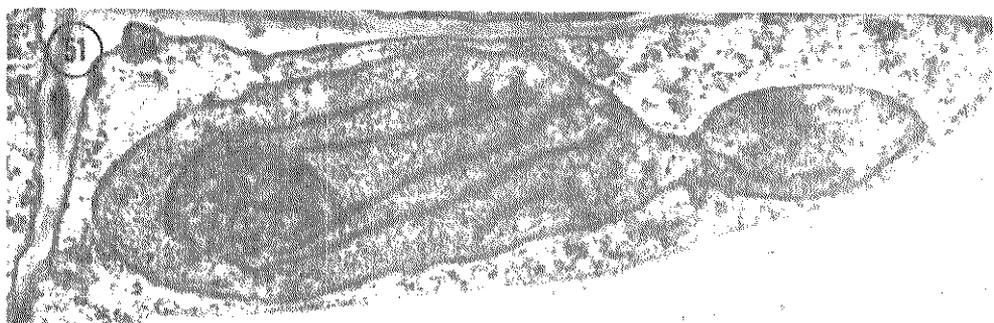
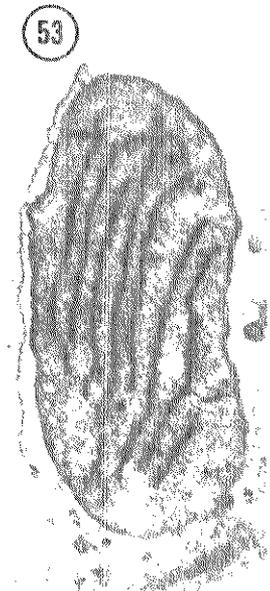


Figuras 45 - 48. Secções de células de diferentes regiões de folhas de plantas normais da linhagem que segrega luteus I, desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 45. Plastídeo da base da folha com desenvolvimento de poucas lamelas e grana rudimentares. 31000 X. Figura 46. Cloroplasto do mesófilo da região mediana da folha onde podem ser observados numerosos grana, lamelas intergrana, retículo periférico, plastoglôbulos e envelope. 20500 X. Figura 47. Secção de células da bainha vascular e do mesófilo da ponta da folha mostrando cloroplastos bem desenvolvidos, típicos dessas células. Notar ocorrência de amido (a) no cloroplasto da bainha vascular. 15000 X. Figura 48. Detalhe ampliado de um cloroplasto do mesófilo mostrado na figura anterior. g, grana; pg, plastoglôbulos. 48000 X.



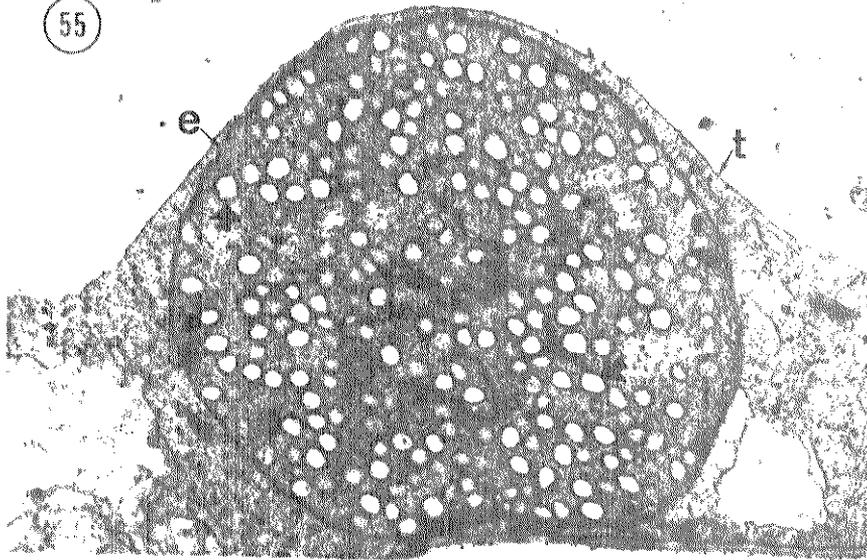
Figuras 49 - 54. Micrografias eletrônicas de secções de diferentes regiões de folhas do mutante luteus I desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 49. Plastídeos da base da folha apresentando desenvolvimento de poucas lamelas simples e ocorrência de corpo pró-lamelar em alguns. Notar plastídeo aparentemente em divisão (\*). m, mitocôndrias. Figura 50. Proplastídeo sem desenvolvimento de lamelas, tipo bastante comum nas células da base da folha desse mutante. 45000 X. Figura 51. Plastídeo da base da folha mostrando desenvolvimento de poucas lamelas simples e corpo pró-lamelar. Notar aparente estrangulamento em uma das extremidades. 29500 X. Figura 52. Plastídeo da região mediana da folha onde, pode ser observada a ocorrência de corpo pró-lamelar do qual partem poucas lamelas de pequena extensão. Notar ocorrência de ribossomos e alguns plastoglôbulos. Membranas do envelope também podem ser observadas. 43000 X. Figura 53. Plastídeo da região mediana da folha apresentando poucas lamelas sem desenvolvimento de grana, retículo periférico e alguns plastoglôbulos. Este tipo de plastídeo é bastante comum na região mediana da folha desse mutante. 25000 X. Figura 54. Porção de um plastídeo da ponta da folha mostrando ocorrência de lamelas simples apresentando algumas descontinuidades (seta) e plastoglôbulos. 28500 X.

49



Figuras 55 -59. Micrografias eletrônicas de diferentes plastídeos encontrados em células da ponta da folha do mutante luteus I desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 55. Secção de célula do mesófilo mostrando um plastídeo arredondado onde podem ser observadas numerosas vesículas (seta), poucas lamelas aparentemente em degeneração, alguns plastoglôbulos e o envelope (e). t, tonoplasto; vc, vacúolo. 15500 X. Figura 56. Plastídeo da bainha vascular com sistema lamelar pouco desenvolvido, sem ocorrência de granum. Notar acúmulo de plastoglôbulos (pg) e alguns plastoglôbulos espalhados no estroma. 32000 X. Figura 57. Detalhe ampliado do plastídeo da figura 58. Notar ocorrência de lamelas com morfologia típica, mantendo espaços uniformes entre si e apresentando regiões de maior densidade eletrônica, com perda da estrutura típica de lamela (setas). 68000 X. Figura 58. Plastídeo do mesófilo em secção longitudinal mostrando ocorrência de lamelas em configuração concêntrica ou com distribuição paralela. Observar região de baixa densidade eletrônica apresentando degeneração das lamelas (seta). Retículo periférico e plastoglôbulos presentes. 34000 X. Figura 59. Plastídeo da bainha vascular com uma invaginação na qual pode-se observar a presença de uma mitocôndria. Notar o arranjo concêntrico de algumas lamelas. 31500 X.

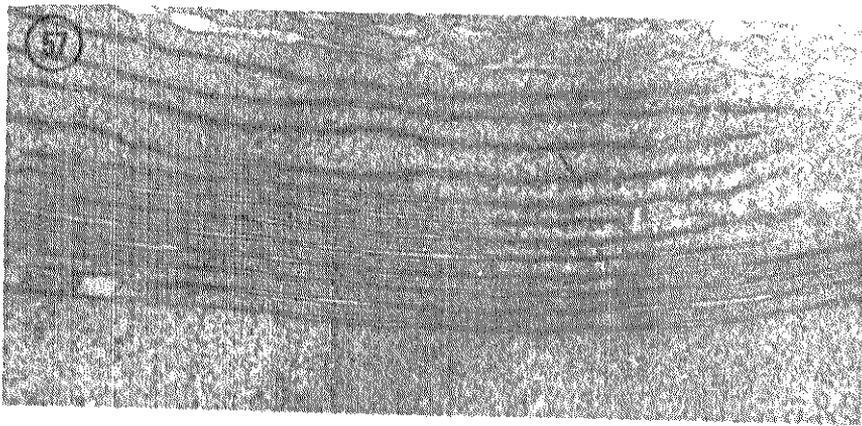
55



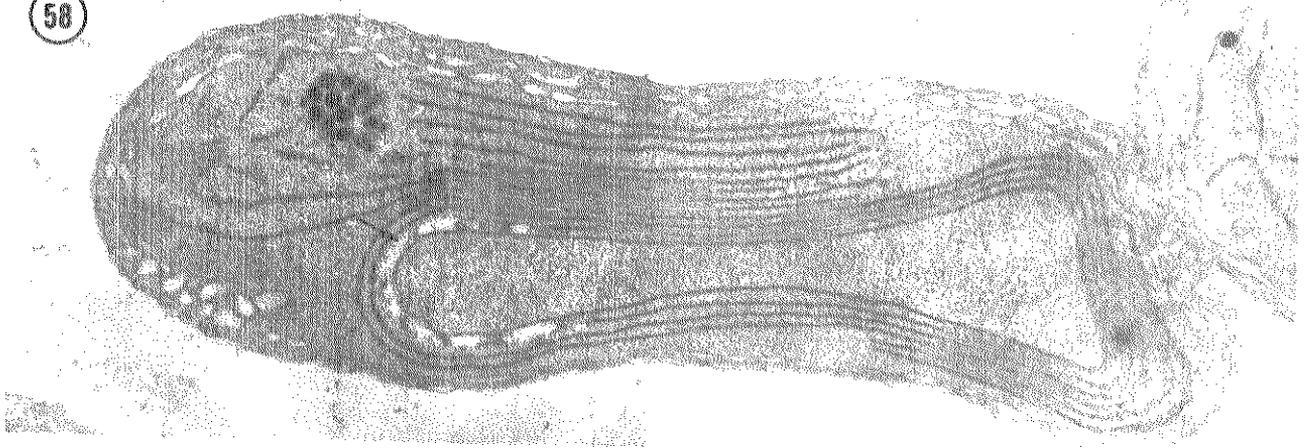
56



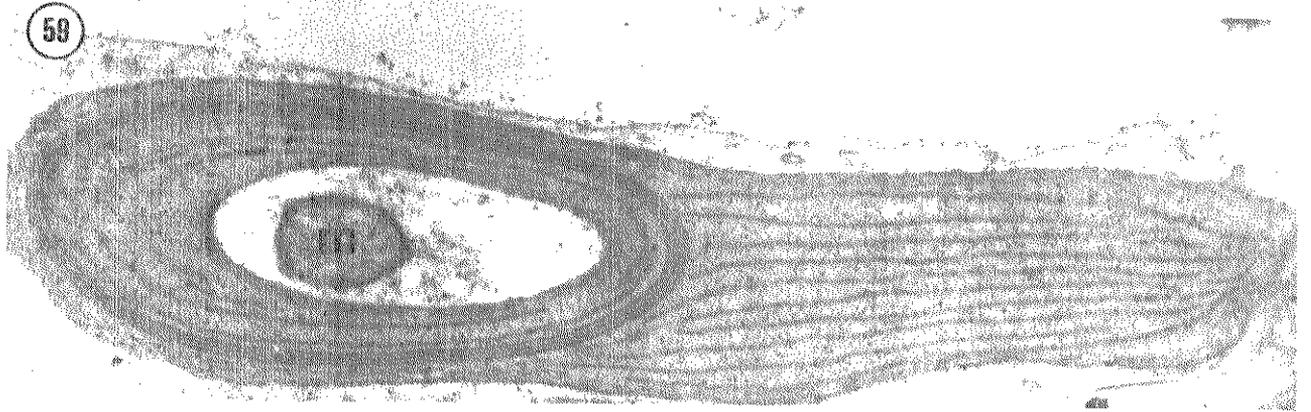
57



58

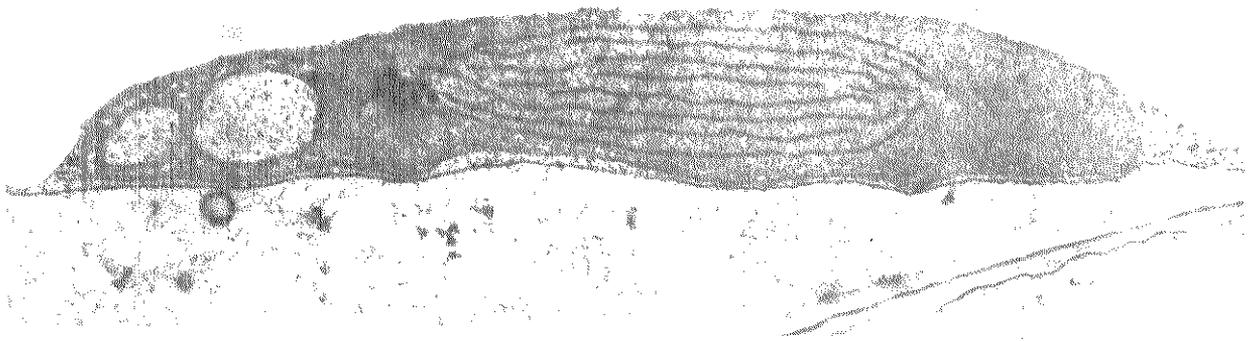


59



Figuras 60 - 62. Secções de células do mesófilo da ponta da folha mostrando diferentes plastídeos do mutante luteus I desenvolvido em condições de 1000 lux. Figura 60. Plastídeo da bainha vascular com desenvolvimento de algumas lamelas e presença de plastoglôbulos. Observar a ocorrência de invaginações (\*) em uma das extremidades. 29000 X. Figura 61. Cloroplasto do mesófilo apresentando algumas lamelas com distribuição paralela, ocorrência de poucos grana rudimentares (seta) e várias lamelas descontínuas. Retículo periférico e plastoglôbulos presentes. 32000 X. Figura 62. Cromoplasto encontrado na bainha vascular apresentando estrutura osmiófila ondulada (◆) e espaço de pouca densidade eletrônica onde se encontrava um cristalóide (cr). Notar o desenvolvimento de algumas lamelas (→) e retículo periférico com formação de algumas vesículas. 30500 X.

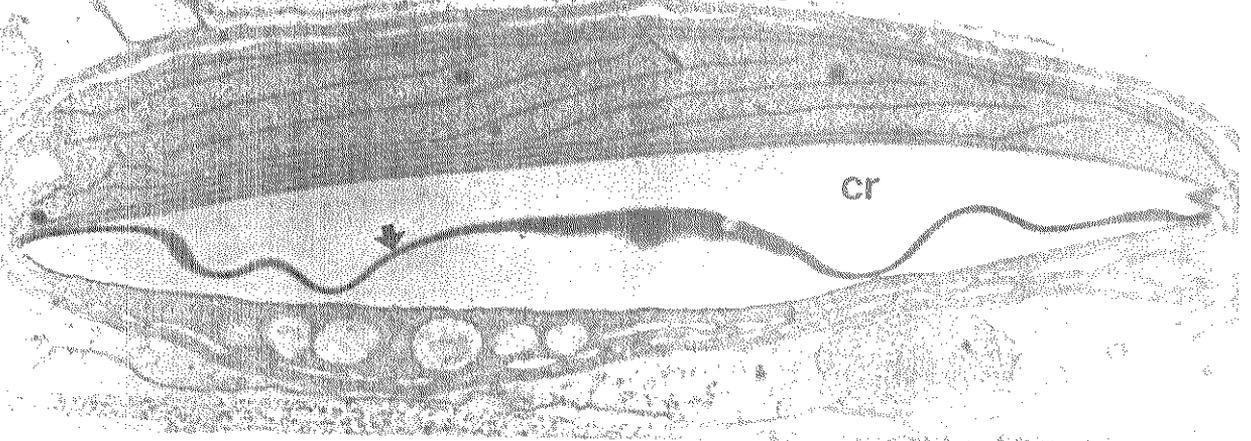
60



61

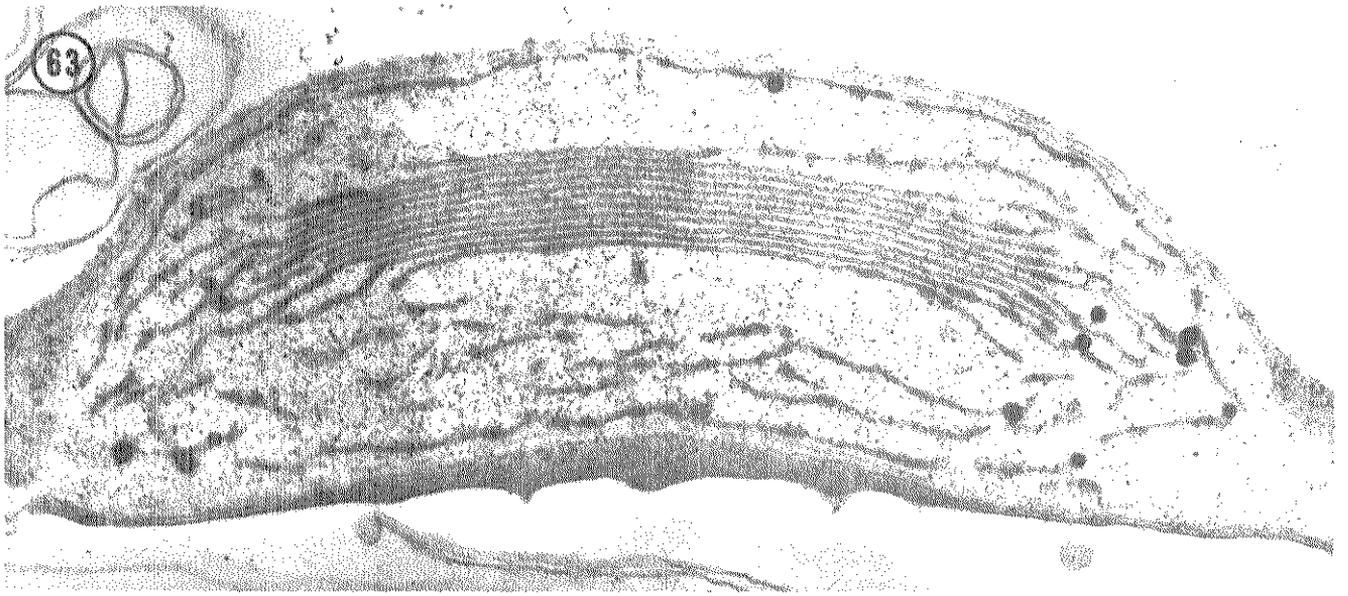


62



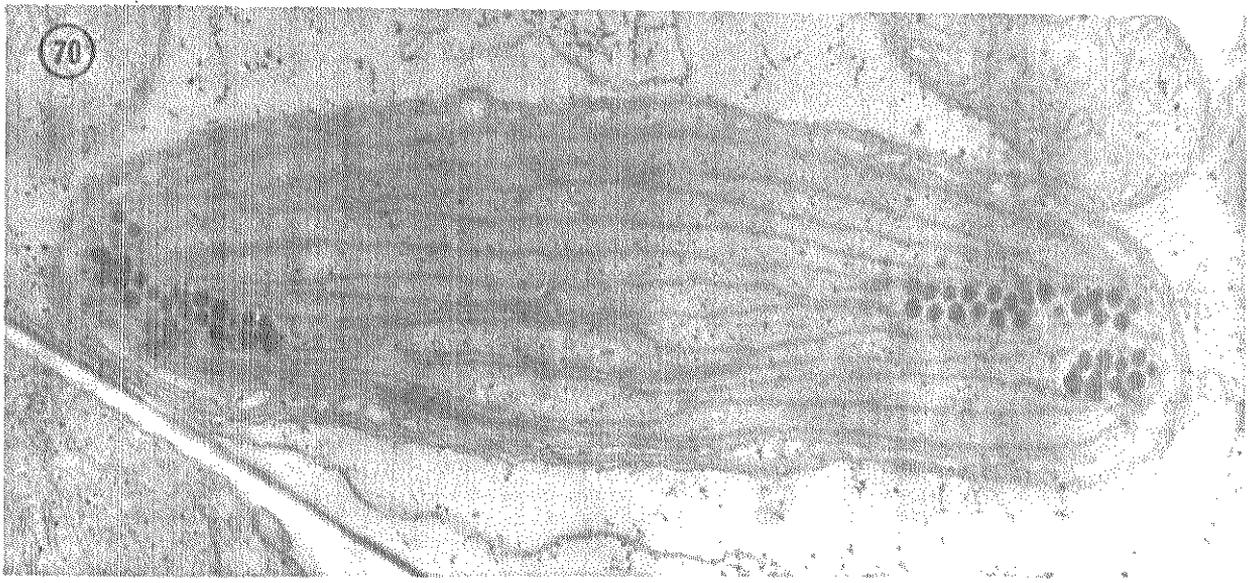
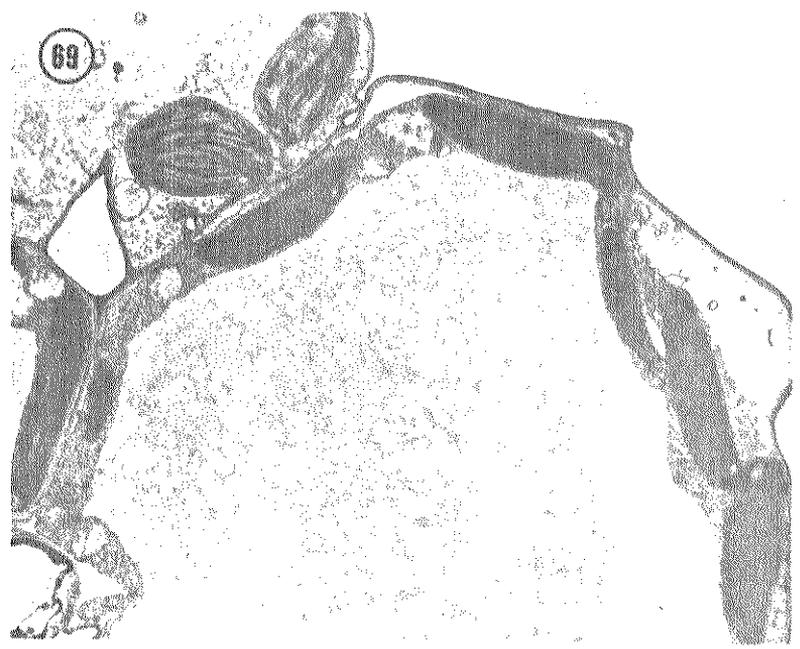
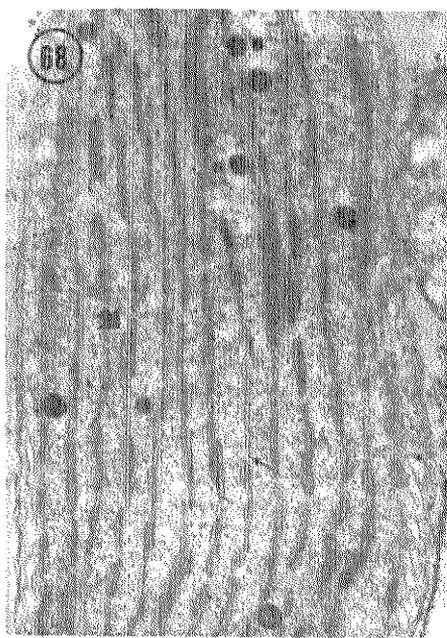
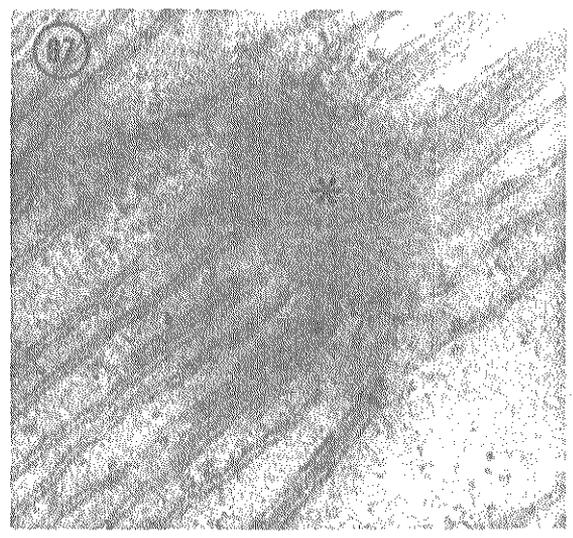
Figuras 63 e 64. Plastídeos do mutante luteus II desenvolvido sob intensidade luminosa de 10000 lux. Figura 63. Plastídeo do mesófilo com sistema lamelar anormal apresentando lamelas simples e alguns grana rudimentares. Notar algumas lamelas descontínuas e plastoglôbulos distribuídos no estroma. 54000 X. Figura 64. Secção de célula da bainha vascular mostrando plastídeos com sistema lamelar pouco desenvolvido, semelhantes aos observados nesse mutante desenvolvido nas outras condições de crescimento. Notar acúmulo de plastoglôbulos (seta). pc, parede celular; vc, vacúolo. 9800 X.

Figura 65. Secção de célula do mesófilo de planta normal desenvolvida em condições de 10000 lux mostrando um cloroplasto normal, com sistema lamelar bem desenvolvido, aparentemente em divisão. 17200 X.



Figuras 66, 67 e 69. Micrografias eletrônicas de seções de células de plantas normais, controle do mutante luteus II, desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux. Figura 66. Cloroplasto do mesófilo com sistema lamelar bem desenvolvido. 15500 X. Figura 67. Porção de um cloroplasto da bainha vascular mostrando ocorrência de corpo pró-lamelar (\*) de onde partem lamelas que ocasionalmente se juntam para formar grana rudimentares. 95000 X. Figura 69. Seção de células da bainha vascular e mesófilo onde podem ser observados cloroplastos alongados típicos da bainha vascular e cloroplastos típicos do mesófilo. 6300 X.

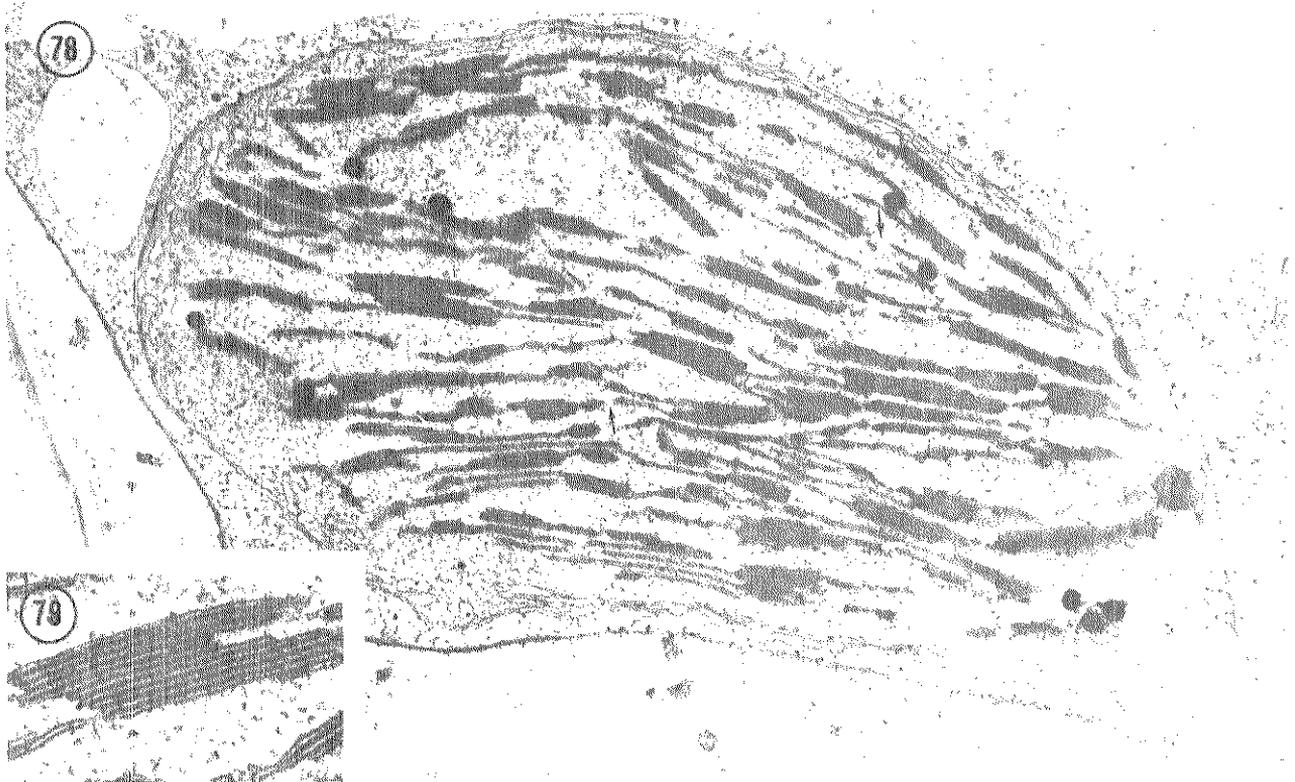
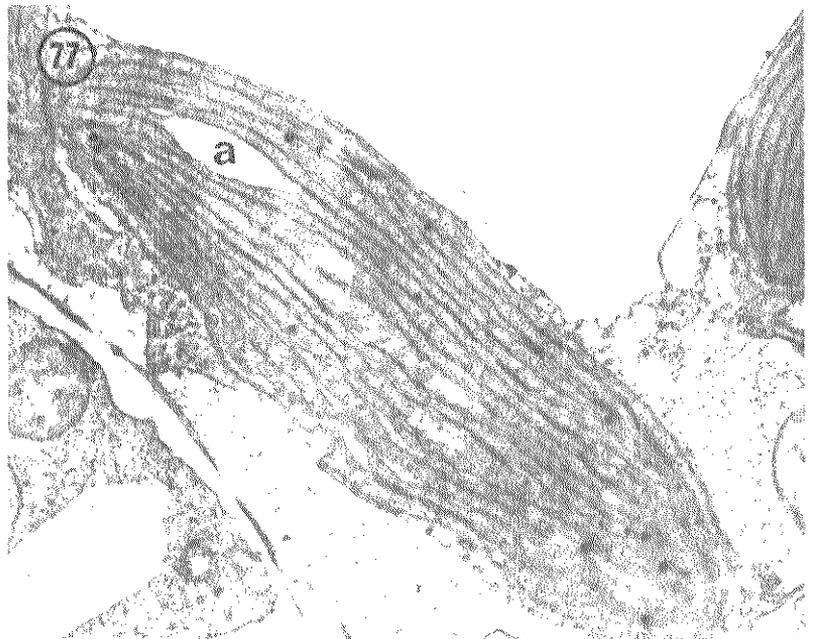
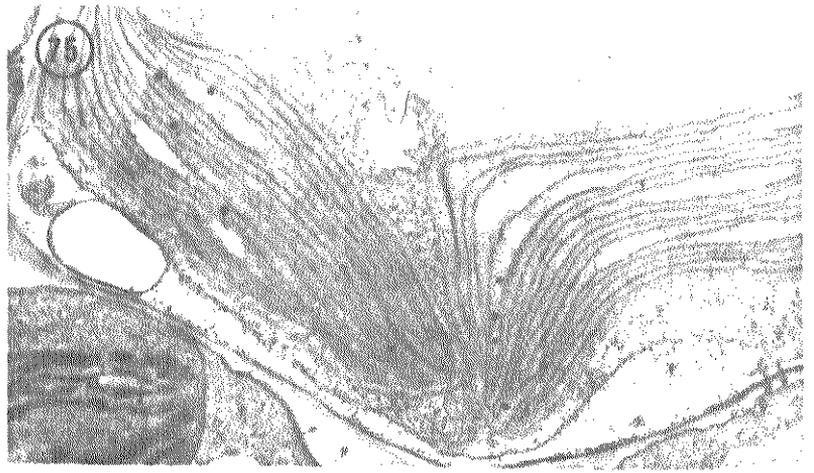
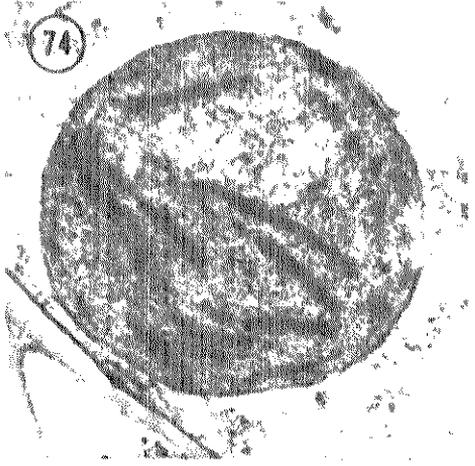
Figuras 68 e 70. Cloroplastos do mutante luteus II desenvolvido em condições de 25-30 lux. Figura 68. Cloroplasto do mesófilo onde podem ser observados grana pouco desenvolvidos ( → ) e algumas lamelas descontínuas ( ➡ ). Podem ser observados plastoglôbulos distribuídos no estroma. 24000 X. Figura 70. Cloroplasto da bainha vascular do mutante luteus II onde podem ser observadas lamelas distribuídas longitudinalmente que se juntam em algumas regiões formando grana com aproximadamente 2-4 tilacóides. Notar plastoglôbulos acumulados em várias regiões do estroma. 38500 X.



Figuras 71 - 73. Secções de diferentes regiões de folhas de plantas normais da linhagem que segrega o mutante luteus II desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 71. Plastídeos da base da folha apresentando grana rudimentares. 32000 X. Figura 72. Secção de células da bainha vascular e mesófilo da região mediana da folha onde podem ser observados cloroplastos dimorfos, típicos dessas células. Notar ocorrência de grana rudimentares nos cloroplastos da bainha vascular (setas). 33000 X. Figura 73. Cloroplastos de células da bainha vascular e mesófilo da região mediana da folha, apresentando sistema lamelar bem desenvolvido. a, amido. 21000 X.

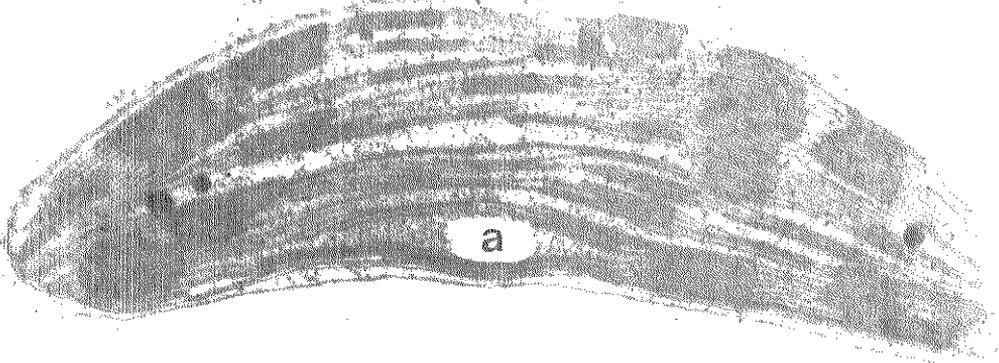


Figuras 74 - 79. Micrografias eletrônicas de plastídeos de diferentes regiões da folha do mutante luteus II desenvolvido sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 74. Plastídeo da base da folha com grana rudimentares. 28500 X. Figura 75. Cloroplasto da bainha vascular da região mediana da folha, apresentando morfologia típica. 17500 X. Figura 76. Cloroplasto do mesófilo da região mediana da folha com sistema lamelar pouco desenvolvido e arranjo desordenado das lamelas. 15500 X. Figura 77. Cloroplasto da bainha vascular da ponta da folha com sistema lamelar bem desenvolvido. 13500 X. Figura 78. Secção da ponta da folha mostrando um cloroplasto do mesófilo com alterações no sistema lamelar. Podem ser observados alguns grana bem desenvolvidos, porém os tilacóides não são uniformes em sua extensão, o que dá uma aparência diferente dos grana observados em cloroplastos de plantas normais. Numerosos grana rudimentares podem ser observados distribuídos pelo estroma. Notar descontinuidades em algumas lamelas (setas). Plastoglôbulos, retículo periférico e envelope podem ser observados. 31000 lux. Figura 79. Detalhe ampliado do cloroplasto da figura anterior mostrando um granum com junção aparentemente normal de tilacóides. 68000 X.

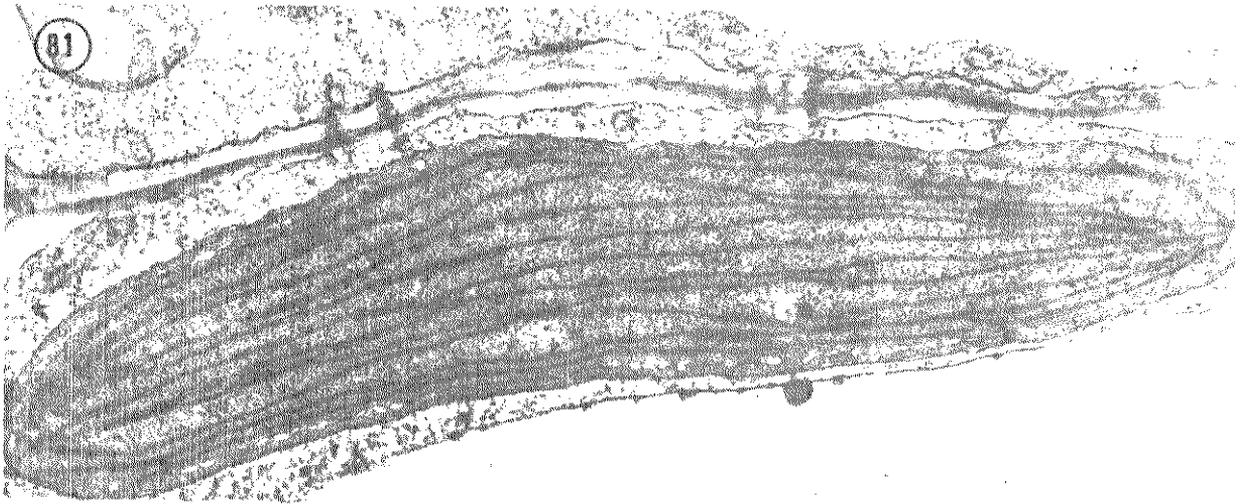


Figuras 80 - 82. Micrografias eletrônicas de secções de células de folhas de plantas normais e do mutante luteus II desenvolvidas sob intensidade luminosa de 10000 lux. Figura 80. Cloroplasto normal típico de células do mesófilo onde podem ser observados grana bem desenvolvidos, lamelas intergrana, retículo periférico, plastoglóbulos e grãos de amido (a). 18000 X. Figura 81. Cloroplasto de planta normal típico da bainha vascular. 16500 X. Figura 82. Cloroplastos de células da bainha vascular e mesófilo do mutante luteus II. O cloroplasto da bainha vascular é aparentemente normal. O cloroplasto do mesófilo apresenta sistema lamelar alterado, de modo semelhante ao observado para os cloroplastos desse mutante desenvolvido em condições de 1000 lux, com grana pouco desenvolvidos. 16000 X.

80



81



82



Figuras 83 - 86. Micrografias eletrônicas de cloroplastos de plantas normais e do mutante luteus II desenvolvidos no campo.

Figura 83. Porção de um cloroplasto normal típico de células do mesófilo. 23000 X. Figura 84. Cloroplasto da bainha vascular de folha de planta normal apresentando numerosas lamelas que ocasionalmente se juntam para formar pequenos grana. Plastoglôbulos e grãos de amido estão presentes. 16500 X. Figura 85. Cloroplasto da bainha vascular do mutante luteus II mostrando sistema lamelar pouco desenvolvido e sem formar grana. Plastoglôbulos podem ser observados. 19500 X. Figura 86. Cloroplasto do mesófilo do mutante luteus II com sistema lamelar bem menos desenvolvido do que o observado nos cloroplastos das plantas normais e nos cloroplastos desse mutante desenvolvidas em outras condições de luminosidade. Podem ser observadas algumas lamelas que ocasionalmente se juntam para formar grana. 28800 X.

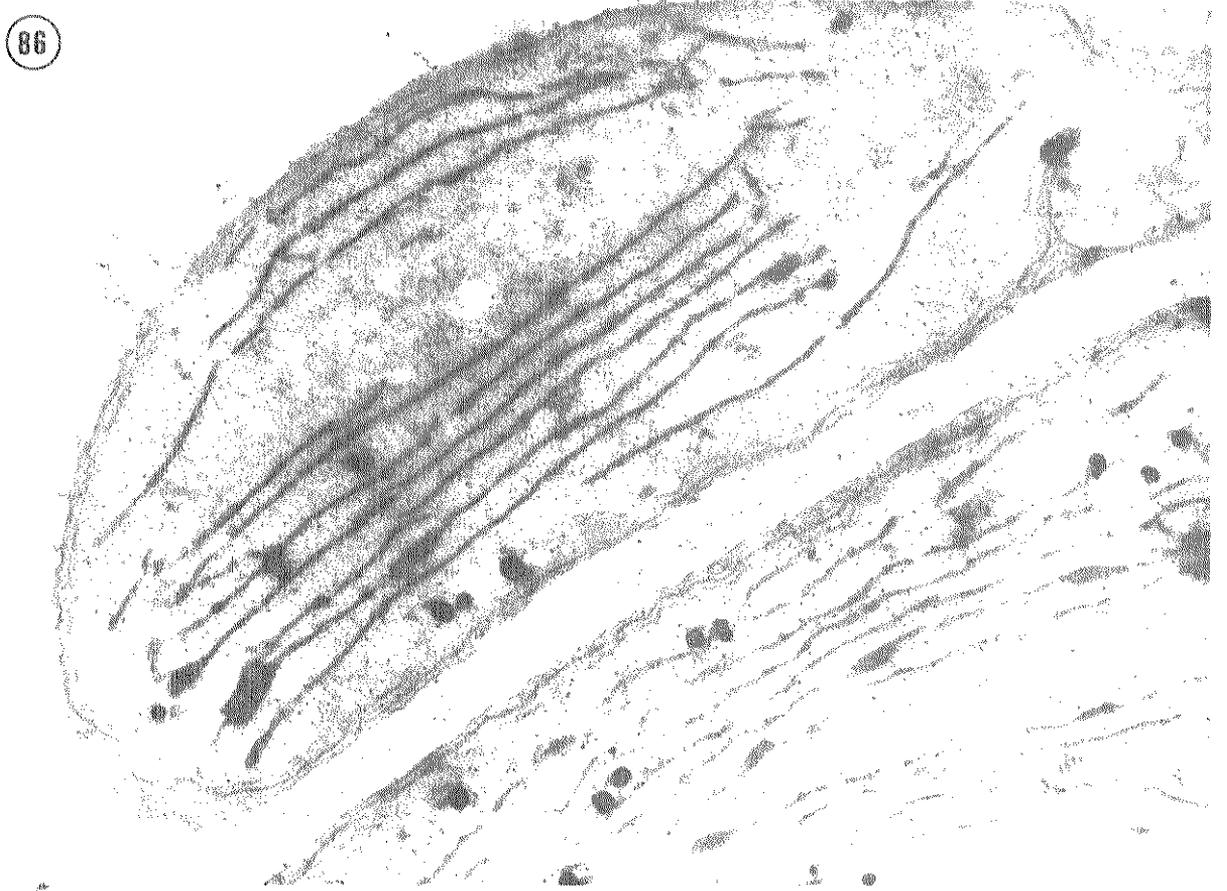
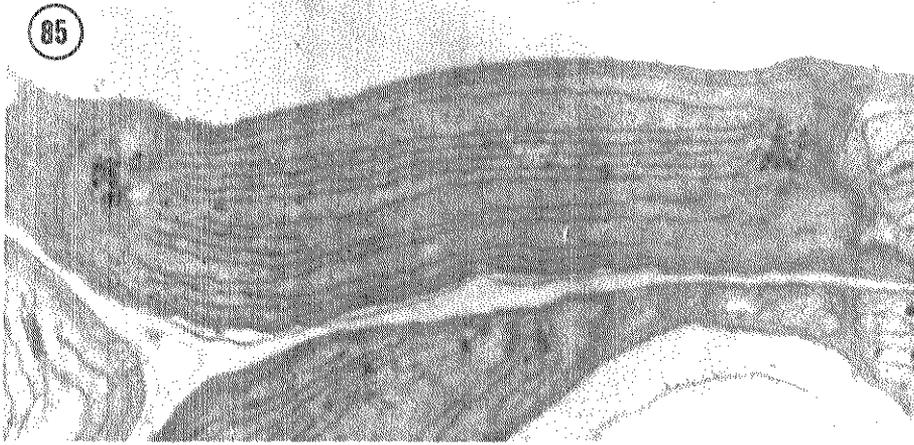
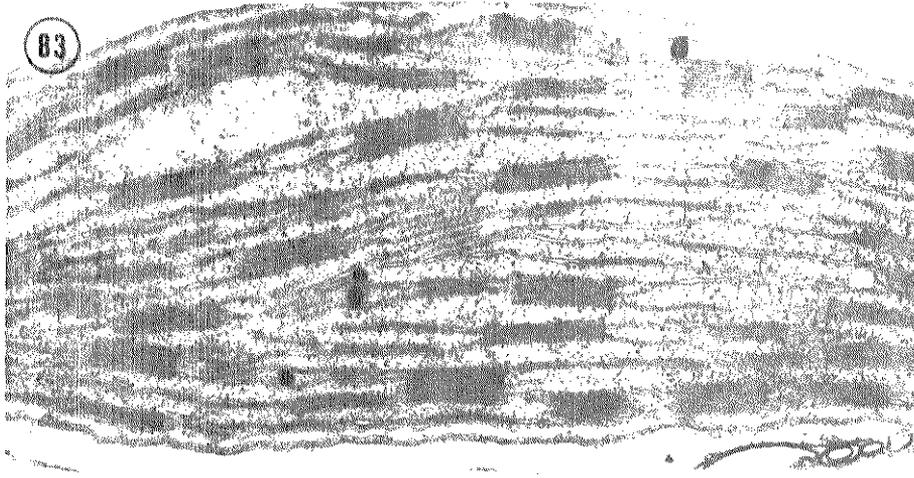


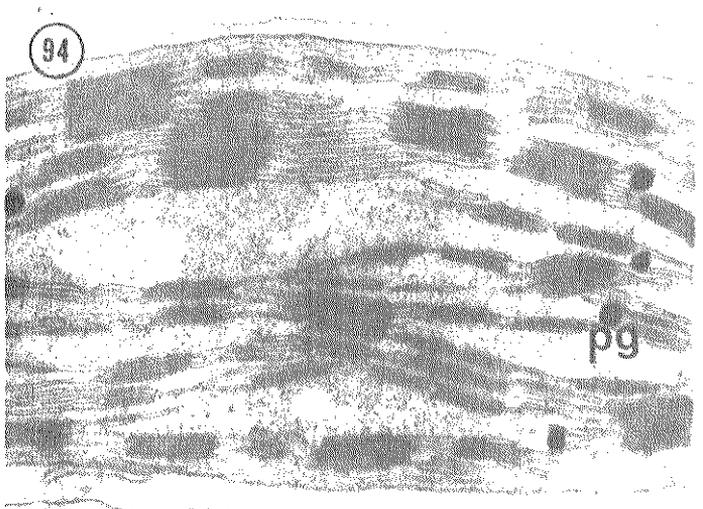
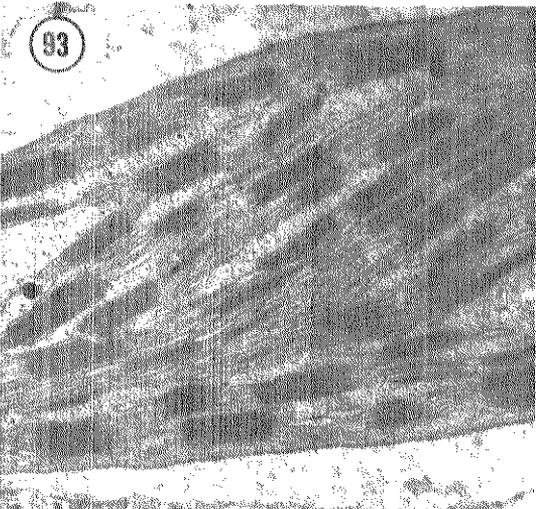
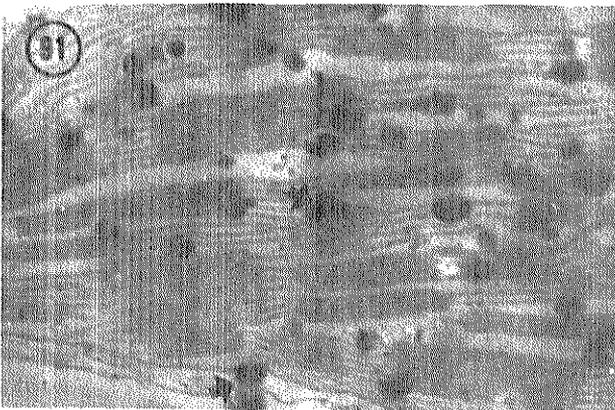
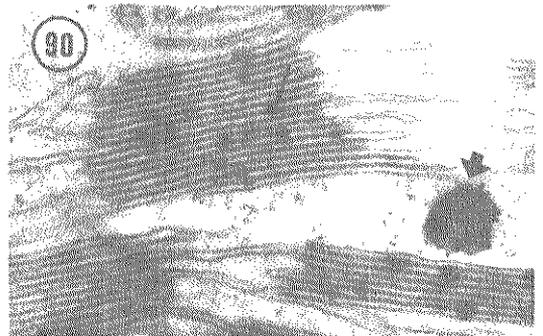
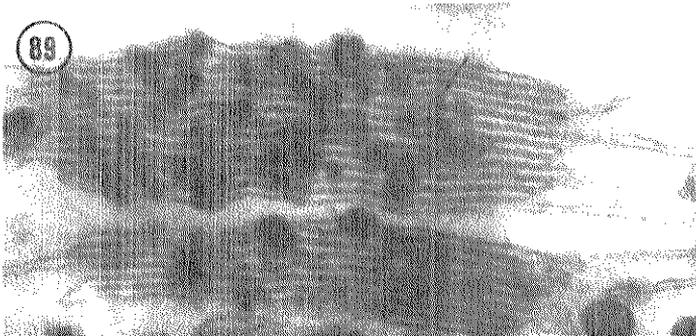
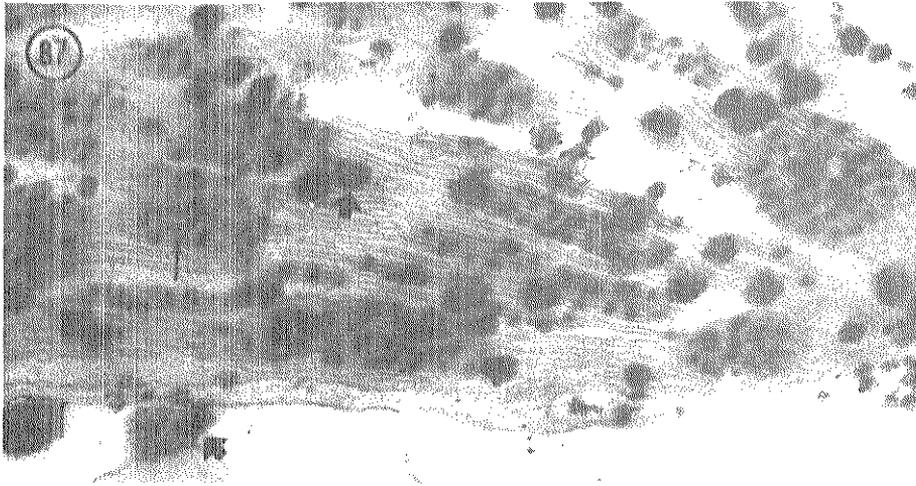
Figura 87 - 90. Micrografias eletrônicas de porções de cloroplastos de plantas normais incubadas em mistura de reação completa para localização citoquímica de atividade do fotossistema II. Figura 87. Cloroplasto do mesófilo onde podem ser observados produtos de reação na forma de depósitos densos localizados nos grana ( → ). Precipitados no estroma e no citoplasma ( ◆ ) representam produtos de reação não específica. 46000 X. Figura 88. Produtos de reação nos grana rudimentares ( → ) e precipitados não específicos no estroma ( ◆ ) podem ser observados em cloroplasto da bainha vascular. 34000 X. Figura 89. Grana de cloroplasto do mesófilo onde podem ser observados depósitos arredondados que aparentemente se originam nas partições e se estendem para os lóculos ( → ). 77500 X. Figura 90. Depósitos alongados podem ser observados nas partições ( → ). Ocorrência de precipitado não específico ( ◆ ) no estroma. 70000 X.

Figura 91. Controle com DCMU após 30 min. de exposição à luz com precipitados não específicos ( ◆ ) distribuídos no estroma e também no citoplasma. 42000 X.

Figura 92. Controle mantido no escuro com precipitados não específicos distribuídos no estroma ( ◆ ). 47500 X.

Figura 93. Controle sem ferricianeto de potássio após 30 min. de exposição à luz sem precipitados. Ocorrência de plastoglobulos distribuídos no estroma. 35000 X.

Figura 94. Controle com tampão fosfato após 30 min. de iluminação. Ausência de precipitados. Plastoglobulos presentes. 37000 X.



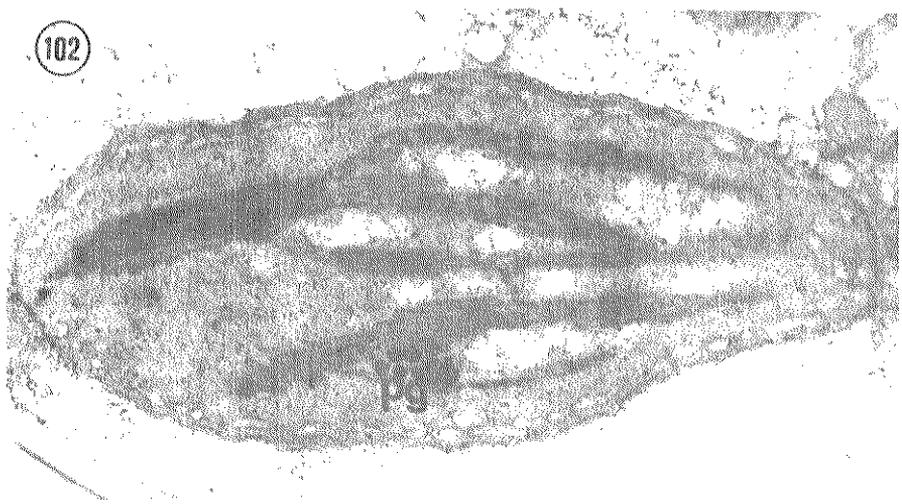
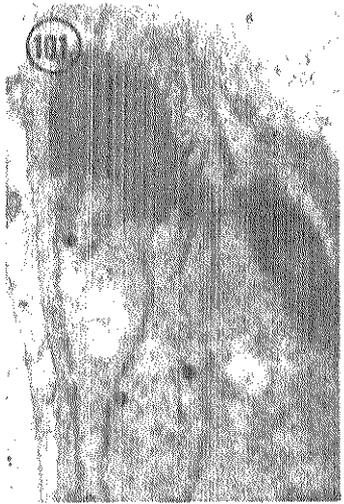
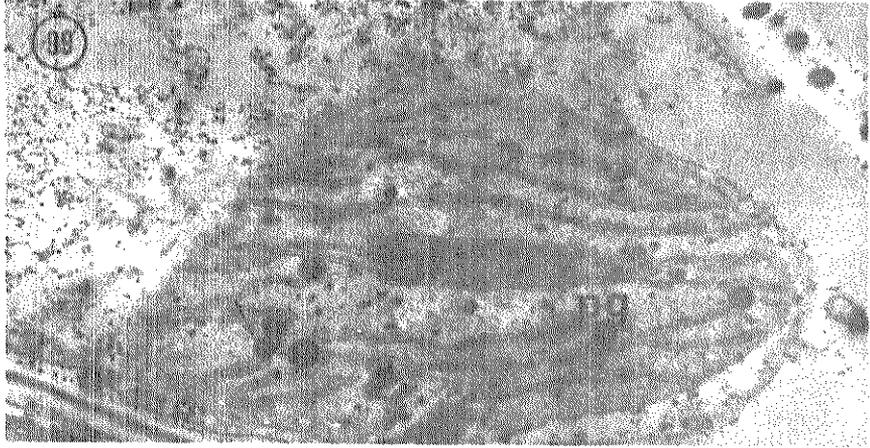
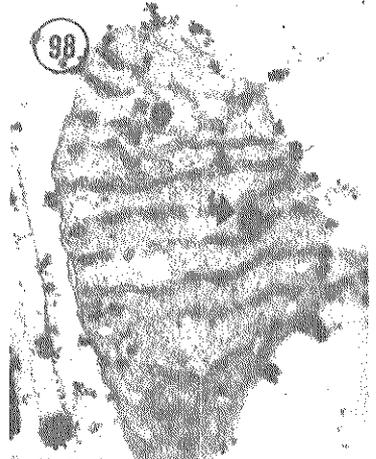
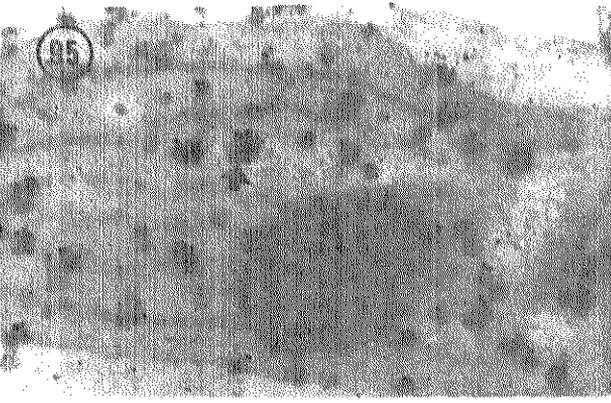
Figuras 95 - 98. Secções mostrando cloroplastos do mutante albino incubados com mistura de reação completa, após 30 min. de exposição à luz. Figura 95. Porção de um cloroplasto onde podem ser observados produtos de reação específica ( → ) em um granum e precipitados não específicos distribuídos no estroma ( ➡ ). 32000 X. Figura 96. Ocorrência de precipitados não específicos no estroma e no citoplasma ( ➡ ) e ausência de produtos de reação nos grana. 36000 X. Figura 97. Ocorrência de precipitados não específicos no estroma ( ➡ ). Notar granum anormal sem produtos de reação específica. 44000 X. Figura 98. Plastídeo com lamelas descontínuas e pouco desenvolvidas mostrando ocorrência de precipitados não específicos no estroma ( ➡ ). Notar também precipitados não específicos no citoplasma. 36000 X.

Figura 99. Controle com DCMU após 30 min. de exposição à luz mostrando a ocorrência de precipitados não específicos ( ➡ ). 37000 X.

Figura 100. Controle mantido no escuro apresentando precipitados não específicos. 29500 X.

Figura 101. Controle sem ferricianeto de potássio após 30 min. de iluminação. 28500 X.

Figura 102. Controle com tampão fosfato após 30 min. de exposição à luz. 32000 X.



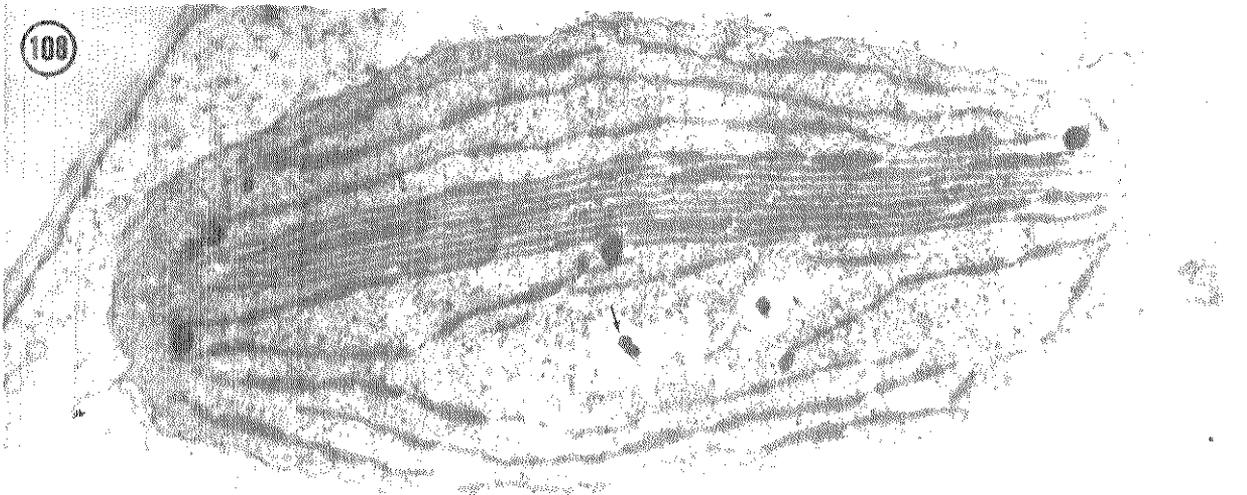
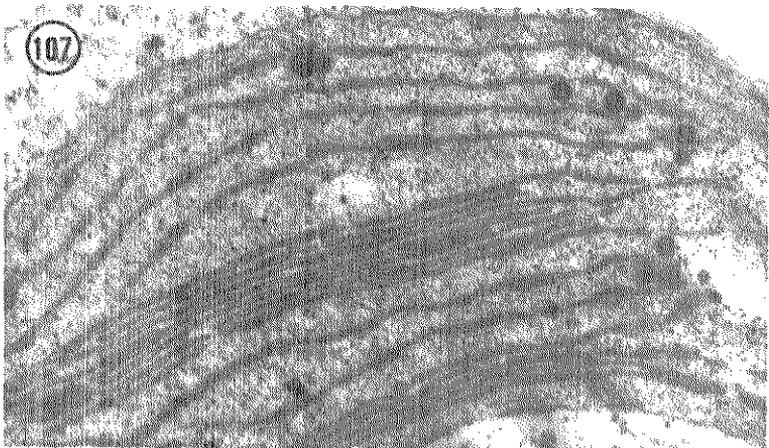
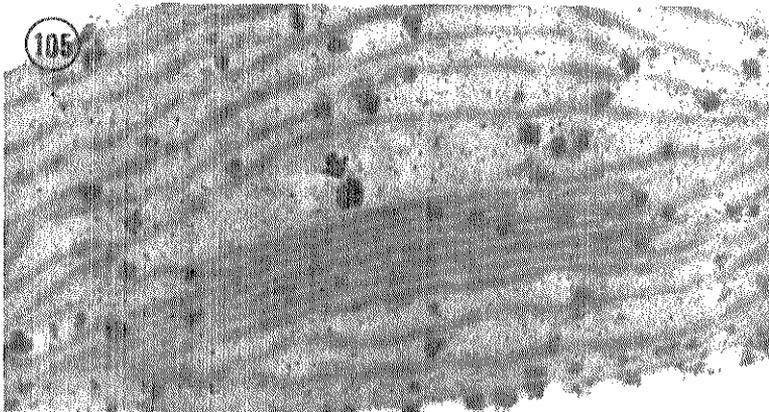
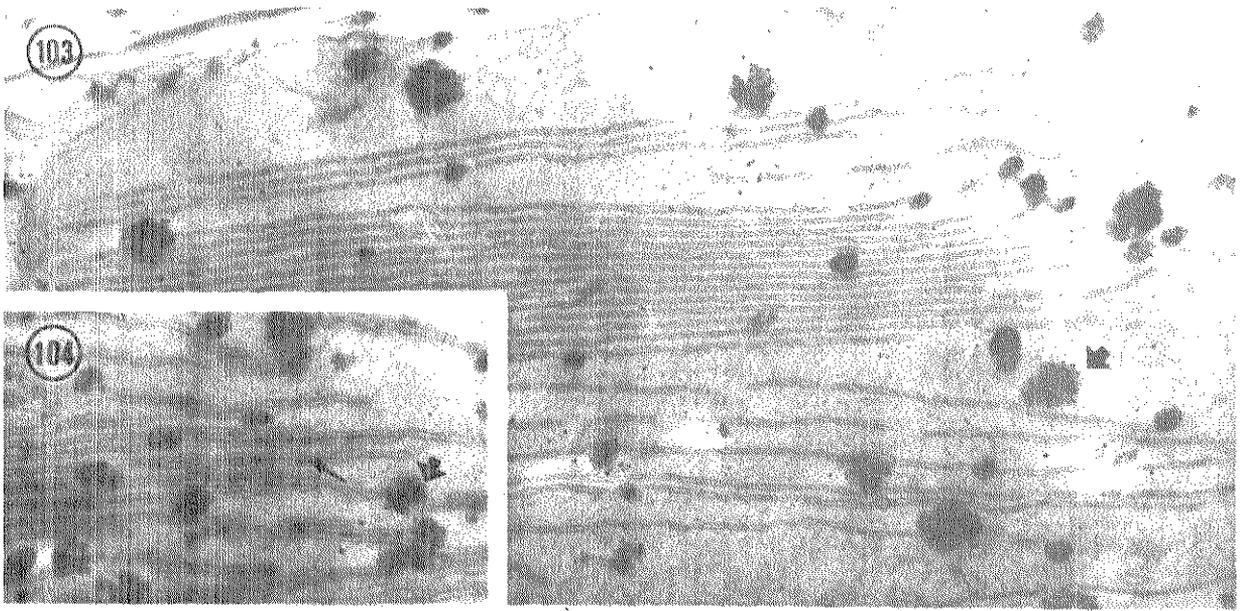
Figuras 103 e 104. Porções de plastídeos do mutante luteus I incubados com mistura de reação completa, após 30 min. de exposição à luz. Figura 103. Plastídeos sem desenvolvimento de grana. Precipitados não específicos podem ser observados no estroma ( ➤ ). 43000 X. Figura 104. Ocorrência de produtos de reação específica nas partições dos grana rudimentares ( → ) e precipitados não específicos espalhados no estroma ( ➤ ). 65500 X.

Figura 105. Controle com DCMU após 30 min. de iluminação mostrando ocorrência de precipitados não específicos ( ➤ ) no estroma e fora do cloroplasto. 40500 X.

Figura 106. Controle mantido no escuro mostrando ocorrência de precipitados não específicos ( ➤ ). 39500 X.

Figura 107. Controle sem ferricianeto de potássio, após 30 min. de iluminação. Presença de plastoglôbulos espalhados no estroma. 24000 X.

Figura 108. Controle com tampão fosfato. Notar plastoglôbulos e fibrilas ( → ), possivelmente DNA, distribuídos no estroma. 29500 X.



Figuras 109 e 110. Porções de cloroplastos do mutante *luteus* II incubados com mistura de reação completa, após 30 min. de exposição à luz, mostrando ocorrência de produtos de reação nos grana ( → ) e precipitados não específicos espalhados pelo estroma e citoplasma ( ➡ ). Figura 109. 30000X. Figura 110. 43000 X.

Figura 111. Controle com DCMU após 30 min. de iluminação. Precipitados não específicos espalhados no estroma. 38500 X.

Figura 112. Controle mantido no escuro mostrando a ocorrência de precipitados não específicos. 48000 X.

Figura 113. Controle sem ferricianeto de potássio após 30 min. de iluminação. 21500 X.

Figura 114. Controle com tampão fosfato após 30 min de exposição à luz. 37500 X.

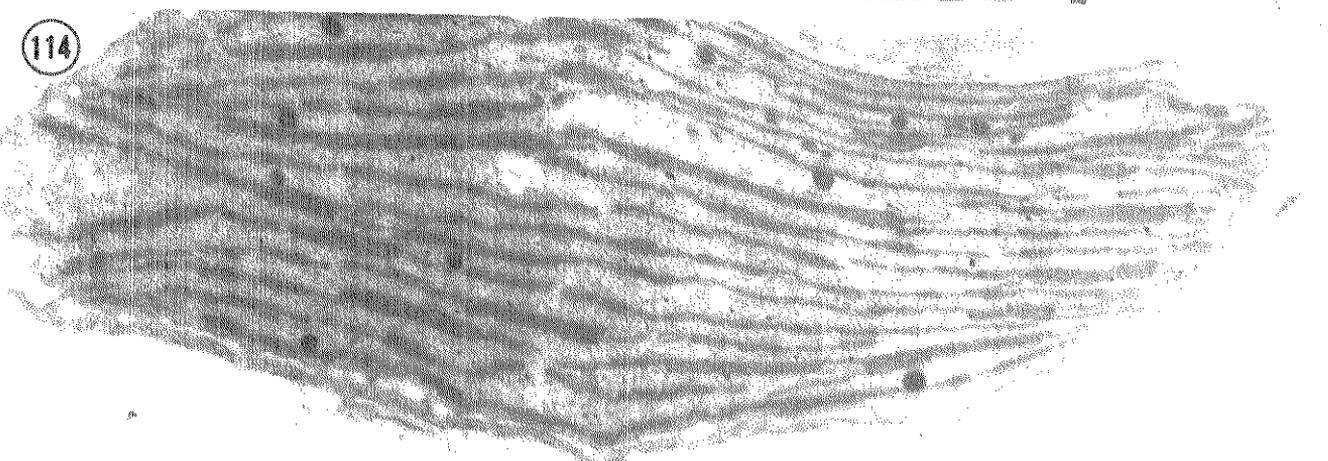
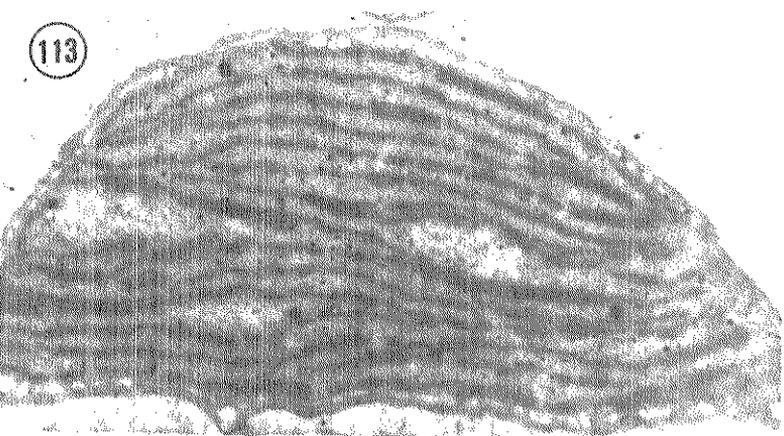
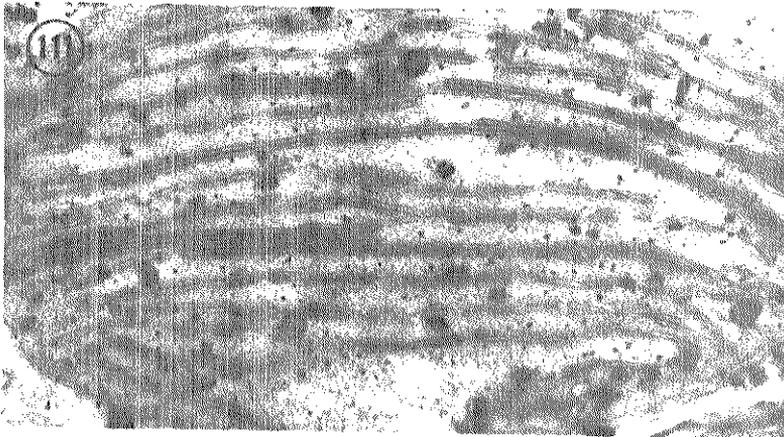
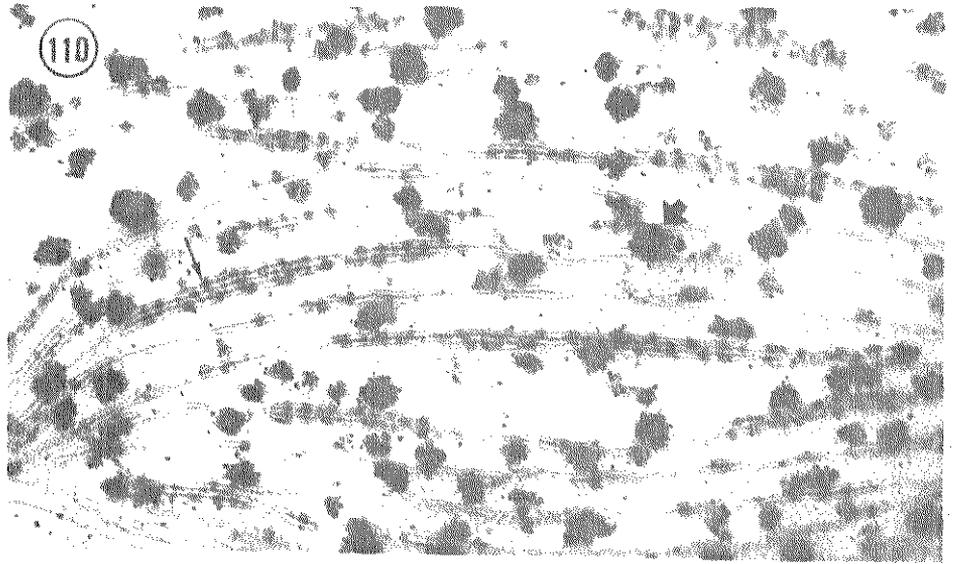
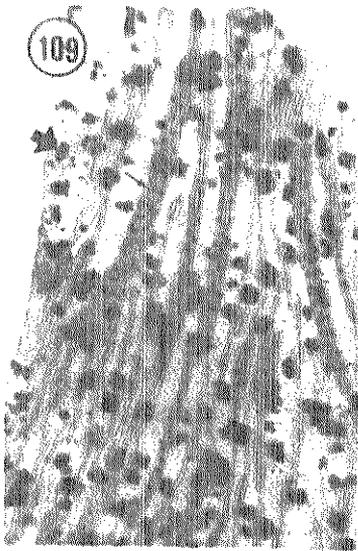
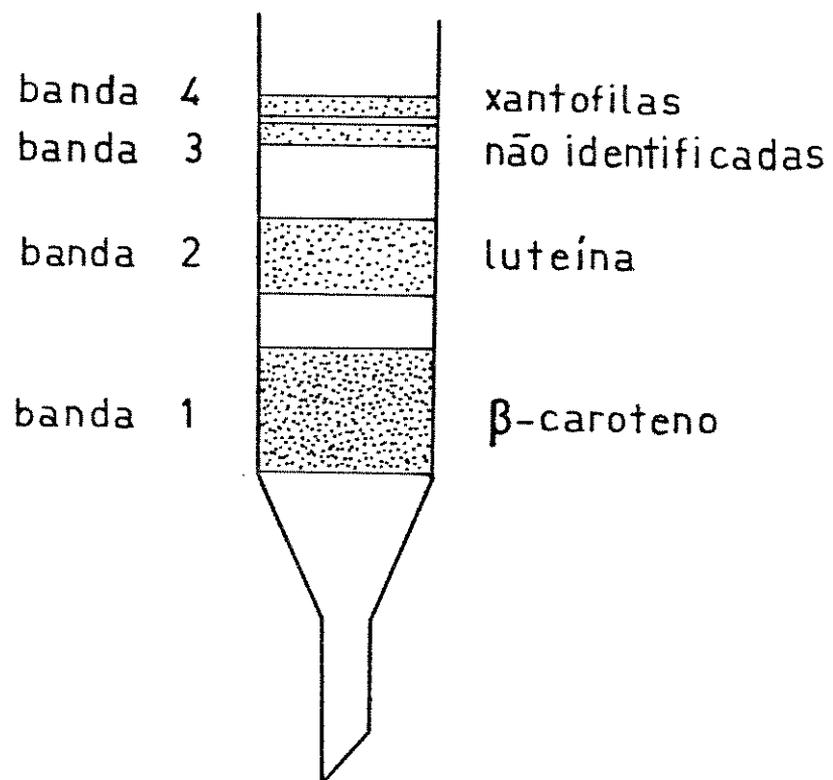
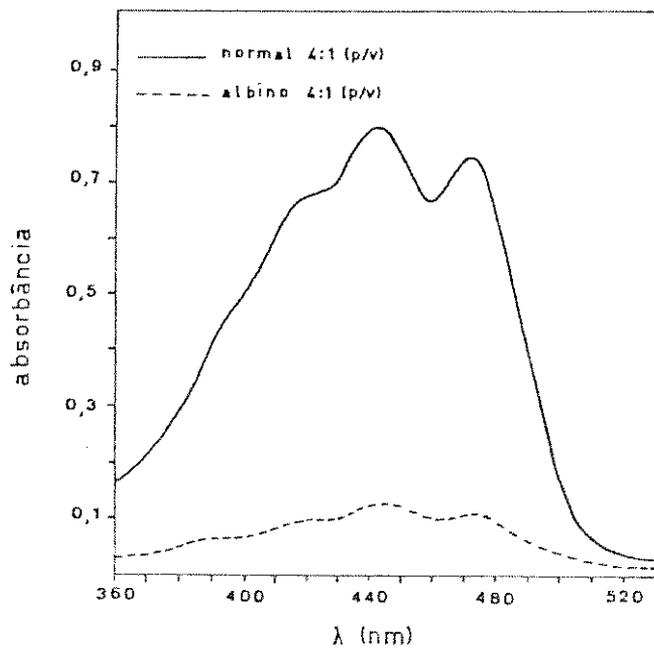
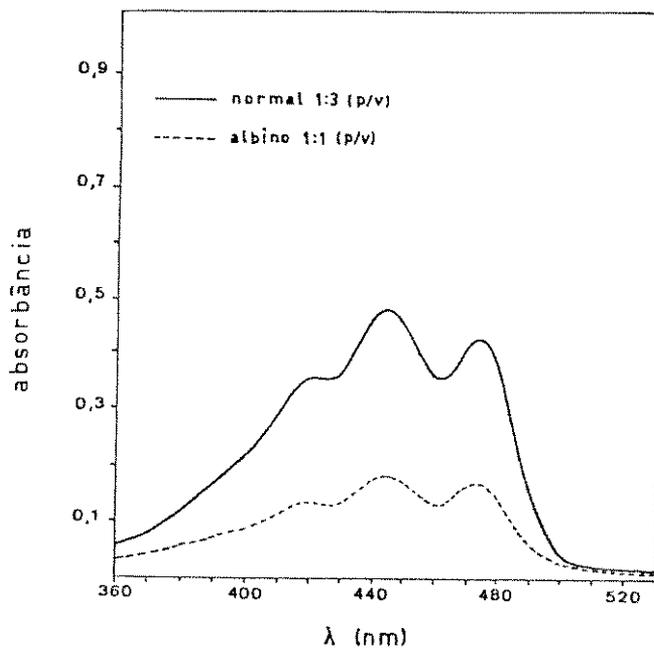
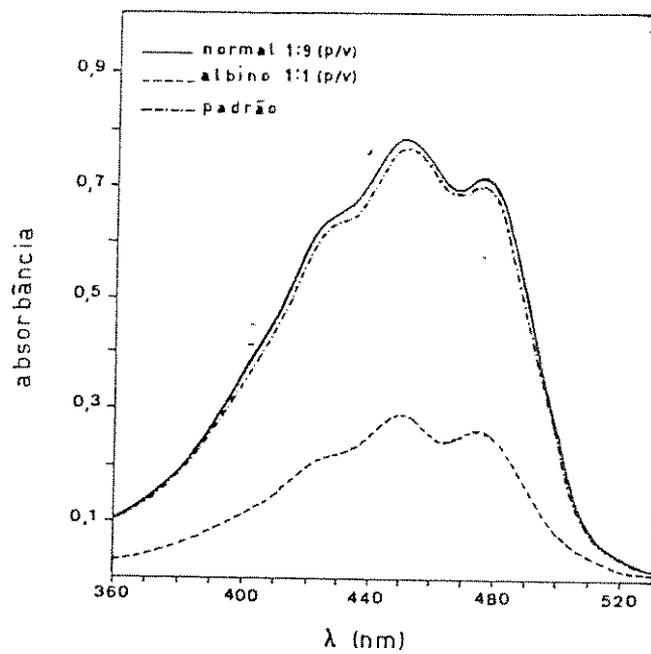


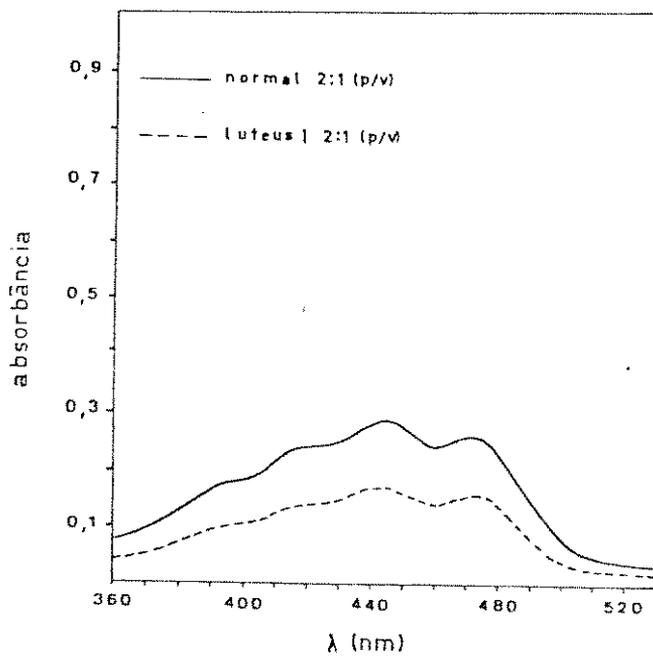
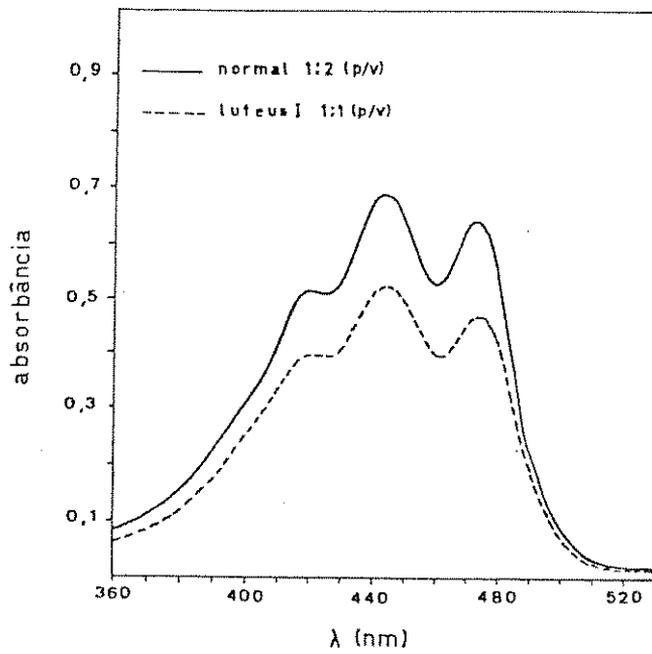
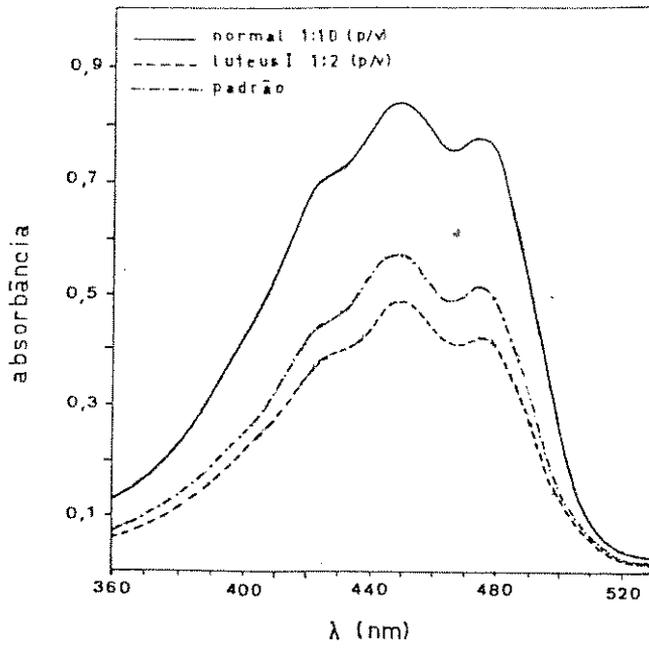
Figura 115. Separação dos carotenóides dos extratos das folhas das plântulas de milho normais e mutantes na coluna de MgO: HyfloSupercel (1:2), eluída sucessivamente com hexano puro e misturas de éter etílico-hexano e acetona-hexano, como descrito no texto (Ítem 4.4.2.).



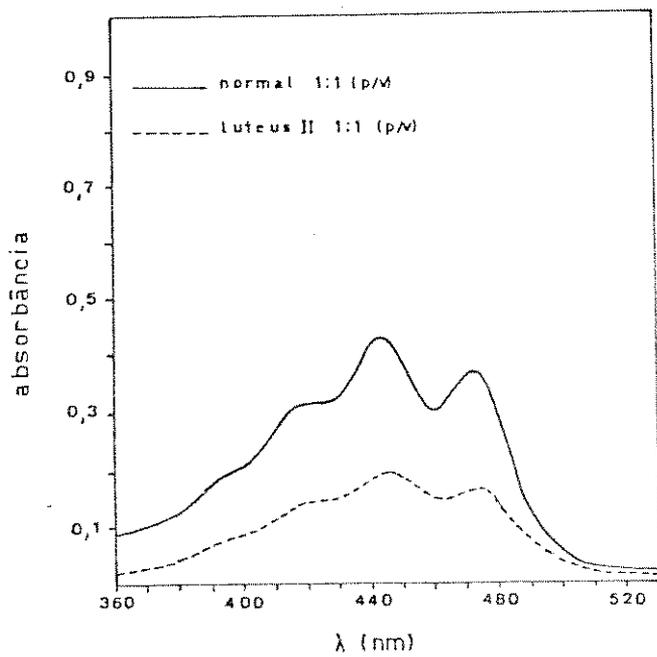
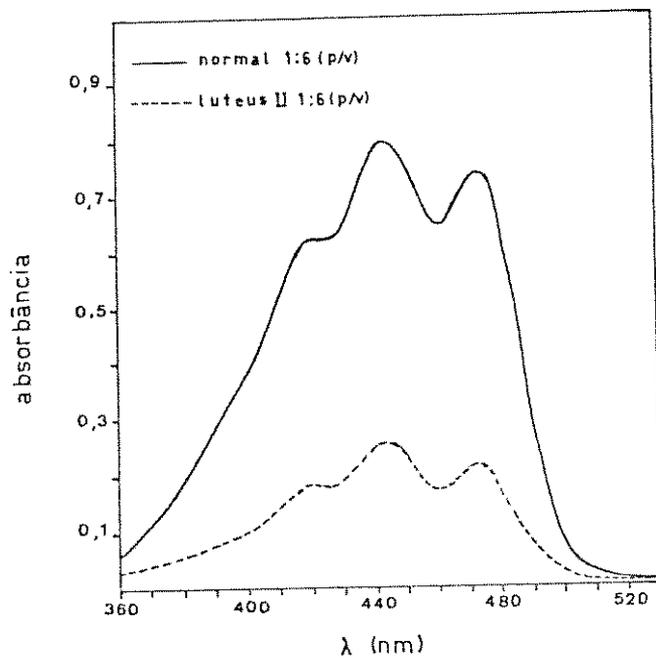
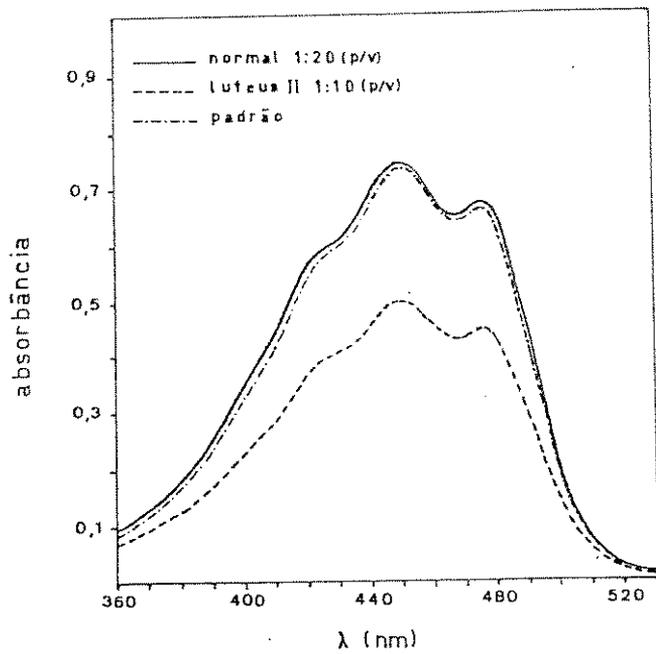
Figuras 116-118. Espectros de absorção dos carotenóides, dissolvidos em hexano, extraídos das folhas das plântulas normais e do mutante albino dissolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 116. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Como padrão foi utilizada uma amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.). Figura 117. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 118. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.



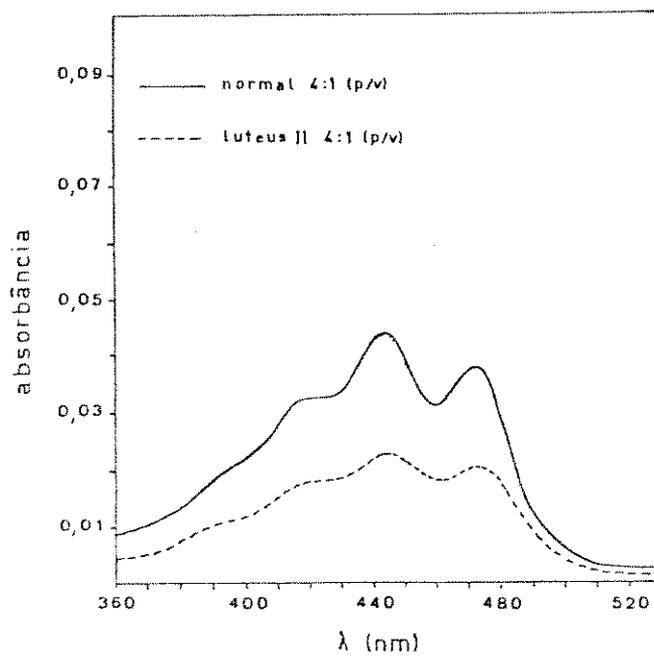
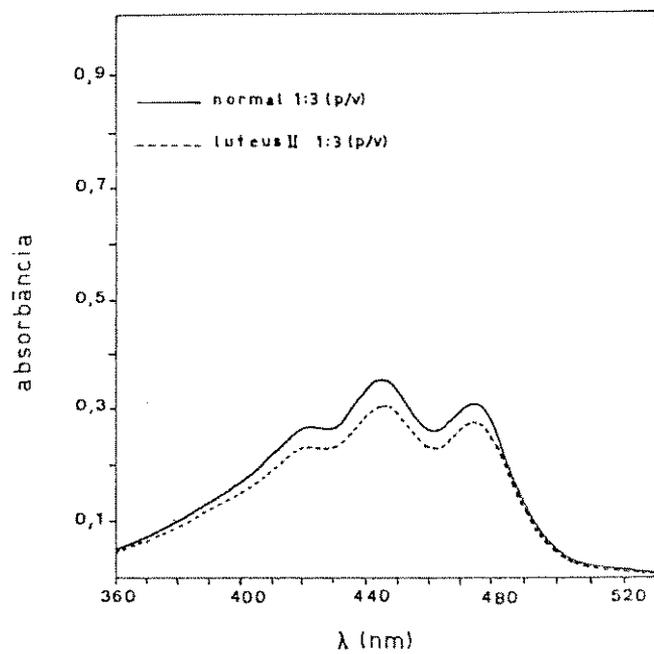
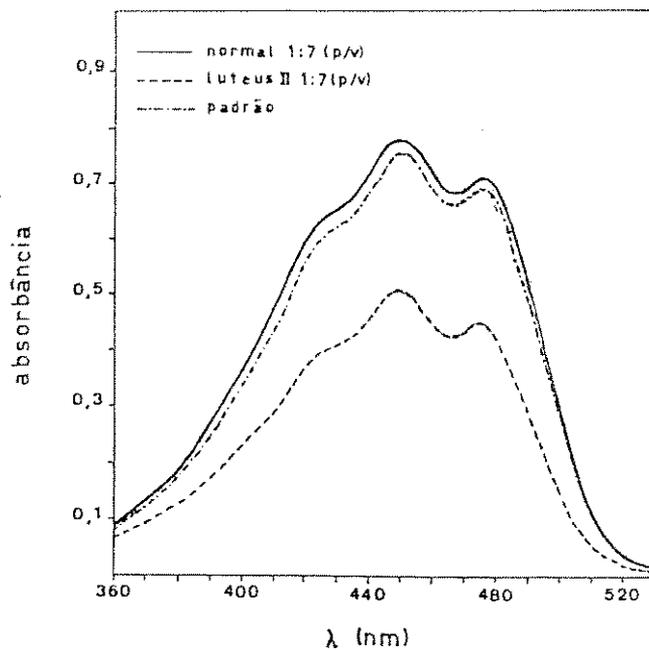
Figuras 119-121. Espectros de absorção dos carotenóides, dissolvidos em hexano, extraídos das folhas das plântulas normais e do mutante luteus I desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 119. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Como padrão foi utilizada uma amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.). Figura 120. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 121. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.



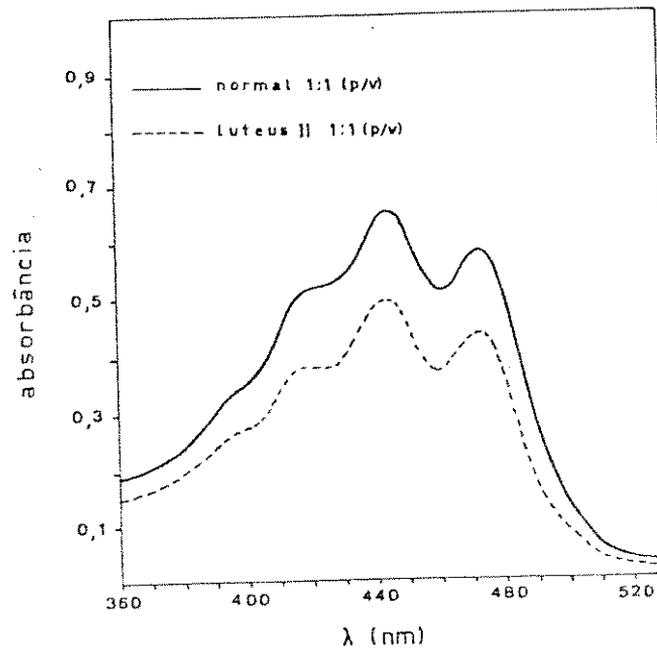
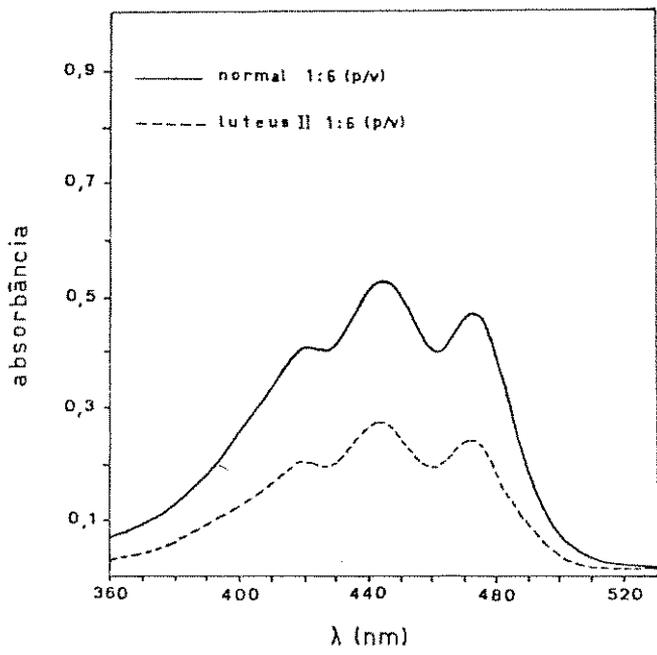
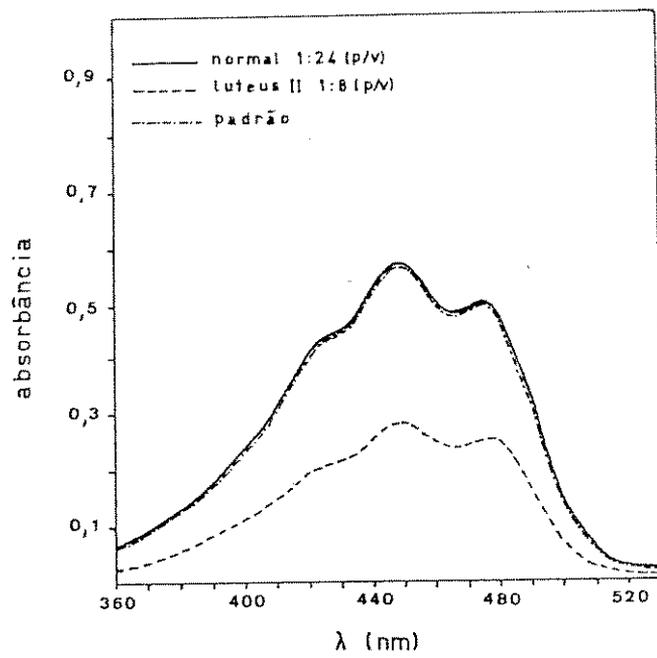
Figuras 122-124. Espectros de absorção dos carotenóides, dissolvidos em hexano, extraídos das folhas das plântulas normais e do mutante luteus II desenvolvidas sob intensidade luminosa de 1000 lux. Figura 122. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Como padrão foi utilizada uma amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.). Figura 123. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 124. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.



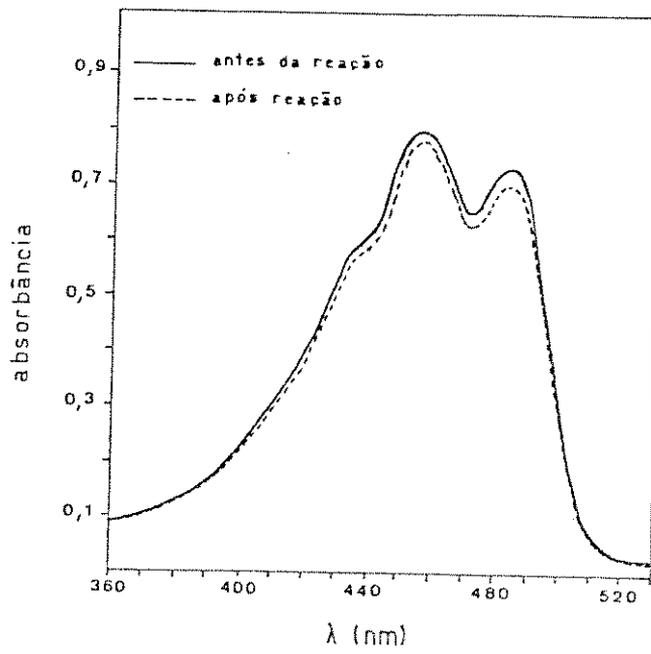
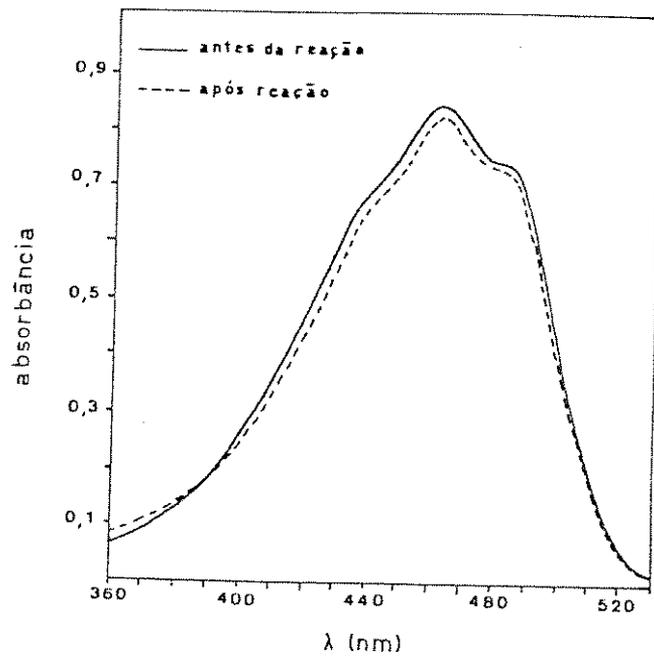
Figuras 125-127. Espectros de absorção dos carotenóides, dissolvidos em hexano, extraídos das folhas das plântulas normais e do mutante luteus II desenvolvidas sob intensidade luminosa de 25-30 lux. Figura 125. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Como padrão foi utilizada uma amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.). Figura 126. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 127. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.



Figuras 128-130. Espectros de absorção dos carotenóides, dissolvidos em hexano, extraídos das folhas das plântulas normais e do mutante luteus II desenvolvidas no campo. Figura 128. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Como padrão foi utilizada uma amostra de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Co.). Figura 128. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 127. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.



Figuras 131 e 132. Espectos de absorção de carotenóides presentes nos extratos das folhas das plântulas normais e dos mutantes albino, luteus I e luteus II, dissolvidos em clorofórmio (—) e após reação de desidratação (-----). Figura 131. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Figura 132. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína.



Figuras 133-135. Espectros de absorção de carotenóides presentes nos extratos das folhas das plântulas normais e dos mutantes albino, luteus I e luteus II, dissolvidos em etanol (—) e após reação com ácido clorídrico para identificação de epóxidos (----). Figura 133. Pigmento correspondente à banda 1 da coluna cromatográfica, identificado como  $\beta$ -caroteno. Figura 134. Pigmento correspondente à banda 2 da coluna cromatográfica, identificado como luteína. Figura 135. Mistura de xantofilas não identificadas, correspondentes às bandas 3 e 4 da coluna cromatográfica.

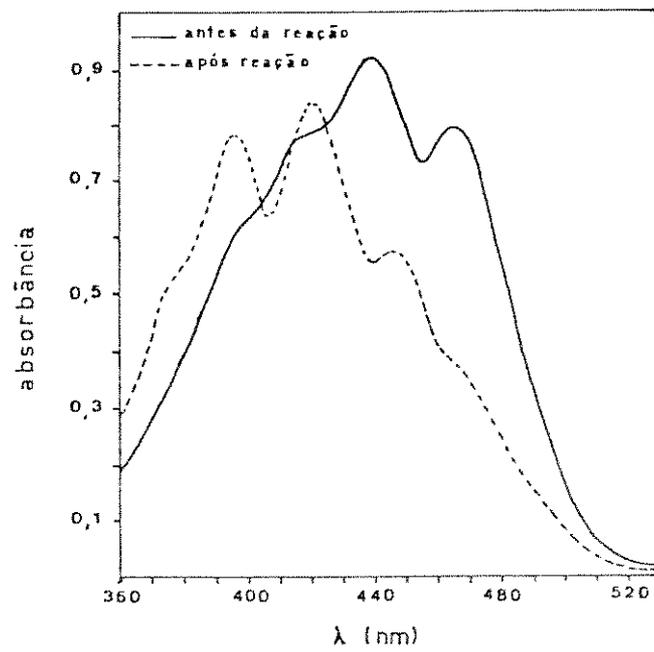
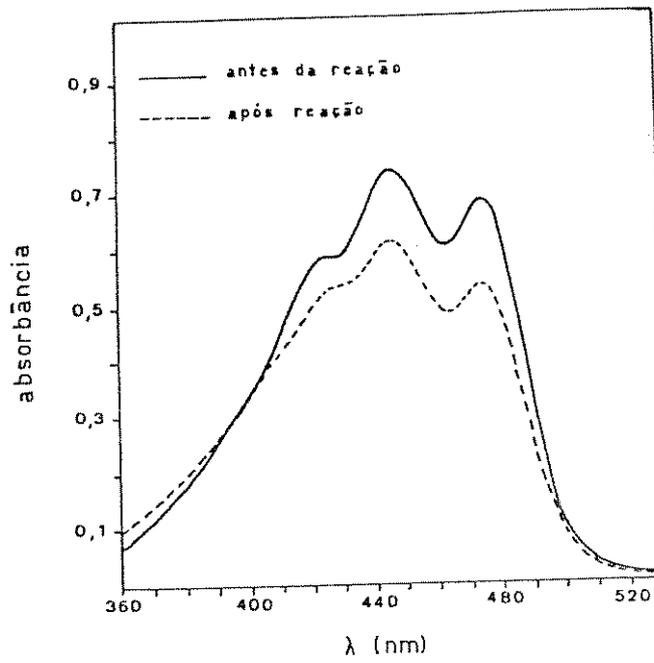
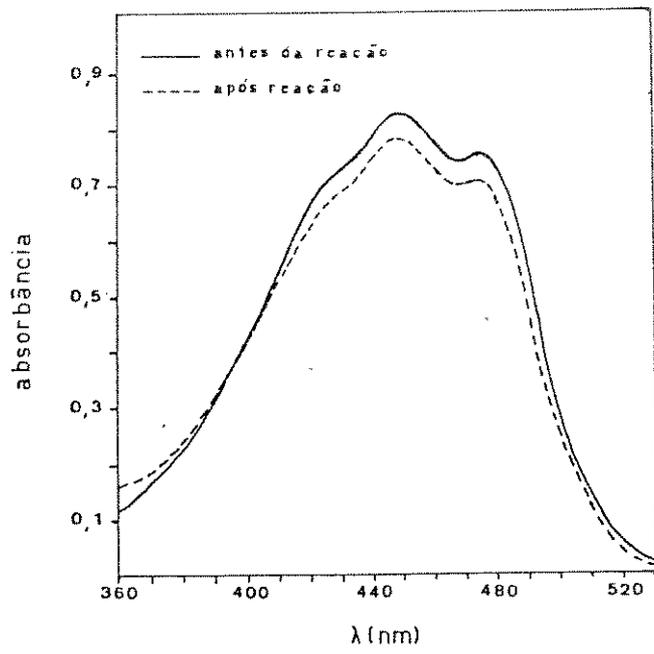


TABELA 1 - Conteúdo de protoclorofila e clorofila (mg/g. peso fresco) em extratos de folhas de plantas normais e mutantes desenvolvidas em intensidade luminosa de 25 - 30 lux.\*

MATERIAL	PROTOCLO	CLOROFI			CLOR.a/
	ROFILA	LA TOTAL	CLOROFILA a	CLOROFILA b	CLOR.b
Normal	0,045	0,265	0,168	0,097	1,73
Albino	0,009	0,024	0,014	0,010	1,40
Normal	0,036	0,264	0,171	0,093	1,84
Luteus I	0,012	0,006	0,004	0,002	2,00
Normal	0,041	0,255	0,163	0,092	1,77
Luteus II	0,026	0,202	0,137	0,065	2,10

(\*) Média de 5 repetições.

TABELA 2 - Conteúdo de protoclorofila e clorofila (mg/g peso fresco) em extratos de folhas de plantas normais e mutantes desenvolvidas em intensidade luminosa de 1.000 lux.\*

MATERIAL	PROTOCLO	CLOROFI			CLOR.a/
	ROFILA	LA TOTAL	CLOROFILA a	CLOROFILA b	CLOR.b
Normal	0,086	0,680	0,420	0,260	1,61
Albino	0,013	0,065	0,036	0,027	1,28
Normal	0,080	0,610	0,374	0,236	1,58
Luteus I	0,003	0,019	0,013	0,006	2,16
Normal	0,126	0,853	0,531	0,322	1,65
Luteus II	0,051	0,331	0,206	0,124	1,66

(\*) Média de 5 repetições.

TABELA 3 - Conteúdo de protoclorofila e clorofila (mg/g peso fresco) em extratos de folhas de plantas normais e mutantes desenvolvidas em intensidade luminosa de 10.000 lux.\*

MATERIAL	PROTOCLO	CLOROFI			GLOR.a/
	ROFILA	LA TOTAL	CLOROFILA a	CLOROFILA b	GLOR.b
Normal	0,104	0,669	0,415	0,254	1,63
Albino	0,011	0,059	0,034	0,025	1,36
Normal	0,097	0,615	0,375	0,240	1,56
Luteus I	0,005	0,018	0,012	0,006	2,00
Normal	0,133	0,837	0,523	0,314	1,66
Luteus II	0,050	0,325	0,208	0,117	1,77

(\*) Média de 5 repetições.

TABELA 4 - Conteúdo de protoclorofila e clorofila (mg/g peso fresco) em extratos de folhas de plantas normais e mutante luteus II desenvolvidas em condições de campo.\*

MATERIAL	PROTOCLO	CLOROFI-			GLOR.a/
	ROFILA	LA TOTAL	CLOROFILA a	CLOROFILA b	GLOR.b
Normal	0,129	1,002	0,634	0,368	1,72
Luteus II	0,024	0,131	0,087	0,044	1,97

(\*) Média de 5 repetições.

TABELA 5 - Carotenóides das folhas das plantas normais e mutantes

BANDA (CROMATOGRAFIA EM COLUNA)	PICOS DE ABSORÇÃO MÁXIMA		CLOROFÓRMIO	VALORES Rf-SÍLICA GEL*				OUTROS CRITÉRIOS PARA IDENTIFICAÇÃO.	IDENTIFICAÇÃO
	HEXANO	ETANOL		1	2	3	4		
1	(425), 449, 476	(427), 449, 475	(435), 461, 485	0,70	0,95	0,95	0,95	Acetilação- Metilação- Desidratação- Teste epóxidos-	β-caroteno
2	420, 445, 474	422, 445, 473	435, 456, 485	0,14	0,40	0,40	0,40	Acetilação+ Metilação+ Desidratação- Teste epóxidos-	Luteína
3 e 4	(395), 415, 443, 472	(393), 415, 438, 465	-	0	0,28	0,28	0,28	Acetilação+ Teste epóxidos+	-
β-caroteno (padrão)	(425), 449, 476	(427), 449, 475	(435), 461, 485	0,78	0,95	0,95	0,95	-	-

\*. Cromatografia em camada delgada;

1. Carotenóides após cromatografia em coluna. Solvente: Metanol 3% em benzeno;
2. Carotenóides após cromatografia em coluna. Solvente: Benzeno, Acetato de Etila e Metanol (75:20:5);
3. Carotenóides do extrato saponificado correspondentes às bandas da cromatografia em coluna. Solvente: Benzeno, Acetato de Etila e Metanol (75:20:5);
4. Carotenóides do extrato não saponificado. Solvente: Benzeno, Acetato de Etila e Metanol (75: 20:5).

TABELA 6 - Valores de Rf dos carotenóides dos tipos mutantes e normais, antes e após reações de acetilação e metilação, submetidos à cromatografia de camada delgada em placas de sílica gel eluídos com metanol 3% em benzeno.

BANDA (CROMATOGRÁFICA EM COLUNA)	Rf ANTES DA REAÇÃO	Rf APÓS ACETILAÇÃO	Rf APÓS METILAÇÃO
1	0,78	0,78	0,78
2	0,14	0,28 e 0,60	0,32
3	0	0,18	-
4	0	0,08	-

TABELA 7 - Resultados dos testes de identificação de epóxidos por exposição dos carotenóides dos tipos normais e mutantes nas placas de cromatografia à vapores de ácido clorídrico.

BANDA (CROMATOGRÁFICA EM COLUNA)	COR ANTES DA REAÇÃO	COR APÓS REAÇÃO
1	amarela - alaranjada	amarela-alaranjada
2	amarela	amarela
3	amarela	azul
4	amarela	azul

TABELA 8 - Conteúdo de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$  peso fresco) em extra-  
tos de folhas de plantas normais e mutantes desenvol-  
vidas em intensidade luminosa de 1.000 lux.

MATERIAL	CAROTENÓIDES TOTAIS	$\beta$ -CAROTENO	LUTEÍNA	XANTOFILAS NÃO IDENTIFICADAS	<u>CAROT. TOTAIS</u> CLOROF. TOTAL
Normal	33,2	27,3	5,1	0,8	0,048
Albino	1,6	1,0	0,5	0,1	0,024
Normal	37,1	31,8	4,8	0,5	0,060
Luteus I	5,8	3,7	1,9	0,2	0,305
Normal	75,0	57,5	16,0	1,5	0,088
Luteus II	24,7	19,0	5,0	0,7	0,071

TABELA 9 - Conteúdo de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$  peso fresco) em extra-  
tos de folhas de plantas normais e do mutante luteus  
II desenvolvidas em intensidade luminosa de 25 - 30  
lux e condições de campo.\*

MATERIAL	CAROTENÓIDES TOTAIS	$\beta$ -CAROTENO	LUTEÍNA	XANTOFILAS NÃO IDENTIFICADAS	<u>CAROT. TOTAIS</u> CLOROF. TOTAL
Normal	24,9	21,2	3,7	0,04	0,097
Luteus II	16,8	13,3	3,5	0,02	0,085
Normal*	68,4	54,2	11,8	2,40	0,068
Luteus II*	15,9	8,1	6,0	1,81	0,120