

EL FITOCROMO COMO MEDIADOR EN LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENODIDES E INFLUENCIA DE HORMONAS VEGETALES.

Por A.K. Khudairi (1) y O. Arboleda (2)

RESUMEN

En este trabajo se estudió la biosíntesis de licopeno en los cromoplastos del parénquima de frutos de tomate, *Lycopersicum esculentum* Mill. var. *Waltham Forcing*, y se encontró que el fitocromo es mediador en la biosíntesis de licopeno. Unos pocos minutos de luz roja durante el día incrementaron la formación de licopeno. La irradiación con rojo-distante (última parte del límite visible del rojo, 730 nm) no incrementó la biosíntesis. El Rojo-distante aplicado después del rojo anuló el efecto promotor de éste. El contenido del licopeno se duplicó en presencia del ácido abscísico. La maduración se inhibió cuando se aplicó giberelina, kinetina y ácido ascórbico a los tomates verdes. La giberelina (GA_3) fué mas inhibidora que la kinetina en el síntesis de licopeno.

INTRODUCCION

Piringer y Heinze (1954) demostraron la producción de un pigmento amarillo en la cutícula de tomates, var. Rutgers, cuando maduraron en la luz, y su ausencia cuando maduraron en la obscuridad. El pigmento que se desarrolló era controlado por el fitocromo. Encontraron además que la luz roja promovía la producción de un pigmento flavonoide amarillo, mientras que la irradiación con rojo-distante (690nm) inhibía el desarrollo del pigmento. Por otra parte, Dostal y Leopold (1967) demostraron que la giberelina inhibe el desarrollo del color en tomates. En presencia de GA_3 , el contenido de licopeno se redujo y los tomates no alcanzaron el mismo estado de maduración que los controles. Fué por lo tanto interesante investigar el desarrollo del pigmento de los cromoplastos en el parénquima de células de tomates controlados por el fitocromo y en relación con la aplicación de hormonas vegetales.

Nuestras investigaciones revelaron que tanto el desarrollo de los cromoplastos, como la biosíntesis de carotenoides, se incrementaron mediante la luz roja y el ácido abscísico, y se inhibieron por rojo-distante y la giberelina.

Abreviaturas: GA_3 = giberelina A_3 , ABA = ácido abscísico, KIN = kinetina (6 furfurylaminopurina), AA = L-ácido ascórbico, A = absorción.

MATERIALES Y METODOS

En esta investigación se utilizaron frutos de tomate *Lycopersicum esculentum* Mill, var. *Waltham Forcing*. Las semillas se obtuvieron en Waltham Field Station, Waltham Massachusetts. Las plantas de tomate se cultivaron en un invernadero. Se cosecharon tomates verdes bien desarrollados y de tamaño uniforme los cuales se conservaron en un refrigerador para usarlos en los experimentos el próximo día. Se empleó un mínimo de ocho tomates en cada tratamiento.

Las soluciones de hormonas se administraron mediante la inyección de 1 ml de una concentración específica de hormona en el lado estilar del fruto por medio de una jeringa de vidrio, desechable. Las hormonas y las concentraciones respectivas que se emplearon fueron las siguientes: GA_3 $3 \times 10^{-5} M$, kinetina $3.5 \times 10^{-5} M$, ácido abscísico $3 \times 10^{-5} M$, y ácido ascórbico $3 \times 10^{-4} M$. Al grupo control se le inyectó agua destilada dentro de los frutos.

Las hormonas se aplicaron al principio del experimento y cuatro días más tarde. Durante el curso del experimento se conservaron los tomates en una cámara de cultivo a $24^{\circ} C$, en oscuridad total o expuestos a la luz de 20.000 lux suministrada por lámparas fluorescentes y bombillas incandescentes. Se chequeó el grado de maduración de los frutos

(1) Profesor Department of Biology, Northeastern University, Boston, Mass. Estados Unidos.

(2) Profesor Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

después de una y dos semanas desde el comienzo del experimento. Se midieron el licopeno y otros carotenoides por medio de un espectrofotómetro (Spectronic 600) con relación a soluciones de concentraciones conocidas. La identificación de los carotenoides se hizo con base a los picos específicos de absorción (Davies, 1965; Goodwin, 1955).

De cada tomate se cortaron discos de 1 cm de diámetro y 2 mm de espesor por medio de un taladra-corchos y se les extrajo el pigmento con 4 ml de acetona-clorofórmico (1: 1 v/v). Se usó acetona absoluta en todas las extracciones. Antes de extraer los pigmentos, los discos de tomate fueron conservados en un refrigerador durante la noche anterior y luego se colocaron entre papel de filtro para remover el agua congelada. Los pigmentos amarillos fueron más solubles en acetona absoluta. Se encontró que la mezcla de acetona y clorofórmico fué el mejor solvente para extraer los carotenoides. El extracto fué chequeado espectrofotométricamente a 515 nm para licopeno, a 475 nm para neurosporeno y a 365 nm para fitoflueno. Se computaron los valores de la absorción media (A), desviación standard y el error standard de la media. Los experimentos se hicieron por duplicado. Se separaron siete carotenoides de los tomates en maduración por medio de la cromatografía en papel en dos dimensiones. Para la primera dirección se usó como solvente n-propanol-éter de petróleo, punto de ebullición 70-100°C, (1:99 v/v) y para la segunda dirección se usó metanol- acetona- agua- aceite vegetal (10: 2: 1:2 v/v). Se midió el espectro de los pigmentos individuales y totales usando el Spectronic 600.

El efecto del fitocromo se observó irradiando los tomates verdes con luz roja o rojo-distante durante cinco minutos y luego guardándolos en la oscuridad a 24°C. La fuente de luz se obtuvo con lámparas rojas fluorescentes marca Sylvania filtrada a través de un filtro rojo de la marca Rohm and Hass Plexiglas, con un nivel de energía de 2×10^3 erg cm^{-2} seg^{-1} . La luz rojo-distante se obtuvo de bombillas incandescentes filtradas a través de un filtro rojo-distante No. FRF-700 (Weslake Plastics Co. Jenni, Pennsylvania). Se hizo circular agua helada entre las bombillas y el filtro con el fin de impedir elevación de la temperatura. El nivel de energía del rojo-distante fué de 1.3×10^5 erg cm^{-2} seg^{-1} . Se tuvo cuidado de no exponer los tomates a otro tipo de luz durante la irradiación y sólo se usó luz de seguridad verde tenue dentro del cuarto oscuro.

RESULTADOS.

Biosíntesis de carotenoides en los tomates. El proceso de maduración del tomate implica un cambio de color: verde, blanco, amarillo-anaranjado, y rojo. Los cloroplastos pierden sus grana, y se sintetizan carotenoides en forma cristalina dentro de la membrana original del plastidio (Harris and Spurr 1969a y b). La figura 1 muestra el espectro de absorción de extracto de tomates: verde, pintón, amarillo-naranjado y totalmente maduro. En tomates verdes los picos de absorción de la clorofila a 665 y 430 nm son claramente evidentes y pronto desaparecen produciendo un

cambio de color. El cambio de color de verde a pintón está asociado con la desaparición de las clorofilas y la aparición de otro pigmento con un pico a 365 nm (95% de absorción). Los tomates amarillo-naranjado tienen una absorción de 53% a 365 nm con picos que aumentan a 445, 475 y 515 nm (Fig. 1-a). Los tomates completamente maduros los cuales son rojos en color tienen menos absorción a 365 nm y más a 445, 475 y 515 nm (Fig. 1-r).

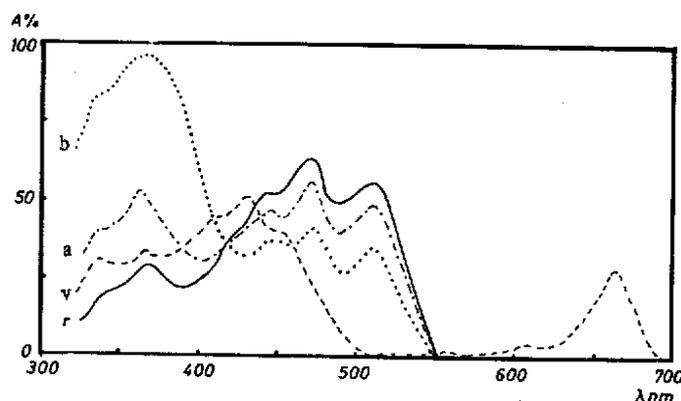


Figura 1. Espectro de Absorción de pigmentos durante la maduración de tomates. (v) tomates verdes (b) tomates blanquecinos los cuales están en el estado pintón, se pierden las clorofilas y un pico a 365 nm es dominante. (a) estado anaranjado, se sintetizan otros carotenoides. (r) estado rojo, tomates completamente maduros, el licopeno es el pigmento dominante.

Control del fitocromo en la síntesis de carotenoides. Se expusieron grupos de tomates a cinco minutos de rojo (R), rojo-distante (RD) ó R seguido de RD durante cinco minutos diariamente. Los resultados se presentan en el TABLA 1. Al final de una semana se hicieron mediciones para licopeno (A a 515 nm), neurosporeno (Aa 475 nm) y fitoflueno (A a 365 nm) en extracto de discos de tomates. El efecto del rojo después de cinco minutos produjo un incremento en la biosíntesis de licopeno con una A_{515} de 0.44, mientras que el rojo distante tenía una A_{515} de 0.16. El efecto favorable del rojo para la biosíntesis de licopeno fué invertido por el efecto del rojo-distante. La luz roja no tuvo un efecto significativo sobre el fitoflueno ni tampoco hubo reversibilidad por el rojo-distante (TABLA 1).

TABLA 1. Efecto del fitocromo en la maduración de tomates. Se aplicó luz roja y rojo-distante diariamente durante 5 minutos a los tomates y luego se conservaron en la oscuridad a 24°C. Se hicieron mediciones de la absorción a las longitudes de onda indicadas después de una semana de la iniciación del experimento. Se da el error standard de la media.

Tratamiento de luz	A a 515 nm	A a 475 nm	A a 365 nm
Control de Oscuridad	0.110±0.011	0.111±0.016	0.180±0.015
Rojo	0.441±0.023	0.500±0.062	0.261±0.027
Rojo-distante	0.162±0.017	0.206±0.023	0.200±0.024
Rojo y Rojo-distante	0.167±0.020	0.220±0.016	0.217±0.025

TABLA 2. Efecto del ABA en la maduración de frutos de tomate en la luz y en la oscuridad a 24° C. Se midió la absorción a 515, 475 y 365 nm.

Tratamiento	Luz			Oscuridad			
	515 nm	475 nm	365 nm	515 nm	475 nm	365 nm	515 nm
H ₂ O	0.82±0.04	0.87±0.07	0.44±0.04	0.94	0.47±0.06	0.76±0.07	0.37±0.03
ABA	1.90±0.08	1.95±0.05	0.87±0.04	0.95	0.69±0.07	0.91±0.03	0.54±0.08

TABLA 3. Efecto del ácido abscísico y otras hormonas en la maduración de tomates. Se midió la absorción a 515, 475 y 365 nm después de una y dos semanas de la iniciación del experimento.

Tratamiento Hormonal	A a 515 nm		A a 475 nm		A a 365 nm	
	1 Semana	2 Semanas	1 Semana	2 Semanas	1 Semana	2 Semanas
H ₂ O	0.110±0.011	0.703±0.077	0.170±0.016	0.815±0.058	0.180±0.015	0.461±0.064
GA ₃	0.010±0.001	0.231±0.035	0.008±0.001	0.285±0.028	0.103±0.008	0.562±0.053
KIN	0.082±0.016	0.453±0.074	0.123±0.015	0.537±0.082	0.157±0.023	0.821±0.069
ABA	0.233±0.024	1.290±0.077	0.277±0.039	1.400±0.097	0.153±0.027	0.512±0.026
AA	0.100±0.011	0.395±0.078	0.014±0.020	0.468±0.077	0.118±0.009	0.496±0.036

Acción del ácido Abscísico. La Tabla 2 muestra que los carotenoides medidos a 515, 475 y 365 nm se encontraron presentes en altas concentraciones en tomates mantenidos bajo iluminación. El contenido del licopeno de los tomates expuestos a la luz fué el doble de aquellos conservados en la oscuridad. El ABA incrementó los tres carotenoides en investigación. Una concentración de ABA de 3×10^{-5} M, dobló el contenido de carotenoide en la luz y produjo un poco menos en la oscuridad. La tasa de A de los carotenoides 515: 475 (licopeno: neurosporeno) fué de 0,95 en la luz y de 0,61 a 0,75 en la oscuridad. El ABA también incrementó la tasa de licopeno: neurosporeno en la oscuridad (Tabla 2). La giberelina, kinetina y el ácido ascórbico, inyectados a tomates verdes conservados en la oscuridad, retardaron la maduración y los frutos presentaron un color pintón; en cambio los frutos del control con agua fueron rojos (Fig. 2 y Tabla 3). Se ha encontrado un posible efecto hormonal del ácido ascórbico en otras plantas (Khurairi, 1968). Se midieron el licopeno y el neurosporeno después de una y dos semanas y se encontraron en menor cantidad en los tomates tratados con GA₃, Kin, y AA que en los controles.

El GA₃ fué el inhibidor más fuerte de la biosíntesis de carotenoides. La kinetina tuvo un posible efecto inhibitor en la síntesis del licopeno, y el ácido ascórbico (AA) tuvo un efecto similar. Por otra parte la síntesis de fitoflueno no pareció estar influenciada por los tratamientos con giberelina ó ácido ascórbico.

La Figura 2 muestra que durante la segunda semana de maduración en la oscuridad, el fitoflueno no cambió en los tratamientos con GA₃ o ABA. En cambio se observó que los picos a 515, 475 y 450 nm fueron incrementados por el ABA y detenidos por el GA₃. Durante este período la tasa de los carotenoides 515: 475 en el control de agua fué de 0.81, mientras que en presencia de ABA la tasa fué de 0.90.

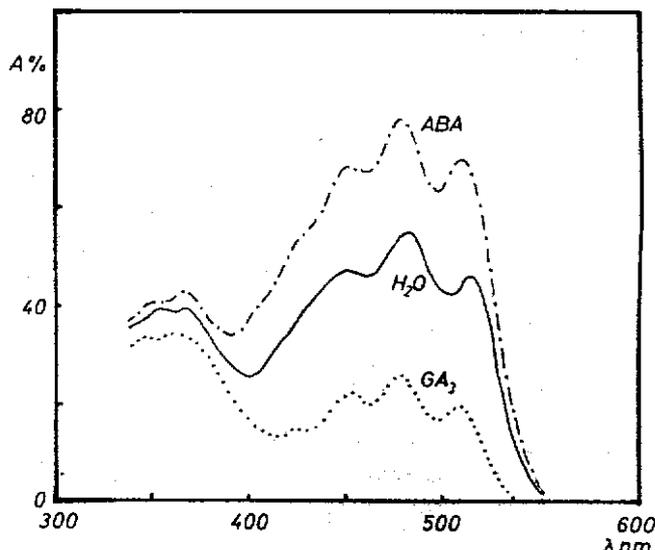


Figura 2. Espectro de Absorción de pigmentos de tomates tratados con ABA, GA₃ y H₂O. Los pigmentos fueron extraídos después de dos semanas de iniciado el experimento.

TABLA 4. Contenido de licopeno en tomates en maduración al final de la segunda semana, expresado como porcentaje de los controles de agua en la oscuridad ó de los Controles de agua con R, RD ó R+RD.

TRATAMIENTO	Oscuridad	% DE LICOPENO			
		Rojo	Rojo-distante	Rojo-distante	
ABA	% del Control de oscuridad,	—	230	184	200
	% del Control de luz,	182	111	139	139
	% del Control de oscuridad,	—	80	46	54
GA	% del Control de luz,	33	27	34	38

TABLA 5. Contenido de licopeno medido a 515 nm en frutos de tomate inyectados con las siguientes hormonas: ABA 3×10^{-5} M, GA₃ 3×10^{-5} , KINN 3×10^{-5} M, AA 3×10^{-4} M y agua destilada.

Se midió el licopeno después de una u dos semanas de incubación en la oscuridad a 24° C. Además del tratamiento hormonal los frutos (8 por tratamiento) recibieron cinco minutos de luz roja, rojo-distante, ó cinco minutos de rojo seguido de 5 minutos de rojo-distante diariamente, y luego fueron conservados en la oscuridad. Los valores denotan el promedio de A a 515 nm de 8 discos.

Tratamiento Hormonal	Rojo		Rojo-distante		Rojo y Rojo-distante	
	1 Semana	2 Semanas	1 Semana	2 Semanas	1 Semana	2 Semanas
H ₂ O	0.441±0.023	1.440±0.064	0.162±0.017	0.927±0.039	0.167±0.020	0.990±0.053
GA ₃	0.190±0.001	0.597±0.048	0.032±0.005	0.323±0.029	0.045±0.005	0.383±0.058
KIN	0.293±0.032	1.330±0.033	0.118±0.016	0.643±0.060	0.126±0.015	0.806±0.062
ABA	0.657±0.051	1.600±0.104	0.293±0.033	1.290±0.064	0.412±0.038	1.390±0.058
AA	0.292±0.028	1.360±0.070	0.130±0.013	0.781±0.116	0.148±0.023	0.783±0.046

Hubo un incremento total de licopeno en los tomates tratados con ABA y una disminución en los tratados con GA (Tabla 4). El ABA produjo un aumento de licopeno de 80–130% sobre los controles de agua-oscuridad y un aumento de 10–80% sobre los controles de agua-luz monocromática. La inhibición del licopeno fue de 60–70% calculada con base en los controles de agua-luz monocromática y de 20–55% calculada con base en los controles de agua-oscuridad (Tabla 4).

Interacción entre el Fitocromo como Mediador en la Biosíntesis de Carotenoides y Hormonas Vegetales. En este experimento se utilizaron 320 tomates divididos en cuarenta grupos de 8 cada uno y se establecieron combinaciones de luz con tratamientos hormonales. Los tratamientos de luz fueron rojo, rojo-distante, rojo seguido de rojo-distante, y un control en la oscuridad. Este experimento fue repetido dos veces y los resultados se anotan en la Tabla 5. Se puede observar que el ABA más la luz roja produjo el mayor contenido de licopeno. El efecto inhibitorio del rojo-distante RD fue superado por el ABA.

Por otra parte, el incremento en licopeno que se esperaba debido a la irradiación roja fue inhibido por el GA₃. La giberelina produjo un 90% de inhibición de síntesis de licopeno en comparación con el control de agua en la oscuridad, pero en los tomates irradiados con luz roja la inhibición fue de solo 50%.

DISCUSION

Se ha encontrado que la síntesis de carotenoides en plántulas de maíz es controlada por el fitocromo (Cohen y Goodwin, 1962). Las xantofilas y carotenos de las plántulas etioladas de maíz aumentaron como resultados de la irradiación con luz roja. El efecto del rojo fue revertido por el rojo distante. Los hallazgos presentados en este informe muestran que los carotenoides (vgr. licopeno) de los cromoplastos del tomate son también controlados por el fitocromo. Ulrich y Mackinney (1970) trabajando en cultivo de tejido encontraron que los carotenoides de los tejidos del "callus" son diferentes de los carotenoides del fruto.

Por otra parte, el pigmento amarillo anotado en la epidermis del fruto de tomate (Piringer y Heinze, 1954), el cual es también mediado por el fitocromo, no es un carotenoide sino un flavonoide.

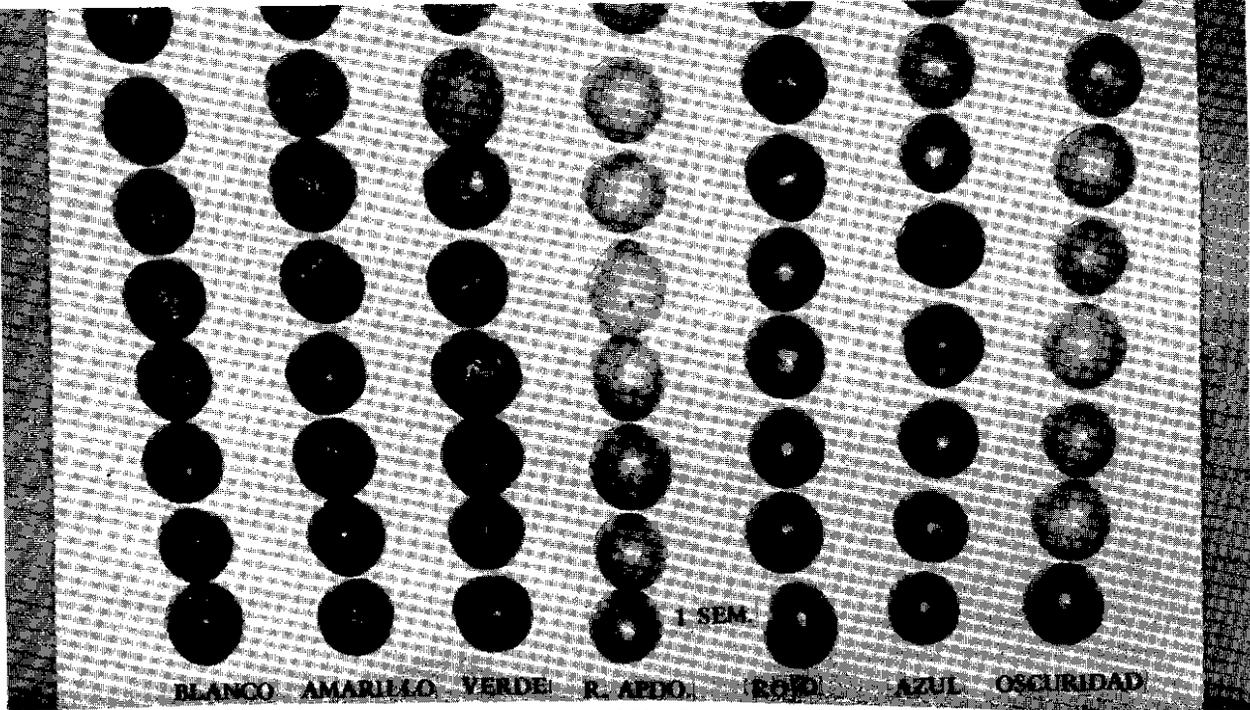
Dostal y Leopold (1967) pudieron retardar el desarrollo de color sumergiendo tomates verdes o porciones del fruto, producidas en cultivo de tejido, en solución de ácido giberélico de 10^{-4} a 10^{-7} M. La aplicación de etileno (1,000 micro litros/L por 24 horas) devolvió el efecto retardador del GA. El presente estudio confirma los hallazgos de Dostal y Leopold, en cuanto a que el desarrollo del color en tomates es retardado por el GA y muestra además que la kinetina y el ácido ascórbico tienen un efecto similar. Porter y Anderson (1967) han sugerido la siguiente vía para la biosíntesis del licopeno: fitoflueno $\xrightarrow{-H}$ Caroteno $\xrightarrow{-H}$ Neurosporeno $\xrightarrow{-H}$ Licopeno. De acuerdo con nuestras observaciones parece que el efecto del rojo/rojo-distante está localizado en el neurosporeno \rightarrow licopeno, pero no está claro si el ABA actúa en el mismo sitio.

Ya que se encontró que el fitocromo afecta la síntesis de carotenoides en los cloroplastos, esto trae la pregunta de si el fitocromo tiene una influencia en la licopeno - dehidrogenasa. También nace aquí otra pregunta: ¿tiene el fitocromo un efecto sobre hormonas endógenas en el tomate? No tenemos respuesta a tales preguntas en la actualidad.

Durante el tiempo en que se escribió este artículo Dörffling (1970) probó que el ABA está presente en los frutos de tomate y que el nivel de ABA cambia durante el desarrollo del fruto y el proceso de maduración.

Agradecimientos.

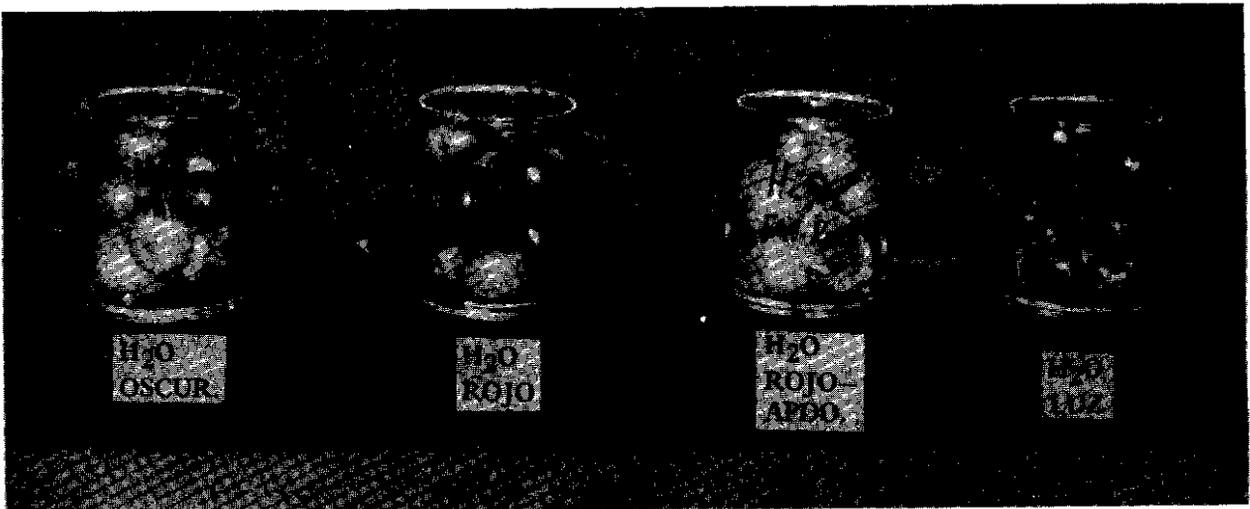
El ácido abscísico usado en esta investigación, es de alta pureza y está designado como SD 16108 Code 1-6-0-0. Fue proporcionado por cortesía de la Shell Development Company, Modesto, California. Se dan los agradecimientos al doctor Robert E. Young de Waltham Field Station University of Massachusetts, por proveer las semillas de tomate.



LAMINA I

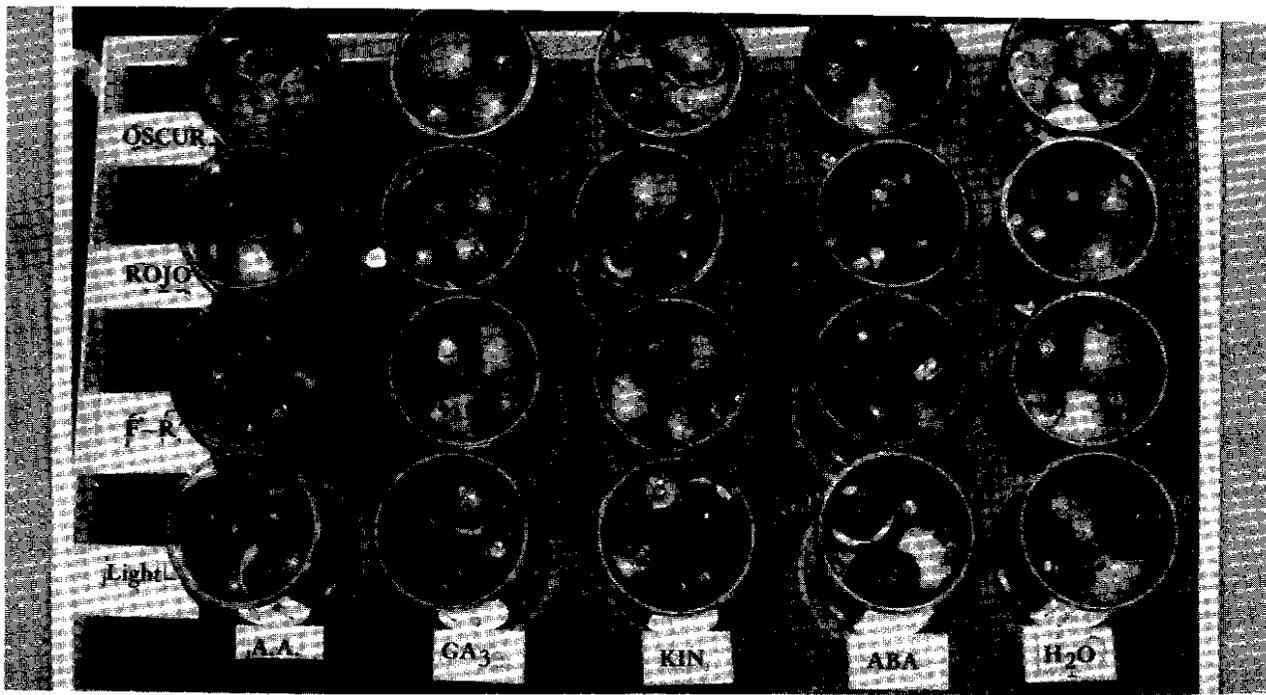
ACCION DEL ESPECTRO EN LA MADURACION DEL TOMATE. Se colocaron 8 tomates en una caja con un filtro especial en la parte superior para transmitir solamente una longitud de onda particular. Los filtros utilizados fueron: rojo 650 nm; rojo-distante 750 nm; azul 450 nm; verde 545 nm. Para el amarillo se utilizó un celofán amarillo, pero éste no actuó como buen filtro. Los tomates estuvieron expuestos en una cámara de cultivo a 24° C y una intensidad lumínica de 2.300 bujías/pié.

La foto fue tomada después de una semana de exposición. Mientras mas oscuro aparece el color, mayor es el grado de maduración.



LAMINA II

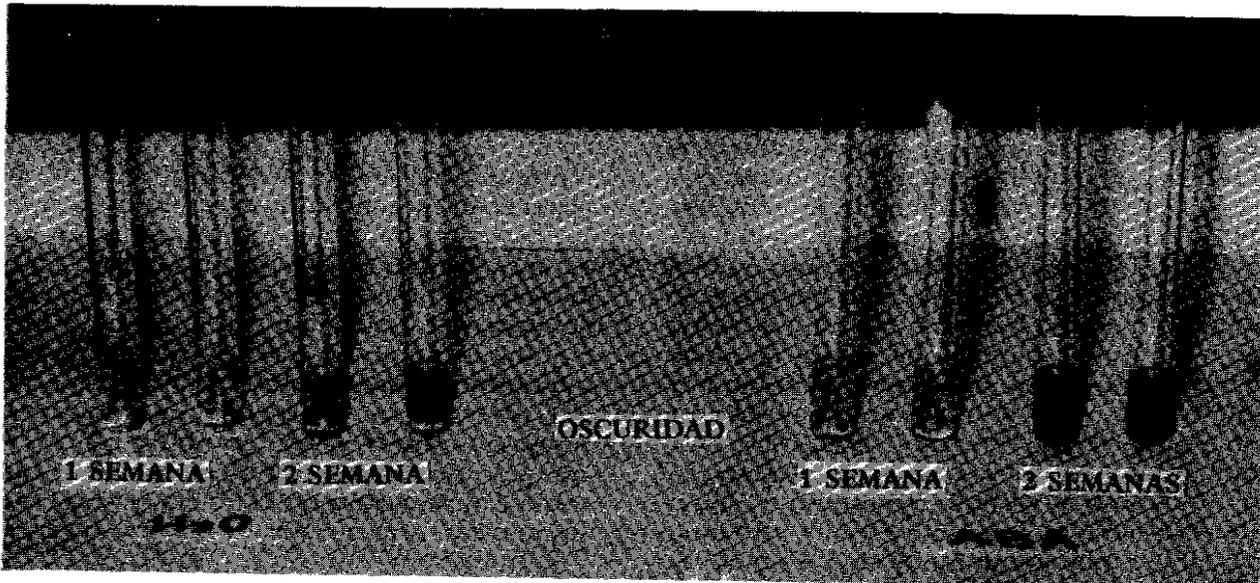
CONTROL DEL FITOCROMO EN LA MADURACION DEL TOMATE. A cada grupo de 8 tomates se le aplicó 5 minutos de luz rojo o rojo-apartado diariamente durante una semana. Después del tratamiento de luz, los tomates se conservaron en la oscuridad. El último a la izquierda es el control de oscuridad. Los tres de la derecha recibieron luz de 2.300 bujías/pié continuamente durante una semana. Todos los grupos se mantuvieron en una cámara de cultivo a 24° C. A un mayor grado de oscuridad corresponde un grado más avanzado de maduración.



LAMINA III

EFFECTO DEL FITOCROMO Y TRATAMIENTOS HORMONALES EN LA MADURACION DE TOMATES. Se inyectó 1 ml/ de solución de hormona al principio del experimento y cuatro días más tarde. Se aplicó diariamente luz roja y rojo-apartado durante cinco minutos. Los tomates se conservaron en una cámara de cultivo a 24° C. La foto fue tomada después de una semana de iniciado el experimento. Mientras mas oscuro aparece el color, mayor es el grado de maduración.

El color blanco puro que aparece en algunos tomates, corresponde a escarcha del refrigerador donde estuvieron antes de tomar la foto.



LAMINA IV

EFFECTO DEL ACIDO ABCISICO EN LA SINTESIS DE LICOPENO. Se extrajo el pigmento de discos de tomate de 1 cm. de diámetro con acetona-cloroformo (1:1). Cada tubo contiene el extracto de un disco de tomate. Los tomates fueron inyectados con 2 ml. de ácido absísico (8 mg/litro) al principio del experimento y cuatro días más tarde. A un mayor grado de oscuridad cooresponde un grado mas avanzado de maduración.

Bibliografia.

- Dostal, M.C. & Leopold, A.C.: Gibberellin delays ripening of tomatoes. *Science* 158:1579-1580, 1967.
- Cohen, R.Z. & Goodwin, T.W.: The effect of red and farred light on carotenoid synthesis by etiolated maize seedlings. *Phytochem.* 1:67-72, 1962.
- Davies, B.H.: Analysis of carotenoid pigments. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Ed. T. W. Goodwin). pp.489-532. Academic Press, London and New York, 1965.
- Dörffling, K.: Quantitative Veränderungen des Abscisinsäuregehaltes während der Fruchtentwicklung von *Solanum lycopersicum* L. - *Planta* (Berl.) 93:233-242, 1970.
- Goodwin, T.W.: Carotenoids. In *Modern Methods of Plant Analysis* (Ed. K. Paech and M.V. Tracey), pp272-311. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955.
- Harris, W.M. & Spurr, A.R.: Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants carotene analyses. *Amer. Jour. Bot.* 56:369-379, 1969 a.
- Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Ibid.* 56:380-389, 1969 b.
- Khudairi, A.K.: A possible new plant hormone. *Phytologia* 17:441-444, 1968.
- Piringer, A.A. & Heinze, P.H.: Effect of light on the formation of a pigment in the tomato fruit cuticle. *Plant Physiol.* 29:467-472, 1954.
- Porter, J.W. & Anderson, D.G.: Biosynthesis of carotenoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18:197-228, 1967.
- Ulrich, J.M. & Mackinney, G.: Callus culture of tomato mutants. II. Carotenoids formation. *Physiol. Plant.* 23:88-92, 1970.