

CONDICIONES DE DESTRUCCION Y NEOSINTESIS DE FITOCROMO EN COTILEDONES DE CITRULLUS VULGARIS

ROSALÍA RAMÍREZ & C. VICENTE

Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad Complutense, Madrid

(Recibido el 24 de febrero de 1976)

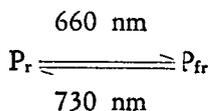
Resumen. Tratamientos con luz roja y obscuridad de plántulas de *Citrullus vulgaris* de cuatro días de vida determinan un alto porcentaje de destrucción del fitocromo, que se inicia ya en las primeras horas de experimentación. Esta destrucción viene determinada, en primer término, por el mantenimiento de altos niveles de P_{fr} en los cotiledones. La neosíntesis del fitocromo bajo forma P_r es desencadenada por contenidos límite de la forma P_r .

Summary. Treatments of four day old seedlings of *Citrullus vulgaris* with red light and darkness, cause a high rate of destruction of phytochrome. This begins in the first hours of the experiments. This destruction is determined by the high levels of P_{fr} in the cotyledons. The new synthesis of phytochrome in the P_r form is produced by a limiting concentration of P_r .

INTRODUCCION

En los procesos de morfogénesis vegetal, entre los que cabe incluir el complicado conjunto de fenómenos que constituyen la germinación de las semillas, el fitocromo juega un papel de capital importancia. El fitocromo es una cromoproteína cuyo cromóforo absorbe luces de 660 nm y 730 nm, determinando esta absorción reacciones fotoquímicas que fotoconvierten de

forma reversible las dos posibles formas del pigmento, según la ecuación:



P_r , o fitocromo que absorbe luz roja, es estable y biológicamente inactivo, mientras que P_{fr} , o fitocromo que absorbe luz infrarroja, es lábil y biológicamente activo. Es precisamente la labilidad de esta forma activa la que vuelve difícil la comprensión de los procesos fotomorfogénicos, ya que, en muchos casos, la simple alternancia diaria de los períodos de luz y oscuridad no es suficiente para prevenir la destrucción y, por tanto, resulta sumamente complejo el comprender cómo una planta, en proceso de diferencia activa puede mantener inalterados los niveles de P_{fr} requeridos para su desarrollo.

Un intento de solución al problema fue el ofrecido por CLARKSON & HILLMAN (1967: 213) al demostrar que, en *Pisum sativum*, la destrucción del fitocromo preexistente determina un proceso de neosíntesis. La destrucción podía ser provocada experimentalmente por una iluminación roja continua, iniciándose la neosíntesis por cortas iluminaciones rojas interrumpidas por períodos de oscuridad.

BOISARD & al. (1974) confirmaron estos resultados para *Cucurbita pepo*, postulando que es el propio fitocromo el que autocontrola el proceso de su neosíntesis.

En los estudios que actualmente se vienen realizando en *Citrullus vulgaris* hemos considerado esencial investigar en primer lugar las condiciones de mantenimiento de los niveles esenciales de fitocromo antes de elaborar datos que conciernen a fotomorfogénesis, lo que constituye la razón fundamental de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Semillas de *Citrullus vulgaris*, variedad comercial Reina, son esterilizadas en superficie y escarificadas en sus cubiertas externas para ser cultivadas sobre medio HOAGLAND (HELLER, 1969: 400), a 26° en oscuridad durante cuatro días, a partir de los cuales son sometidas a iluminaciones continuas blanca, roja o infrarroja durante 48 horas, manteniendo un cultivo control en oscuridad durante el mismo tiempo. El contenido en fitocromo se evalúa por el método de los incrementos en densidades ópticas a 660 y 730 nm

(MOHR, 1972: 14) en preparaciones *in vitro* obtenidas por maceración de los cotiledones en metanol y posterior centrifugación a $23.000 \times g$ (BUTLER & al., 1965: 197). Los tetrapirroles cíclicos son extraídos de la preparación metanólica con éter de petróleo hasta que la preparación alcohólica no muestra absorción en la zona de los 400-450 nm.

La iluminación con luz blanca se realiza con tubos fluorescentes Osram Fl, de 40 w, colocados a una distancia de las plántulas de tal manera que la energía radiante sobre ellas fuese de $12.000 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La iluminación roja se llevó a cabo con tubos fluorescentes Mazda J9, de 20 w, emitiendo en la zona de 600-680 nm. La iluminación infrarroja se realizó con lámparas Philips HP, 3608, de 150 w, que emiten en la región de 700-750 nm.

La valoración de proteínas se ha llevado a cabo por el método de WARBURG & CHRISTIAN (1941), en extractos libres de células, preparados a partir de cotiledones según se ha descrito anteriormente (VICENTE & OLCINA, 1974).

RESULTADOS Y DISCUSION

Lotes de 10 semillas de *Citrullus vulgaris* sembradas como se ha descrito, presentan un 100 % de germinación al segundo día de cultivo en obscuridad. A partir del quinto día, las plántulas son sometidas a los siguientes tratamientos:

- iluminación infrarroja continua
- iluminación roja continua
- 24 horas de luz roja seguidas de 24 horas de obscuridad
- iluminación blanca continua
- control de obscuridad

durante un tiempo máximo de 48 horas, realizándose medidas de fitocromo total, P_r , P_{fr} y proteínas totales en los tiempos indicados.

En la figura 1 se expresan los resultados obtenidos para las medidas del porcentaje de P_{fr} frente a fitocromo total. Los tratamientos con luces blanca e infrarroja disminuyen el porcentaje de P_{fr} , desde su valor inicial de un 50 %, hasta valores estables cercanos al 5 %. Por el contrario, el tratamiento con luz roja continua o los controles en obscuridad mantienen porcentajes relativamente altos de P_{fr} , cercanos al 30 %. Sin embargo, la secuenciación de estas dos últimas condiciones, entendida como un tratamiento de 24 horas de luz roja más 24 horas de obscuridad, provocan la disminución del porcentaje de P_{fr} hasta un 5 % del fitocromo total para las 48 horas de tratamiento.

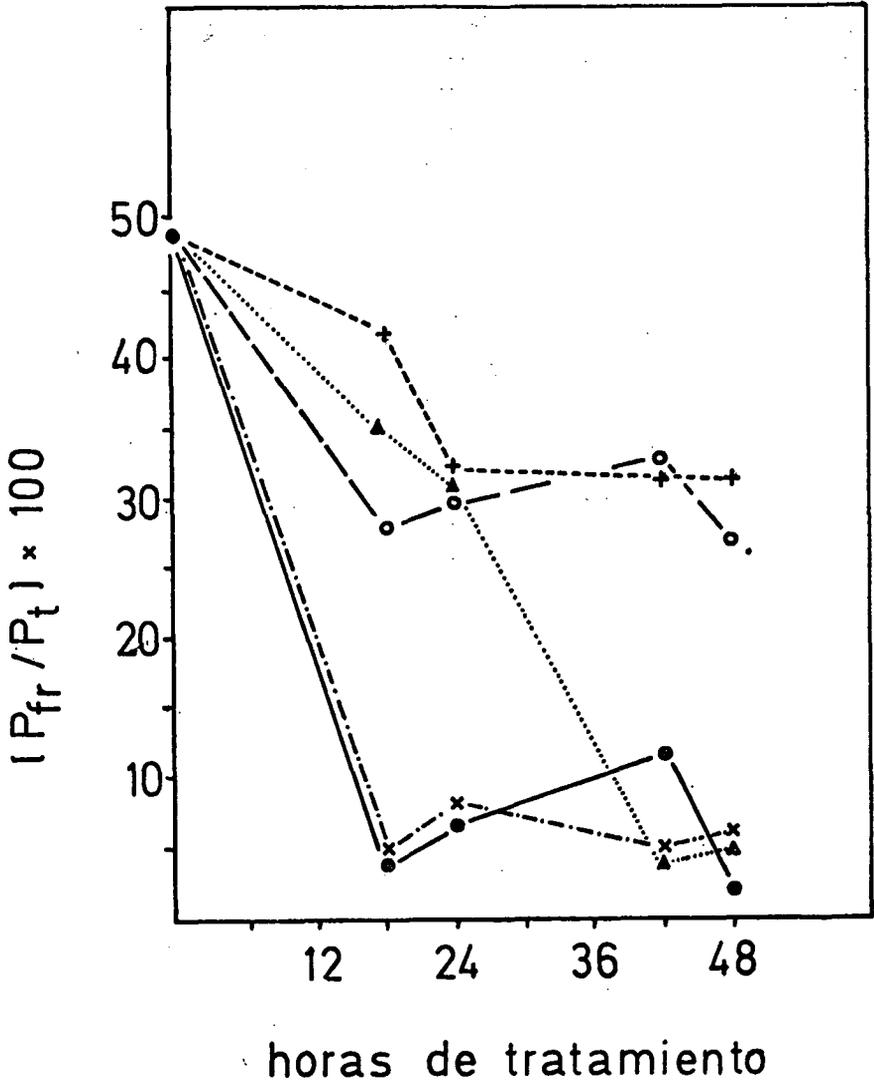


Fig. 1.—Porcentaje de P_{fr} en cotiledones de plántulas tratadas con: (●) luz infrarroja continua; (○) luz roja continua; (▲) 24 horas de luz roja más 24 horas de oscuridad; (×) luz blanca continua; (+) oscuridad continua.

Si se presume que la forma P_{fr} es lábil, sería lógico pensar que los tratamientos que mantengan mayores niveles de P_{fr} estarán expuestos a mayor posibilidad de destrucción. En efecto, en la tabla I se exponen los resultados obtenidos al estimar el fitocromo total por mg de proteína. En ellos se apre-

Tratamiento	P_r /proteínas totales x 100					
	Horas	0	18	24	42	48
IR		0,64 ± 0,01	0,41 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,44 ± 0,05
R		0,64 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,73 ± 0,05	0,57 ± 0,01
R + O		0,64 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,02
B		0,64 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,82 ± 0,03	1,20 ± 0,08
O		0,64 ± 0,01	0,13 ± 0,08	0,31 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,41 ± 0,04

TABLA I.—Contenido en fitocromo total en cotiledones de *Citrullus vulgaris* bajo diferentes condiciones de iluminación. IR = iluminación infrarroja continua; R = iluminación roja continua; R + O = 24 horas de luz roja más 24 horas de obscuridad; B = iluminación blanca continua; O = obscuridad continua. Las proteínas totales vienen expresadas en mg.

cia que la proporción de cromóforo por unidad de proteína disminuye según los tratamientos hasta un límite a partir del cual se inicia un notable incremento. Como se había sospechado, los tratamientos con luz roja y obscuridad inducen el nivel mínimo 24 horas antes que los demás tratamientos, lo que confirma la hipótesis de que altos niveles de P_{fr} y su mantenimiento condicionan destrucción de fitocromo.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos valorando P_r en relación al contenido proteico. Los datos son absolutamente paralelos a los de la tabla I. El contenido en P_r disminuye, según el tratamiento, iniciándose un incremento cuando el nivel de cromóforo alcanza un valor mínimo. Por

Tratamiento	P_r /proteínas totales x 100					
	Horas	0	18	24	42	48
IR		0,32 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,44 ± 0,03
R		0,32 ± 0,07	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,60 ± 0,01
R + O		0,32 ± 0,07	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,05
B		0,32 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,79 ± 0,03	0,99 ± 0,01
O		0,32 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,04

TABLA II.—Contenido en P_r de cotiledones de *Citrullus vulgaris* bajo diferentes condiciones de iluminación.

tanto, podría concluirse que la destrucción de la forma lábil del fitocromo va siempre seguida de un proceso de neosíntesis, de tal manera que la plántula contendrá siempre niveles de fitocromo suficientes para controlar su morfogénesis.

Con respecto al problema de cuál es la forma del fitocromo cuyo nivel mínimo determina neosíntesis, los datos expuestos indican claramente que es la forma P_r la que desencadena la síntesis del cromóforo, ya que su bajo nivel viene determinado por el mantenimiento de altos porcentajes de P_{fr} . Este hecho resulta particularmente evidente para los tratamientos con luz roja continua y oscuridad continua. Además, se puede afirmar que la forma del fitocromo sintetizada es P_r , como viene demostrado por el hecho de que los bajos porcentajes de P_{fr} , estacionarios para tratamientos con luces infrarroja continua y blanca continua, van acompañados por un neto incremento en la cantidad de P_r , paralelo al incremento en fitocromo total.

BIBLIOGRAFIA

- BOISARD, J., B. GABRIEL-MARCHAL & P. ROLLIN (1974) *Physiol. Vég.* 12: 601.
 BUTLER, W. L., S. B. HENDRICKS & H. W. SIEGELMAN (1965) en T. W. GODWIN (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London.
 CLARKSON, D. T. & W. S. HILLMAN (1967) *Nature* 213: 468.
 HELLER, R. (1969) *Biologie Végétale* 2. Paris.
 MOHR, H. (1972) *Lectures on Photomorphogenesis*. Heidelberg.
 VICENTE, C. & I. OLCINA (1974) *Rev. Esp. Fisiol.* 30: 71.
 WARBURG, O. & W. CHRISTIAN (1941) *Biochem. Zeitschr.* 310: 384.