

Influjo de la irradiación con UV de 2.537 Å sobre *Nicotiana rustica* L. I. Crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles *

J. Barceló, C. Morales, M.ª T. Piñol y M. Serrano

Laboratorio de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
Barcelona (España)

(Recibido el 20 de agosto de 1971)

J. BARCELO, C. MORALES, M.ª T. PIÑOL and M. SERRANO. *Influence of UV Radiation (2.537 Å) on Nicotiana rustica L. I. Growth and Contents in Lipo-soluble Pigments.* R. esp. Fisiol., 28, 21-28. 1972.

The effect of short radiation (2.537 Å) has been studied on the growth and contents of lipo-soluble pigments in *Nicotiana rustica* L. plants.

It has been proved that increasing dosage of UV slow the growth and preferably cause some damage to the leaves, with typical folding back on the hedges and the appearance of dark spots. When the treatment is stoped and the plants leaved under natural light, it becomes visible the phenomena of «photoreactivation», although the plant tends to recover provided only sub-lethal doses had been administered.

In general the farther UV decreases the contents of chlorophyle b more than the chlorophylla.

The synthesis of carotenes seems not to be affected by the treatment with farther UV, since the radiated plants have a high contents of them. On the other hand it is noticeable an interference in the synthesis of xantophill, since from the 3rd sample the contents decreases in the radiated plants.

Dentro de la zona UV del espectro, el comportamiento de las radiaciones que la componen es distinto según correspondan a la parte cercana (4.000-3.200 Å), para la que existen varios fotorreceptores naturales (flavinas, carotenoides, clorofilas, etc.), que pueden ser excitados, y por reacciones fotoquímicas traducirse en procesos de

«estímulo» para el crecimiento de la planta; y aquellas otras de corta longitud de onda (2.800-2.000 Å). En general, se ha comprobado que las radiaciones de longitud de onda inferiores a 2.900 Å actúan de forma destructiva para la vida, debido a que macromoléculas biológicamente tan esenciales como los ácidos nucleicos absorben principalmente la longitud de onda de 2.600 Å y las proteínas la de 2.800 Å. Se han realizado muchos estudios y esta-

* Trabajo realizado con ayuda del Fomento de la Investigación en la Universidad.

blecido diversas hipótesis de trabajo para tratar de explicar los mecanismos de esta «inactivación».

Los primeros estudios acerca de la acción de las radiaciones con UV lejano se han realizado con bacterias y plantas inferiores. Menos conocidos son los efectos de estas radiaciones sobre las plantas superiores. CLINE y SALISBURY (3) han estudiado la sensibilidad y resistencia relativa al UV de 2.537 Å y a las lámparas de xenón, que reproducen las condiciones correspondientes a esta radiación en Marte y Venus. Tomaron como criterio la muerte de las hojas y la aparición de coloraciones pardas. Estos mismos autores estudiaron también el efecto de la «fotoreactivación», concepto observado y establecido inicialmente en 1949 por KELNER (8), que se produce si tras la irradiación con UV de corta longitud de onda se suministra luz visible. IKENAGA y MABUCHI (5) hallaron que la proporción de mutación en el endospermo de maíz disminuía si después de la irradiación con UV era tratado con luz visible. TROSKO y MANSOUR (11, 12) observaron en cultivos de células de *Nicotiana* también una reactivación de su crecimiento si después de la irradiación con UV se aplicaba luz visible.

La radiación UV se ha mostrado especialmente activa en el proceso de la foto-inhibición fotosintética. SHAVIT y AVRON (10) han sugerido que sea la plastoquinona el compuesto responsable de dicho fenómeno. Según JONES y KOK (6, 7) el UV probablemente afecta a diversos componentes celulares. Indican también que la inhibición por luz UV del fotosistema II y la fotofosforilación preceda a la fotodestrucción de las clorofilas y carotenoides. YAMASHITA y BUTLER (14) han sugerido que el sitio de inhibición por la irradiación UV de corta longitud de onda se podría situar en la cadena de transportadores electrónicos que actúan entre el agua y el fotosistema II.

En el presente trabajo se ha estudiado

el efecto de la «inactivación» causada por diferentes dosis de UV lejano, con el máximo de emisión en la longitud de onda de 2.537 Å, en plantas que vivían en las condiciones naturales del invernadero, observando particularmente su morfogénesis y crecimiento, y el contenido y variación de los pigmentos liposolubles.

Material y métodos

Condiciones del cultivo y de la irradiación. Las experiencias se han realizado con *Nicotiana rustica* L. procedente de una cosecha obtenida en 1967 en el invernadero del laboratorio. Las semillas, previamente lavadas, se sembraron (26 de febrero de 1971) en tierra de buena clase y homogénea, contenida en jardineras, y éstas repartidas en cuatro lotes, tres para irradiar y uno que se dejó como control. La irradiación se inició el 1 de marzo, y se suministraron dosis diarias de 1, 3 y 5 minutos (excepto los domingos) a los correspondientes lotes, que se denominaron, respectivamente, UV-1, UV-3 y UV-5. Las jardineras se dejaron en el invernadero, en el que las temperaturas medias máximas y mínimas mensuales eran las siguientes:

Mes	Temp. máxima	Temp. mínima
Febrero	18° C	7° C
Marzo	22° C	9° C
Abril	27° C	17° C

La humedad se mantuvo relativamente alta y constante, dadas las condiciones del invernadero. Además de los riegos diarios con agua se efectuaron otros adicionales con solución nutritiva completa para evitar la interferencia de cualquier deficiencia mineral.

Para la irradiación se usaron cuatro tubos Philips del tipo TUV 15W que poseen un máximo de emisión en la longitud de onda de 2.537 Å, dispuestos bajo una pantalla de aluminio pulido, y situados a

Tabla I. *Tiempos globales de irradiación UV de 2.537 Å, expresados en minutos.*

Muestra	Ensayos		
	UV-1	UV-3	UV-5
1	45	135	225
2	48	144	240
3	50	150	250
4	53	159	265

una distancia aproximada de 40 cm de las plantas a irradiar. En la tabla I se indican los tiempos globales de irradiación a que han estado expuestas las plantas correspondientes a cada ensayo y muestra hasta el momento de recolectarlas para su análisis.

Determinación espectrofotométrica de las clorofilas a y b. Para la extracción de la clorofila se ha seguido el método de ARNON (1) y MACKINNEY (9). Las plantas (hojas + tallo) se homogeneizan en mortero, se extraen exhaustivamente con acetona de 80 %, se lleva el extracto a un volumen de 250 ml y se efectúan las lecturas en las longitudes de onda de 645 m μ y 663 m μ , en cubetas de 1 cm, en un espectrofotómetro Zeiss PMQII. Para el cálculo de las cantidades de clorofila se aplican las fórmulas dadas por ARNON (1), basadas en los trabajos de MACKINNEY (9):

$$Ca = 12,7 A_{663} - 2,7 A_{645} \text{ mg/l}$$

$$Cb = 22,9 A_{645} - 4,7 A_{663} \text{ mg/l}$$

Separación por cromatografía en capa fina y determinación espectrofotométrica de clorofilas y carotenoides. Se extrae con acetona de 80 % la totalidad de los pigmentos existentes en las plantas, tal como se indicó en un trabajo anterior (2). Se parte de dos plantas (hojas + tallo) de cada lote y se utiliza la cantidad de acetona necesaria para lograr la decoloración total del residuo. Se lleva a volumen conocido y se analiza siempre una cantidad

determinada del extracto para que los resultados sean comparables.

Se efectúa la separación de los pigmentos por cromatografía en capa fina según el método propuesto por EGGER (4), descrito en un trabajo anterior (2). Esta separación cromatográfica permite la elución de las manchas correspondientes, que se recogen en 3 ml de acetona de 80 %, y la subsiguiente determinación de las D.O. en las longitudes de onda características para cada pigmento, en un espectrofotómetro Zeiss PMQII. En la tabla II se indican los valores Rf obtenidos mediante el método cromatográfico descrito por EGGER (4).

Resultados y discusión

Efectos sobre el crecimiento. El crecimiento longitudinal y el peso seco eran tanto menores cuanto mayor el tiempo de irradiación (tabla III). Es decir, control > UV-1 > UV-3 > UV-5. Comparadas con las plantas control, las irradiadas tienen un menor porcentaje de peso seco (tabla III), particularmente en los primeros estados del crecimiento.

Las plantas irradiadas sufrieron malformaciones que se manifestaron, en primer lugar, por una curvatura de los bordes de las hojas hacia el haz. Las hojas se hacían también más carnosas debido a la acumulación de agua, por lo que su porcentaje de peso seco era menor (tabla III). Los fenómenos indicados eran tanto más

Tabla II. *Valores Rf para las clorofilas y carotenoides ensayados.*

Pigmento	Valor del Rf
Carotenos	0,00
Clorofila a	0,03
Clorofila b	0,10
Luteína	0,40
Epoxiluteína	0,68
Violoxantina	0,82
Neoxantina	0,93

Tabla III. Crecimiento en centímetros, peso fresco y peso seco, ambos en gramos por planta (hojas + tallo), y porcentaje de peso seco en plantas de *Nicotiana rustica* L. crecidas en condiciones normales (control) e irradiadas con UV de 2.537 Å.

Ensayo	Primera muestra				Segunda muestra				Tercera muestra				Cuarta muestra			
	Long. cm	Peso fresco	Peso seco	% peso seco	Long. cm	Peso fresco	Peso seco	% peso seco	Long. cm	Peso fresco	Peso seco	% peso seco	Long. cm	Peso fresco	Peso seco	% peso seco
Control	8,6	1,25	0,075	6,00	12,3	2,01	0,103	5,10	19,2	3,80	0,130	3,88	21,8	6,19	0,156	2,55
UV-1	7,7	0,99	0,071	7,08	12,0	1,80	0,083	4,61	16,8	3,02	0,100	3,32	20,9	5,08	0,130	2,56
UV-3	7,4	0,99	0,040	4,05	9,1	1,12	0,050	4,46	14,0	2,23	0,053	2,36	15,3	2,58	0,060	2,32
UV-5	5,1	0,57	0,024	4,10	5,1	0,56	0,023	4,01	8,2	0,85	0,019	2,29	9,8	1,01	0,013	1,32

Tabla IV. Contenido de clorofila a (Ca) y clorofila b (Cb) expresado en mg por planta (hojas + tallo) y en porcentaje de peso seco (cifras entre paréntesis) de las plantas de *Nicotiana rustica* L. control y de las irradiadas con UV de 2.537 Å.

Ensayo	Primera muestra		Segunda muestra		Tercera muestra		Cuarta muestra	
	Ca	Cb	Ca	Cb	Ca	Cb	Ca	Cb
Control	0,188 (0,250)	0,081 (0,108)	0,532 (0,516)	0,302 (0,292)	1,143 (0,879)	0,662 (0,510)	1,323 (0,848)	0,727 (0,466)
UV-1	0,184 (0,259)	0,082 (0,115)	0,522 (0,506)	0,259 (0,251)	0,764 (0,588)	0,319 (0,245)	1,194 (0,918)	0,497 (0,282)
UV-3	0,174 (0,435)	0,086 (0,215)	0,319 (0,638)	0,122 (0,244)	0,335 (0,532)	0,145 (0,278)	0,521 (0,868)	0,213 (0,355)
UV-5	0,024 (0,100)	0,011 (0,047)	0,104 (0,452)	0,046 (0,200)	0,153 (0,805)	0,062 (0,326)	0,231 (1,776)	0,091 (0,700)

Tabla V. *Relación clorofila a/clorofila b en las plantas (hojas + tallo) de Nicotiana rustica L. control y en las irradiadas con UV de 2.537 Å.*

Ensayo	Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra	Cuarta muestra
Control	2,30	1,76	1,78	1,81
UV-1	2,31	2,01	2,38	2,42
UV-3	2,01	2,65	2,31	2,44
UV-5	2,06	2,27	2,48	2,55

patentes cuanto más prolongado el tratamiento, llegando incluso a producirse necrosaciones.

Los primeros síntomas se apreciaron en las plantas UV-5 (irradiadas diariamente 5 minutos), cuando habían recibido 120 minutos de irradiación desde la siembra y 35 desde el comienzo de la germinación. En las UV-3 (irradiadas diariamente 3 minutos), a los 66 minutos de irradiación y 33 desde el comienzo de la germinación. Las UV-1 (irradiadas diariamente 1 minuto), presentaron síntomas a los 51 minutos, es decir, bastante tiempo después, dada la baja dosis de irradiación correspondiente a este tratamiento. Lógicamente, la irradiación se manifestó más efecti-

Tabla VI. *D.O de los pigmentos liposolubles de plantas (hojas + tallo) de Nicotiana rustica L. control y de las irradiadas con UV de 2.537 Å.*

Ensayo	Pigmentos	Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra	Cuarta muestra
Control	Carotenos	0,034	0,010	0,255	0,670
	Clorofila a	0,280	0,290	1,150	1,000
	Clorofila b	0,025	0,042	0,120	0,140
	Luteína	0,093	0,128	0,600	0,570
	Epoxiluteína	0,018	0,150	0,155	0,205
	Violoxantina	—	0,028	0,122	0,115
	Neoxantina	—	0,080	—	—
UV-1	Carotenos	0,020	0,028	0,242	0,540
	Clorofila a	0,280	0,280	0,540	0,900
	Clorofila b	0,030	0,050	0,050	0,076
	Luteína	0,170	0,152	0,610	0,290
	Epoxiluteína	0,047	0,064	0,188	0,220
	Violoxantina	0,022	0,034	0,020	0,044
	Neoxantina	—	0,080	—	—
UV-3	Carotenos	0,026	0,018	0,078	0,060
	Clorofila a	0,231	0,120	0,600	0,840
	Clorofila b	0,014	0,028	0,110	0,074
	Luteína	0,120	0,098	0,400	0,310
	Epoxiluteína	0,034	0,050	0,084	0,108
	Violoxantina	0,018	0,078	0,270	0,035
	Neoxantina	—	—	—	—
UV-5	Carotenos	0,036	0,180	0,182	0,440
	Clorofila a	0,120	0,038	0,375	0,080
	Clorofila b	0,007	0,010	0,130	0,062
	Luteína	0,090	0,028	0,351	0,250
	Epoxiluteína	0,030	0,014	0,190	0,078
	Violoxantina	0,024	0,012	0,046	0,020
	Neoxantina	—	—	—	—

va a partir del comienzo de la germinación, es decir, cuando los tejidos meristemáticos habían emergido.

Las plantas UV-1 se diferenciaban muy poco de las control, y las malformaciones que presentaban eran muy ligeras y enteramente reversibles, por lo menos en su aspecto externo. Las plantas sometidas a los tratamientos UV-3 y UV-5 presentaban malformaciones mucho más estables, aunque también reversibles a más largo plazo, cuando el tratamiento había cesado.

Contenido de clorofilas. El contenido de clorofilas *a* y *b* por planta (hojas + tallo) (tabla IV) sigue el orden: control > UV-1 > UV-3 > UV-5. Este hecho es particularmente ostensible a partir de la segunda muestra, cuando los efectos de la irradiación comienzan a manifestarse externamente de modo bien visible.

Expresados los contenidos de clorofila *a* y clorofila *b* como porcentaje de peso seco (tabla IV), se observan dos efectos independientes que se interaccionan: *a*) Uno directo sobre la formación de clorofila, especialmente ostensible en las muestras primera y segunda de las plantas UV-5, es decir, aquellas que recibieron desde el principio la dosis más alta de irradiación. El crecimiento de estas plantas, expresado en peso seco, representaba 1/3 y 1/4, respectivamente, del alcanzado por las control (tabla III), mientras que, en las mismas muestras, el contenido de clorofila *a* se reducía a cerca de 1/8 y 1/5, y el de clorofila *b* a cerca de 1/5 y 1/7, es decir proporcionalmente mayor (tabla IV). *b*) Otro de crecimiento, observable en la muestra cuarta, también de las plantas UV-5. El peso seco de estas plantas representa 1/12 del alcanzado por las control (tabla III), mientras la clorofila *a* solamente se ha reducido a cerca de 1/6, y la clorofila *b* a 1/8, aproximadamente (tabla IV). El estudio de la tabla IV permitiría apreciar los indicados efectos en otros valores en ella representados.

La relación clorofila *a*/clorofila *b* (ta-

bla V), a partir de la segunda muestra, sigue prácticamente el orden UV-5 > UV-3 > UV-1 > control. Este hecho indica que la destrucción o la inhibición de la síntesis de clorofila *b* se ha producido más rápidamente que la de clorofila *a*.

Contenido de carotenos y xantofilas. La consecuencia más evidente en relación con carotenos y xantofilas (tabla VI) es que estos compuestos frecuentemente alcanzan los mismos y, a veces, mayores valores en las plantas irradiadas que en las control. En los casos en que los valores de carotenos y xantofilas son más bajos en las plantas irradiadas que en las control, son todavía muy altos, si se tiene en cuenta la diferencia de peso que entre ellas existe. Se puede deducir que la capacidad de la planta para producir pigmentos carotenoides no ha sido afectada, o lo ha sido muy poco, directamente por la irradiación o por el efecto que ha ejercido sobre el crecimiento.

Resumen

Se ha estudiado el influjo sobre el crecimiento y contenido de pigmentos liposolubles de la irradiación de corta longitud de onda (2.537 Å) en plantas de *Nicotiana rustica* L.

Se ha comprobado que las dosis crecientes de UV retardan el crecimiento y dañan preferentemente el haz de las hojas, con un típico repliegue de sus bordes hacia arriba y la aparición de manchas pardas. Al cesar el tratamiento, y en presencia de luz natural, se comprueba el fenómeno de la «fotorreactivación», pero la planta se recupera siempre que sólo haya recibido dosis subletales.

En general, el UV lejano descende el contenido de clorofilas y preferentemente la clorofila *b* respecto a la clorofila *a*.

La síntesis de carotenos no parece estar afectada por el tratamiento con UV lejano, ya que las plantas irradiadas son muy ricas en ellos. Por el contrario, se observa una interferencia en la síntesis de xantofilas, pues a partir de la tercera muestra descende su contenido en las plantas irradiadas.

Bibliografía

1. ARNON, D. I.: *Plant Physiol.*, **24**, 1, 1949.
2. BARCELÓ, J., MORALES, C. PIÑOL, M.^a T.: *Bol. Informat. Circul. Farmacéut.*, **19**, 3, 1971.
3. CLINE, M. G. y SALISBURY, F. B.: *Radiat. Bot.*, **6**, 151-163, 1966.
4. EGGER, K.: *Planta*, **58**, 664, 1962.
5. IKENAGA, M. y MABUCHI, T.: *Radiat. Bot.*, **6**, 165, 1966.
6. JONES, L. W. y KOK, B.: *Plant. Physiol.*, **41**, 1037, 1966.
7. JONES, L. W. y KOK, B.: *Plant. Physiol.*, **41**, 1044, 1966.
8. KELNER, A.: *J. Bacteriol.*, **58**, 511, 1949.
9. MACKINNEY, G.: *J. Biol. Chem.*, **140**, 315, 1941.
10. SHAVIT, N. y AVRON, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 187, 1963.
11. TROSKO, J. E. y MANSOUR, V. H.: *Radiat. Res.*, **36**, 333, 1968.
12. TROSKO, J. E. y MANSOUR, V. H.: *Radiat. Bot.*, **9**, 523, 1969.
13. YAMAMOTO, H. Y., NAKAYAMA, T. O. M. y CHICHESTER, C. O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 168, 1962.
14. YAMASHITA, T. y BUTLER, W. L.: *Plant. Physiol.*, **43**, 2037, 1968.

