

## Estudio del Desarrollo, Calidad de Planta y Acumulación de Pigmentos en Lígulas de *Tagetes erecta* L. Expuestas a dos Intensidades de Luz

[Study of development, quality of plant and accumulation of pigments in ligules of *Tagetes erecta* L. exposed to two light intensities]

Silvia EVANGELISTA LOZANO<sup>1</sup>, Denisse UBALDO SUÁREZ<sup>2</sup>, Brenda Hildeliza CAMACHO DÍAZ<sup>1</sup>,  
Martha Lucia ARENAS OCAMPO<sup>1</sup>, Alma Angélica DEL VILLAR MARTÍNEZ<sup>1</sup>,  
Federico GARCÍA JIMÉNEZ<sup>3</sup> & Antonio JIMÉNEZ APARICIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos/Intituto Politécnico Nacional Carretera Yautepec-Jojuta. C. P. 62731, Morelos, México.

<sup>2</sup>Instituto de Química / Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria. Delegación Coyoacán. C. P. 04510, DF, México.

Contactos / Contacts: Antonio JIMÉNEZ APARICIO E-mail address: [ariaparcio@hotmail.com](mailto:ariaparcio@hotmail.com)

### Abstract

The carotenoids are photosensitive pigments during photosynthesis. The objective of this work was to study the effect on development and accumulation of carotenoids in ligules of *Tagetes erecta* exposed under two different lighting ambient (with mesh and without mesh of 50%). The plant development was evaluated measuring the height of the plant, number of floral buds, the ligules diameter. In addition, the quantification and identification of carotenoids from ligules was done by HPLC. The results showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in the height of the plant, number of floral buds and ligules diameter of *T. erecta*. The group grown without mesh received greater UV radiation and different temperature, that under a mesh. The first conditions lead to a reduction of the ligules diameter and total content of xanthophylls (lutein and zeaxanthin). The plastids ultrastructure in the cells of *T. erecta* developed with mesh showed the greatest amount of thylakoid membranes and more conspicuous starch granules.

**Keywords:** *T. erecta*, ligules, illumination, development, xanthophylls, plastids.

### Resumen

Los carotenoides son pigmentos fotosensibles frente a un exceso de intensidad luminosa durante el proceso de fotosíntesis. El objetivo de este trabajo fue el estudio del efecto en el desarrollo de la planta y la acumulación de carotenoides por la exposición a dos diferentes intensidades lumínicas (con y sin malla de sombra al 50%). Se evaluó el desarrollo de *T. erecta* en cuanto a la altura de la planta, número de botones florales y el diámetro de las lígulas. Adicionalmente, en las lígulas se cuantificaron e identificaron los carotenoides por HPLC. Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en cuanto al desarrollo de las plantas expuestas a mayor radiación UV y temperatura, presentaron reducción del diámetro de las lígulas y disminución en el contenido de Xantófilas totales (luteína y zeaxantina) con respecto a las cultivadas con malla. La ultraestructura de los plastidios mostró mayor cantidad de membranas tilacoidales y gránulos de almidón más conspicuos en las células de las plantas de *T. erecta* desarrolladas con malla.

**Palabras Clave:** *T. erecta*, lígulas, iluminación, desarrollo, xantofilas, plastidios.

**Recibido | Received:** 29 de junio de 2011.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 1 de Septiembre de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Septiembre 2011.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** CONACYT, Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y Beca-Tesis IPN Institucional. La investigación fue realizada con el financiamiento económico de los proyectos CGPI (2004-0676, 2005-0278 Y 2006-0123) y Fundación Produce Morelos.

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Silvia Evangelista Lozano, Denisse Ubaldo Suarez, Brenda Hildeliza Camacho Díaz, Martha Lucia Arenas Ocampo, Alma Angélica Del Villar Martínez, Federico García Jimenez, Antonio Jimenez Aparicio. 2011. Estudio del desarrollo, calidad de planta y acumulación de pigmentos en lígulas de *Tagetes erecta* L. expuestas a dos intensidades de luz. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(5): 476 – 488.

**Lista de abreviaciones:** Abs – Absorbancia; D –Factor de dilución; gM – gramos de la muestra; F– Factor de extinción de la luteína; PF – Peso fresco; PS – Peso seco; e – Estromas; mt – Membrana tilacoidal; a – Almidón; vl – Vesículas lipídicas; pc – Pared celular.

## INTRODUCCIÓN

La caléndula (*Tagetes erecta* L.), perteneciente a la familia de las *Asteraceae* coloquialmente es nombrada “Cempoalxochilt” (náhuatl: flor de veinte pétalos), es una planta herbácea con importancia ornamental e industrial (Del Villar-Martínez et al., 2009), además ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana como antiparasitario, antiespasmódico, antioxidante y anti-mutagénico, estos dos últimos efectos terapéuticos han sido atribuidos a los carotenoides responsables de la pigmentación de la planta (Delgado-Vargas et al., 2003).

*Tagetes erecta* L. es una planta C3 con alto contenido de pigmentos (Bosma et al., 2003), que presenta lígulas botríticas de flores sésiles (liguladas) sobre un receptáculo (Rzedowski y Rzedowski, 2005). En estas lígulas el principal carotenoide presente es la luteína; compuesto del que se ha demostrado carácter anti-mutagénico en formas de dosis-dependiente (Del Villar-Martínez et al., 2010). Por lo que actualmente se ha dado un especial interés por el uso de esta planta con fines medicinales.

Las plantas superiores están sujetas a múltiples señales ambientales que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo (Thompson y White, 1991; Marraccini et al., 1994), tales como la luz, temperatura, humedad relativa, factores de estrés, que en exceso desnaturalizan las moléculas que forman parte integral de las membranas del aparato fotosintético, en especial a los carotenoides (Long et al., 1994), estos compuestos están localizados en los plastos que durante el desarrollo de la lígula, son transformados de proplástidas en cromoplastos. La ultraestructura de estos plastos sufre cambios notables, en cuanto a la organización interna y posible desaparición de ellos durante el desarrollo de la flor (Del Villar-Martínez et al., 2009).

Los Carotenoides además de ser responsables de la pigmentación de la planta son disipadores del exceso de energía luminosa a través del ciclo de la zeaxantina (Bungard et al., 1999; Hirschberg, 2001), proceso conocido como disipación no fotoquímica (NPQ). Con esto se protegen los tejidos contra el daño foto-oxidativo (Britton, 1998). En este sentido Sánchez-Millán et al., (2006), evaluaron los cambios

en la concentración total de xantofilas bajo condiciones de invernadero y concluyeron que la biosíntesis de carotenoides en *T. erecta* puede ser afectada drásticamente por la cantidad y calidad de la luz; modificando la formación de distintas especies químicas de carotenoides.

Dymova y Golovko (2007) determinaron que los pigmentos fotosintéticos disminuyen en *Ajuga reptans* cuando se crecieron a la intemperie en comparación con las que estuvieron bajo cubierta. Ganelevin (2005) al cultivar *Lycopersicon esculentum* bajo sombra (malla al 50%), reporto incrementos en la producción, calidad y tamaño de la fruta. Por otro lado Bungard et al., (1999) indicaron que la velocidad de la pérdida del pigmento estuvo directamente correlacionada con la intensidad de la luz.

Por lo anterior en este trabajo se evaluó el efecto de la intensidad lumínica en la calidad de la planta, acumulación de carotenoides y cambios ultraestructurales en lígulas durante el desarrollo de *T. erecta*; con el fin de contribuir al conocimiento sobre la fototransformación de los carotenoides, pigmentos con actividad antioxidante y anti-mutagenica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material biológico y germinación*

Se germinaron semillas de *Tagetes erecta* L. de la variedad Marvel african (Akiko S. A. de C. V.) de porte bajo; en recipientes especiales para germinación de 38 cavidades. Estas fueron trasplantadas con tres hojas definitivas y un tamaño de  $13,0 \pm 2,0$  cm a macetas conteniendo una mezcla de turba, agrolita y vermiculita en proporción 3:1:1. El sustrato tuvo una porosidad del 86% y un pH de  $5-8 \pm 0,2$ . Se establecieron lotes de 65 plantas; las cuales se regaron con la solución nutritiva descrita por Hogland y Arnon (1950).

### *Ambientes de cultivo de T. erecta*

Cada lote de plantas se cultivó en dos ambientes lumínicos; A) un invernadero tipo casa sombra con malla del 50% (Polysack®) y B) a la intemperie sin malla RFA. La intensidad luminosa se midió con un cuantómetro (Apogee® Modelo QMSW-55) en un intervalo de  $0-1000 \mu E m^{-2} s^{-1}$ . Además se llevó el registro de la humedad relativa (HR %) y temperatura (°C) con un higrómetro (Extech Instruments® modelo RH520) cada hora/ mes, tanto bajo malla como a la intemperie, con lo que se obtuvo el valor de

radiación fotosintéticamente activa (RFA) en unidades de mol/mes.

### Desarrollo de las plantas

a) Altura: se evaluó midiendo desde el cuello del tallo hasta la última yema terminal a los 90 días.

b) Color de follaje: se evaluó el color del follaje en coordenadas Lab, utilizando la tabla de colores para tejidos vegetales de Munsell (1977)

c) Evaluación de botones florales en dos ambientes de luz: se registró la fecha en que aparecieron los primeros botones después del trasplante, se contabilizó el número de botones (receptáculos unidos); así también, una vez que las lígulas abrieron completamente se registró el diámetro de estas (diámetro de pompón).

d) Peso fresco y seco de las lígulas: se cortaron al límite superior del receptáculo a los 90 días después del trasplante, se colocaron de manera individual en bolsas de papel para determinar posteriormente el peso fresco de cada una; posteriormente fueron deshidratadas en una estufa eléctrica con circulación de aire (Scorpion Scientific, 50107) a 50° C durante 8 h, para evaluar el peso seco de estas por gravimetría.

### Extracción y cuantificación del contenido de Xantofilas totales por espectrofotometría UV/Vis

Una vez deshidratadas, se separaron las lígulas de las lígulas y fueron pulverizadas en un molino ultracentrífugo (Retsch, ZM 200). El polvo, se pasó por un tamiz metálico (Retsch, AS-200) con un diámetro de malla de 600 µm. La extracción de los pigmentos se realizó según el método de la AOAC (1984) en matraces volumétricos de 10 mL; se pesaron 50 mg de polvo de planta y se adicionó 3 mL de una solución compuesta por "HEAT" (hexano: etanol: acetona: tolueno; 10:6:7:7, v/v/v/v) para agregar posteriormente 2 mL de KOH al 40% en metanol al 80%.

Los matraces se taparon e incubaron a 20° C durante 16 h. Posteriormente se llevaron a un volumen de 10 mL con NaSO<sub>4</sub> al 10%. La solución fue agitada durante 2 min en un vortex (Labnet, VX-100) y se dejó en reposo durante una hora hasta la clarificación de la epifase en la oscuridad, para después centrifugar 100 µL de ésta.

Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 474 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Lobomed, UVD-3500), usando hexano como blanco. Finalmente las xantofilas totales se reportaron en g/Kg de polvo según la AOAC (1984).

$$\frac{Abs \times D \times F}{gM} = \frac{g \text{ de xantófilas totales}}{Kg \text{ de muestra}}$$

donde:

Abs: Absorbancia

D: Factor de dilución

gM: gramos de la muestra

F: Factor de extinción de la luteína

### Identificación y cuantificación de pigmentos por HPLC.

Se realizó la identificación y la cuantificación de las especies químicas, a los extractos (oleorresinas) de las lígulas de *T. erecta* desarrolladas bajo dos ambientes de luz, mediante un cromatografo de líquidos de alta resolución HPLC, (Hewlett Packard, 1100), equipado con una bomba cuaternaria y un detector UV-Vis con arreglo de diodos. La fase estacionaria fue una columna C18 (Alltech Allsphere ODS-1 5µ de 250 mm de longitud con un diámetro interno de 4.6 mm); para la fase móvil se emplearon dos mezclas de disolventes; Disolvente A: Acetonitrilo:Metanol:TRIS-HCl pH 8.0 - 0.1 M 108:12:4.5 (v/v, v/v, v/v) y Disolvente B: Metanol:Hexano 80:20 (v/v).

La elusión de 20 µL de muestra fue en gradiente y en fase reversa; iniciando con 100% del disolvente A durante 5 min y a los 2.5 min se cambió por el disolvente B al 100% manteniéndose durante 7.5 min teniendo un tiempo total de corrida de 15 min, con flujo constante de 2.0 mL/min. La detección de los pigmentos se realizó mediante con un detector de arreglo de diodos con intervalo de 360 a 800 nm, con un registro fijo a 440 nm.

La identificación de pigmentos se realizó por comparaciones del tiempo de retención de cada pigmento en el cromatograma y de picos máximos de absorción correspondientes a los pigmentos identificados (cis-luteína, luteína, zeaxantina) relacionándolos con tablas de absorción reportadas por diferentes autores: Mínguez-Mosquera y Homero-Méndez, 1993; Razungles *et al.*, 1996; Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997; Mercadante *et al.*, 1997 y Goodwin, 1980. Una vez que se identificaron por comparación los picos de absorción correspondientes a cada pigmento, la cuantificación de éstos, se realizó integrando el área bajo la curva del pico del cromatograma. Los coeficientes de extinción y factores de conversión empleados para la cuantificación de luteína y zeaxantina fueron 2550, 27.10 y 2540, 26.90, respectivamente.

**Análisis de la ultraestructura de plastidios de lígulas.**

La colecta de lígulas se realizó en una cámara húmeda durante las primeras horas del día. Se trasladaron al laboratorio en donde se separaron las lígulas y se cortaron en cuadros no mayores de 1 mm<sup>2</sup> fijándose inmediatamente en glutaraldehído al 2.5%. Posteriormente se pasaron a una solución de p-formaldehído en un buffer de cacodilato a una concentración de 0.1 M (pH 7.4) durante 12 h a 4° C.

Posteriormente los fragmentos de las lígulas se lavaron en buffer de cacodilato con sacarosa 0.25 M y se fijaron nuevamente con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de cacodilato durante 12 h a 4° C. Después se deshidrató el tejido con diferentes concentraciones de alcohol (desde 10 hasta el 100%). Las muestras se depositaron en óxido de propileno (1:1 v/v) durante un día y finalmente se incluyeron en resina; la cual se dejó polimerizar en un horno a 60° C durante 36 h. Las muestras se cortaron en secciones 900 Å de grosor en un ultramicrotomo (LKB Nova), se colocaron en rejillas de Níquel recubiertas por una película de collodion. Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 2%

para la observación en microscopio electrónico de transmisión (JEOL-1010, 1200 EXII a 80 kV,) al alto vacío. El análisis ultraestructural de las micrografías se basó en la organización de las estructuras en las que se almacena el pigmento, los plastidios.

**Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de la altura de 65 plantas, botones florales, peso fresco y peso seco de las lígulas y contenido de las xantófilas totales en los dos ambientes, evaluados por triplicado, consistió en un Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor completamente aleatorio mediante el software Origin versión 7.0. con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

**RESULTADOS**

Las plantas con malla presentaron una altura total de  $27,9 \pm 2,0$  cm a los 90 días  $\pm 5$ , las desarrolladas sin malla mostraron una altura menor ( $24,2 \pm 2,6$  cm) (Tabla 1) además las plantas con malla presentaron un color verde más intenso (4G 8/4) (Munsell, 1977).

**Tabla 1**  
Desarrollo vegetativo y floración de *Tagetes erecta* L. en dos ambientes de luz

Desarrollo	Con malla	Sin malla
Altura de la planta (cm)	$27.90 \pm 1.96^a$	$24.2 \pm 2.58^a$
Número de botones	$28.00 \pm 1.34^a$	$10.0 \pm 2.12^b$
Diámetro de lígulas (cm)	$8.96 \pm 1.160^a$	$5.64 \pm 0.569^b$

\*Media de 20 repeticiones  $\pm$  error estándar

Letra diferente en cada columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

Después del trasplante los primeros botones florales aparecieron a los  $60 \pm 3$  días bajo malla y sin malla a los  $70 \pm 5$  días; una diferencia de 10 días con respecto al cultivo sin malla. el promedio del número de botones florales con malla fue de  $28 \pm 1,34$  botones; sin malla  $10 \pm 2,12$  botones (algunos botones al inicio de su formación se deshidratación). el

diámetro de la lígula bajo la malla fue de  $8,96 \pm 1,2$  cm; sin malla  $5,646 \pm 0,6$  cm (Tabla 1).

Los datos de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) que se registró durante el último mes bajo la malla fue de 220,30 mol/mes, los cuales presentaron diferencia significativa con respecto a la de sin malla de 628,79 mol/mes (Tabla 2).

**Tabla 2**

Radiación fotosintéticamente activa acumulada durante el desarrollo del ciclo de cultivo de *Tagetes erecta* L con malla y sin malla.

Mes	Con malla (mol/ mes)	Sin malla (mol./mes)
1	166.88	283.11
2	194.61	489.68
3	220.30	628.79

\*Promedio mensual X2: P < 0.001

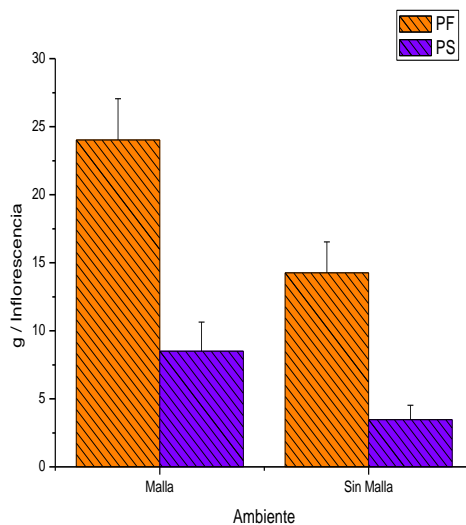
La temperatura promedio bajo la malla fue en promedio de 26.2°C y sin malla de 33.6°C, con una diferencia estadística de p ≤ 0.05

El peso fresco (PF) promedio de las lígulas a la cosecha de las plantas con malla fue de 24,3 ± 3,0 g; para las plantas sin malla fue de 14,26 ± 2,3 g. Por otro lado el peso seco (PS) de de las lígulas a la cosecha de las plantas con malla fue de 8,50 ± 2,1 g; y

sin malla de 3,47 ± 1,0 g. Resaltando que el PF y PS de las lígulas tratadas sin malla ambos registros fueron menores que cuando fueron desarrolladas con malla (Figura 1).

**Figura 1**

PF y PS promedio de las lígulas de *Tagetes erecta* L. expuestas con malla y sin malla.



La mayor concentración de xantófilas determinadas por espectrofotometría UV/Vis que se obtuvo fueron con malla (4,393 ± 0,14 g de

xantofilas/Kg de polvo de planta) con una RFA de 556 mol/día, y sin malla de (3,013 ± 0,02 g de xantofilas/Kg polvo de planta), recibiendo en ésta

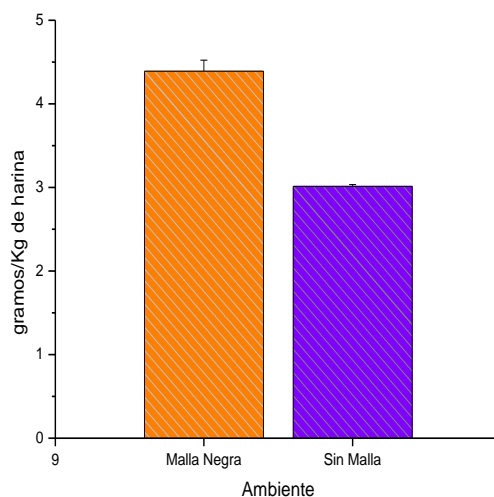
última, una irradiación de  $1121 \pm 1,3$  mol/día, se observó diferencia significativa (Figura 2).

El espectro de absorción obtenido por HPLC en gradiente y en fase reversa del extracto del polvo de planta de lígulas *Tagetes erecta* L. expuestas con malla y sin malla, correspondió a extractos completamente saponificados, presentando un perfil típico de xantófilas al ser comparado con los espectros de absorción máxima reportados en la literatura.

En los cromatogramas del polvo de plantas de lígulas que permanecieron bajo malla, el pico detectado a los 6,23 min correspondió al isómero cis-luteína, un pico principal se presentó con un tiempo de retención de 7,57 min, el cual, se identificó como luteína y un tercer pico con un tiempo de retención de 7,81 min que se identificó como zeaxantina (Figura 3).

**Figura 2**

Contenido de xantófilas totales promedio en las lígulas expuestas con malla y sin malla por espectrofotometría UV/Vis bajo dos ambientes de luz.

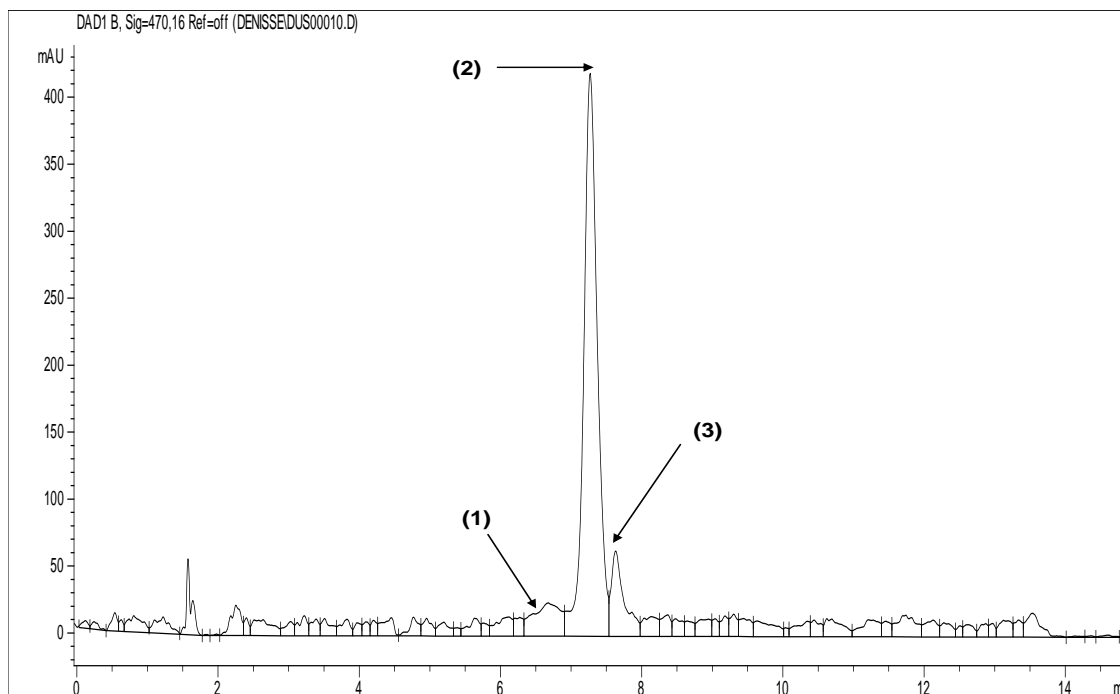


En el cromatograma del extracto correspondiente a las lígulas sin malla, el pico detectado a los 6,67 min correspondió al isómero cis-luteína, el pico máximo fue detectado a 7,27 min y correspondió a luteína, el tercer pico detectado a 7,632

min, el cual correspondió a zeaxantina. Se observaron otras señales con un tiempo de retención de 8,14 min estos fueron identificados como grupos epóxidos (Figura 4).

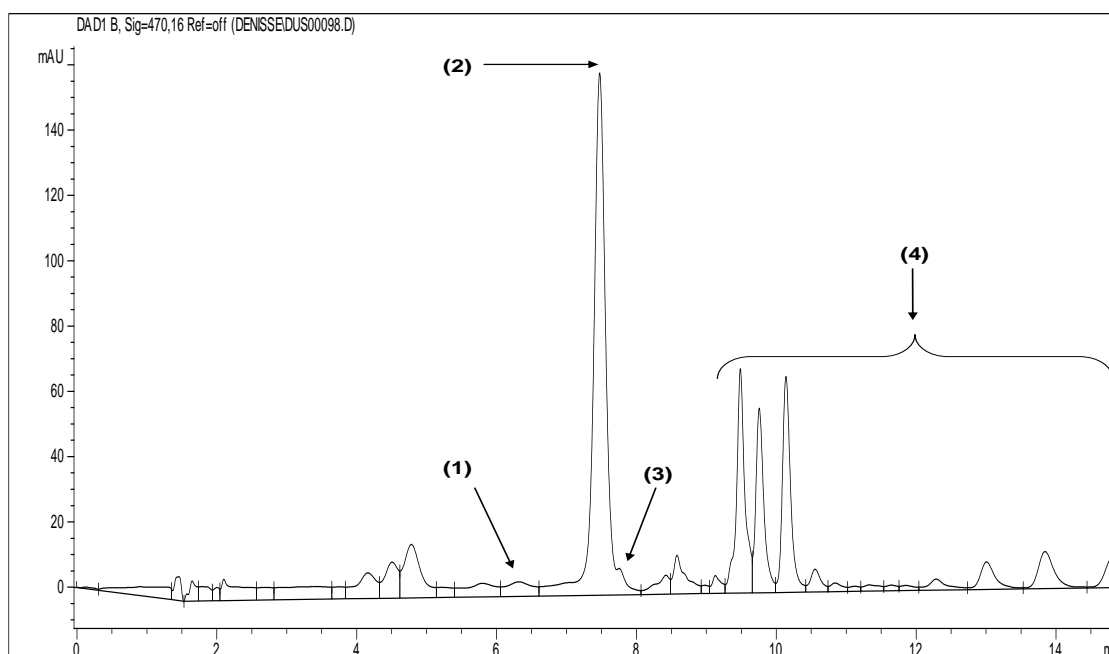
**Figura 3**

Perfil cromatográfico del HPLC obtenido de las oleorresinas de lígulas provenientes de lígulas expuestas con malla. Los números indican los carotenoides: (1): cis-luteína, (2): luteína y (3): zeaxantina.



**Figura 4**

Perfil cromatográfico del HPLC obtenido de las oleorresinas de lígulas provenientes sin malla. Los números indican los carotenoides: (1): cis-luteína, (2): luteína, (3): zeaxantina y (4) grupos epóxidos.



La cuantificación de carotenoides identificados anteriormente realizado bajo la curva del pico correspondiente a ese pigmento en el

cromatograma se reportaron como el porcentaje de área relativa para con malla y sin malla (Tabla 3).

**Tabla 3**

Porcentajes de áreas relativas de los pigmentos identificados en oleorresinas de lígulas de *Tagetes erecta* L. con malla y sin malla

Pigmento	Area Relativa (%)	
	Con malla	Sin malla
Cis-luteína	5.21	4.49
Luteína	90.03	66.17
Zeaxantina	2.89	1.79
Epóxidos	1.87	27.55

En el análisis de la ultraestructura de plastidios en lígulas de *T. erecta* bajo dos ambientes, a través de micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de transmisión (MET), se observaron diferentes componentes de los plastidios como, membranas tilacoidales; vesículas lipídicas y gránulos de almidón.

Para el caso de las lígulas que permanecieron bajo malla sombra se observaron plastidios con un sistema de membranas altamente ramificado; así como, cuerpos lipídicos en forma de manchas de color oscuras (Figura 5A). En membranas tilacoidales, el grana se encontró rodeado de gránulos de almidón de color blanco y forma ovoide (Figura 5B).

En los extremos del cloroplasto, pudieron observarse extensiones de las membranas tilacoidales rodeadas de gránulos de almidón y unidas a la membrana interna del cloroplasto, la cual es una zona hidrofóbica, donde se encontró presencia de cuerpos lipídicos en la periferia cercana a la membrana (Figura 5C). Además, se observaron grandes gránulos de almidón rodeados por el estroma (Figura 5D).

En las lígulas sin malla dominó la presencia de gránulos de almidón (Figura 6A), y el sistema membranoso de los tilacoides fue menos abundante con las lígulas bajo la malla. Las bandas tilacoidales fueron escasas y en algunos casos desorganizada (Figura 6B). En la Figura 6C el plastidio se encuentra próximo a la pared celular con membranas tilacoidales delgadas y en la Figura 6D resalta el tamaño del almidón presente en el plastidio.

## DISCUSIÓN

Las plantas que permanecieron bajo la malla mostraron una altura, número de botones florales y

diámetro de las lígula mayores que las plantas sin malla (Tabla 1). Esta diferencia posiblemente se debe a que es una planta C3 que requiere una alta humedad, debido a que pierden agua durante la exposición a los rayos del sol (Azcón-Bieto y Talón, 1993; Hopkins, 1995; Buchanan *et al.*, 2000). Esto implica que las plantas sin malla permanecieron en un ambiente más estable y su desarrollo se vio favorecido en un mayor y mejor desarrollo, permitiéndoles que expresen su máximo potencial (Vazquez-García *et al.*, 2002).

Según Ganelevin (2005), plantas de tipo C3 como el tomate expuestas a una alta radiación, activan procesos meristemáticos dando una alta diferenciación de primordios florales; sin embargo varios se deshidrataban o no llegaban a formar botones completos, además de presentar crecimiento acelerado de las hojas y folíolos muy separados. Ganelevin (2005) demostró una alta floración en *Lycopersicon esculentum*, manifestándose en la producción y calidad de la fruta con el uso de malla sombra. Por otro lado, Sánchez-Millán *et al.*, (2006) encontraron que las lígulas de las plantas cultivadas en el invernadero de plástico presentaron mayor diámetro que las cultivadas en el invernadero de vidrio ( $6,77 \pm 0,71519$  cm).

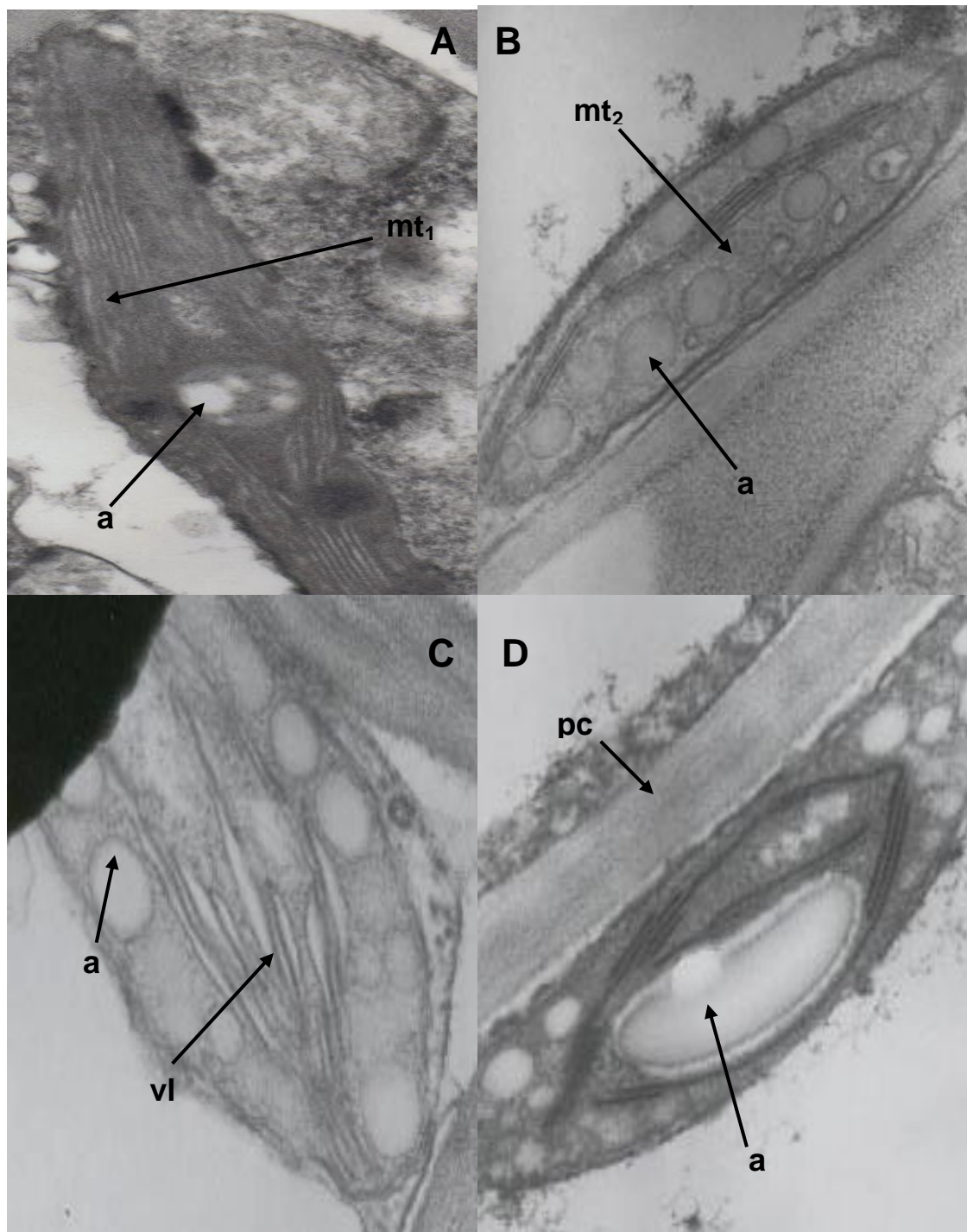
Algunos trabajos reportan que el uso de malla sombra es sumamente positivo para cultivos foliáceos, sobre todo durante el verano (Ganelevin, 2005; Salazar *et al.*, 2010). En otro trabajo realizado por Oren-Shamir *et al.*, (2001), pusieron plantas de *Pittosporum* y helechos, bajo la malla, reportaron una mayor ramificación y color de hojas con calidad comercial a diferencia de las manejadas sin malla. Aunque *Tagetes erecta* no es una planta cultivada por su follaje como algunas hortalizas, también el desarrollo de las hojas



se vio influenciado manifestando hojas verdes y compactas en las plantas desarrolladas sin malla.

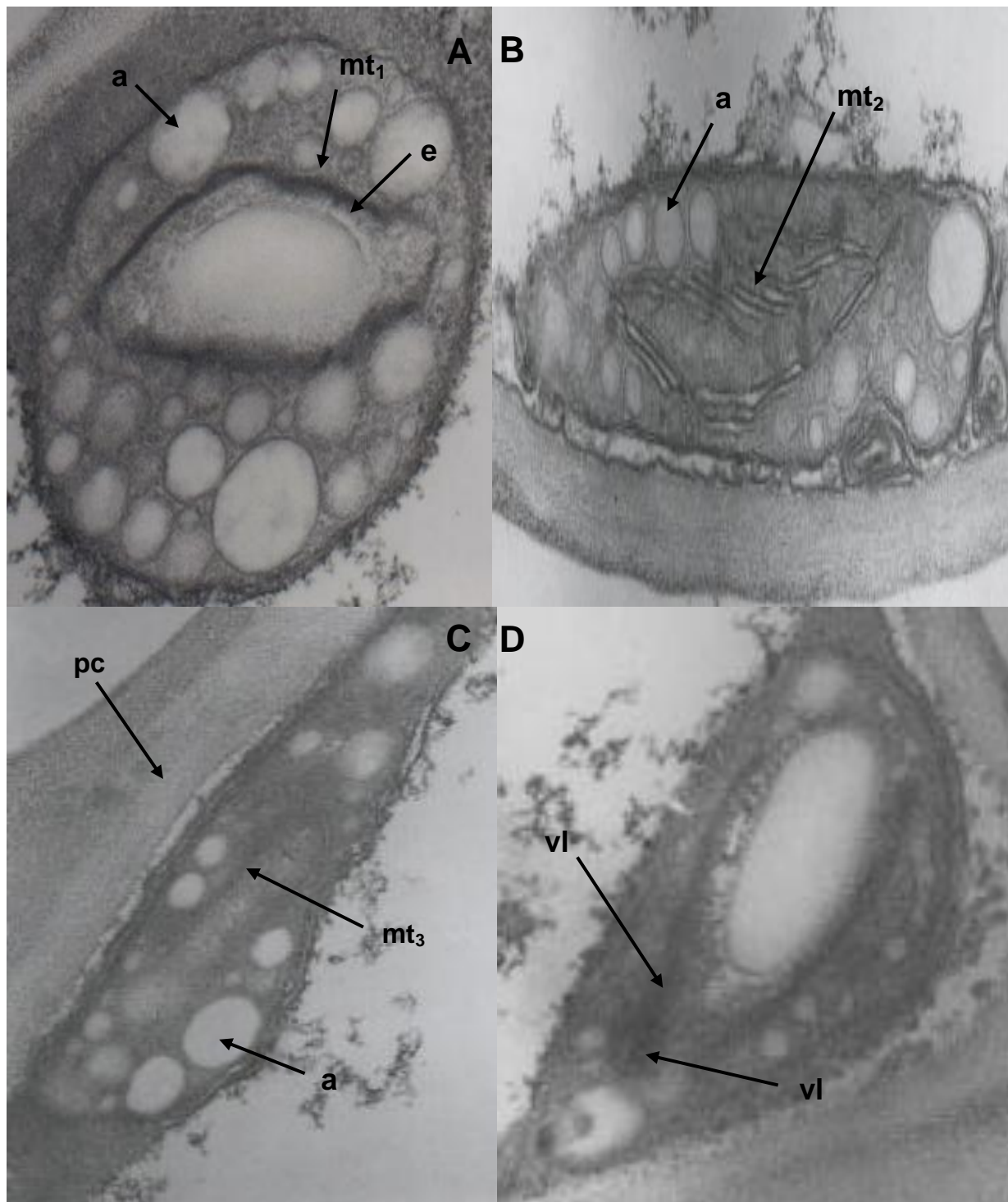
**Figura 5**

Micrografía de cortes longitudinales de plastidios de lígulas expuesta con malla en diferentes etapas de desarrollo, con las estructuras que se indican: (e): Estroma, (mt): Membranas tilacoidales, mt1-abundantes y muy apiladas, posiblemente ya no sintetizan clorofila, mt2-alineadas al centro y finas, mt3-ligeramente hinchadas, en forma de bolsa; mt4-, más engrosadas rodeando a gránulos de almidón; (a): almidón, (vl): vesículas lipídicas, (pc): Pared celular.



**Figura 6**

Micrografías de plastidios de lígulas expuestas sin malla en diferentes etapas de desarrollo. A y B cortes transversales, C y D cortes longitudinales. Con las estructuras que se indican: (e) estroma; (mt) membranas tilacoidales, mt1-finas, mt2-dispersas y ligeramente hinchadas, mt3-muy tenues; (a) almidón; (vl) vesículas lipídicas; (pc) pared celular.



El peso fresco y peso seco que manifestaron las lígulas fue mayor en las de malla (Figura 1), posiblemente debido a la alta capacidad fotosintética por el ambiente, es decir, que no hubo un factor ambiental brusco que pudiera estresar a la planta (luz, temperatura, humedad relativa, principalmente), dándose condiciones más estables a diferencia de las desarrolladas sin malla donde las condiciones de intensidad lumínica excesivas llevaron a la planta a recudir su desarrollo vegetativo y capacidad fotosintética. Resultados similares a lo que obtuvo Sánchez-Mill n *et al.*, (2006), ya que el peso seco de las lígulas fue mayor en las plantas provenientes del invernadero de plástico que en las del invernadero de vidrio, dado que, en el plástico no estuvieron influenciadas directamente por la radiación UV.

Las lígulas irradiadas a 1100 mol/mes presentaron menos concentración de xantófilas ( $5,67 \pm 1,48 \text{ g x kg}^{-1}$  polvo de planta), que las lígulas irradiadas con malla (400 mol/mes) ( $7,68 \pm 1,25 \text{ g x kg}^{-1}$  polvo de planta) (Figura 2), observándose que la perdida de pigmento es directamente proporcional a la intensidad de la luz (Bungard *et al.*, 1999); Sánchez-Mill n *et al.*, 2006; Dymova y Golovko, (2007), encontraron una respuesta similar en cuanto a una mayor concentración de xantófilas totales en invernaderos. Concluyendo que las condiciones ambientales especialmente la luz, controlan la biosíntesis de los pigmentos y la cantidad de los mismos.

Los cromatogramas mostraron que las áreas relativas de cis-luteína, luteína y zeaxantina, en las lígulas con malla fueron mayores que las sin malla (Figura 3 y 4), donde se observó una disminución significativa además de la aparición de grupos epóxidos, dado que las lígula sin malla presentaron daños por el exceso de luz solar provocando la oxidación de los carotenoides convirtiéndolos en los grupos epóxidos. Bungard *et al.*, (1999) demostraron que la luteína puede ser fototransformada a luteína-5,6-epóxido.

En las lígulas sin malla, la luteína presentó cambios drásticos en las concentraciones, pues se presentó una disminución de cis-luteína y zeaxantina, posiblemente por reacciones fotoquímicas, dado que la luteína es transformada a neoxantina u otro intermediario del ciclo de las xantófilas.

Young y Britton (1990), menciona que la presencia de grupos epóxidos en las lígulas sin malla son por procesos fotoquímicos en el tejido

fotosintético como mecanismo de protección a altas irradiaciones de luz solar. Sapozhnikov *et al.*, (1957) fueron los primeros en reportar que la disminución de la concentración de violaxantina en hojas de plantas de chícharo expuestas a intensa RFA. Posteriormente, Yamamoto *et al.*, (1999) demostraron que la violaxantina se restituía a partir de zeaxantina en la oscuridad o en baja RFA, lo que confirmo que existía una interconversión de los pigmentos.

Comparando la ultraestructura de los plastidios, se detectaron cambios importantes en el número y distribución de membranas tilacoidales, en lígulas expuestas con malla (Figura 5) los cromoplastos tuvieron forma alargada a esférica en contraste con las formas irregulares de los cromoplastos presentes en las lígulas sin mallas. Los cromoplastos en lígulas expuestas con malla correspondieron a una etapa primaria debido a que ya no se encuentran produciendo clorofila, sino carotenoides, por lo que presentaron un sistema de membranas muy ramificado y numeroso, con presencia de vesículas lipídicas (manchas oscuras), organelos donde se encuentran almacenados los carotenoides, debido a que son moléculas altamente lipofílicas (Gruszecki, 1999) (Figura 6).

En la Figura 5B, se observó un cromoplasto de forma alargada, con un sistema de membranas tilacoidales más limitado y apiladas, con una mayor presencia de almidón; comparando la Figura 5A y 5C, se muestra un cromoplasto correspondiente a una etapa intermedia, con sus membranas tilacoidales ligeramente hinchadas y en forma de bolsa (Hooper H uner, 1984); a diferencia de la figura 5D, donde se observó un cromoplasto más avanzado en su desarrollo, con sus membranas tilacoidales más anchas y alargadas, en la periferia de un gránulo de almidón. En general, se pudo apreciar que hubo una menor acumulación de gránulos de almidón, esto posiblemente se debió que al estar las plantas bajo condiciones más estables y al no recibir altas radiaciones de luz, la planta no tuvo la necesidad de almacenar reservas, como es el almidón; por lo que pudo haber sintetizado más pigmento.

En las micrografías de lígulas sin malla (Figura 6A, 6C), se observaron en general cromoplastos modificados, con una mayor acumulación de almidón, sistema de membranas tilacoidales limitada y en algunos casos en forma de sacos o de bolsas, en algunos otros, se observaron sistemas de membranas tilacoidales desordenados y

poco apilados (Figura 6 B, D), ya que sin malla, las plantas estuvieron bajo condiciones ambientales extremas, tanto de luz como de temperatura, por lo que tuvo que almacenar más reservas para sobrevivir; por lo que, la cantidad y el tamaño de gránulos de almidón fue más sobresalientes (Figura 5A).

## CONCLUSIONES

El desarrollo vegetativo evaluado con la altura de la planta de *T. erecta* en los dos ambientes: bajo malla y sin malla presentó diferencias significativas siendo las de mayor altura las expuestas bajo malla; así como con mayor número de botones florales y el diámetro de las lígulas. El contenido de xantofilas totales en las lígulas de *T. erecta* en los ambientes fue mayor en las expuestas bajo la malla. En el análisis ultraestructural de los plastidios de lígulas bajo los dos ambientes mostraron diferencias en cuanto a la disposición sistema membranoso de los tilacoides y una mayor apilación de grana en los plastidios. En general, el cultivo bajo la malla proporcionó mejores resultados en el desarrollo vegetativo así como mayor acumulación de carotenoides en las lígulas. A partir de esto se pudo inferir que al estar expuestas las lígulas de *T. erecta* a altas irradiaciones se presentó la fotodegradación de los carotenoides, mediante el ciclo de las xantofilas, que pudo haber sido una oxidación de zeaxantina a violaxantina y de luteína a luteína-5,6-epóxido. Es decir, que a irradiaciones muy elevadas y temperaturas altas, se inhibió la fotosíntesis y la formación de carotenoides; en cambio en las lígulas de *T. erecta* desarrolladas bajo la malla con una menor irradiación y temperatura más baja; hubo un mejor desarrollo vegetativo y una a mayor biosíntesis de los carotenoides.

## AGRADECIMIENTOS

CONACYT, Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y Beca-Tesis IPN Institucional. La investigación fue realizada con el financiamiento económico de los proyectos CGPI (2004-0676, 2005-0278 Y 2006-0123) y Fundación Produce Morelos.

## REFERENCIAS

AOAC 1984. **Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists** (14<sup>th</sup> Ed). Washington, DC, USA

Azcón-Bieto J, Talón M. 1993. **Fisiología y Bioquímica Vegetal**. Ed. Interamericana-McGraw Hill. España. pp. 393-418.

Bosma LT, Dole MJ, Maness ON. 2003. Crop ecology, management and quality. **Crop Sci** 43: 2118 - 2124.

Britton G. 1998. **Overview of carotenoid biosynthesis**. In: Britton, G. (ed.) *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. Basel: Birkhäuser. pp. 13-147.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. **Membrane structure and inheritance of cell membranes**. In *Biochemistry Molecular Biology of Plants*. Ed. American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland.

Bungard RA, Ruban AV, Hibberd JM, Press MC, Horton P, Scholes JD. 1999. Unusual carotenoid composition and new type of xanthophyll cycle in plants. **Proc Natl Acad Sci** 96: 1135 - 1139.

Del Villar-Martínez AA, Vanegas-Espinoza PE, Paredes-López O. 2009. **Marigold as an important source of carotenoids**. En: *Plants Secondary Terpenoids*. Signpost. Ed. Palazón, J. y Cusidó. pp.131 - 138

Del Villar-Martínez AA, Vanegas-Espinoza PE, Paredes-López O. 2010. **Marigold regeneration and molecular analysis of carotenogenic genes**. En: *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Ed. Humana Press and Springer. 589: 213 - 221.

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. 1997. Enzymatic treatment to enhance carotenoid content in dehydrated marigold flower meal. **Plant Food Hum Nutr** 50: 163 - 169.

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. 2003. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA

Dymova OV, Golovko TK. 2007. Pigment Apparatus in *Ajuga reptans* plants as affected by adaptation to light growth conditions. **J Plant Physiol** 54: 339 - 345

Ganelevin R. 2005. Mallas de colores para el mejoramiento de la productividad y calidad de la fruta en plantaciones de manzana. **Fruticultura profesional** 148: 50 - 52

Goodwin TW. 1980. **The biochemistry of the carotenoids**. Vol. 1. Plants London Chapman & Hall.

Gruszecki IW. 1999. **Carotenoids in membranes**. In: *The photochemistry of carotenoids*. Ed. Kluwer Academic Publishers. USA.

Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. **Curr Opin Plant Biol** 4: 210 - 218.

- Hogland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. **Calif Agric Exp Station**, Circular. 347.
- Hooper JK, Hüner NPA. 1984. **Chroloplast**. Ed. Plenum Press, New York, USA.
- Hopkins WG, 1995. **Introduction to Plant Physiology**. Ed. Wiley John & Sons, Inc. USA.
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG, 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annu Rev Plant Phys** 45: 633 - 662.
- Marracini P, Cassier-Chauvat C, Balteau S, Chávez S, Chauvat F. 1994. Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC6803 share a consensus motif involved in photoregulation. **Mol Microbiol** 6: 1005 - 1012.
- Mercadante A, Rodríguez-Amaya D, Britton G. 1997. HPLC and mass spectrometric análisis of carotenoids from mango. **J Agr Food Chem** 45: 120 - 123.
- Minguez-Mosquera M, Homero-Méndez D. 1993. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red pepper (*Capsicum annum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. **J Agr Food Chem** 41: 1616 - 1620.
- Munsell HH, 1977. **Munsell Color Charts for Plant Tissues**, pp. 1-20, Macbeth Division of Kollmorgen Instruments Corporation. 405 Utle Britain Road New Windsor, New York. USA.
- Oren-Shamir M, Gussakovsky EE, Spiegel E, Nissim-Levi A, Ratner K, Ovadia R, Giller YE, Shahak Y. 2001. Mallas de sombreo de color pueden mejorar la producción y la calidad de ramas decorativas verdes de *Pittosporum variegatum*. **J Hortic Sci Biotech** 76: 353 - 361.
- Razungles A, Babic I, Sapis J, Bayonove C. 1996. Particular behavior of epoxy xanthophylls during veraison and maturation of grape. **J Agr Food Chem** 44: 3821 - 3825.
- Rzedowski J, Rzedowski GC. 2005. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. II. Ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. México DF, México.
- Salazar PC, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen J J, Morales F. 2010. Effects of climate change scenarios on Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening: response to a combination of elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and moderate drought. **Plant Soil** 337: 179 - 191
- Sánchez-Millán JL, Arreguín-Espinosa R, Barradas VL, Anaya-Lang AL, García-Jiménez FA. 2006. Efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) en carotenoides en condiciones *in vitro* e *in vivo*. **XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica**. Guanajuato, Gto., México.
- Sapozhnikov DJ, Kraskovskaya TA, Mayevskaya AN. 1957. Dokl. & ad Nauk 113: 465 - 467.
- Thompson WF, White MJ. 1991. Physiological and molecular studies of lightregulated nuclear genes in higher plants. **Annu Rev Plant Phys** 42: 423 - 466.
- Vázquez-García LM, Viveros-Farfán IMG, Salomé-Castañeda E. 2002. **Cempasúchil (Tagetes spp.)**. **Recursos Fitogenéticos Ornamentales de México**. Ed. Universidad del Estado de México.
- Yammamoto YH, Bugos CR, Hieber D. 1999. **Biochemistry and molecular biology of the xanthophyll cycle**. In: The photochemistry of carotenoids. Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ Ed. Kluwer Academic Publishers. USA.
- Young A, Britton G. 1990. Photobleaching in the unicellular green alga *Dunaliella parva* 19/9. **Photosynth Res** 25: 129 - 136.