

Incorporación del Académico Correspondiente Dr. Ambrosio R. Bottini

Resumen de Conferencia

FITOHORMONAS ¿Cómo interpretan las plantas las señales del ambiente?

Dr. Ambrosio Rubén Bottini ^a

^a Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias, CONICET-Universidad Nacional de Cuyo, (rbottini@fca.uncu.edu.ar)

Algunos organismos en general, y las plantas superiores en particular, por su carácter sésil no tienen más alternativa que enfrentar las condiciones del ambiente ya que no pueden evitar las contingencias del mismo, tal como hacemos los animales. Factores como luz, temperatura, humedad relativa del aire (HR), contenido hídrico del suelo, disponibilidad de nutrientes en el mismo, etc., son señales del cambio en sí mismo o anticipan los cambios por venir.

A modo de ejemplo, observando diversos ambientes veremos que algunos árboles crecen muy alto en busca de la luz solar, mientras que otros lo hacen con una inclinación contraria al sentido de fuertes vientos predominantes.

Otro ejemplo de la respuesta de las plantas al ambiente es la que manifiestan en relación a la radiación electromagnética, ya que esta no sólo actúa como factor trófico en el proceso de fotosíntesis, sino que diversas calidades del espectro luminoso son percibidas por sistemas de pigmentos específicos: los fitocromos en la zona del rojo rojo-lejano, los criptocromos en el azul, y proteínas con residuos de triptófano en el ultravioleta. Además, la percepción del largo del día por parte de algunos vegetales los induce a desarrollar primordios reproductivos. La escasez de agua (o de nutrientes), así como el anegamiento, también actúan como señales a nivel radical. Pero no sólo los factores físicos actúan como señales, sino que diversos componentes bióticos del entorno del individuo también lo son. Va de suyo que las plantas perciben como señales la agresión por parte de patógenos (virus, bacterias, hongos), insectos fitófagos y herbívoros. Del mismo modo, son señales la flora bacteriana del suelo y/o microorganismos endofíticos que integran la interfase suelo-raíz y/o habitan los tejidos vegetales, ya sean de carácter simbiote o de "vida libre", y que no actúan como agentes etiológicos de enfermedades o depredadores, sino como estimuladores del crecimiento.

Una característica bastante frecuente de la percepción de señales del ambiente por parte de los vegetales es que las respuestas pueden ser inductivas (es decir se producen aun cuando el estímulo-señal haya desaparecido) y/o tiene carácter sistémico. Lo que conlleva la sugerencia que la respuesta está mediatizada por algunas sustancias sintetizadas en pequeña cantidad por el metabolismo secundario de algunas células/tejidos que pueden actuar en otras partes de la planta. A estas sustancias les damos el nombre de fitohormonas.

Darwin y Darwin, en 1880, llevaron a cabo experimentos pioneros estudiando la respuesta de coleoptilos de avena a la luz unidireccional. El coleoptilo, una estructura en forma de “capuchón” protector que envuelve y protege el primer par de hojas en la germinación de gramíneas en la fase de emergencia, crece en oscuridad y dicho crecimiento se interrumpe o desvía ante la radiación lumínica proveniente de una fuente lateral. En los experimentos de los Darwin los coleoptiles se curvaban en dirección a la fuente lumínica y esta respuesta desaparecía si se seccionaba el ápice (los primeros 2-3 mm) del órgano, o se lo cubría con un material opaco. Posteriormente, en 1913, Boysen-Jensen encontró que la respuesta se restablecía si el ápice separado se reubicaba mediante un trozo de gelatina, mientras que si la unión se efectuaba mediante una placa de mica (que impedía la difusión de sustancias) esto no ocurría. La conclusión fue que el estímulo lumínico que hacía crecer en forma diferencial las paredes del coleoptilo se propagaba mediante un transmisor químico que se sintetiza en una zona específica y transporta la señal hacia tejidos “blanco”. Es interesante destacar que este concepto de hormona fue tomado luego por la biología animal y desarrollado rápidamente. Sin embargo, en plantas el camino fue algo más tortuoso, en parte porque aquellas no poseen órganos de síntesis específicos (como lo son las glándulas en los mamíferos), y sus células son más “independientes” y autosuficientes lo que involucra el concepto de “totipotencia”.

En 1928, Fritz Went en USA logró aislar de orina de yegua (ya que los riñones de los animales funcionaron como elementos filtrantes/purificadores) una sustancia que estimulaba el crecimiento de los coleoptilos a la que llamó en forma genérica auxina (del griego auxein, crecimiento). A partir de la forma cristalizada de esa sustancia, ya en 1940 se la identificó por cristalografía de rayos X como ácido-3-indol, acético (IAA en su abreviatura inglesa). En forma casi simultánea al descubrimiento de las auxinas en occidente, en Japón, Kurosawa en 1926 utilizó el filtrado de cultivo del hongo *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi* en su forma sexual) para elicitar el crecimiento de entrenudos de plantas de arroz enano. A la forma purificada del principio activo se la

llamó giberelina, la que fue caracterizada físico-químicamente por espectrometría de masas ya en 1936. Cabe acotar que las giberelinas, que son diterpenos con estructura *ent*-kaureno, constituyen una familia de compuestos numerosa ya que en la actualidad se han identificado al menos 136 formas distintas en plantas, hongos y bacterias. Sin embargo, la mayoría son intermediarios o productos del catabolismo, y sólo unas 4-5 constituyen las formas con actividad biológica comprobada según el estado de oxidación en algunas posiciones estratégicas de los anillos del *ent*-kaureno. Más tarde fueron descubiertas y comprobadas las funciones hormonales sobre diversos parámetros del crecimiento y desarrollo vegetal, de las citocininas, el ácido abscísico (ABA), el etileno, las poliaminas, las estrigolactonas, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, las sisteminas y el óxido nítrico. A lo largo de mi carrera científica de poco más de 40 años, mi objeto de estudio lo ha constituido el papel de intermediarios en las respuestas de plantas al ambiente de giberelinas y, más recientemente, del ABA.

La mayoría de la información acerca del papel de las fitohormonas ha sido desarrollada mediante la técnica de “spray and pray”, literalmente “pulverizar y rezar”, es decir mediante aplicaciones de la hormona en estudio (o de inhibidores de su síntesis), a la planta entera u órganos en particular, para la ulterior evaluación de resultados. Asimismo, con el acompañamiento de la genética y el posterior desarrollo de la biología molecular, los procesos mecanísticos de la acción hormonal se fueron dilucidando. Además, la aplicación práctica de hormonas con fines productivos (o aún investigativos) se puede hacer en pulverizaciones directas al follaje, suministrándolas con el agua de riego, o bien de modo indirecto, mediante infestación con microorganismos productores, o por diseño genético/selección de plantas super-productoras, sub-productoras o insensibles al tipo de hormona.

En algunos casos la mejora genética de las plantas con fundamento hormonal precedió al conocimiento básico. Es típico el ejemplo de la “primera revolución verde” ocurrida en los 1960’s con la selección de material de trigo genéticamente enano, que permitió la fertilización con dosis superiores de nitrógeno a la que soportaban las plantas de altura normal. Recién en 2009, Harberg y colaboradores determinaron que los genes *Norin* de trigos japoneses, utilizados para enanizar variedades de la especie, se corresponden con una mutación localizada que disminuye la sensibilidad a giberelinas en los entrenudos de las plantas que resultan más cortos, haciéndolas resistentes al “acamado” como consecuencia de la sobrefertilización. Se trata de genes que en su forma recesiva evitan

la destrucción de proteínas DELLA que a su vez condicionan la respuesta a giberelinas responsables del alargamiento de entrenudos.

En lo que respecta al aporte hormonal por medio de microorganismos productores, mi propia contribución personal comienza en 1989 cuando nuestro grupo publicó por primera vez la producción de las giberelinas A₁, A₃ e iso-A₃, activas en promover el crecimiento vegetal, por parte de cultivos en medio químicamente definido de *Azospirillum* sp., una bacteria endofítica promotora del crecimiento de las plantas. Este descubrimiento, en consonancia con lo publicado al mismo tiempo sobre la producción de IAA en bacterias por investigadores de un grupo de Escocia, tuvo no sólo implicancias productivas sino que también evolutivas. En 1993 informamos además que la inoculación bacteriana tenía el mismo efecto en promover el crecimiento de pelos radicales en plántulas de maíz que el de aplicación directa de GA₃.

Entre los años 1974 a 2002 desarrollé una vasta tarea de investigación en la Universidad Nacional de Río Cuarto como docente de Fisiología Vegetal e investigador CONICET, y en colaboración con investigadores de Canadá e Italia. Durante ese período trabajé en la identificación físico-química y los efectos fisiológicos de giberelinas en diversas especies de cultivo, algo que no voy a relatar ahora por razones de tiempo. Es a partir de mediados de los 1990's que mi actividad más notoria se orientó hacia la elucidación del papel del ABA en la respuesta de las plantas al ambiente adverso, que es lo que voy a relatar ahora de modo sucinto.

El ABA es un sesquiterpeno que las plantas sintetizan en cloroplastos a través de la vía del eritritol 5 fosfato y que tiene reconocidos efectos fisiológicos, siendo el más conspicuo el de promover cierre de estomas, lo que alivia a los tejidos del estrés hídrico. Ha sido identificado tanto en plantas, como en hongos, y aún tejidos de mamíferos. En 2009 nuestro grupo de trabajo informó su producción en bacterias PGPR.

Una de las cosas que llamó nuestra atención desde el principio, especialmente al trabajar con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en ABA, es que éste parece ser necesario aún en ausencia de estrés hídrico. Es decir, plantas deficientes en ABA creciendo en ambiente de 100% de HR lo hacen mejor si se les aplica la hormona, indicando que su acción excede los alcances de la economía del agua. A partir de estas observaciones y de otros experimentos a campo, reflaté una teoría de investigadores australianos de los 1960's que proponía que, ante un cierre parcial del poro estomático, la fotosíntesis se vería menos afectada que la transpiración, es decir, si se logra cerrar parcialmente los estomas de una planta el consumo de agua será comparativamente menor que la reducción en producción

de materia seca con el consiguiente beneficio productivo. El concepto se completa (y explica) en el sentido que al disminuir la transpiración se ve menos afectada la turgencia celular que, a su vez, es la responsable de la primera etapa del crecimiento por expansión. A su vez, células más turgentes demandan más asimilados, ya que se sabía que la fuerza de los destinos incentiva la asimilación de carbono.

A fines de los 1990 pusimos a prueba esta hipótesis trabajando con aplicaciones de ABA a plantas de yerba mate en macetas y a campo. Los tratamientos con ABA incrementaron el área foliar, el largo de tallos nuevos y el peso seco tanto de hojas como de tallos. Los efectos fueron más notorios en la parte de la canopia que recibía plena luz solar, y disminuían a medida que aumentaba el sombreado en el interior de aquella.

Trabajando luego con trigo en condiciones de cultivo a campo, el ABA aplicado en etapa de macollaje aumentó la materia seca de los tallos en etapa de anthesis, diferencia que desapareció a cosecha. Sin embargo, el mayor peso seco de los tallos en anthesis se tradujo en una mayor producción de grano determinado por una mayor cantidad de granos por planta, sin que se viera afectado el contenido ni la calidad de proteína. La implicancia fue que el ABA al principio incentivó la acumulación de materia seca en tallos, por sus efectos de mantener una mayor turgencia celular, y luego acrecentó el transporte de esos asimilados al destino final como son las semillas. Resultados similares obtuvimos con experimentos en cultivos de soja.

En el año 2002 me trasladé a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo para hacerme cargo de la Cátedra de Química Orgánica y Biológica y, como es lógico cambié mi objeto de estudio, es decir pasé de las plantas de gran cultivo a la vid y, especialmente, vid para vino tinto de la variedad Malbec. En base a la experiencia aquilatada previamente y a lo referido en la literatura, elaboré la siguiente hipótesis general: como en la vid el estrés tiene efectos deseados como son acumulación de polifenoles y volátiles que hacen al “flavor” del vino, pero también indeseados como baja producción y pérdida de plantas, la sustitución del estrés por la molécula señal, es decir ABA, permite obtener las ventajas sin las desventajas.

El primer experimento consistió en la aplicación de ABA al follaje de plantas de un viñedo de Cabernet Sauvignon, lo que arrojó un incremento de hasta un 80% en la producción de uva respecto del control, con una fuerte correlación con el número de bayas. En concreto, la hormona aumentó la persistencia de la fruta en racimo posiblemente al inhibir la producción de otra hormona, etileno, responsable de la abscisión de órganos. Para corroborarlo repetimos los experimentos con un inhibidor de

etileno, metil ciclo propeno, confirmando los resultados previos. La diferencia fue que en el caso de ABA no se alteró la calidad de la uva, medida como contenido de polifenoles ante la mayor producción, lo que sí ocurrió con la aplicación del inhibidor de etileno, sugiriendo una vez más que los efectos del ABA son múltiples.

Como la realización de experimentos en el campo experimental de la Facultad resultaba complicada en razón de las vacaciones de enero de los operarios de finca, comenzamos a trabajar en colaboración con la firma Catena Zapata, productora y exportadora de vinos, algunos “premium”. Lo primero que interesó fue analizar los efectos de la radiación UV-B, ya que las uvas para vinos de excelencia provienen de viñedos localizados a más de 1300 m sobre el nivel del mar (s.n.m.). Mediante experimentos combinando la filtración de radiación UV-B con la aplicación de ABA en viñedos “de altura”, es decir ubicados en Gualtallary (Valle de Uco) a 1450 m s.n.m., pudimos dilucidar que la UV-B, en la mayoría de los casos mediatizada por ABA, promovía la aparición de compuestos fenólicos que filtran la radiación, de carotenos que disipan energía, de un complejo de enzimas antioxidantes que capturan especies reactivas de oxígeno y de esteroides que protegen las membranas. Todo ello como respuesta biológica de defensa ante el estrés. Algunas de estas respuestas tienen efecto sobre la calidad de la baya que se evidencia luego en el proceso de vinificación.

También (como en el caso de las giberelinas) encontramos que ABA podía ser aplicado indirectamente por bacterias promotoras del crecimiento previamente aisladas de raíces de vid, lo que demoró la desecación de hojas de plantas cultivadas in vitro. Esto se correlacionó con un aumento de hasta 40 veces en el contenido foliar de ABA en las plantas inoculadas, que era sintetizado por las bacterias endofíticas y/o por la planta ante el estímulo bacteriano.

Ya en trigo y soja habíamos estudiado el efecto promotor del transporte de asimilados por parte de ABA, y nos abocamos a verificarlo en vid. Para eso realizamos experimentos en macetas donde verificamos que ABA promovió el transporte de asimilados hacia destinos de sobrevivencia, es decir raíces y bayas. Mediante análisis morfológico y molecular, encontramos que ABA promovió un aumento en el área de vasos (ya sea xilema como floema), a la vez que aumentó la expresión de genes para la síntesis de proteínas de transporte de azúcares, tanto a nivel de membrana plasmática como vacuolar. Finalmente, ABA intermedió en el incremento de terpenos volátiles provocado por UV-B.

En resumen, ABA estimula el crecimiento vegetativo ante condiciones de estrés hídrico en yerba mate, promueve la producción y transporte de asimilados en trigo, soja

y vid, incrementa la producción al promover persistencia de frutos en vid, estimula un sistema de defensa celular ante UV-B en vid (mediante filtración, disipación de energía, enzimas antioxidantes, captosres de especies reactivas de oxígeno y esterolos estructurales), y aumenta polifenoles y terpenos en hollejos de bayas de vid.

Muchas gracias.

Palabras clave: Fitohormonas, giberelinas, ácido abscísico

Keywords: Phytohormones, gibberellins, abscisic acid