

Carlos de Ollas · Vicent Arbona · Sara I. Zandalinas · Aurelio Gómez-Cadenas

EL ÁCIDO JASMÓNICO SEÑALIZA LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS A LA SEQUÍA

Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural.
Universitat Jaume I.
Campus Riu Sec
12071, Castelló de la Plana.

Email: aurelio.gomez@uji.es

INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico es uno de los factores ambientales que más afecta al crecimiento y al desarrollo vegetativo y limita tanto la cantidad como la calidad de la producción agrícola. En cítricos, se sabe que el ácido abscísico (ABA) regula muchas de las respuestas fisiológicas al estrés hídrico tales como la abscisión de órganos y el cierre estomático, además de modular la intensidad de la respuesta fisiológica frente a esta condición ambiental adversa (Gómez-Cadenas y col., 1996). Por ello, cuando se someten a estrés hídrico severo, los árboles de cítricos sufren un cierre estomático muy rápido que afecta al flujo xilemático que puede llegar incluso a detenerse completamente en un periodo de tiempo muy corto.

En condiciones de estrés hídrico severo, las plantas de cítricos manifiestan síntomas de marchitez e, incluso, daños foliares aunque no experimentan abscisión foliar. Sin embargo, cuando las condiciones de humedad se restablecen, bien por el riego o por precipitaciones se observa que las hojas recuperan la turgencia pero, poco después, una parte de ellas se desprende de la planta (Gómez-Cadenas y col., 1996). Se sabe que la regulación de este fenómeno depende tanto del ABA como del etileno (otra hormona vegetal de gran importancia en agricultura). En condiciones de estrés hídrico, el ABA y un precursor metabólico

Resumen

El estrés hídrico afecta a diferentes parámetros fisiológicos en cítricos además de reducir la producción y la calidad de los frutos. Las plantas responden a la sequía regulando el estado hídrico y aumentando la abscisión de hojas y frutos a través de la modificación los niveles hormonales endógenos. En este trabajo se estudió la implicación del ácido jasmónico (JA) como posible molécula señalizadora de la respuesta de los cítricos al estrés hídrico. Para ello, se realizaron diversas medidas de los niveles hormonales radicales y foliares en plantas de citrómelo CPB4475 sometidas a condiciones de sequía extremas y, una vez caracterizado el patrón de acumulación del ABA y el JA, se realizaron tratamientos de inhibición química de las rutas de biosíntesis de ambas hormonas. Los resultados indican que existe una acumulación transitoria de JA que precede a la acumulación progresiva de ABA. Además, los experimentos de inhibición mostraron que el incremento en los niveles de JA en raíces es necesario para la posterior acumulación de ABA. Estos datos sugieren que el JA tendría un papel de disparador temprano de la cascada de señales que se desencadena en raíces de cítricos sometidos a condiciones de sequía, actuando como interruptor de respuestas posteriores.

Abstract

Water stress affects a number of different physiological parameters in citrus and also reduces fruit quality and yield. Plants respond to water stress regulating water status and increasing leaf and fruit abscission through modification of endogenous hormonal levels. In the present work the involvement of jasmonic acid (JA) as a putative signal in the response of citrus to water stress was studied. Therefore, different measurements of hormonal levels were performed in roots and leaves of citrómelo CPB4475 exposed to severe drought conditions, and, once the accumulation pattern was characterized, chemical inhibition of hormone biosynthetic pathways was performed. Results show that exists a JA transient accumulation that precedes ABA progressive increase. Moreover, chemical inhibition experiments suggest that the increase in the JA levels is necessary for the subsequent ABA accumulation. These results point to the JA as an early trigger for the signal cascade originated in roots of citrus under drought conditions, acting as a switch of downstream responses.

del etileno se acumulan en las raíces de los cítricos y cuando se restablecen las condiciones de riego, ambos son translocados a la parte aérea donde el precursor es oxidado a etileno y promueve la abscisión de hojas y frutos. En este marco, el ABA adopta un papel central como señalizador en condiciones de estrés hídrico, aunque se asume que las respuestas de las plantas a los estímulos ambientales están reguladas por una compleja red de hormonas vegetales. Por tanto, cabe esperar una interacción concertada en el

tiempo de sus rutas de biosíntesis y catabolismo.

El ácido jasmónico (JA) y sus metabolitos, conocidos colectivamente como jasmonatos, son compuestos señalizadores derivados de lípidos de membrana similares, tanto a nivel estructural como funcional, a las prostaglandinas animales. Las respuestas vegetales mediadas por jasmonatos incluyen la defensa frente a herbívoros, patógenos bacterianos y fúngicos y también la protección frente a

condiciones de estrés abiótico como incrementos en la concentración de ozono o daño mecánico (Lorenzo y Solano, 2005). Sin embargo, la función de los jasmonatos en la respuesta vegetal al estrés hídrico es poco conocida a pesar de que cada vez hay evidencias en más especies que apuntan a una posible función señalizadora del JA en estas condiciones (Mahouachi y col., 2007; Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; Brossa y col., 2011).

Los cítricos son muy sensibles al estrés hídrico en el estadio de plántula, durante su trasplante. En España y en la mayor parte de los países productores de cítricos la producción de plantas certificadas se realiza en viveros autorizados. El proceso implica el cultivo de patrones tolerantes a partir de semillas que son injertados posteriormente con las diferentes variedades, este proceso tiene una duración que puede oscilar entre uno y tres años, después de los cuales la planta está lista para ser trasplantada a su ubicación definitiva. Además, es frecuente que antes o durante el trasplante ocurra una poda parcial de raíces, lo cual, sin duda, induce un estrés hídrico en la planta joven que es en gran parte responsable de la mortalidad de las plantas en este periodo de aclimatación.

Para profundizar en el conocimiento de la función de las hormonas vegetales como señalizadoras del estrés por sequía, en este trabajo se ha estudiado la relación entre las variaciones de las concentraciones endógenas de JA y ABA en raíces de cítricos en respuesta a estrés hídrico. En concreto, se ha profundizado en la hipotética inducción de la acumulación de ABA mediada por un aumento transitorio en la concentración de JA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En los experimentos descritos, se emplearon plántulas de un año de edad de citrómelo CPB 4475 (*Citrus paradisi* L. Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) obtenidas de un vivero autorizado, que se trasplantaron a macetas de plástico de 2.5 L utilizando perlita como sustrato. Las plantas se cultivaron durante dos meses para su aclimatación en un invernadero con

un fotoperiodo de 16 horas (PAR máximo de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), una temperatura diurna/nocturna de $25 \pm 2 / 18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y una humedad relativa entre el 60% y el 95%. Durante este período, las plántulas se regaron tres veces por semana con 0.5 L de solución Hoagland modificada para cítricos (Gómez-Cadenas y col., 1996).

Tratamientos y análisis hormonal

Tras el periodo de aclimatación, las plántulas se dividieron aleatoriamente en distintos grupos de cuatro macetas cada uno y se trataron durante la semana previa a la imposición del estrés bien con un inhibidor de la biosíntesis del JA, el ácido salicilhidroxámico (SHAM), o bien con norflurazona (NFZ, proporcionada por Syngenta España, Madrid, España), un inhibidor indirecto de la biosíntesis de ABA (Gómez-Cadenas y col., 1996). Otros grupos de plantas se trataron, además, con JA y ABA. Los compuestos químicos se disolvieron en 4 ml de DMSO y posteriormente se diluyeron en 0.5 L de solución de riego a sus concentraciones finales (20 mM en SHAM y 1 mM en JA, ABA y NFZ). Las plantas control se regaron al mismo tiempo con 0.5 L de solución de riego sin tratamiento alguno.

El estrés hídrico se aplicó trasplantando las plantas a macetas con perlita seca durante diferentes periodos de tiempo en las mismas condiciones descritas con anterioridad.

En todos los casos, se muestrearon raíces jóvenes y hojas de posición intermedia de cuatro plantas por grupo y el

material fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Las extracciones y determinaciones hormonales se llevaron a cabo tal y como se describe en Durgbanshi y col., (2005) con modificaciones menores.

RESULTADOS

Caracterización de la acumulación de ABA y JA en raíces de cítricos en respuesta a estrés hídrico

En primer lugar, se caracterizó la dinámica de acumulación de ABA y JA en raíces de cítricos a lo largo de 30 horas desde la aplicación del estrés. En la figura 1A se observa que durante este periodo se produjo una acumulación transitoria de JA, que comenzó a las 3 h tras la imposición del estrés y alcanzó un máximo a las 6 h. (264.4 frente a 25.9 ng/g en las plantas en condiciones control). Posteriormente, la concentración de JA radicular disminuyó paulatinamente hasta llegar a niveles control 30 h después de la aplicación del estrés. En las mismas condiciones, el ABA (figura 1B) mostró una acumulación radicular constante tras un pico inicial a las 6 horas (figura 1B).

El aumento de ambos metabolitos pocas horas tras la aplicación del estrés sugiere una posible respuesta temprana y un posible papel del JA como nexo entre la percepción del estrés por la célula vegetal y la posterior acumulación de ABA.

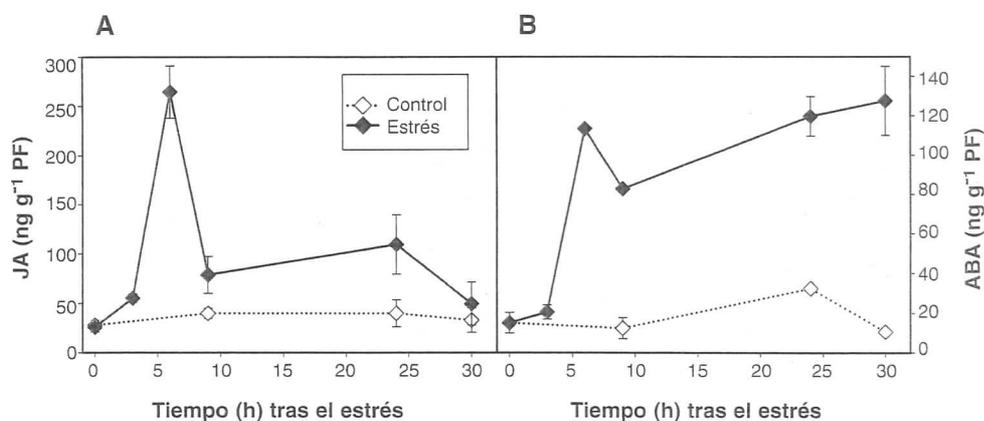


Figura 1: Concentraciones de JA (A) y ABA (B) en raíces de plantas control (◇) y sometidas a estrés hídrico (◆).

Inhibición de la biosíntesis de JA

Los experimentos de caracterización de la acumulación hormonal permitieron seleccionar el punto de 6 horas como el tiempo óptimo para realizar el muestreo de los experimentos de inhibición química de la biosíntesis de JA, con el fin de averiguar si existía una relación de dependencia entre la acumulación transitoria de JA y la acumulación progresiva de ABA en respuesta al estrés hídrico (figura 2). El tratamiento con SHAM en plantas estresadas previno la acumulación de JA en raíces (figura 2A). Además, los niveles de ABA en estas plantas (figura 2B) fueron mucho menores que los correspondientes a plantas no tratadas (288.0 frente a 56.6 ng/g PF).

En este experimento, se incluyeron grupos de plantas estresadas y tratadas simultáneamente con SHAM y JA para intentar restaurar la concentración de JA endógena encontrada en plantas sometidas a estrés. Las raíces de estas plantas mostraron niveles de JA equivalentes a los de plantas estresadas (115.9 frente a 133.7 ng/g PF). La concentración de ABA en las raíces (127.0 ng/g PF), aunque mayor que en plantas tratadas con SHAM (56.6 ng/g PF), fue menor que la encontrada en plantas no tratadas (20.6 ng/g PF), lo cual fue considerado como una recuperación parcial de la concentración endógena. Los grupos de plantas estresadas y tratadas exclusivamente con JA mostraron niveles endógenos tanto de JA como de ABA superiores al resto de grupos de tratamiento (191.4 y 591.4 ng/g PF respectivamente).

Inhibición de la biosíntesis de ABA

En la figura 3B podemos ver como el tratamiento con NFZ redujo a la mitad el incremento de ABA en las raíces de plantas estresadas (149.0 frente a 288 ng/g PF) sin afectar a la acumulación de JA (figura 3A) (109 frente a 133.7 ng/g PF). Por otro lado, el tratamiento simultáneo con ABA y NFZ restauró los niveles de ABA encontrados en plantas estresadas (331.5 frente a 288.0 ng/g PF) sin alterar en gran medida la concentración de JA (98.9 frente a 133.7 ng/g PF). Las plantas sometidas a deficiencia hídrica y tratadas exclusivamente con ABA presentaron niveles endógenos de esta hormona ligeramente superiores a plantas estre-

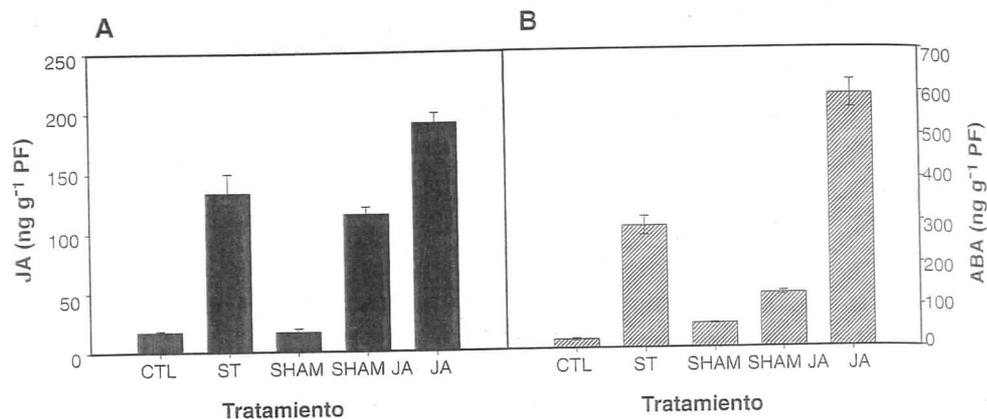


Figura 2: Concentraciones de JA (A) y ABA (B) en raíces de plantas estresadas (excepto CTL) y tratadas con hormonas exógenas y/o inhibidores de su biosíntesis.

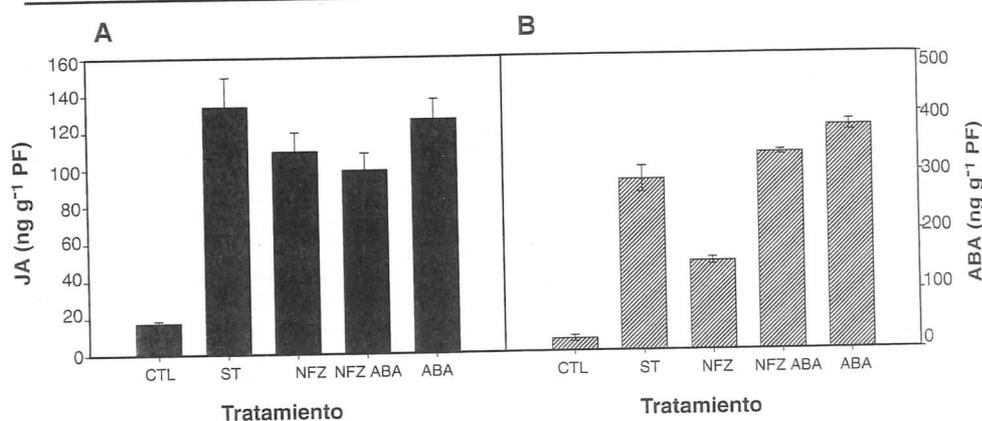


Figura 3: Concentraciones de JA (A) y ABA (B) en raíces de plantas estresadas (excepto CTL) y tratadas con hormonas exógenas y/o inhibidores de su biosíntesis.

sadas (376.9 frente a 288.0 ng/g PF) pero nuevamente, los niveles de JA de las raíces de estas plantas fueron equivalentes a los de las plantas estresadas sin ningún tratamiento (126.4 frente a 133.7 ng/g PF).

Respuesta de los tratamientos en la parte aérea

Aunque el presente trabajo se centra en la acumulación radicular de JA y ABA, también se llevó a cabo la cuantificación de estas fitohormonas en la parte aérea. En la figura 4 podemos ver que se produjo un aumento en la concentración endógena tanto de JA (A) como de ABA (B) en respuesta al estrés de forma similar a la respuesta observada en la parte radicular, sin embargo, el tratamiento de inhibición de la biosíntesis de JA no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de éste en la parte foliar, probablemente debido a que el tratamiento fue administrado en el agua de riego; de esta forma,

el SHAM pudo no transportarse a la parte aérea en cantidad suficiente para ejercer su acción. La acumulación de ABA tampoco se vio modificada por el tratamiento. Por el contrario, el tratamiento con JA exógeno, bien solo o bien junto con SHAM sí provocó un aumento significativo de los niveles de JA en parte aérea, sin embargo este aumento no se vio reflejado en la acumulación de ABA.

El tratamiento con NFZ consiguió reducir los niveles de ABA respecto a los niveles de plantas estresadas sin ningún tratamiento (162.3 frente a 310.4 ng/g PF), el tratamiento de NFZ simultáneamente con ABA exógeno no causó ninguna variación significativa respecto a las plantas tratadas únicamente con NFZ; por el contrario, las plantas tratadas exclusivamente con ABA exógeno sí presentaron un aumento significativo en la cantidad de ABA foliar, alcanzando niveles de ABA estresadas sin ningún tratamiento.

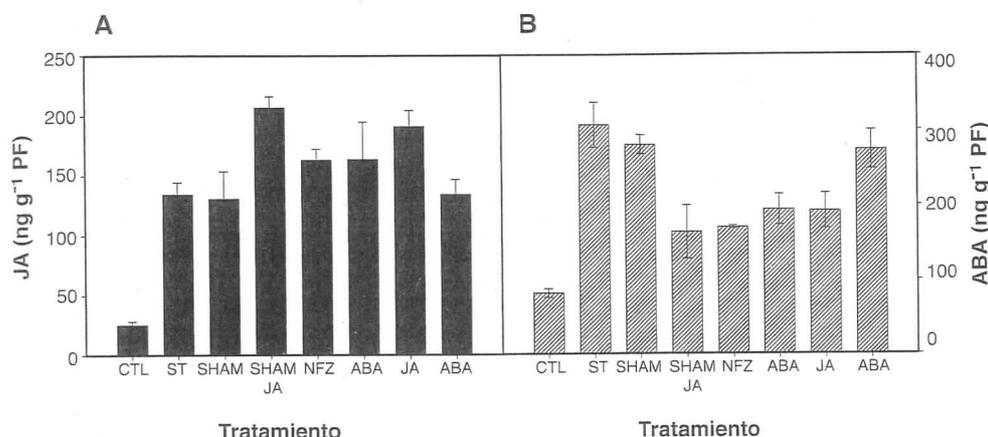


Figura 4: Concentraciones de JA (A) y ABA (B) en hojas de plantas estresadas (excepto CTL) y tratadas con hormonas exógenas y/o inhibidores de su biosíntesis.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la interacción entre JA y ABA en plantas de cítrulo sometidas a estrés hídrico severo y se mostró la dinámica de acumulación del JA y ABA en raíces de cítricos sometidos a sequía por un período de 30 h. En estas condiciones, se observó un aumento transitorio de la concentración endógena de JA tanto en hojas como en raíces al cabo de 6 horas partiendo de valores control. Posteriormente, los valores disminuyeron de nuevo hasta alcanzar valores cercanos a los presentes en plantas no estresadas. Coincidiendo con el incremento transitorio de JA, los niveles de ABA radicular y foliar aumentaron de forma progresiva durante las 24 horas restantes.

En trabajos anteriores, se había descrito un comportamiento similar en hojas de cítricos sometidos a encharcamiento radicular (Arbona y col., 2008) y en hojas de plántulas de papaya sometidas a deshidratación progresiva (Mahouachi y col., 2007). Además, los resultados preliminares son compatibles con trabajos anteriores realizados en cítricos y en condiciones de estrés hídrico severo (Gómez-Cadenas y col., 1996). En este trabajo, se observó una acumulación progresiva y masiva de ABA en raíces de mandarina Cleopatra en respuesta a estrés hídrico severo. A la vista de estos resultados y los existentes en la literatura, se puede concluir que esta respuesta es común a diferentes tipos de estrés abiótico y a diferentes especies vegetales. Además, el patrón de acumulación observado es

compatible con un papel 'disparador' del JA, mientras que el ABA actuaría modulando las respuestas fisiológicas frente al estrés, como se ha sugerido anteriormente (Mahouachi y col., 2007; Arbona y col., 2008). En este modelo, el JA ejercería el papel de 'interruptor principal' alternando entre el estado de "no-estrés" y "estrés", actuando directamente sobre la biosíntesis de ácido abscísico, al menos en raíces, donde se ha podido llevar a cabo una inhibición de las rutas de biosíntesis de ambas hormonas; respecto a la parte aérea no se puede afirmar que exista la misma dependencia dada la imposibilidad de impedir la acumulación de JA y ABA.

En el trabajo de Adie y col., (2007) se postula la necesidad de biosíntesis de ABA para la subsiguiente biosíntesis de JA como respuesta a la infección por *Pythium irregulare* en *Arabidopsis thaliana*. Según este artículo es necesaria la síntesis previa de ABA para la producción de JA y la activación de las defensas de la planta frente a *P. irregulare*. Esto estaría en desacuerdo con nuestra hipótesis de que la síntesis de JA es independiente de la producción de ABA y que, como apuntan nuestros resultados, es la acumulación de JA lo que permite la subsiguiente acumulación de ABA en respuesta al estrés. En cualquier caso estas diferencias podrían deberse al hecho de tratar con especies diferentes o a que el estrés en el caso del trabajo de Adie y col. es biótico, provocado por la infección de un patógeno frente a nuestro sistema, en el que utilizamos un estrés hídrico severo.

En un artículo recientemente publicado por Kim y col., (2009), se postula una tesis diferente en relación a la interacción JA/ABA en el contexto del estrés hídrico, en este trabajo los resultados obtenidos en plantas de arroz (*Oryza sativa*) transgénicas, sugieren que las plantas producen MeJA al aplicar el estrés hídrico y éste a su vez estimula la producción de ABA, lo que sería compatible con nuestros resultados. En general, lo que parece ser cierto es que el JA es una señal temprana implicada en procesos fundamentales de la respuesta de los cítricos a la sequía y, además, se requiere acumulación de JA para el inicio de la biosíntesis de ABA.

Este trabajo puede ser la base para diseñar actuaciones agronómicas que incrementen la tolerancia al estrés abiótico de las plantas jóvenes de cítricos, especialmente durante el momento de su trasplante a campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2010-C03-01/AGR (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y P1 1B2009-01 (Universitat Jaume I / Fundació Bancaixa).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adie B, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez M, Godoy M, Sánchez-Serrano J, Schmelz E, Solano R 2007 ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19, 1665-1681.
- Arbona V, Gómez-Cadenas A 2008 Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J Plant Growth Regul.* 27, 241-250.
- Brossa R, López-Carbonell M, Jubany-Marí T, Alegre L 2011 Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient *Arabidopsis* plants. *J Plant Growth Regul.* 30, 322-333.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho J V, Gómez-Cadenas A 2005 Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 53, 8437-8442.
- Gómez-Cadenas A, Tadeo F R, Talon M, Primo-Millo E 1996 Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112, 401-408.
- Kim E, Park S, Kim J 2009 Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signal. Behavior.* 4, 348-349.
- Lorenzo O, Solano R 2005 Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol.* 8, 532-540.
- Mahouachi J, Arbona V, Gómez-Cadenas A 2007 Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regul.* 53, 43-51.