

Efectos de la sobreproducción de ácido abscísico y citoquininas en la respuesta fisiológica y agronómica de tomate bajo estrés salino en invernadero

A. Martínez-Pérez, A. Albacete, M.P. Sánchez-Iglesias, F. Pérez-Alfocea, C. Martínez-Andújar

Departamento Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo. 30100. Murcia, España
amperez@cebas.csic.es

RESUMEN

La salinidad limita la productividad de los cultivos y modifica el balance hormonal vegetal. El ácido abscísico (ABA) y las citoquininas (CKs) son fitohormonas que median la respuesta a estreses abióticos y se considera que son producidas principalmente en la raíz. Para evaluar el papel de estas dos hormonas en el crecimiento y productividad de los cultivos bajo salinidad, se realizaron injertos cuyo portainjerto eran unas variedades transgénicas de tomate que sobreproducían ácido abscísico (ABA) (líneas *NCED*) y citoquininas (líneas *IPT*), utilizando una variedad comercial de tomate cherry como injerto. Las plantas de tomate injertadas fueron cultivadas en un invernadero comercial durante 6 meses en condiciones de salinidad moderada. Las plantas cuyo portainjerto era una variedad transgénica eran más vigorosas y presentaban mayor producción que las que tenían como portainjerto una planta *wild type* o la propia parte aérea injertada. Los análisis hormonales no explican completamente estos datos, por lo que otros tipos de análisis (genéticos, enzimáticos) son necesarios para explicar completamente estos datos.

Palabras clave: Fitohormonas; transgénicos; injertos; salinidad.

1. Introducción

La salinidad es el mayor factor limitante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las estrategias que permiten a las plantas enfrentarse al estrés salino incluyen cierre estomático parcial, alteración en el metabolismo para desviar asimilados hacia la raíz, inhibición del crecimiento, senescencia foliar y por último abscisión [1]. Como organismos sésiles, las plantas perciben las condiciones medioambientales y generar señales sistémicas (en los tejidos expuestos al estrés) para coordinar los ajustes metabólicos y de desarrollo. Bajo condiciones de salinidad y sequía, las señales relacionadas con el estrés inducen cambios en la expresión génica específica que puede ser mediada por señales hidráulicas o químicas, en las que la mayoría de grupos de hormonas vegetales (ácido abscísico – ABA-, etileno, citokininas –CK- y ácido jasmónico –JA-) son de vital importancia [2, 3]. Los trabajos recientes sugieren que la mayor parte de las fitohormonas están implicadas no sólo en la regulación del crecimiento bajo condiciones de estrés abiótico, sino también en otros procesos

clave como la adquisición de recursos (agua y nutrientes), de forma directa a nivel radical a través de la actividad y expresión de transportadores, o bien de forma indirecta alterando el crecimiento y desarrollo de la raíz.

El ácido abscísico (ABA) y las citoquininas (CKs) son hormonas que median la respuesta de la planta al estrés y se considera que son producidas mayoritariamente en la raíz. En la investigación sobre comunicación raíz-parte aérea es aún incierto si los cambios hormonales en la parte aérea bajo estrés salino se deben a cambios en su exportación desde la raíz, o a cambios metabólicos locales en la hoja. Los datos contradictorios existentes acerca del papel de las hormonas de la raíz y su impacto en la fisiología de la parte aérea, sugieren que el papel de las hormonas sintetizadas en la raíz CKs y ABA en la regulación de las respuestas de la parte aérea requiere una reevaluación.

La disponibilidad de plantas transgénicas con distinta gradación en la producción de ABA (plantas que sobreexpresan *NCED*, cis-epoxycarotenoid dioxygenasa) y CKs, de nuevos sistemas de microarray para el análisis de la

expresión génica, de ensayos optimizados para actividades enzimáticas, y la facilidad de realizar injertos en tomate, nos permite realizar una aproximación a distintos niveles (molecular / bioquímica / fisiológica / agronómica) de la implicación del ABA y las CKs en la regulación del crecimiento de la raíz y de la parte aérea, así como de la producción, bajo estrés salino, con objeto de poder mejorar la tolerancia.

El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de la sobreproducción de ABA y CKs sobre el crecimiento y la producción de plantas de tomate cultivadas en condiciones de salinidad.

2. Materiales y Métodos

Se utilizaron dos sets independientes de plantas. El primer set de plantas disponía de dos líneas funcionales sobreproductoras de ABA, denominadas sp12 y sp5 (*sp::LeNCED1-12* y *sp::LeNCED1-5*), que sobreexpresan el gen *NCED* de tomate bajo un promotor constitutivo [4], y su respectivo Wild Type (*WT*) Ailsa Craig (*AC*). El segundo set de plantas disponía de dos líneas funcionales sobreproductoras de CKs, denominadas iptF e iptG (*35S::IPT*) que sobreexpresa el gen *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el promotor constitutivo 35S, y su respectivo *WT* UC82B.

Las semillas de los genotipos anteriormente citados fueron sembradas en semilleros con vermiculita y humedecidas con disolución de Hoagland semiconcentrada. Entre 30 y 45 días (en función de la velocidad de germinación de cada genotipo) después de la siembra, cuando las plantas tenían entre 4 y 6 hojas verdaderas, se realizaron los injertos. Los genotipos citados anteriormente fueron utilizados como portainjerto de una variedad cherry comercial denominada Sugar Drop (*SD*), dando lugar a las siguientes combinaciones de injertos: *SD/AC*, *SD/sp12*, *SD/sp5*, *SD/UC82B*, *SD/iptF*, *SD/iptG*. Como control del experimento se utilizó la variedad comercial autoinjertada (*SD/SD*) y sin injertar (*SD*). Se realizó un injerto en bisel, tras el cual se mantuvieron dichas plantas injertadas una semana en condiciones de semioscuridad y 100% de humedad relativa: Transcurrida una semana las plantas se fueron aclimatando de forma progresiva hasta alcanzar una humedad relativa del 60%. Dos semanas más tarde las plantas fueron transferidas a un invernadero comercial, donde permanecieron 6 meses en cultivo enarenado y regadas con agua cuya conductividad era de aproximadamente 3µS/cm. Durante el tiempo que las plantas

permanecieron en el invernadero se analizaron los parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo y la producción. Se recolectaron muestras de hoja, fruto, xilema y floema de hoja de diferentes estadios para su posterior análisis hormonal (UHPLC-MS). Al final del ensayo se midió el crecimiento vegetativo de la planta, se analizó la producción y se recolectó xilema de raíz y muestra de raíz para su posterior análisis hormonal. La fotosíntesis y el intercambio gaseoso se midieron en varias ocasiones a lo largo del cultivo utilizando un ADC (*Analytical Development Company*), modelo LCA 4.

3. Resultados y Discusión

Los resultados apuntan a una ventaja en términos de vigor vegetativo de las líneas transgénicas sobreproductoras de ABA y CKs utilizadas como portainjerto de la variedad comercial *SD* comparando con sus respectivos controles. El peso fresco de la hoja y el área foliar se redujo significativamente en la combinación *SD/AC*, por lo que parece ocurrir cierta incompatibilidad entre la variedad comercial utilizada en éste ensayo y el patrón *AC*. A pesar de ésta incompatibilidad observada el uso de las líneas transgénicas sp12 y sp5 como portainjertos de la variedad comercial combinaciones *SD/sp12* y *SD/sp5* dió lugar a un aumento significativo del vigor de la hoja respecto a su *WT AC* injertado sobre *SD (SD/AC)* y a la variedad *SD* injertada sobre sí misma (*SD/SD*) (Figura 1). El *WT UC82B* presentó mayor vigor que *AC* y ninguna incompatibilidad con el injerto *SD*. Las líneas transgénicas iptF e iptG utilizadas como portainjerto de la variedad comercial (*SD/iptF* y *SD/iptG*) fueron las más vigorosas de todas las combinaciones de injertos utilizadas presentando un incremento significativo del peso fresco de la hoja y del área foliar respecto de su *WT* injertado sobre *SD (SD/UC82B)* y la variedad *SD* autoinjertada (*SD/SD*) (Figura 1).

En cuanto a los parámetros relacionados con la producción, tanto la longitud de los racimos como el peso fresco de los mismos fue significativamente superior en las 4 combinaciones en las que utilizamos líneas transgénicas como portainjertos de la variedad comercial (*SD/sp12*, *SD/sp5*, *SD/iptF* y *SD/iptG*), comparados con sus respectivos *WT* utilizados como portainjertos de *SD (SD/AC* y *SD/UC82B)*, y con la variedad comercial autoinjertada (*SD/SD*).

Las concentraciones de ABA encontrados en el xilema de la hoja 80 días después del trasplante (DDT), al contrario de lo que cabría esperar dada la función del transgén, fueron inferiores en las combinaciones de injertos con las líneas transgénicas sp12 y sp5 (SD/sp12 y SD/sp5) que en las combinaciones SD/AC y SD/SD. Las concentraciones de CKs observadas en las combinaciones con raíces transgénicas resultaron mayores que en las combinaciones con sus respectivos WT, siendo los niveles de CKs mayores en las combinaciones SD/iptF y SD/iptG (Figura 3b).

Aunque en plantas injertadas el injerto siempre tiene una mayor efecto que el portainjerto, se ha visto que portainjertos de plantas *wild type* pueden restaurar parcialmente el crecimiento y el contenido foliar de ABA en injertos de *flacca* (mutantes deficientes en ABA) [5, 6], indicando así que el ABA sintetizado en la raíz puede influenciar la fisiología de la parte aérea, aunque bajo condiciones de cultivo óptimas, la sobreexpresión del gen *NCED* solamente en la raíces no produce niveles suficientes de ABA para incrementar los niveles en la parte aérea [7]. Del mismo modo, la sobreexpresión del gen *IPT* solamente en la raíz, incrementó la concentración de CKs bioactivas en raíz, savia xilemática y parte aérea [8].

4. Conclusiones

Entender el papel de una hormona específica en respuesta a la salinidad es difícil ya que, a) la salinidad modifica simultáneamente las concentraciones de varias hormonas vegetales y b) dos hormonas pueden influir de forma recíproca en la síntesis, transporte o sensibilidad la una de la otra. Es sorprendente en el caso de este ensayo como dos transgénesis completamente distintas pueden dar lugar a resultados similares, como son el incremento del crecimiento vegetativo y de la longitud y peso de los racimos. Existen otros factores, no se sabe si mediados o no por las hormonas, o por algunos de sus precursores o derivados, que están afectando a estas plantas a otro nivel que no es sólo el hormonal y que requiere reevaluación y análisis genéticos y enzimáticos para completar el ensayo.

5. Agradecimientos

Los autores de la presente comunicación desean agradecer a Andrew J. Thompson de la Universidad de Cranfield (Reino Unido) y a Ann C. Smigocki del Molecular Plant Pathology

Laboratory (EEUU) por los sets de semillas *NCED* e *IPT* respectivamente. Este trabajo ha sido financiado por CICYT AGL2011-27996 y ROOTOPOWER (REF: 289365. FP7-KBBE-2011-5 European Union)

6. Referencias bibliográficas

- [1] Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681
- [2] Chaves M.M., Flexas, J., Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- [3] Pérez-Alfocea F., Albacete A., Ghanem M.E., Dodd I.C. 2010. Hormonal regulation of source-sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signaling in tomato. *Functional Plant Biology* 37: 592-603.
- [4] Thompson A.J., Jackson A.C., Symonds R.C., Mulholland B.J., Dadswell A.R., Blake P.S., Burbidge A., Taylor I.B. 2000. Ectopic expression of tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *The Plant Journal* 23: 363-374.
- [5] Dodd I.C., Theobald J.C., Richer S.K., Davies W.J. 2009. Partial phenotypic reversion of ABA-deficient *flacca* tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany* 60: 4029-4039.
- [6] Chen G., Fu X., Herman Lips S., Sagi M. 2003. Control of plants growth resides in the shoot, and not in the root, in reciprocal grafts of *flacca* and wild-type tomato (*Lycopersicon esculentum*), in the presence and absence of salinity stress. *Plant and Soil* 256: 205-215.
- [7] Thompson A.J., Andrews J., Mulholland B.J., McKee J.M.T., Hilton H.W., Horridge J.S., Farquhar G.D., Smeeton R.C., Smillie I.R.A., Black C.R., Taylor I.B. 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology* 143: 1905-1917
- [8] Ghanem M.E., Albacete A., Smigocki A.C., Frévort I., Pospisilova H., Martínez Andújar C., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F. Root synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*solanum lycopersicum* L.) plants. 2011. *Journal of Experimental Botany* 62: 125-140.

Figuras

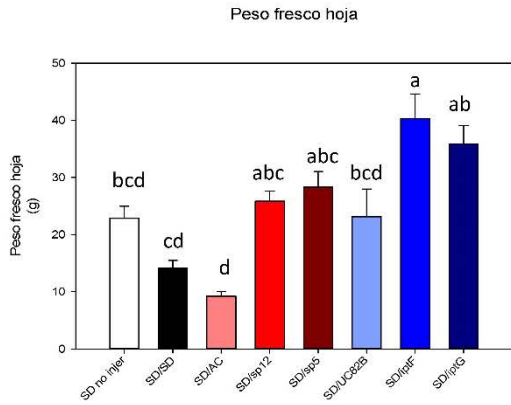
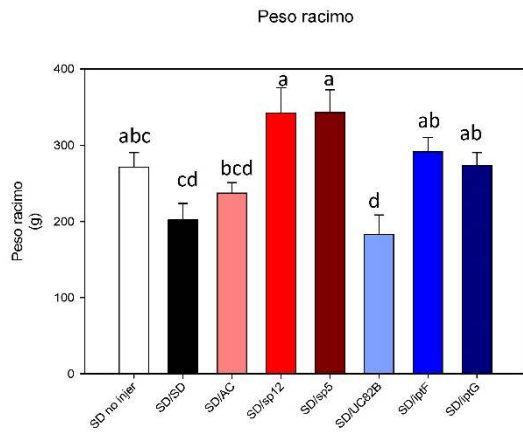
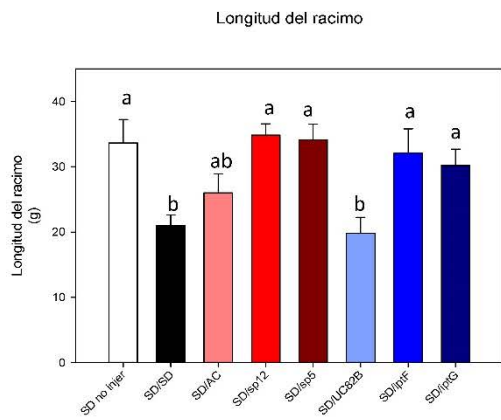
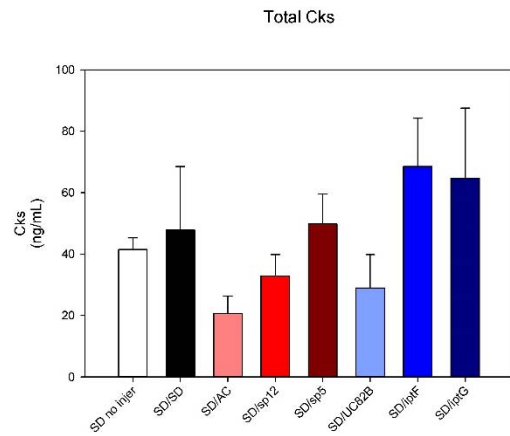
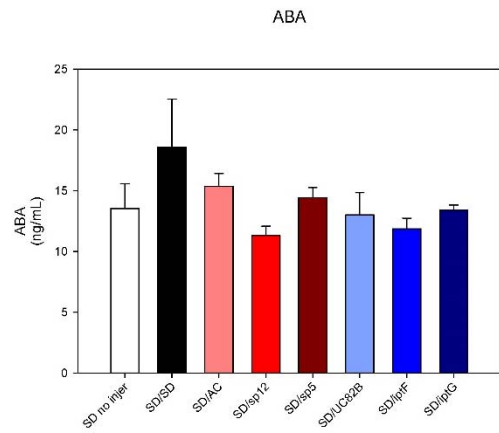


Figura 1. Peso fresco de hoja por encima del cuarto racimo 80DDT.



Figuras 2 a y b. Longitud (a) y peso(b) del 4º racimo maduro 120 DDT.



Figuras 3 a y b. Concentración hormonal de ABA (a) y CKs (b) en savia xilemática procedente de la hoja por encima del cuarto racimo 80DDT.