



Aportes al conocimiento del papel de esteroides bioactivos en los procesos moleculares y fisiológicos de las plantas

ENTIDADES EJECUTORAS PRINCIPALES: Universidad de La Habana y Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana

AUTORES PRINCIPALES: Yamilet Coll García¹, Francisco Coll Manchado¹, Merardo Pujol Ferrer²

Otros autores: Eduardo Canales López², Giselle Hernández Campoalegre¹, Orlando Borrás Hidalgo², Carlos Borroto Nordelo², Elena Moreno Castillo¹, Vladimir Niebla Morejón¹, Ingrid Hernández Estévez²

Colaboradores: Asunción Amorós³, Mario Serna³, Francisca Hernández³, Roxana Portieles Álvarez², Meylín Rodríguez Hernández², Yuniór López Regalón², Mayra Rodríguez García², Sergio Miguel Salazar⁴, Ramiro M. Furio⁵, Pedro J. Zapata³, María Ángeles Botella³, María Teresa Pretel³, Patricia Albornoz⁶, Gustavo M. Martínez Zamora⁵, Gustavo Martos⁷, Juan Carlos Díaz-Ricci⁵, Miguel Aranguren⁷, Eugenio Alonso⁸, Roger Delgado⁸, Maritza Luis⁷, Lochy Batista⁷, Camilo Paredes⁷, María Elena Ochagavía², Viviana Falcón², Ryohei Terauchi⁹, Hideo Matsumura¹⁰, Camilo Ayra-Pardo², Raixa Llauger⁷, María del Carmen Pérez¹¹, Mirian Núñez¹¹, Melissa S. Borrusch¹², Jonathan D. Walton¹², Yussuan Silva¹³, Eulogio Pimentel².

Filiación: ¹Laboratorio de Bioproductos, Centro de Estudio de Productos Naturales (CEPN); Facultad de Química, Universidad de La Habana. ²Laboratorio de Genómica Funcional de Plantas, División de Agropecuaria; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). ³Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior de Orihuela Miguel Hernández; Orihuela, España. ⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Famaillá, Argentina. ⁵Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO); San Miguel de Tucumán. ⁶Facultad de Ciencias Naturales (UNT), y Fundación Miguel Lillo (FML), Argentina. ⁷Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical; La Habana. ⁸Empresa Agroindustrial Victoria de Girón; Jagüey Grande, Matanzas. ⁹Department of Genomics and Breeding, Iwate Biotechnology Research Center; Kitakami, Japan. ¹⁰Gene Research Center, Shinshu University; Ueda, Japan. ¹¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas; Mayabeque, Cuba. ¹²Department of Energy Plant Research, Laboratory, Michigan State University; East Lansing, Michigan, 48824, United States of America. ¹³Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones del Tabaco; La Habana, Cuba.

RESUMEN

Palabras clave

esteroides bioactivos; procesos moleculares; procesos fisiológicos; plantas

La presente propuesta describe resultados científicos de los últimos 7 años de investigación con brasinoesteroides naturales y análogos semisintéticos obtenidos en el Centro de Estudio de Productos Naturales de la Universidad de La Habana. Estos trabajos demuestran el papel de los análogos esteroidales cubanos en la inducción de la respuesta defensiva vegetal, y es posible corroborar mediante evidencias moleculares, bioquímicas y fisiológicas el efecto protector de estos compuestos sobre diferentes tipos de estrés ambiental (abiótico y biótico) en varios cultivos de importancia económica. Parte de la investigación presentada en esta propuesta constituye el primer reporte de la inducción de la respuesta defensiva mediada por brasinoesteroides en un cultivo peren-

ne (cítricos). Igualmente, incluye el primer estudio teórico *in silico* que demuestra la afinidad existente entre el receptor de brasinoesteroides BRI1 de la célula vegetal y los esteroides sintetizados en el CEPN, y el conocimiento de los resultados obtenidos se refuerza experimentalmente en los ensayos de actividad biológica. Los resultados presentados en esta propuesta son de total novedad en las ciencias biológicas y constituyen un aporte al conocimiento científico avalado por 9 publicaciones, 8 de ellas referenciadas en la Web de la Ciencia y una en SciELO. Entre estas publicaciones se encuentran artículos localizados en prestigiosas revistas y de alto impacto en el campo de la química, la biología molecular y la bioquímica de plantas. Un grupo de estos resultados forman parte de una patente internacional, ya concedida en los EE.UU., entre otros países. Es significativa la contribución a la formación de recursos humanos realizada por esta investigación, que se evidencia en un Doctorado en Ciencias Agronómicas y uno en Ciencias Biológicas presentados y defendidos exitosamente en junio de 2011 en la Universidad Miguel Hernández, de Alicante (España), y en diciembre de 2015 en la Universidad de La Habana respectivamente, y una maestría en Ciencias Químicas defendida también exitosamente en el primer semestre de 2018.

Los brasinoesteroides (BR) son fitohormonas esteroideas reguladoras de numerosos procesos fisiológicos. Su purificación a partir de fuentes naturales resulta trabajosa y costosa, lo que conlleva a sintetizar análogos estructurales y funcionales para, aprovechando su efecto como estimuladores del crecimiento, utilizarlos en formulaciones comerciales y mejorar así los rendimientos agrícolas. El reciente desarrollo de las tecnologías "ómicas" ha esclarecido la percepción de las señales mediadas por BR, demostrado su papel esencial en el control de la interacción planta-entorno, y evidenciado que generan una respuesta vegetal para tolerar los diferentes tipos de estrés que las afectan permanentemente. Esto los convierte en útiles herramientas para el manejo integral de los cultivos en la tolerancia a los eventos naturales desfavorables generados por el actual cambio climático. Sin embargo, hasta el momento, no se conocen muchos aspectos sobre los mecanismos bioquímicos y moleculares, así como la relación estructura/actividad que justifican el abanico de actividad biológica de esta familia de compuestos.

La aplicación de BR naturales como parte de formulaciones agrícolas no solo incrementa los rendimientos de los cultivos, sino que los BR, al actuar como moléculas clave en el equilibrio entre crecimiento y defensa, activan en las plantas señales inductoras de tolerancia a estrés ambiental.

El Centro de Estudios de Productos Naturales (CEPN) de la Facultad de Química, en la Universidad de La Habana, sintetiza análogos estructurales y funcionales de BR fundamentalmente a partir de sapogeninas, fitoesteroides y ácidos biliares. De ellos, el DI-31 (fórmula global $C_{27}O_5H_{42}$) constituye el principio activo de la formulación comercial BIOBRAS 16, utilizada en diferentes cultivos para incrementar los rendimientos agrícolas. Con su aplicación se han obtenido resultados que tras-

cienden las fronteras nacionales y posicionan el BIOBRAS16 como uno de los productos universitarios fuente de ingresos económicos, además de permitir el ahorro de importaciones por su empleo en la agricultura cubana.

Estas investigaciones explican a nivel bioquímico, fisiológico y molecular posibles mecanismos que activan la inducción de la respuesta defensiva de las plantas mediada por BR. Además, se aportan elementos para el empleo de estas moléculas no solo para incrementar los rendimientos agrícolas (Coll *et al.*, 2015), sino también para mejorar la calidad de las cosechas y utilizarlos así como parte de estrategias del manejo integrado en la protección de los cultivos ante condiciones adversas (Canales *et al.*, 2015; Serna *et al.*, 2015).

En esta investigación se demuestra que la aspersión foliar regular con $0,1 \text{ micromol}\cdot\text{L}^{-1}$ del brasinoesteroide natural 24-epibrasinólida (24 EBL) durante 1 año induce una respuesta defensiva frente a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal de huanglongbing. Esta respuesta resultó en una significativa disminución (160 veces) de las concentraciones del patógeno en las plantas que asperjadas con la hormona, resultado que aportó elementos esenciales que ayudan a la mejor comprensión del papel de estas fitohormonas en la inducción de la respuesta defensiva en general y de los cítricos frente a *Ca. L. asiaticus*, en particular. La reducción de la concentración bacteriana se corroboró molecularmente por el estudio de la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa mediada por BR, y se observó un incremento altamente significativo de niveles de transcritos de genes que codifican para enzimas relacionadas con la defensa vegetal tanto local (respuesta hipersensible [RH]) como sistémica (resistencia sistémica adquirida [RSA] y resistencia sistémica inducida [RSI]). Se evidenció que

la aplicación exógena de 24-epibrasinólida cambia el perfil transcriptómico de las plantas de lima mexicana enfermas con HLB e induce la generación de una respuesta defensiva local y sistémica frente a la enfermedad (Coll, 2015).

La integración de los resultados permitió proponer un posible mecanismo de acción de los BR en la inducción de la defensa vegetal que permite explicar la disminución de la población bacteriana en las plantas enfermas mediada por la aplicación de 24BL. Este esteroide natural se une al dominio rico en leucina (LRR) del receptor tipo quinasa BRI1 (del inglés *brassinosteroid-insensitive 1*), e inicia una cascada de señalizaciones que culmina en la expresión de genes. Después de esta unión, BRI1 heterodimeriza con la proteína de membrana BAK 1 (del inglés *BRI1-associated receptor kinase 1*) y se disocia del regulador negativo BKI1 (del inglés *BRI1 kinase inhibitor 1*); se activa entonces su actividad quinasa y se induce, a su vez, la activación de la proteína quinasa BUS 1 (del inglés *BRI1-suppressor 1*). Esto inactiva por defosforilación al inhibidor BIN1, el cual es degradado por proteasas citoplasmáticas. Finalmente, este evento conduce a la activación de los factores de transcripción BZ1 (del inglés *brassinazole-resistant 1*) y BES1 (del inglés *BRI1-EMS-suppressor 1*), que median la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva vegetal local (genes que codifican para enzimas que participan en la respuesta hipersensible) y sistémica (genes que codifican para enzimas relacionadas con la respuesta sistémica adquirida e inducida).

Una vez demostrada bioquímicamente y molecularmente la activación de respuesta de defensa mediada por BR, se realizó un acoplamiento molecular para predecir la posible afinidad al receptor BRI1 de los esteroides sintetizados. Teniendo en cuenta que los ensayos experimentales de unión no están disponibles para la mayoría de estos compuestos, el estudio *in silico* es altamente ventajoso en esta materia y eventualmente podría conducir a nuevos compuestos promotores de crecimiento o incluso inductores de tolerancia/resistencia a estrés. Al realizar simulaciones de acoplamiento molecular se demostró que 17 de 20 esteroides sintetizados pueden activar potencialmente el receptor BRI1 (Moreno-Castillo *et al.*, 2018).

El estrés causado por fenómenos abióticos es la causa principal de las pérdidas de los cultivos, siendo la salinidad el más severo de ellos. Como resultado del estrés salino, las plantas sufren importantes alteraciones fisiológicas y bioquímicas, traducidas en una severa disminución del rendimiento, y por tanto una menor productividad. Por estas razones, la salinidad se considera como uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola. La aspersión foliar de DI

31 no solo estimula el crecimiento y desarrollo vegetal, sino que además puede inducir la respuesta de defensa de las plantas frente a diferentes condiciones de estrés ambiental, biótico y abiótico (Furio *et al.*, 2018; Serna *et al.*, 2015), lo que hace más atractiva su utilización en beneficio de cultivos de importancia económica.

La salinidad induce la emisión de etileno y este a su vez activa la iniciación de la senescencia, la clorosis y procesos de abscisión que pueden llevar a la muerte de la planta. La producción de etileno resultante del estrés salino es mayor en las raíces porque este es el órgano más expuesto al NaCl, y son más sensibles que otras regiones de la planta. En las plantas tratadas con DI 31 se reduce significativamente la síntesis de etileno resultante del estrés salino.

Resultados similares se observaron al evaluar el comportamiento de la síntesis de poliaminas totales (PA), compuestos de bajo peso molecular que protegen a la célula vegetal del estrés salino modulando directa o indirectamente el transporte iónico. La aspersión con DI 31 antes de salinizar las plantas de lechuga revertió los efectos causados por el NaCl en todos los casos y disminuyó la concentración de poliaminas totales. Este resultado se acentuó cuando se indujo el *shock* osmótico, y cuando se obtuvieron concentraciones de PA similares a las plantas no salinizadas, al aplicar 1 μ M de DI 31 previo al estrés salino, lo que demuestra el carácter protector del DI 31 contra los efectos del estrés salino, con lo que se favorece el crecimiento de las plantas sin afectar el fenotipo de las lechugas. La aspersión de DI 31 también puede inducir una respuesta de tolerancia a estrés biótico. Por ejemplo, aplicando 0,1 mg de este esteroide sintético por litro de agua es posible proteger plantas de fresa (*Fragaria ananassa* cv. Pájaro) frente al estrés ocasionado por el hongo *Colletotrichum acutatum* (Furio *et al.*, 2018).

Este efecto protector se pudo corroborar al realizar un estudio histológico de las plantas tratadas y no tratadas con el brasinoesteroide natural (EP24) y el análogo sintético (DI 31), donde se buscaron señales de modificaciones morfológicas que demostraran inducción de protección mediada por estos compuestos. Se muestra la acumulación de calosa y la lignificación en el tejido de las plantas asperjadas con ambos esteroides (Furio *et al.*, 2018).

Los beneficios demostrados de estos compuestos innovadores los convierten en atractivos candidatos de formulaciones comerciales de alto valor agregado, para ser utilizados en la agricultura con el objetivo de incrementar los rendimientos e inducir tolerancia a diferentes condiciones de estrés ambiental.

Referencias bibliográficas

- Coll Y., F., A. Amorós & M. Pujol. Brassinosteroids roles and applications: an up-date. *Biologia* (2015) 70/6: 726-732.
- Canales E., Coll Y, Hernández I. *et al.* 'Candidatus Liberibacter asiaticus', Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids. *PLOS ONE* | DOI: 10.1371/journal.pone.0146223, January 5, 2016
- Serna Mario, Coll Yamilet, Zapata Pedro J., Botella, María Ángeles, Pretel María Teresa, Amorós Asunción. A brassinosteroid analogue prevented the effect of salt stress on ethylene synthesis and polyamines in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, 2015, vol. 185, pp. 105-112.
- Coll, Y. Determinación del papel del brasinoesteroide 24-epibrasinólida en la respuesta defensiva de *Citrus x aurantifolia* (Christm) "Swingle" frente a la infección con "Candidatus Liberibacter asiaticus". Tutores: Orlando Borrás y Eduardo Ortega. Asesor: Francisco Coll. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2015.
- Moreno-Castillo Elena, Ramírez-Echemendía Daniel P., Hernández-Campoalegre Giselle, Mesa-Tejeda Dayana, Coll-Manchado Francisco, Coll-García Yamilet. *In silico* identification of new potentially active brassinosteroid analogues. *Steroids*, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.06.009>
- Furio R. N., Albornoz P. L., Coll Y., Martínez G. M., Salazar S. M., Martos G. G, Díaz Ricci J. C. Effect of natural and synthetic Brassinosteroids on strawberry immune response against *Colletotrichum acutatum*. *Eur J Plant Pathol*, 2018, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1551-3>

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dra. C. Yamilet Coll García. Laboratorio de Bioproductos, Centro de Estudio de Productos Naturales (CEPN), Facultad de Química, Universidad de La Habana. Calle Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, Vedado. CP 10400. La Habana, Cuba. Correo electrónico: yamcoll@fq.uh.cu