

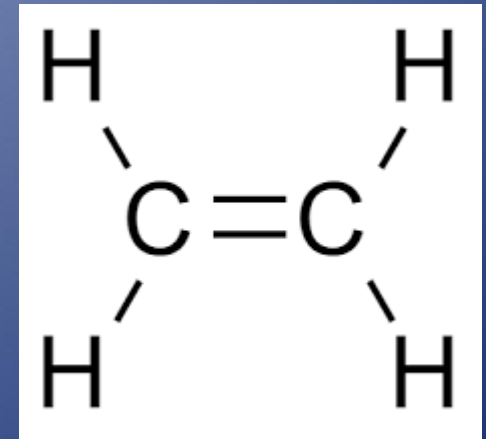
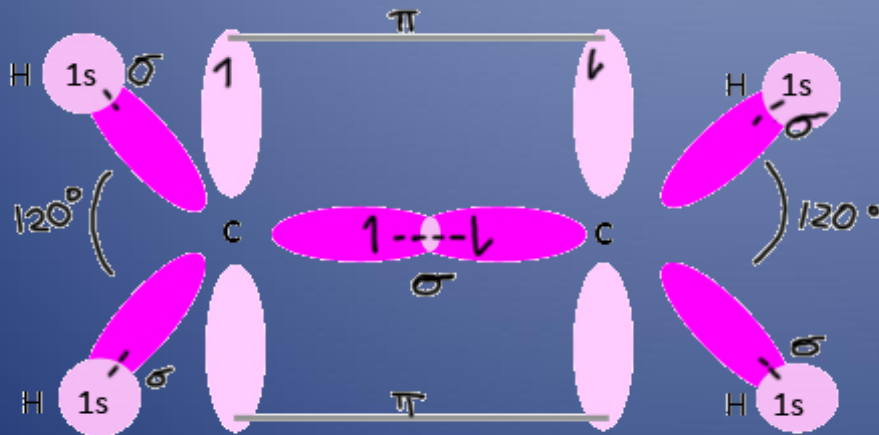
- Continuando con la Unidad Didáctica N° 6:  
Hormonas. Reguladores vegetales.
- Conceptos generales. Regulación génica y sitios de acción. Fenómenos de correlación. Auxinas. Giberelinas. Citocininas. Etileno. Ácido abscísico y otras hormonas. Estructura química; síntesis y traslado. Movimiento en las plantas: nutación, tropismos, nastismos y taxismos. Ritmos endógenos. Interacción entre hormonas.

**TP Senescencia en flores climatéricas. Rol del etileno**

# ETILENO

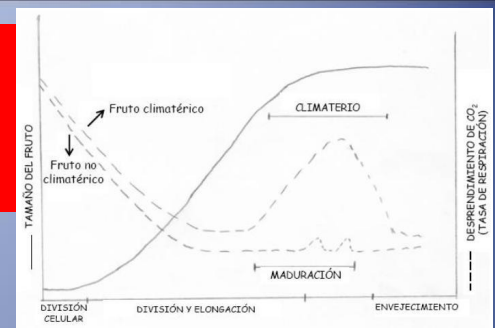
Repasando conceptos vistos en la clase teórica...

- El etileno ( $C_2H_2$ ) es químicamente un 'eteno', un alqueno gaseoso
- Por su condición gaseosa, difunde libremente por los tejidos desde los sitios de síntesis (atraviesa fácilmente las membranas: receptor en el retículo endoplásmico)



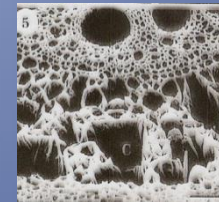
# Algunos efectos fisiológicos:

- Regulación de la maduración en frutos y flores climatéricos

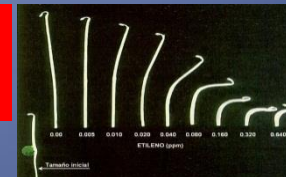


Inhibición de la elongación (en mesófitas). En palustres (arroz) estimula la elongación

Rol en la formación de aerénquimas en raíces en condiciones de inundación (hipoxia)



Respuesta triple en plántulas (plagiotropismo, incremento del gancho plumular, hipocotilo corto y grueso)



Promueve la senescencia en hojas (antagonista de las citocininas en este proceso)



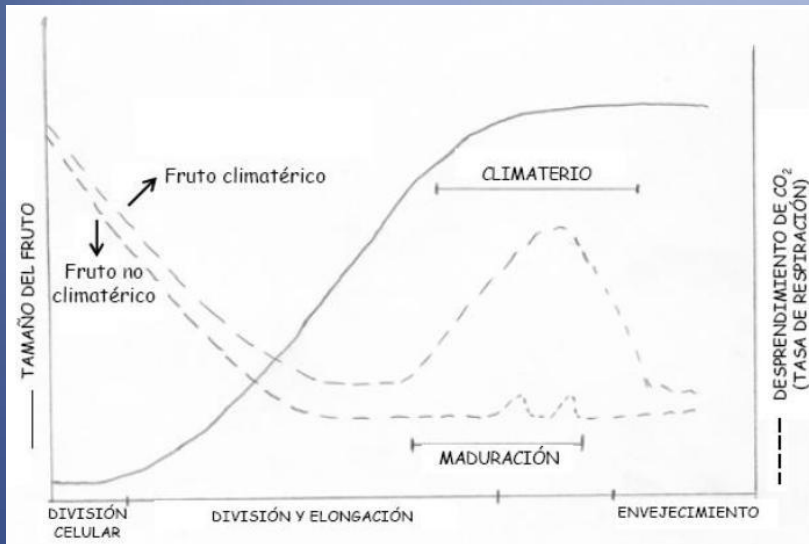
Epinastia en hojas



Rol en la abscisión de hojas (interacción con las auxinas)



# En el TP nos concentraremos en el rol del etileno en la senescencia de órganos climatéricos



**Recuerden:** lo que define y distingue a un órgano climatérico de otros 'no climatéricos' (además del pico en la producción de etileno) es la existencia de un sistema autocatalítico en la síntesis de la hormona (sistema tipo II) durante la maduración: el etileno promueve su propia síntesis en forma de '**retroalimentación positiva**'

También recuerden que los frutos climatéricos tienen un pico respiratorio (posterior al pico de etileno) durante la maduración (usados como 'modelo' en el TP de Respiración)



## TP Senescencia en flores climatéricas. Rol del etileno

**Objetivo:** determinar la regulación ejercida por el etileno sobre la vida post-cosecha (que involucra senescencia) de una flor climatérica ('clavel', *Dianthus caryophyllus*)



**Fundamento general:** para analizar la regulación ejercida por el etileno en la senescencia del clavel (1) se aumentará en forma exógena el nivel de etileno en los tejidos, (2) se inhibirá su síntesis y (3) se inhibirá su acción (bloqueo del receptor)

# Materiales

Material vegetal: 28 flores cortadas de clavel blanco *Dianthus caryophyllus*

¿Porqué elegimos este material vegetal?: (1) especie climatérica. (2) el color blanco facilita el análisis de la senescencia (por ejemplo, evaluar cambios de color del pétalo). (3). Especie de importancia económica como ornamental (como 'flor cortada')

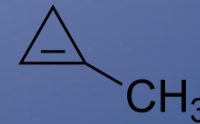


Etefón (producto comercial Tifón):  
libera etileno en la célula



AOA (ácido aminooxiacético) Solución 1 mM  
Inhibe la síntesis de etileno

MCP polvo (metilciclopropeno en dextrina, producto comercial Ethyl Block). Inhibe la acción por unión al receptor del etileno



Cubas de vidrio para bloqueo con MCP (ver más adelante)



Tubos de ensayo, gradillas, agua destilada, pipetas, y materiales diversos (jeringa, vaselina, tijeras, cinta, marcadores para rotulación)

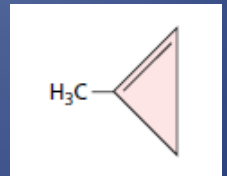


## Tratamientos (claveles cortados)

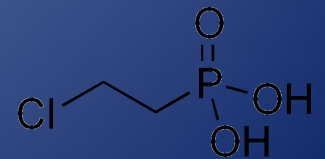
1.  $H_2O$
2.  $H_2O + \text{pre-MCP}$  ( $1 \mu\text{L L}^{-1}$ )
3. Etefón 1/1000 v/v
4. Etefón 1/1000 v/v + pre-MCP ( $1 \mu\text{L L}^{-1}$ )
5. Etefón 1/100 v/v
6. Etefón 1/100 v/v + pre-MCP ( $1 \mu\text{L L}^{-1}$ )
7. AOA 1 mM

**4 repeticiones por tratamiento (28 claveles en total)**

**MCP (metilciclopropeno) pretratamiento el día anterior** (ver diapos más adelante...) Inhibidor de acción por bloqueo del receptor



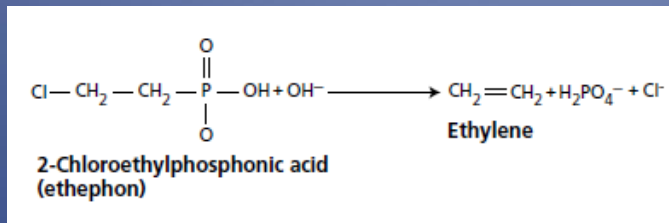
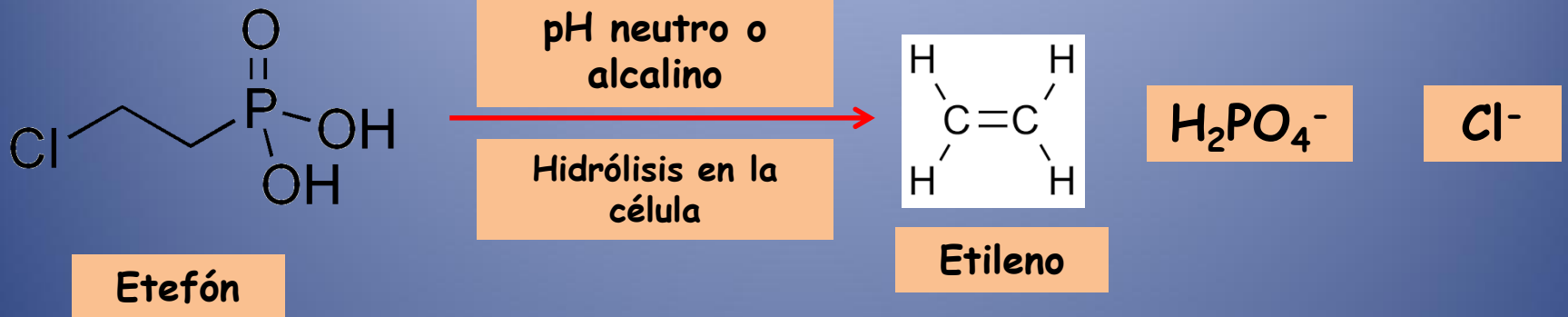
**Etefón: (ácido 2-cloro etil fosfónico) regulador (sintético)** que se hidroliza y libera etileno en la célula (nombres comerciales Ethrel, Tifón).



**AOA (ácido AminoOxiAcético)** Inhibidor de la enzima AAC sintasa (inhibidor de síntesis)



**Etefón: (ácido 2-cloro etil fosfónico) regulador (sintético) que se hidroliza y libera etileno en la célula (nombres comerciales Ethrel, Tifón)**



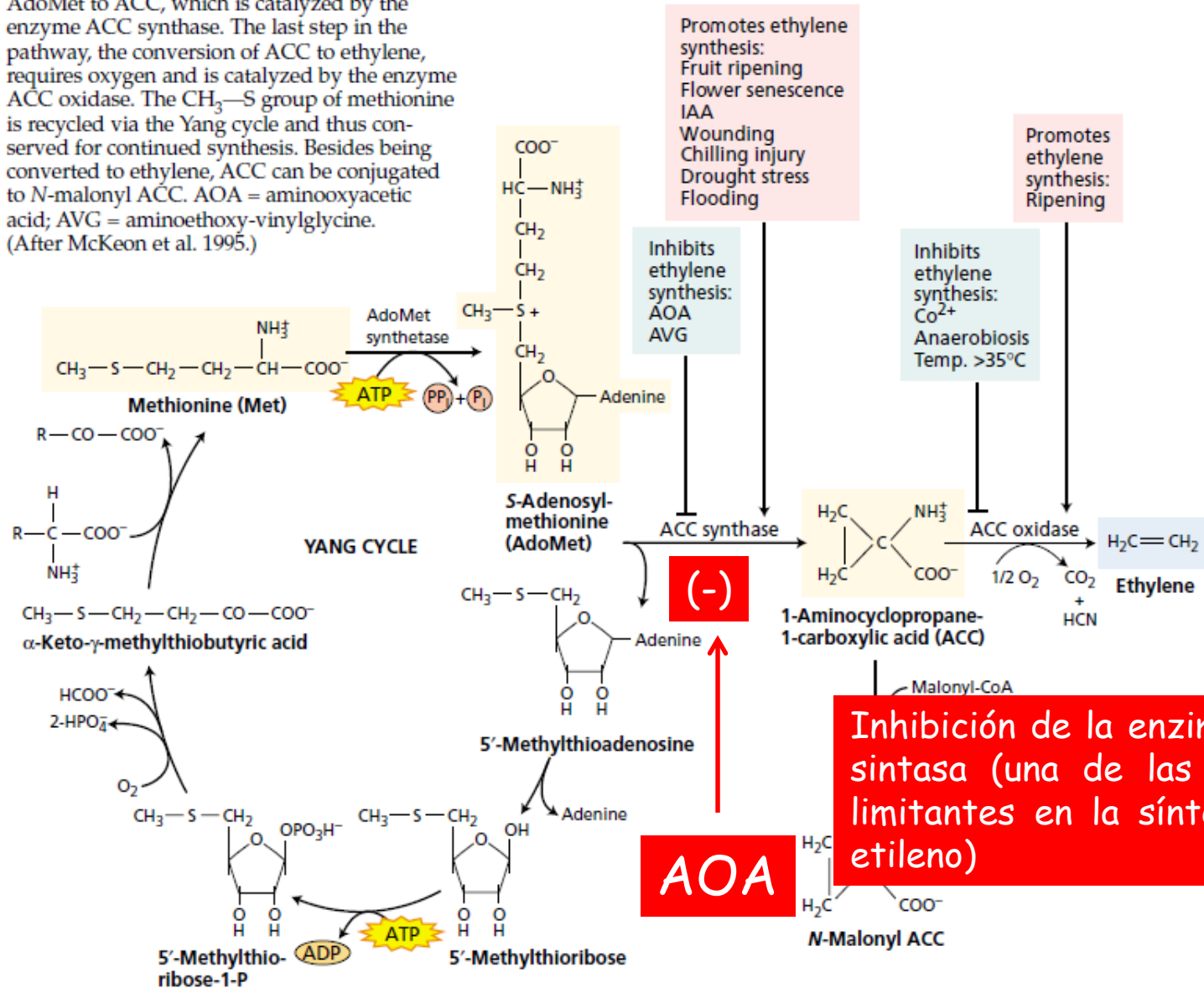
Una de las ventajas de utilizar Etefón (líquido) en lugar de usar directamente etileno (gaseoso) reside en la facilidad de su aplicación en la planta u órgano



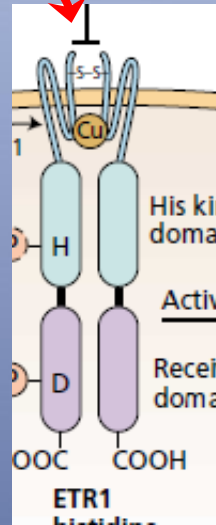
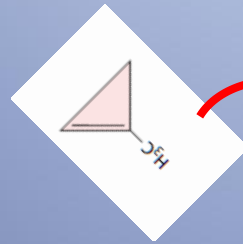


# Inhibición de la síntesis

step in the pathway is the conversion of AdoMet to ACC, which is catalyzed by the enzyme ACC synthase. The last step in the pathway, the conversion of ACC to ethylene, requires oxygen and is catalyzed by the enzyme ACC oxidase. The  $\text{CH}_3\text{-S}$  group of methionine is recycled via the Yang cycle and thus conserved for continued synthesis. Besides being converted to ethylene, ACC can be conjugated to *N*-malonyl ACC. AOA = aminooxyacetic acid; AVG = aminoethoxy-vinylglycine. (After McKeon et al. 1995.)



# Inhibición de la acción



El **MCP** se une en forma irreversible al receptor y bloquea las respuestas mediadas por etileno

A pesar de ser irreversible, un tejido puede volver a ser sensible al etileno si renueva sus receptores

Vista del receptor del etileno (Ret. Endoplásmico)

# Recordando las aproximaciones experimentales en el estudio de hormonas

**'Farmacológicas'**  
(aplicaciones exógenas)

En el TP de hoy  
utilizamos estas 3  
aproximaciones

1. Hormona o regulador  
(o de un precursor)

2. Inhibidor de la síntesis

3. Inhibidor del transporte

4. Inhibidor de la acción  
(bloqueo del receptor)

**Plantas con modificaciones  
genéticas**

(mutantes, transgénicos etc)

1. Mutantes deficientes  
en la síntesis

2. Mutantes insensibles

3. Sobre-expresantes

1. Hormona o regulador  
(o de un precursor)

Etefón

2. Inhibidor de la síntesis

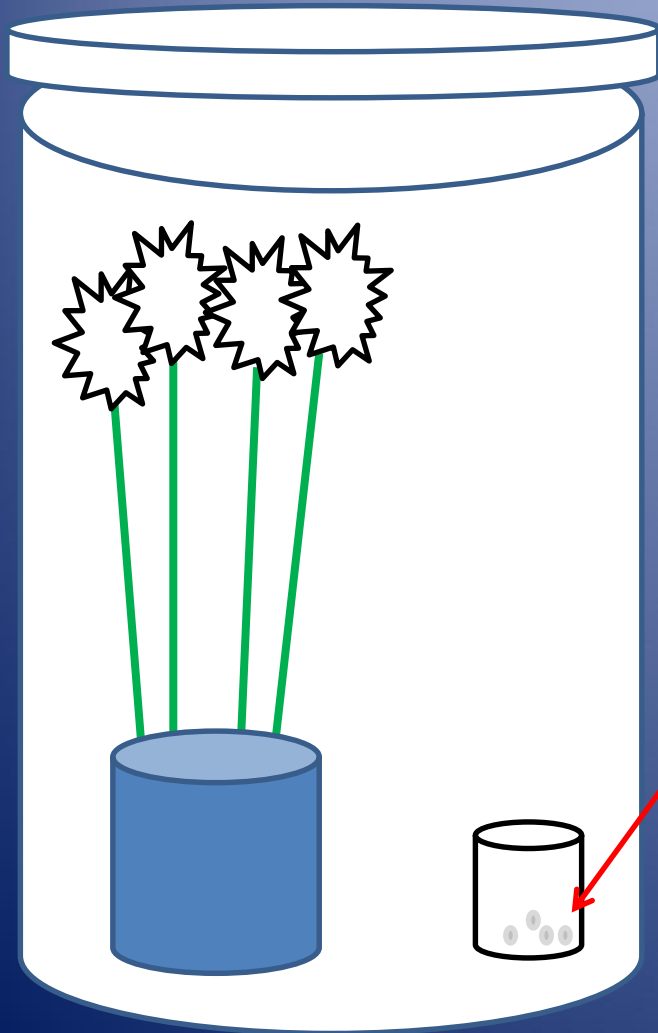
AOA

3. Inhibidor del transporte

4. Inhibidor de la acción  
(bloqueo del receptor)

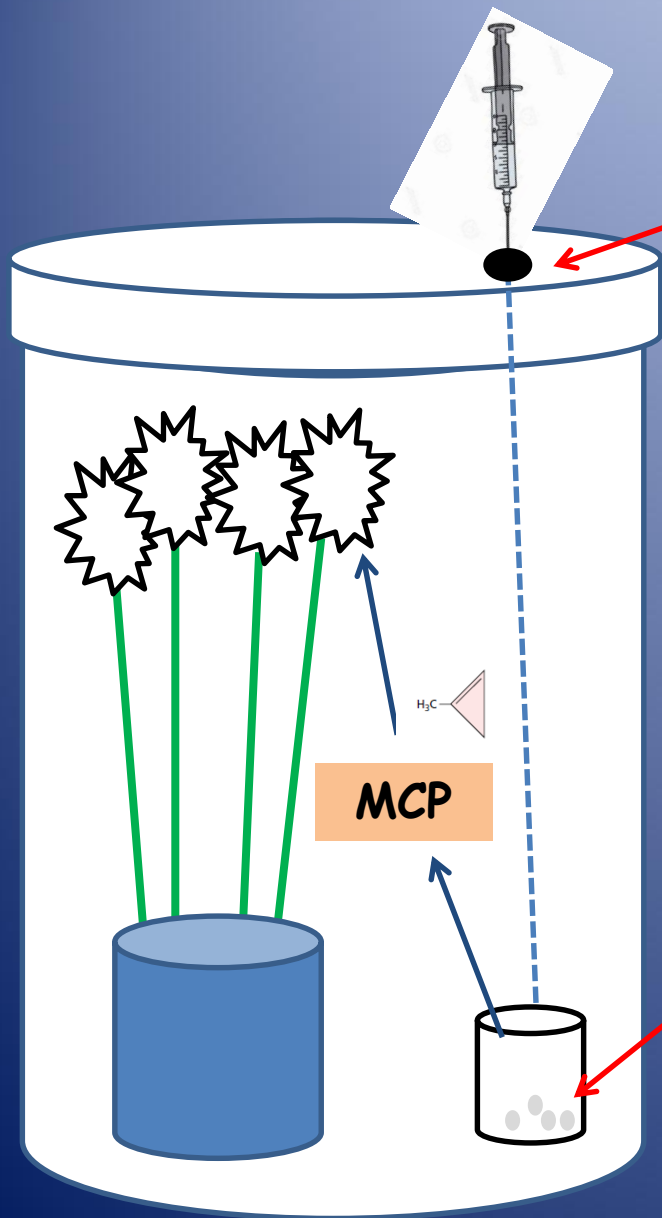
MCP

**¿Cómo se hace el pre-tratamiento con MCP?:  
debe realizarse un día antes del inicio del  
experimento...**



**1. Se colocan los claveles en una cuba de vidrio estanca (con tapa hermética, sellada con vaselina en el borde) (aún abierta en el esquema)**

**2. El MCP (50 mg, gas atrapado en una dextrina, en polvo) se coloca en un vaso de precipitados dentro de la cuba de vidrio**



3. Ya con la tapa bien cerrada, a través de un 'septum' de goma en la tapa de la cuba, se inyectan 50 ml de agua destilada (al recipiente donde está el MCP)

4. El agua cae al vaso de precipitados, desplaza al MCP de la dextrina, y éste difundirá a la atmósfera de la cuba

El MCP (gaseoso) penetrará en las células y se unirá a los receptores de etileno (retículo endoplásmico)

nota: con esas cantidades de polvo de MCP+ dextrina, y en ese volumen de cuba, se obtiene una concentración de MCP gaseoso de  $1 \mu\text{L L}^{-1}$



**Claveles  
'control'  
sin tratar**

**Claveles durante el pre-  
tratamiento con MCP**



## Volvamos a los tratamientos del experimento...

1. H<sub>2</sub>O
2. H<sub>2</sub>O + pre-MCP (1 μL L<sup>-1</sup>)
3. Etefón 1/1000 v/v
4. Etefón 1/1000 v/v + pre-MCP (1 μL L<sup>-1</sup>)
5. Etefón 1/100 v/v
6. Etefón 1/100 v/v + pre-MCP (1 μL L<sup>-1</sup>)
7. AOA 1 mM

- Cada clavel (i.e. cada repetición) de los diferentes tratamientos se coloca en sendos tubos de ensayos, cada uno con la solución correspondiente según el caso.
- Las gradillas de los tratamientos con etefón se colocan lejos de los demás tratamientos. ¿Porqué creen que se hace esto?

**¿Qué se evaluará en el experimento?:** analizaremos la senescencia de los pétalos, a través de cambios de color (pardeamiento). También puede observarse el ángulo de los pétalos y el nivel de deshidratación.

**Evaluaciones cada 2-3 días**

## **Escala semi-cuantitativa de porcentaje de 'pardeamiento' de pétalos**

**Grado 0** sin pardeamiento (pétalo bien blancos, turgentes)

**Grado 1** pardeamiento en los bordes , < 10% del área del pétalo

**Grado 2** pardeamiento entre 10% y 30% del pétalo

**Grado 3** pardeamiento entre 30 % y 50 %

**Grado 4** pardeamiento entre 50% y 70%

**Grado 5** pardeamiento > 70 %

**RESULTADOS:** los valores de la tabla muestran los datos de evaluación de senescencia realizadas con la escala de 'pardeamiento' de los pétalos (2, 5 y 8 días desde el inicio de los tratamientos)

**Nivel de senescencia pétalos (escala semi-cuantitativa)**

Tratamiento	2 días	5 días	8 días
1. Agua	1	3	3,5
2. Agua + pre MCP	0	0	1
3. Etefón 1:1000 v/v	2	4	5
4. Etefón 1:1000 v/v + pre MCP	0	1	2
5. Etefón 1:100 v/v	3,5	5	5
6. Etefón 1:100 v/v + pre MCP	0	1	3
7. AOA	0	0	2

Tratamiento	2 días	5 días	8 días
1. Agua	1	3	3,5
2. Agua + pre MCP	0	0	1
3. Etefón 1:1000 v/v	2	4	5
4. Etefón 1:1000 v/v + pre MCP	0	1	2
5. Etefón 1:100 v/v	3,5	5	5
6. Etefón 1:100 v/v + pre MCP	0	1	3
7. AOA	0	0	2

Un par de 'tips' para comenzar a mirar y analizar los datos:

- En un mismo día de medición, comparen un tratamiento determinado, con otro tratamiento en el que solo está modificada una variable. Por ejemplo, el tratamiento 2 *versus* el 1, o el tratamiento 4 *versus* el 3, o el 7 *versus* el 1, etc. Esto ayuda a la comprensión...
- Otra manera de ver los datos es comparar la evolución en el tiempo en un mismo tratamiento (día 2, día 5, día 8..)

Fotografías de claveles de un experimento similar (dado que no contamos con fotografías de todos los tratamientos, las fotos se muestran solo a fines de ilustrar los efectos del etefón , AOA y MCP) 1 semana de tratamiento



Claveles 'control' en agua



Claveles tratados con etefón  
1/100 v/v



Claveles tratados con AOA 1  
mM



Claveles pre- tratados con  
MCP , en agua



Detalle clavel en agua  
'control'



Detalle clavel pre-tratado  
con MCP

Tener en cuenta que con el transcurrir de los días en la vida post-cosecha, las diferencias que vemos en estas fotos se acentúan (a medida que la senescencia del control continúa)

## Algunas preguntas y comentarios para analizar los resultados:

1. ¿Qué efecto produjo el aumento exógeno de etileno sobre la senescencia del clavel? ¿Los datos sugieren una relación dosis-respuesta?
2. ¿Qué pasó en los claveles pre-tratados con MCP? ¿Y los tratados con AOA?. Explique mecanísticamente estas observaciones.
3. Analice los tratamientos con etefón *versus* etefón pre tratados con MCP: ¿porqué a pesar de estar bloqueados los receptores, de todas maneras se observó cierto nivel de senescencia? (compare por ejemplo, el tratamiento 5 *versus* tratamiento 6 en el día 8, y tome como referencia el control en agua; tratam. 1).
4. ¿Porqué creen que durante el pre-tratamiento con MCP, los controles no tratados se colocan también en una cuba? (ver foto en esta presentación)

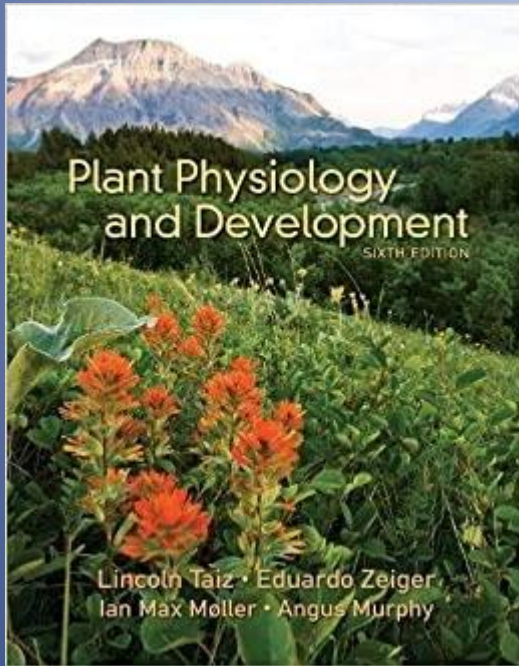


5. En base a los conocimientos que ha adquirido en relación al etileno y a los órganos climatéricos, responda lo siguiente:

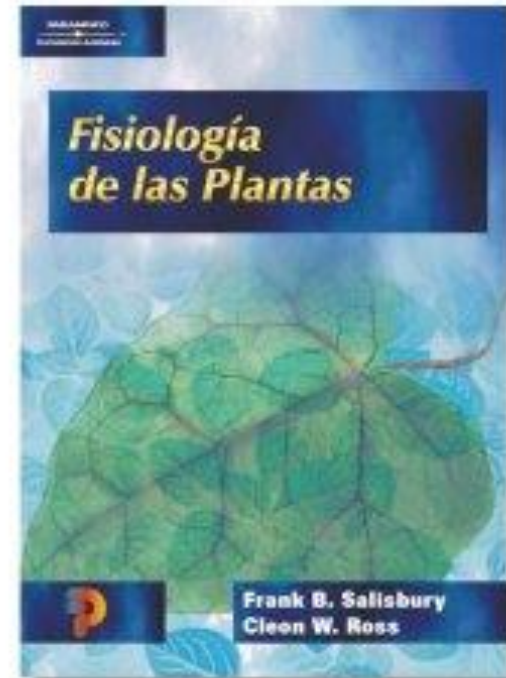
Suponga que usted tiene un cargamento de manzanas. Proponga cinco tratamientos para alargar la vida post-cosecha de esos frutos (cuenta con instalaciones, equipos, reactivos etc. para todo tipo de manipulación)

Confeccionen el informe del TP en base a la explicación descripta en esta presentación y a las clases en la plataforma virtual (incluir Objetivos, Fundamentos, Materiales y Métodos, los Resultados mostrados, y la interpretación de los mismos (incluyendo las respuestas a la preguntas formuladas en las diapos 21 y 22, y la pregunta de la diapo 16)

Enviar documento Word por e-mail al docente de la comisión correspondiente



El texto más actualizado de Fisiología Vegetal (existe versión en portugués) 6ta edición 2015

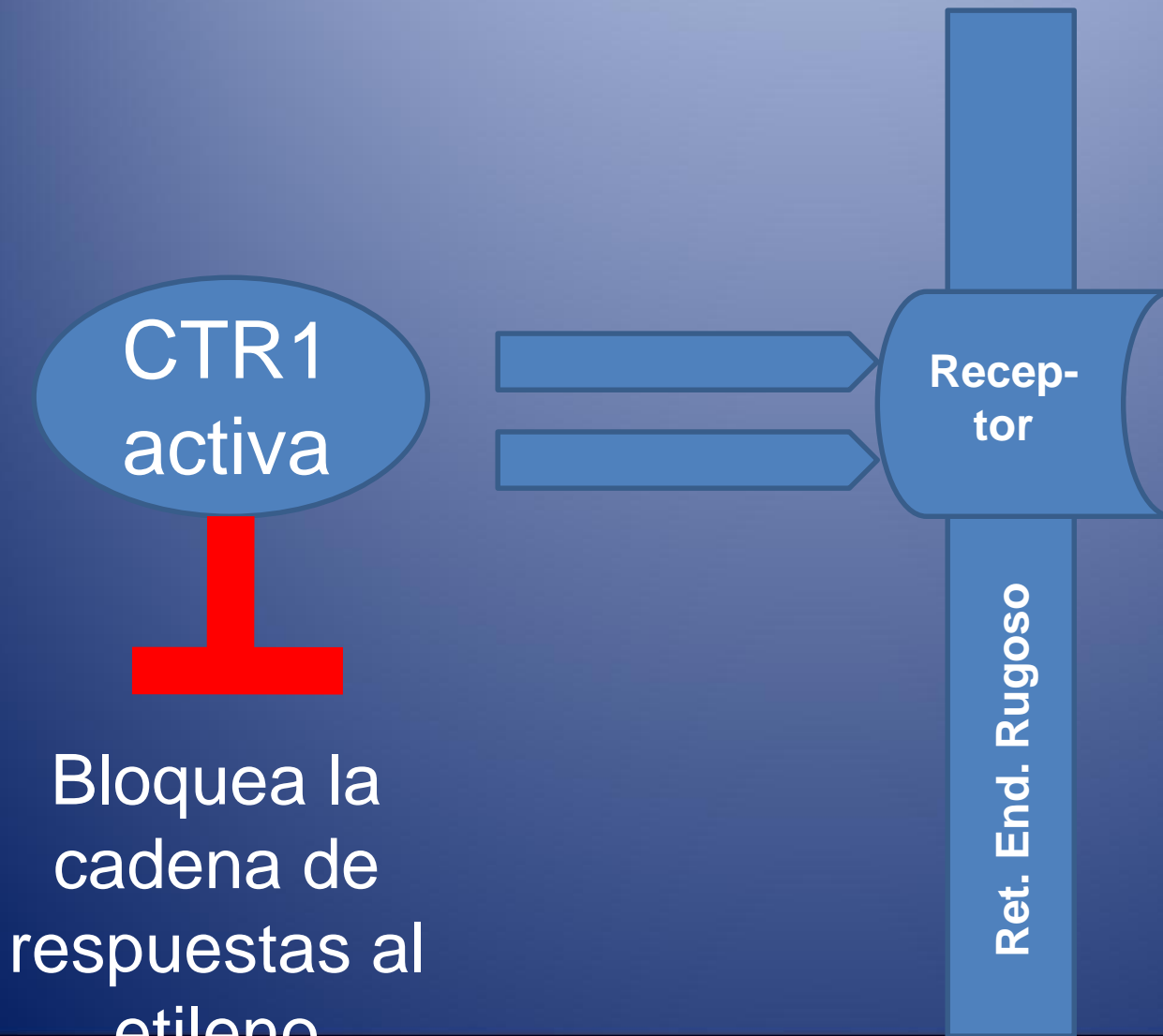


Para temas generales de la hormona (desactualizada para aspectos moleculares, vías de señalización etc)

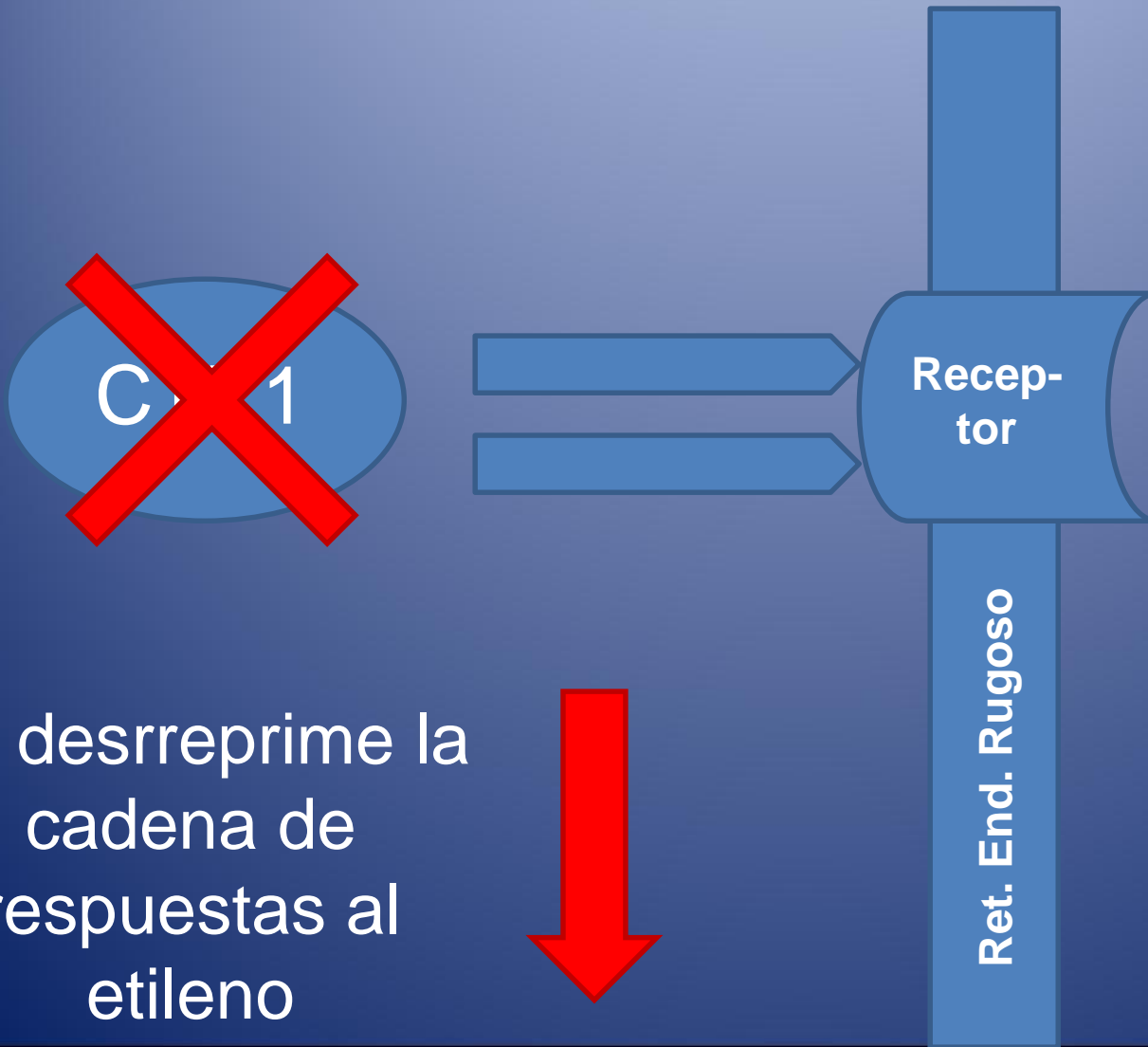


Texto en castellano, actualizado 2da edición 2013

# ¿Cómo están los receptores sin etileno?

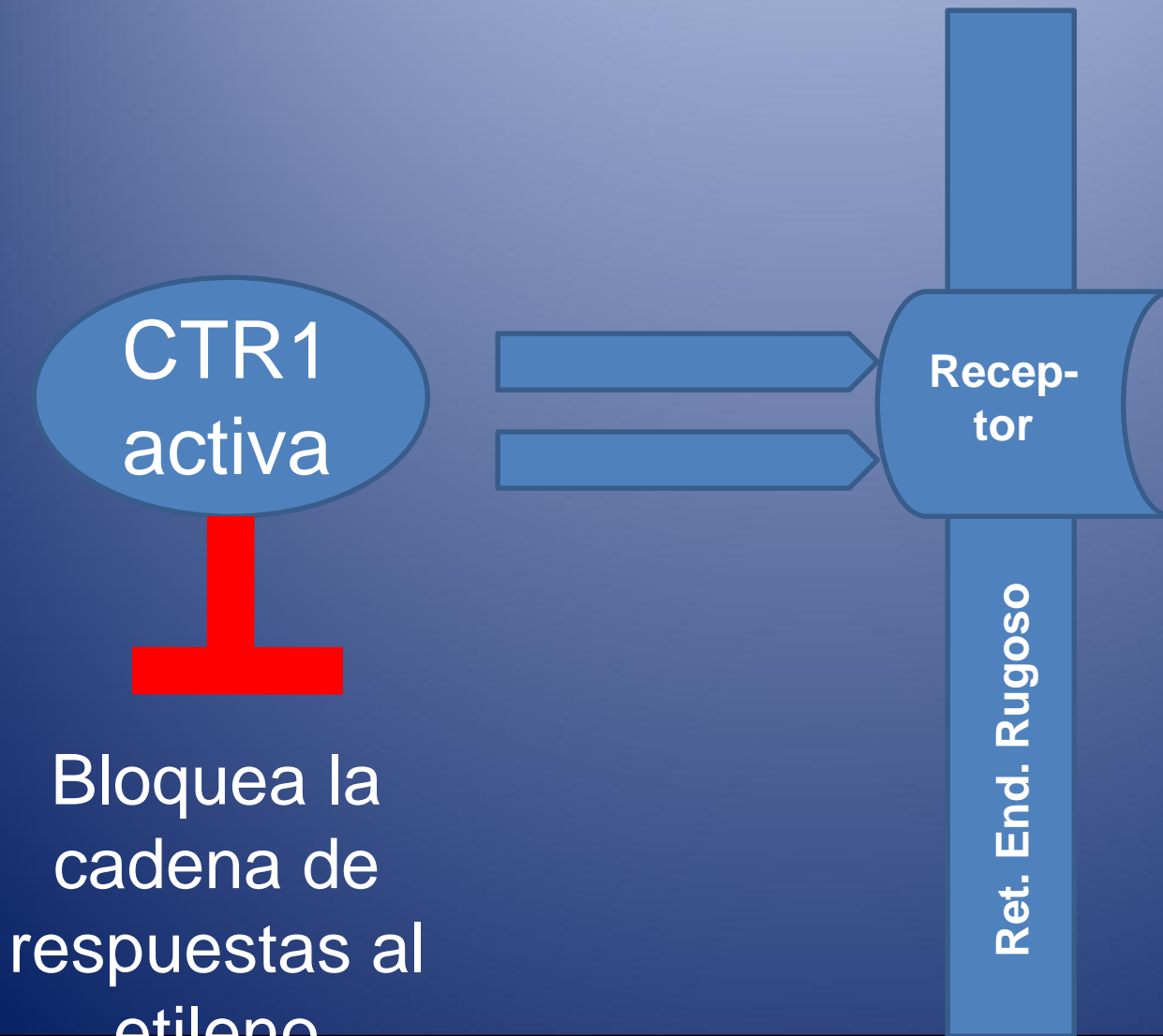


# ¿Qué ocurre si se les une etileno?



Se desreprime la  
cadena de  
respuestas al  
etileno

¿Qué sucede si los receptores están bloqueados con 1-MCP?



De la misma manera ocurre con

Ag<sup>+</sup>

