

## ANÁLISIS HORMONAL EN PLANTAS: TENDENCIAS ACTUALES \*

### Analysis of plants hormones: actual tendencies \*\*

Por: Victor J. Flórez-Roncancio<sup>1</sup>

#### RESUMEN

En esta revisión, se procura mostrar el desarrollo de la investigación en el área hormonal, desde los primeros trabajos que mostraron la interacción entre hormonas y tipos de crecimiento, la aplicación de estas sustancias y sus implicaciones en el estudio de las respuestas de las plantas, hasta los métodos de cuantificación hormonal. Se da énfasis en la purificación de extractos de plantas por columnas de inmunoafinidad y su cuantificación por ELISA, técnica ésta recientemente establecida para hormonas vegetales y que posibilita un análisis más preciso de los fenómenos en plantas bajo control hormonal.

**Palabras claves:** Columnas de Inmunoafinidad, Giberelinas, Citocininas, Acido Abscísico, Auxinas, ELISA.

#### SUMMARY

This review is intended to show the development of plant hormones-related research, from the early works that proved the

interactions between hormones and growth of plant parts, the application of these hormones and growth of plants substances and their implications in the study of plant responses, to hormone quantification methods. Emphasis is given to plant extract purification by immunoaffinity columns and hormone quantification by ELISA technique, which has been established recently and allows a more precise analysis of hormone-controlled plant processes previous techniques.

**Key Words:** Immunoaffinity Columns, Gibberellins, Cytokinins, Abscisic Acid, Auxins, ELISA.

El presente trabajo tiene como objetivo suministrar una amplia y bien sustentada información sobre el Análisis Hormonal en las Plantas, con el fin de que sean tenidos en cuenta para los futuros trabajos sobre tan importante, como necesario tema que se proyecten y adelanten por los profesores de la facultad y que, por consiguiente, redundarían en el mejoramiento y actualización de la enseñanza de la fisiología vegetal en nuestra unidad docente. Se deja al criterio de nuestros fisiólogos el utilizar esta información.

En los procesos de morfogénesis, se procura encontrar los factores que gobiernan la formación de los órganos, su crecimiento y desarrollo. La teoría de una sustancia formadora de órganos fue definitivamente abolida cuando Skoog & Miller (1957), en experimentos con callos y tejidos de tallo de tabaco, en cultivo *in vitro*, demostraron interacciones cuantitativas entre factores de crecimiento (AIA y KI), estableciendo un mecanismo común de regulación de los tipos de crecimiento por ellos investigados, desde la elongación celular hasta la formación del órgano.

\* Recibido en Julio de 1997

\*\* **Abreviaturas:** ABA Ácido Abscísico; AIA Ácido indol-3-acético; BSA Albúmina de Soro Bovina; DHZ Dihidrozeatina; DHZR Dihidrozeatina Ribosido; ELISA "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"; GS-MS Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometro de Masas; HPLC Cromatografía Líquida de alta Eficiencia; IgG Inmunoglobulina G; iP Isopentenil Adenina; iPA Isopentenil Adenosina; KI Cinetina; RIA Radio Inmuno Ensayo; Z trans-Zeatina; ZR trans-Zeatina Ribosido.

1 Profesor Asistente, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Apartado 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Basándose en el efecto antagónico citocininas-ABA en varios fenómenos morfogénicos, principalmente en el control de la germinación de semillas y en la eliminación de la dominancia apical, Khan (1975) estableció un modelo de acción que atribuye funciones a las hormonas. En este modelo, una determinada hormona tendría un papel primario para la germinación o el crecimiento, en cuanto que las demás clases hormonales tendrían papeles secundarios, esencialmente preventivos y permisivos. Así, las hormonas actuarían selectivamente en el control del proceso en cuestión.

Las aplicaciones de hormonas en órganos de plantas intactas nos pueden indicar la posibilidad de que una o más hormonas estén involucradas en el proceso en estudio; entretanto, según Khan (1975), la interpretación de estos resultados estaría sujeta a considerar si las sustancias aplicadas alcanzarían los mismos centros metabólicos de las sustancias endógenas. Las hormonas *in situ* podrían estar localizadas, sin tener acceso a los sitios activos tan rápidamente como las hormonas aplicadas; no se sabe que cantidad de la hormona aplicada alcanza los centros activos y si su acción sería más o menos rápida en relación a las hormonas endógenas. Las interpretaciones de las respuestas fisiológicas, también, deben considerar que los cambios en la cantidad de una hormona o de una clase hormonal no, necesariamente, son la indicación de su potencial para afectar el crecimiento o de su papel fisiológico, lo cual podría estar más relacionado con la actividad y la edad del órgano. En muchos procesos, la relación entre hormonas cambia constantemente durante el crecimiento y el desarrollo, cambio que, también, ocurre en relación con la forma activa (libre) e inactiva (ligada) de la misma hormona.

También, es necesario considerar que no hay una relación obligatoria entre el efecto de una sustancia aplicada y sus niveles endógenos, como, también, puede no existir una correlación entre los niveles endógenos de una sustancia y el fenómeno estudiado. El análisis de fitohormonas requiere procesos de extracción que destruyen la estructura

*in vivo*, pudiendo afectar la estimación de la actividad en la fracción biológicamente activa. Además, la sensibilidad del tejido a la hormona puede ser una variable fisiológicamente más significativa que la concentración de la misma (Kinet *et al.*, 1985).

De esta forma, queda evidente que el patrón de crecimiento y desarrollo vegetal es, en parte, controlado por fitohormonas, pero, el análisis de la respuesta de las plantas a las aplicaciones exógenas de hormonas no es confiable, en función de las variables ya mencionadas.

Considerando las limitaciones de las aplicaciones de hormonas en órganos de plantas intactas, las limitaciones en los procesos de extracción y las inherentes a los ensayos biológicos y a los análisis cuantitativos, se debe procurar estudiar el balance hormonal al contrario de analizar la concentración de una única hormona, pues esto nos permite una mejor comprensión del proceso en estudio.

Entre los métodos de cuantificación para el análisis de fitohormonas, se destacan GC-MS, RIA y ELISA. El GC-MS, cuando es usado con marcadores estables, es específico, sensible y preciso. En las técnicas de RIA y ELISA, además de la sensibilidad y la rapidez de los análisis, se tiene una alta capacidad de procesamiento de muestras. Entretanto, es necesario purificar y fraccionar los extractos, evitando interferencia inespecífica y la reacción cruzada con compuestos análogos. Hedden (1993) hace énfasis en la necesidad de la purificación del extracto en la mayoría de los inmunoensayos y, como en los ensayos físico-químicos, la precisión de la cuantificación requiere la inclusión de controles internos para determinar el porcentaje de recuperación, lo más apropiado son las hormonas análogas de alta especificidad radioactiva marcadas en  $^3\text{H}$ .

Así como los anticuerpos desarrollados para fitohormonas se han venido utilizando en inmunoensayos, también, han sido usados en cromatografía de inmunoafinidad, permitiendo una rápida y eficiente purificación de los extractos antes del análisis cuantitativo.

Davis *et al.* (1986) compararon soportes para columnas de inmovilización y concluyeron que, para análisis por HPLC, los inmuoadsorbentes investigados (Affi-Gel 10, Sílica y Sepharose) son eficientes en la purificación de citocininas; entretanto, en los soportes utilizados para la inmovilización de la IgG anti-ZR, hubo reducción en la constante de equilibrio de la ligación ( $K_a$ ), con relación al anticuerpo soluble. Cuando el anticuerpo fue fijado en el Affi-Gel 10, hubo una reducción en la  $K_a$  de tres veces y, de más de 100 veces cuando el anticuerpo fue inmovilizado en los soportes de Sepharose. De los soportes evaluados para  $K_a$ , solamente, la ligación con Affi-Gel 10 incluye una molécula espaciadora entre el anticuerpo y el soporte sólido, permitiendo mayor libertad conformacional del mismo. Esta molécula espaciadora es la probable responsable de los mayores valores de  $K_a$  del Affi-Gel 10.

Ulvskov *et al.* (1992a), Nicander *et al.* (1993) y Bollmark *et al.* (1995) utilizaron columnas de inmovilización para la purificación de citocininas; Sundberg *et al.* (1986) y Ulvskov *et al.* (1992b), para la purificación de AIA. Ulvskov *et al.* (1992a) utilizaron, solamente, anticuerpo monoclonal de amplia especificidad para aislar las citocininas del grupo Z, DHZ e iP y el antisuero policlonal en la cuantificación enzimática por ELISA; Nicander *et al.* (1993) utilizaron una mezcla de anticuerpos policlonales, anti-ZR y anti-iPA, explorando la reacción cruzada de estos anticuerpos para la purificación por inmovilización de 25 citocininas.

Aunque la repetitividad del RIA y del ELISA son comparables, el ELISA, basado en anticuerpo monoclonal, es aproximadamente 10 veces más sensible. El ELISA, en función de la naturaleza menos peligrosa de las sustancias químicas utilizadas es una técnica menos dispendiosa y más segura, haciendo que esta técnica sea la más apropiada para la cuantificación de las fitohormonas (Mertens *et al.*, 1985; Eberle *et al.*, 1986).

En lugar de hacer la partición típica del extracto acuoso, con solventes orgánicos, para obtener la separación de las fracciones

ácida y básica; la separación por cromatografía de placa o HPLC preparativa, se puede partir directamente para la purificación del extracto en columnas de inmovilización y posterior cuantificación por HPLC analítica y/o por ELISA.

De acuerdo con Sequeira (1992), se han desarrollado numerosas modificaciones de la versión original de la técnica de ELISA, designadas por "sandwich" de doble anticuerpo ("double antibody sandwich") y se opta por la fijación del antígeno a la placa sin el uso de anticuerpos de revestimiento. Así, de acuerdo con Hedden (1993), la competencia entre el antígeno conjugado fijado a la placa y el antígeno de la muestra por el anticuerpo marcado con la enzima forman la base del ensayo. Alternativamente, en este ELISA indirecto, un segundo anticuerpo ligado a la enzima es usado para cuantificar un primer anticuerpo anti-hormona, ligado vía antígeno inmovilizado en la placa. Debido a la bivalencia de los anticuerpos, con el uso del segundo anticuerpo se presenta una amplificación adicional y un aumento de cinco a diez veces en la sensibilidad del ELISA indirecto.

En las técnicas inmunoenzimáticas, se utilizan enzimas en la marcación de los anticuerpos. Las enzimas, en contacto con el substrato adecuado, lo transforman (hidrolizan) químicamente y forman un producto coloreado que permite la cuantificación de la reacción por colorimetría. La lectura de los resultados se realiza colocando la placa, después de la reacción, en un colorímetro, donde, para cada celda, se mide la absorbancia en la longitud de onda de 405nm (Sequeira, 1992).

Los anticuerpos monoclonales producidos por clones obtenidos a partir de hibridomas (fusión de una célula productora de anticuerpos con una célula de mieloma) (Sequeira, 1992), pese a ser técnicamente difíciles de preparar proporcionan mayor especificidad y un ilimitado suministro de anticuerpos (Hedden, 1993). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales útiles en inmunoensayos tendrían que mostrar alta afinidad y especificidad, combinación raramente conseguida para antígenos de bajo peso

molecular (Weiler, 1984). Entretanto, el anticuerpo monoclonal de alta afinidad disponible para ABA no presenta reacción cruzada con compuestos relacionados, permitiendo la cuantificación de trazas de la forma libre de ABA (*cis* (+)-ABA), la cual ocurre naturalmente en plantas (Weiler, 1980(a); Weiler, 1984). También, se han obtenido anticuerpos monoclonales de alta afinidad y especificidad para AIA (Mertens *et al.*, 1985), para giberelinas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>9</sub>) (Knox *et al.*, 1987), y para ZR, DHZR, sus bases libres y ésteres fosfatados (ribotídos) (Eberle *et al.*, 1986).

Weiler (1980b) demostró que el antisuero producido contra el conjugado BSA-*trans*-ZR tiene alta afinidad para ZR y Z, lo cual posibilita su cuantificación mediante separación previa. iPA y t-ZR han sido usados como materiales iniciales y los antisueros disponibles discriminan marcadamente las citocininas del tipo t-Z y las del tipo iPA (Weiler, 1984).

Por lo tanto, en la actualidad, técnicamente es posible hacer determinaciones hormonales simultáneas más completas (giberelinas, citocininas, AIA y ABA), con sus respectivas asociaciones, en un sinnúmero de fenómenos morfogénicos en plantas, utilizandonos de técnicas precisas, en el orden de picomoles a femtomoles, lo que nos posibilita una comprensión más próxima de la realidad, en los fenómenos estudiados.

## BIBLIOGRAFIA

**BOLLMARK, M., CHEN, H., MORITZ, T., ELIASSON, L.** Relations between cytokinin level, bud development and apical control in Norway spruce, *Picea abies*. *Physiol. Plant.*, 95:563-68, 1995.

**DAVIS, G. C., HEIN, M. B., CHAPMAN, D. A.** Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules. Isolation and purification of cytokinins. *J. Chromatogr.*, 366:171-89, 1986.

**EBERLE, J., ARNSCHIEDT, A., KLIX, D., WEILER, E. W.** Monoclonal antibodies to plant growth regulators. III Zeatinriboside and dihydrozeatinriboside. *Plant Physiol.*, 81:516-21, 1986.

**HEDDEN, P.** Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:107-29, 1993.

**KHAN, A. A.** Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant systems. *Bot. Rev.*, 41:391-420, 1975.

**KINET, J. M., SACHS, R. M., BERNIER, G.** *The physiology of flowering; volume III the development of flowers*. Boca Raton: CRC Press, 1985. 274 p.

**MERTENS, R., EBERLE, J., ARNSCHIEDT, A., LEDEBUR, A., WEILER, E. W.** Monoclonal antibodies to plant growth regulators. II. indol-3-acetic acid. *Planta*, 166:389-93, 1985.

**NICANDER, B., STANHL, U., BJORKMAN, P. O., TILLBERG, E.** Immunoaffinity co-purification of cytokinins and analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-spectrum detection. *Planta*, 189:312-20, 1993.

**KNOX, J. P., BEALE, M. H., BUTCHER, G. W., MacMILLAN, J.** Preparation and characterization of monoclonal antibodies which recognise different gibberellin epitopes. *Planta*, 170:86-91, 1987.

**SEQUEIRA, J. C.** Técnicas serológicas e bio-moleculares de diagnóstico de vírus e de viróides em plantas. *Summa Phytopathol.*, 18:79-110, 1992.

**SKOOG, F., MILLER, C. O.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Biological action of growth substances. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Cambridge University Press, 11:118-31, 1957.

**SUNDBERG, B., SANDBERG, G., CROZIER, A.** Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography. *Phytochemistry*, 25:295-98, 1986.

**ULVSKOV, P., NIELSEN, T. H., SEIDEN, P., MARCUSSEN, J.** Cytokinins and leaf development in sweet pepper (*Capsicum*

*annuum* L.): I. Spatial distribution of endogenous cytokinins in relation to leaf growth. *Planta*, 188:70-7, 1992(a).

**ULVSKOV, P., MARCUSSEN, J., SEIDEN, P., OLSEN, C. E.** Immunoaffinity purification using monoclonal antibodies for the isolation of indole auxins from elongation zones of epicotyls of red-light-grown Alaska peas. *Planta*, 188:182-89, 1992(b).

**WEILER, E. W.** Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta*, 143:262-72, 1980(a).

**WEILER, E. W.** Radioimmunoassays for *trans*-zeatin and related cytokinins. *Planta*, 149:155-62.

**WEILER, E. W.** 1984. Immunoassay of plant growth regulators. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:85-95, 1980(b).