

REVISION

La determinación de la senescencia en las plantas

Victorio S. Trippi

RESUMEN

La senescencia es interpretada por algunos autores como un proceso controlado genéticamente; sin embargo, hay evidencias que el ambiente interno y externo también están implicados en dicho control. Así, por ejemplo, el aumento de la relación C/N, que implica una alteración de la materia viva, característica del proceso de senescencia, podría originarse en una inhibición de la actividad nitrato reductasa por altas presiones de oxígeno.

La evolución de los parámetros de senescencia bajo la acción de la presión de oxígeno, evidencia que el proceso se acelera en relación directa con la concentración del gas. Asimismo, en la degradación de clorofilas y proteínas aparecen implicados radicales libres y enzimas. En el caso de las clorofilas, todas las especies tóxicas del oxígeno conocidas (O_2^- , 1O_2 , HO^{\cdot} , H_2O_2) pueden blanquear el pigmento y la misma degradación enzimática se lleva a cabo con la participación de radicales libres.

Por lo que concierne a la proteólisis, se han podido establecer cuatro proteasas en el cloroplasto de avena, entre ellas una endopeptidasa cuya actividad incrementa bajo condiciones oxidantes. Asimismo, pudo constatarse la sensibilidad de algunas proteínas del cloroplasto a la acción de radicales libres.

Pudo establecerse además, que concentraciones de oxígeno superiores al 0,5% tienen marcada influencia sobre el metabolismo energético de las hojas, produciendo degradación de nucleótidos (ATP, ADP y AMP) y disminución de la carga energética. Las evidencias muestran que el contenido de 21% de oxígeno de la atmósfera es una concentración tóxica, que estimula los procesos oxidativos en los tejidos foliares.

Finalmente, pudo observarse que la expansión foliar misma puede constituirse en un factor de senescencia.

Se descarta la existencia de un programa genético determinante del envejecimiento, interpretándose la morfogénesis y la senescencia como el resultado de la progresiva alteración del medio interno hacia condiciones más oxidativas que determinan, finalmente, la senescencia.

Palabras clave: Senescencia; oxidaciones; metabolismo energético; proteólisis; degradación de clorofilas.

Victorio S. Trippi, 1992. Senescence determination in plants. Agriscientia, IX N° 1 : 49-53.

SUMMARY

Senescence is interpreted by some authors to be a genetically controlled process, nevertheless, there are evidences that the internal and external environments are also implied in its control. Thus, for example, the increase in the C/N ratio, an alteration of living matter which is characteristic of senescence, could originate in an inhibition of nitrate reductase by high oxygen pressures.

The evolution of senescence parameters under the action of oxygen pressure, indicates that the process accelerates directly in correlation with the concentration of this gas. Likewise, free radicals and enzymes seems to be involved in the degradation of chlorophylls and proteins. In the case of chlorophylls, all known toxic species of oxygen (O_2^- , 1O_2 , HO^{\cdot} , H_2O_2) can bleach the pigment and enzymatic degradation itself involves the participation of free radicals.

In regards to proteolysis, four proteases have been detected in Avena chloroplasts, among them an endopeptidase, whose activity increases under oxidative conditions. The sensitivity of some chloroplast proteins to the action of free radicals has also been established.

Oxygen concentrations in excess of 0.5% have a marked influence on the energetic metabolism of leaves, producing a degradation of nucleotides (ATP, ADP, AMP) and a decrease in the energy charge. There is evidence that the oxygen concentration in the atmosphere (21%) is toxic, and stimulates oxidative process in leaf tissues.

Finally, it has been observed that leaf expansion itself can constitute a factor of senescence.

The existence of a genetic program determining senescence is disestimated, morphogenesis and senescence are interpreted to be the result of the progressive alteration of the internal environment, leading towards an increase of oxidative conditions which finally determine senescence.

Victorio S. Trippi. Laboratorio de Fisiología Vegetal. F. C. E., F. y N. Univ. Nac. Córdoba. C. C. 395. (5000) Córdoba. Argentina.

INTRODUCCION

La asociación del crecimiento determinado con la senescencia ha llevado a algunos autores a la hipótesis que hay una determinación genética de la senescencia o senescencia programada (Stoddart y Thomas, 1982; Rodriguez *et al.*, 1990). Sin embargo, otra línea de evidencias relaciona el envejecimiento con el ambiente (interno y externo) y minimiza la intervención directa de un control genético.

La distribución de las especies vegetales en la naturaleza con límites precisos por ambientes, evidencia que la capacidad homeostásica se pone en juego. Cuando el ambiente permite un crecimiento indefinido de la planta, la senescencia afecta sólo órganos. En cambio, cuando el crecimiento de la planta es definido afecta todo el organismo (Trippi y Brulfert, 1973 a). En forma asociada también se observan cambios en las potencialidades morfogénicas y en los mecanismos de perpetuación (Trippi y Brulfert, 1973 b)

Por lo enunciado, se puede concebir que, aún cuando las plantas tienen potencialidad para el crecimiento indefinido, el crecimiento definido de las hojas, p.e. resulta de cambios en el ambiente interno. La expresión del genoma de cada célula podría modificarse según la naturaleza, concentración y proporción de las sustancias que forman su entorno. El simple desplazamiento de

moléculas de acuerdo a un gradiente de concentración, podría ser un motor de tales cambios.

Varios hechos apoyan esta idea: 1) que el genoma y su expresión conciernen a cada célula individual; 2) que puede orientarse la morfogénesis *in vitro* mediante el manejo de los niveles de hormonas en el medio, i. e. la relación auxina/citocinina; 3) que el grado de diferenciación condiciona la capacidad de proliferación celular y 4) que las sustancias morfogénicas actúan mediante un traslado, es decir que actúan en un lugar diferente al de su síntesis.

Si la expresión del genoma se resuelve a nivel celular, la morfogénesis y la senescencia tendrían que resultar de la interacción de la célula con el ambiente externo y ambiente interno más que de una determinación genética. Desde este punto de vista, la morfogénesis y la detención del crecimiento pueden verse como una parte del camino hacia la senescencia que se produciría porque el ambiente interno va cambiando o se altera y, finalmente, no permite las funciones vitales.

Alteración en la proporción de los componentes celulares

El crecimiento y la senescencia foliar se acompañan de un aumento de la relación C/N. Esta proporción se modifica por disminución del N orgánico más que por un incremento en la concentración de moléculas carbonadas (Pereyra, 1986) Como

el oxígeno es capaz de competir con los nitratos por el poder reductor, se pensó que la modificación del ambiente interno hacia condiciones más oxidativas podría explicar la disminución en los tenores de N en la célula durante la senescencia. Esto indujo la idea que la alteración de los componentes celulares y de su proporción debía relacionarse con los factores ambientales. Entre éstos, el oxígeno, liberado constantemente durante el proceso fotosintético. Sobre esta base, se decidió estudiar los efectos del oxígeno sobre diferentes aspectos de la fisiología del envejecimiento.

Efectos del oxígeno sobre la reducción de nitratos

La actividad nitrato reductasa disminuye con el aumento de la concentración de oxígeno ambiental en fragmentos de hojas de avena sometidos a diversas situaciones experimentales (Kenis y Trippi, 1986, 1987). Estudios más detallados sobre el mecanismo de acción, mostraron que la concentración de oxígeno no afecta la acumulación de mensajeros, pero sí la cantidad de proteína NR (Kenis y Campbell, 1988). Esto sugiere que el oxígeno afectaría a la enzima a nivel traduccional o postraduccional. La inactivación postraduccional estaría mediada por oxidación de los grupos SH de la enzima, ya que la adición de cisteína (un protector de grupos SH) retarda el efecto (Kenis y Trippi, 1987). La pérdida de actividad NR por procesos oxidativos podría explicar, al menos parcialmente, el aumento de la relación C/N durante el crecimiento y la senescencia foliar.

Efectos del oxígeno sobre parámetros de senescencia

Concentraciones de oxígeno por encima del 0,3% en condiciones de luz aceleran el desarrollo de los parámetros de senescencia, tales como degradación de clorofilas y proteólisis mientras aumentan las oxidaciones celulares (contenido en malondialdehído) y la permeabilidad (medida como conductividad del medio de incubación) (Trippi y De Luca d'Oro, 1985). En oscuridad, el efecto se satura con atmósferas de 21% de Oxígeno no observándose diferencias importantes con respecto a 100%, hecho que evidencia diferencias en el comportamiento de los tejidos en luz y oscuridad.

Estudios más detallados sobre los mecanismos implicados en la degradación de clorofilas, muestran que dicho proceso resulta de la participación de radicales libres generados por reacciones químicas y/o fotogeneradas, así como por la partici-

pación de peroxidasas. Pudo comprobarse una efectiva degradación del pigmento por diferentes especies tóxicas del oxígeno (1O_2 , O_2^- y HO^{\cdot}) así como por todas las isoenzimas de peroxidasas de hojas de avena detectadas por electroforesis, en presencia de fenol y HO^{\cdot} (Del Longo, 1991). Una peroxidasa detectada en tilacoides podría intervenir en el proceso. Los resultados mostrarían que no es necesario un programa genético para la degradación de clorofilas por cuanto el cloroplasto posee el sistema enzimático que intervendría, así como la posibilidad de generar radicales libres por la existencia de un sistema transportador de electrones y por la naturaleza fotosensible del pigmento.

Otras evidencias surgen del estudio de los mecanismos implicados en la proteólisis durante la senescencia. Pudo detectarse la presencia de por lo menos cuatro proteasas en el cloroplasto (Casano *et al.*, 1990). Una de ellas, una endopeptidasa ácida, ubicada en tilacoides incrementa su actividad por oxidaciones de membranas (Casano *et al.*, 1992). Asimismo, pudo comprobarse la inducción de la proteólisis por radicales del oxígeno (HO^{\cdot}) y la posibilidad de contrarrestar su acción por manitol un secuestrador del radical.

Estos hechos ponen de relieve la trascendencia de los procesos oxidativos en la regulación de los parámetros de senescencia y sugieren que el cloroplasto cuenta con la posibilidad de autodegradación sin depender de un programa genético o conjunto de genes cuya activación desencadene el envejecimiento.

Efectos del oxígeno sobre el metabolismo energético

En general, concentraciones de oxígeno por encima del 0,5% en hojas y del 4-10% en pétalos, aceleran la senescencia y el deterioro del metabolismo energético. Dicho deterioro se manifiesta en una progresiva disminución del contenido en nucleótidos en una primera etapa y en la caída de la carga energética cuando los nucleótidos se ubican en valores del 30% del máximo observado (Trippi *et al.*, 1988, 1989).

Quizá, lo más significativo de estos experimentos es la evidencia que la concentración de 21% de oxígeno en la atmósfera es tóxica para los tejidos foliares. Dicha toxicidad puede guardar relación con la expansión y diferenciación, por lo que implica un cambio de relación del oxígeno con el ambiente y constituye un factor no genético.

Es interesante destacar que otras condiciones de estrés como falta de requerimientos nutricio-

nales (Swedes *et al.*, 1975) y falta de agua (Luna and Trippi, 1988) afectan el metabolismo energético de la misma manera que la alta concentración de oxígeno, evidentemente aumentando los procesos oxidativos.

La expansión foliar y las oxidaciones

Mientras algunos parámetros de senescencia como el contenido en clorofilas y en proteínas aumentan durante el crecimiento foliar para luego disminuir, el contenido en hidroperóxidos (malondialdehído) aumenta durante el crecimiento hasta el último período de senescencia.

Como la expansión foliar se acompaña de un aumento en superficie foliar expuesta a fotooxidaciones y de un aumento en la producción de oxígeno por la diferenciación de cloroplastos y el incremento de la fotosíntesis, se podría presumir un aumento de oxidaciones asociado con el crecimiento foliar. El crecimiento podría constituir, por lo tanto, un factor de senescencia.

A fin de probar experimentalmente dicha hipótesis, se utilizaron diversos tratamientos (bajas temperaturas, estrés hídrico, etc) para obtener hojas de la misma edad con diferente grado de expansión. Un tratamiento posterior de 24 hs de luz mostró mayor grado de oxidaciones (MDA/DNA) inducidas por luz en tejidos con mayor superficie foliar/DNA. Esto sugirió que las células de mayor tamaño pueden sufrir más oxidaciones y una evolución más rápida de los parámetros de senescencia (Trippi y Del Longo, en preparación).

Cuando se piensa en la hoja, que posee una estructura que facilita la interacción con los gases de la atmósfera y se la compara con la de los meristemas, se puede pensar que las diferencias de comportamiento en relación a la senescencia puede conectarse con la cantidad de oxidaciones derivadas de sus relaciones con la atmósfera.

CONCLUSIONES

La experiencia acumulada evidencia que los procesos degradativos seniles pueden ser realizados por 1) sistemas enzimáticos, cuya formación depende de la información que posee el genoma, 2) por radicales libres o especies tóxicas del oxígeno que derivan de la actividad celular y con la participación de fotosensibilizadores cuya producción guarda relación con el medio interno y la concentración del oxígeno.

El reconocimiento de la participación de ambas formas de degradación senil (enzimática y no

enzimática) no es compatible con la idea de un determinismo genético de la senescencia. Esta interpretación exigiría la activación de genes codificadores de enzimas degradativas durante la senescencia, no habiéndose encontrado constataciones de esta naturaleza. Tampoco ha podido constatar activación de genes específicos en presencia de ambientes desfavorables los que sin lugar a dudas son inductores de senescencia. La síntesis de enzimas especiales, desencadenadoras de senescencia, parece innecesario, ya que la célula posee normalmente las enzimas para su demolición. Estas enzimas podrían ser activadas en condiciones de estrés pero por mecanismos ajenos a un control genético.

Resumiendo, la participación del genoma en la morfogénesis y la senescencia puede comprenderse por su rol en la formación del ambiente interno. La participación del ambiente exterior, en cambio, por su capacidad modificadora del ambiente interno mediando muchas veces el crecimiento y la morfogénesis (expansión foliar y diferenciación) que facilitan la interacción con la luz y el oxígeno.

BIBLIOGRAFIA

- Casano L., L. Gómez and V. S. Trippi. 1990. Oxygen and light-induced proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 31: 377-382.
- Casano L. and V. S. Trippi. 1992. The effect of oxygen radicals on proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* En prensa.
- Del Longo O. 1991. Contribución al estudio de la degradación de clorofilas en hojas de avena (*Avena sativa* L.) Tesis doctoral U.N.C.
- Kenis J. D. and V. S. Trippi. 1986. Regulation of nitrate reductase in detached oat leaves by light and oxygen. *Physiol. Plant.*, 68: 387-390.
- Kenis J. D. and V. S. Trippi. 1989. Involvement of oxidation, proteolysis and reductant availability in the regulation of in vivo nitrate reductase in attached oat leaves during growth and senescence. *Plant Cell Physiol.*, 28: 1307-1312.
- Kenis, J. D. and W. Campbell. 1989. Oxygen inhibition of nitrate reductase biosynthesis in detached corn leaves via inhibition of total soluble protein synthesis. *Plant Physiol.*, 91: 883-888.
- Luna C. and V. S. Trippi. 1988. Effect of osmotic stress under different pO₂ on energy metabolism and senescence development in oat leaves. Inédito.
- Pereyra S. 1982. Alteración de la proporción de componentes celulares durante el envejecimiento foliar de *Phaseolus vulgaris* L. y su regulación. Tesis Doctoral. U.N.C.

- Rodríguez R., Sánchez Tamés and D. J. Durzán. 1990. Plant aging. Basic and applied approaches. Plenum Press, New York, pp. 448.
- Stoddart, J. L. and H. Thomas. 1982. Leaf senescence. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 14 A*: Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 592-636.
- Swedes J. S., R. J. Sedo and D. E. Alkinson. 1975. Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 250: 6930-6938.
- Trippi V. S. and J. Brulfert. 1973a. Organisation of the morphophysiological unit in *Anagallis arvensis* L. and its relation with the perpetuation mechanism and senescence. *Amer. J. Bot.*, 60: 641-647.
- Trippi V. S. and J. Brulfert. 1973 b. Photoperiodic aging in *Anagallis arvensis* L. clones: its relation to RNA content, rooting capacity and flowering. *Amer. J. Bot.*, 60: 951-955.
- Trippi, V. S. and G. M. De Luca d'Oro. 1985. The senescence process in oat leaves and its regulation by oxygen concentration and light irradiance. *Plant Cell Physiol.*, 26: 1303-1311.
- Trippi V. S., X. Gidrol and A. Pradet. 1989. Effect of oxidative stress caused by oxygen and Hydrogen peroxide on energy metabolism and senescence in oat leaves. *Plant Cell Physiol.*, 30: 157-162.
- Trippi V. S. A. Paulin and A. Pradet. 1988. Effect of O₂ concentration on the senescence and energy metabolism of cut carnation flowers. *Physiol. Plant.*, 73: 374-379.
- Trippi V. S. and O. Del Longo. 1992. Senescence associated changes in leaf growth of *Avena sativa* and growth dependent senescence development. En revisión.