

Figura VI.6: JA y etileno actúan cooperativamente induciendo la expresión de *HAHB4*.

A: Niveles de *HAHB4* en plantas de girasol de tratadas con 200 μ M MetJA (barras negras), 30 μ M ACC (barras blancas) o con ambas hormonas juntas (barras grises). Los niveles de transcritos se expresan en forma relativa a los de plantas tomadas como control (C) **B:** Representación de los cuatro mecanismos posibles que explicarían la acción de estas hormonas sobre la expresión de *HAHB4*. **I:** el JA activa la síntesis de etileno y éste induce la expresión de *HAHB4*. **II:** el etileno activa la síntesis de JA y éste induce la expresión de *HAHB4*. **III:** ambas hormonas son necesarias para activar la expresión de *HAHB4*, ya sea directamente o a través de un intermediario desconocido. **IV:** ambas hormonas inducen la expresión de *HAHB4* de forma independiente.

C: Niveles de expresión de *HAHB4* en hojas de girasol tratadas con 200 μ M MetJA (JA), 30 μ M ACC o con ambas hormonas. Las hojas fueron incubadas por una hora y media con 100 μ M AgNO₃ (inhibidor de la percepción de etileno, barras blancas), 2 mM AIB (ácido α -aminoisobutírico, inhibidor de la biosíntesis de etileno, barras grises oscuras), 1 mM SA (ácido salicílico, inhibidor de JA, barras grises claras), 1 mM ASA (ácido acetil salicílico, inhibidor de JA, barras blancas y negras) o no

tratadas con ningún inhibidor (barras negras) antes de ser tratadas con las hormonas respectivas como se indica. Los niveles de transcritos representados en A y C fueron medidos por RT-PCR cuantitativa y las desviaciones estándar calculadas a partir de al menos tres ensayos independientes hechos por triplicado. Sólo se consideraron significativas las diferencias si el valor estadístico p era inferior a 0,05.

La regulación de *HAHB4* por JA y etileno podría cursar varios mecanismos posibles (figura VI.6B). Dos de estos mecanismos, el I y el II, se descartan rápidamente ya que los niveles de *HAHB4* son superiores cuando las dos hormonas actúan simultáneamente que cuando cada una de ellas lo hace por separado. El modelo I también se descarta adicionalmente porque los datos bibliográficos indican que el JA no puede inducir la síntesis del etileno. Los dos modelos restantes, III (cooperativo) y IV (aditivo), podrían ser coherentes con los resultados experimentales obtenidos (mostrados en la parte A de la figura).

Con el fin de determinar cuál de estos dos modelos encaja mejor con la regulación de *HAHB4*, decidimos inhibir la acción de cada una de estas hormonas y observar la posible influencia de la acción de cada una sobre la otra. En el ensayo se utilizaron los siguientes compuestos químicos: ácido α -aminoisobutírico (AIB, inhibidor específico de la enzima ACC-oxidasa y por ende de la síntesis de etileno), AgNO_3 (inhibidor de la percepción de etileno), ácido acetil salicílico y ácido salicílico (ASA y SA inhibidores de la biosíntesis y percepción de JA). Suponiendo que la acción de alguna de estas hormonas fuera imprescindible para inducir la expresión de *HAHB4* (modelos I, II y III), el tratamiento con el respectivo inhibidor debería suprimir la activación del gen aún en presencia de la otra hormona. De no ser así, la inducción de la expresión de *HAHB4* por MeJA o etileno debería permanecer inalterable aún si se bloquea la acción de la otra hormona (modelo IV). Los resultados obtenidos que se muestran en la Figura VI.6C indicaron que tanto JA como etileno pueden inducir la expresión de *HAHB4* independientemente de la supresión de la acción de la otra hormona. El tratamiento con AIB o AgNO_3 evita que el ACC (precursor del etileno) promueva la expresión de *HAHB4* pero no afecta la inducibilidad de la expresión del gen por JA. El mismo panorama se observa si usamos ASA y SA bloqueando la inducción mediada por JA, pero no la de etileno. El conjunto de resultados nos permitió concluir que ambas hormonas actúan de forma independiente regulando positivamente la expresión de *HAHB4* y que sus efectos son aditivos. Este tipo de regulación encaja perfectamente en el modelo IV (Figura VI.6C).

VI.2.3 – En hojas de girasol HAHB4 induce la expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa.

El hecho de establecer que la expresión de *HAHB4* se activa notoriamente cuando la planta sufre cualquier tipo de lesión nos planteó una nueva serie de preguntas: ¿Qué papel estaría jugando esta inducción? ¿Cuál sería la función de *HAHB4* en los procesos de defensa? Para lograr contestar estas preguntas recurrimos nuevamente a la información obtenida en el ensayo de microarreglos. Esta información nos sirvió de guía para poder identificar cuáles genes relacionados con la respuesta a heridas podrían estar regulados por *HAHB4*. Una vez identificados, podríamos analizar el comportamiento de estos genes en girasol y establecer una relación con *HAHB4*. La información disponible sobre el genoma y las secuencias expresadas en girasol sigue siendo muy limitada a la fecha. A pesar de eso, logramos encontrar en las bases de datos algunos genes que presentan alta homología con los identificados en el microarreglo, con funciones relacionadas a los mecanismos de defensa frente al ataque de insectos. Los niveles de los transcritos de estos genes fueron medidos en hojas de girasol en condiciones estándar y también cuando la expresión de *HAHB4* se indujo o se reprimió transformando las plantas en forma transitoria con las construcciones *35S:HAHB4* y *H4 RNAi (H4i)*, que generaron la sobreexpresión o el silenciamiento respectivamente. En el mismo experimento se usaron como controles, hojas transformadas con el vector de ARNi vacío (EV) o con *35S:GUS*. A fin de poder apreciar los efectos de la interferencia sobre la expresión de *HAHB4* y teniendo en cuenta que los niveles de este gen en plantas crecidas en condiciones estándar son extremadamente bajos, las hojas transformadas se incubaron en condiciones estándar o con 200 μ M de MetJA con el objeto de inducir su expresión.

Como se puede observar en la figura VI.7 la expresión de los genes *VSP*, *LOX2*, *LOX3*, *TII*, *TI2*, *DEF-L*, *SPI1*, *AOS*, *HPL1* y *NAC3* (todos ellos ligados a la respuesta a heridas) fue inducida concomitantemente con la de *HAHB4*. Por su lado en las plantas privadas de expresar *HAHB4* (*H4 ARNi*) los niveles de expresión de estos mismos genes, alcanzados después del tratamiento con MetJa, fueron inferiores o totalmente nulos comparados con los de las plantas utilizadas como controles. Según los datos de la literatura, todos estos genes se activan en presencia de JA (Sasaki y col., 2001; Jung y col., 2007). Por otro lado, el análisis *in silico* reveló que nueve de los diez genes analizados presentan, al menos una vez, en las primeras 1000 pb corriente arriba de los

sitios de inicio de la transcripción, la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG, secuencia identificada *in vitro* como unida específicamente por HAHB4. El conjunto de datos y resultados sugiere que HAHB4 actuaría aguas arriba de esos genes en la respuesta de defensa frente a heridas.

La eficiencia alcanzada en la transformación transitoria fue analizada midiendo los niveles del transcripto correspondiente al gen de resistencia a kanamicina, el cual está incluido en los vectores utilizados. La expresión del gen *OPR2*, cuya expresión no aparece regulada por *HAHB4* en el microarreglo, fue utilizada como control negativo para descartar los posibles artefactos inherentes a la técnica.

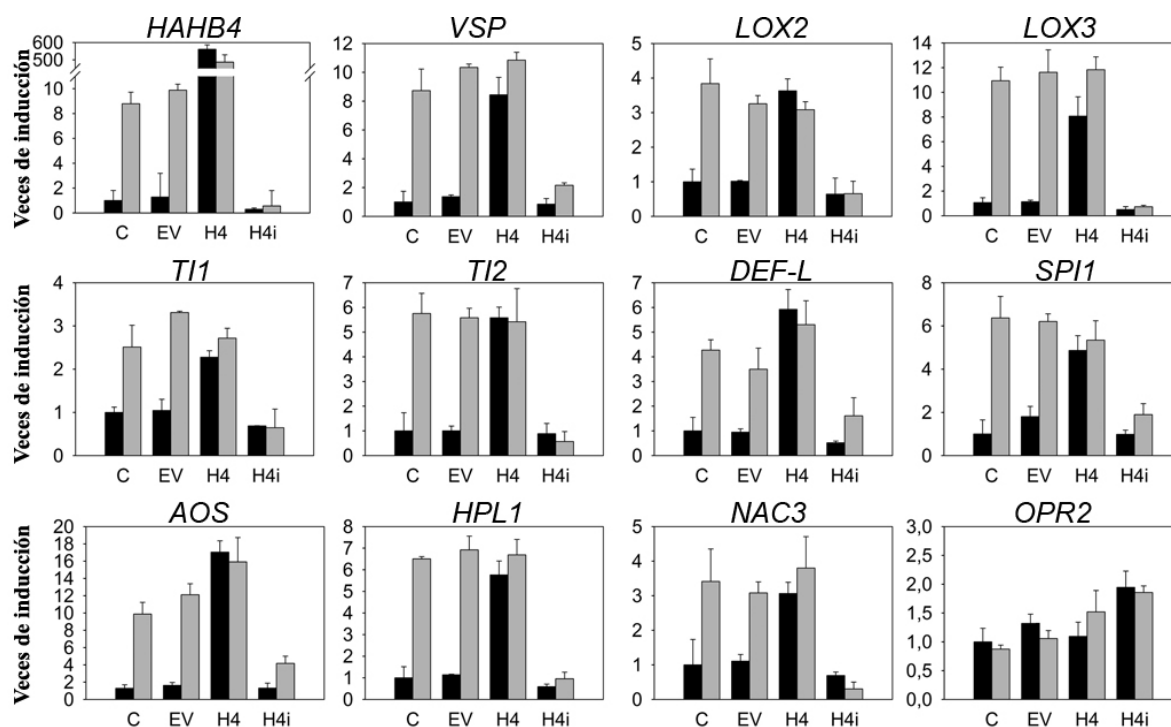


Figura VI.7: Los niveles de transcriptos de genes involucrados en la respuesta a heridas aumentan concomitantemente con los de *HAHB4*. La expresión de genes relacionados a la respuesta de defensa fue analizada en hojas de girasol transformadas transitoriamente con solución de 100 mM MgCl₂ (C), con el vector de interferencia vacío (EV), con 35S:*HAHB4* (H4) o con una construcción de ARNi que silencia la expresión endógena de *HAHB4* (H4i). Antes de extraer los ARNs y cuantificarlos por RT-PCR cuantitativa, las muestras fueron tratadas con 200 μM MetJA (barras grises) o en condiciones control (barras negras). Los ensayos fueron repetidos al menos tres veces con triplicados internos. Los niveles del transcripto de *Actina 2* y *8* de girasol fueron usados para estandarizar las muestras. Las diferencias fueron consideradas significativas si el valor p estadístico era inferior o igual a 0,01. VSP: proteína de almacenamiento vegetativo; LOX2 y 3: lipoxigenasas 2 y 3; TI1 y 2: inhibidores de tripsina 1 y 2; DEF-L: proteína semejante a defensina; SPI1: inhibidor de serin-proteasas 1; AOS: alleno-oxidasa-

sintetasa; HPL1: hidropoxido-liasa 1; NAC3: factor de transcripción tipo NAC 3; OPR2: 12-oxofitodienoato-reductasa.

La eficiencia de la construcción *H4-ARNi* para generar silenciamiento fue evaluada de dos maneras. Se midieron los niveles de expresión de *HAHB4* en hojas transformadas con esta construcción y el vector vacío después de tratarlas en distintas condiciones (control, 100 μ M ABA, 100 mM NaCl₂, 30 μ M ACC o sometidas a estrés hídrico). En la figura VI.8A se puede observar cómo la inducción de *HAHB4* producida por cualquiera de estos factores desapareció en presencia del casete de interferencia. En segundo lugar, se analizó la identidad de los transcritos de *HAHB4* por RT-PCR a tiempo final en las distintas hojas transformadas. Para realizar este análisis se usaron dos pares de oligonucleótidos distintos (figura VI.8B), el primero amplifica 546 pb correspondientes a la región codificante de *HAHB4* mientras que el segundo par (utilizado previamente para el clonado del casete de interferencia) amplifica 300 pb que comprenden la región 3' no codificante y parte del ADNc. Ambos pares de oligonucleótidos se utilizaron para detectar la expresión de *HAHB4* en hojas de plantas transformadas (con el vector vacío, con *35S:HAHB4* y con el casete ARNi) y tratadas con 200 μ M MetJa + 30 μ M ACC con el objeto de inducir la expresión de *HAHB4*. En la figura VI.8C se puede observar la fotografía de un gel de agarosa en el que se visualiza la ausencia de la banda específica correspondiente al ADNc completo de *HAHB4* en dos hojas transformadas con el casete de interferencia (líneas 10 y 11). En los demás casos aparece la banda de 564 pb correspondiente a este ADNc. La banda de 300pb que aparece en las plantas transformadas con el ARNi corresponde a la expresión del fragmento codificado en el *casete* de interferencia amplificada con los oligonucleótidos específicos

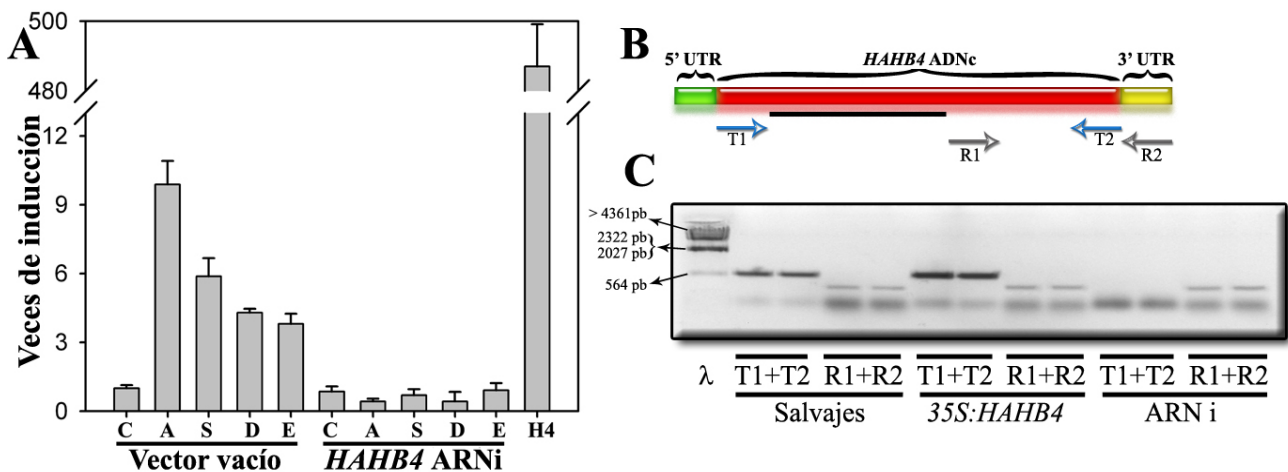


Figura VI.8: El silenciamiento de *HAHB4* resultó eficiente. **A:** Niveles de expresión de *HAHB4* en hojas de girasol transformadas transitoriamente con el vector pART27 vacío o con el casete para silenciar *HAHB4* clonado en el mismo vector. Plantas tratadas con 100 μ M ABA (A), 100 mM NaCl (S), 30 μ M ACC (E), o sometidas a deshidratación por una hora y media (D) o sin tratar (C). Como control positivo se utilizaron hojas transformadas con la construcción *35S:HAHB4* (H4). Los análisis estadísticos fueron realizados a partir de tres ensayos independientes. **B:** Representación grafica de la estructura del ARNm de *HAHB4*. La región roja representa la secuencia codificante, la verde y la amarilla (5'UTR y 3'UTR) representan las regiones 5' y 3' no codificantes respectivamente. Las flechas azules y grises representan la ubicación de los oligonucleótidos usados para el ensayo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la sección de materiales y métodos (III.15). La línea negra debajo de la región codificante indica la ubicación estimativa de la secuencia que codifica el homeodominio y el cierre de leucinas. **C:** Productos de la amplificación por PCR de los ADNc provenientes de hojas de girasol salvajes, transformadas con *35S:HAHB4* o con el casete de silenciamiento, incubadas durante una hora con 200 μ M MetJA + 30 μ M ACC. Se utilizaron los ARNs de dos hojas transformadas por cada tratamiento como molde de amplificación. Primera calle marcador de peso molecular: ADN del fago lambda cortado *HindIII* (λ).

VI.2.4 – HAHB4 aumenta la concentración de los inhibidores de tripsina y enzimas involucradas en la biosíntesis de JA y GLV.

Los resultados obtenidos hasta este momento no eran suficientes para comprender si el aumento en los niveles de transcriptos, generado por la presencia de *HAHB4* se traducía en un aumento de las concentraciones y/o actividades de las proteínas codificadas. Nos propusimos entonces, tratar de dilucidar esta cuestión, para lo cual medimos la actividad de las enzimas lipoxigenasas (LOX) e hidroperóxido-liasas (HPL) en plantas de girasol en condiciones estándar (C), transformadas con un vector vacío (EV), con *35S:HAHB4* (H4) o con *H4-ARNi* (H4i). Las actividades específicas de estas enzimas se encontraron incrementadas en las plantas que sobreexpresan el factor de transcripción y cuando se lo silenció éstas permanecieron en valores bajos (Figura VI.9). Fue la disminución en la actividad de estas enzimas en las plantas transformadas con el casete silenciado y tratadas con MetJA, un inductor natural de estas actividades, fue fácilmente apreciable. Estos resultados fueron confirmados en plantas de *Arabidopsis* transformadas de forma estable con *35S:HAHB4* respaldando los hallazgos hechos en girasol.

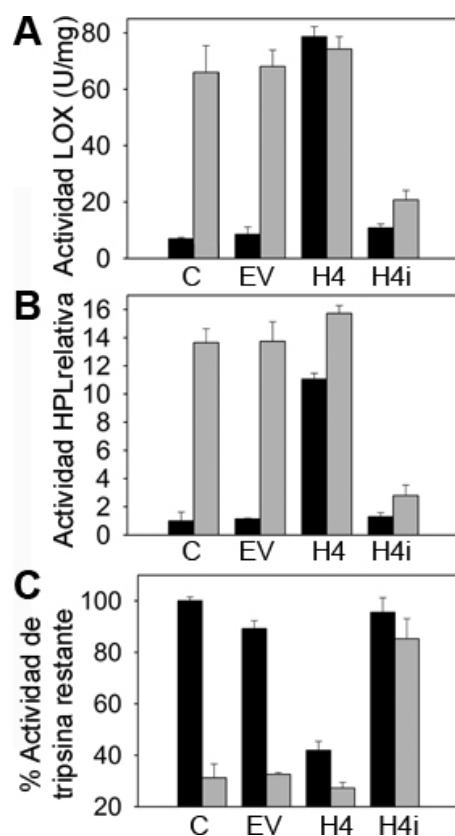


Figura VI.9: HAHB4 produce un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la defensa contra insectos. **A:** Actividad total de lipoxigenasas en plantas transformadas con el vector pART27 vacío (EV), con *35S:HAHB4* (H4), con la construcción que permite silenciar la expresión de *HAHB4* (H4i) o con solución de $MgCl_2$ en condiciones estándar (barras negras) y tratadas con $200 \mu M$ MetJA (barras grises). **B:** Actividad de hidroperoxi-liasas medida en las mismas plantas y expresada en forma relativa a la actividad en las plantas transformadas con $MgCl_2$, utilizadas como controles. **C:** Actividad remanente de tripsina tras incubar la enzima de origen comercial con extractos proteicos provenientes de las plantas transformadas, antes mencionadas. Para realizar los análisis estadísticos se utilizaron los datos obtenidos de al menos cinco repeticiones independientes de cada experimento, hechas con tres replicas internas del ensayo. Se consideraron relevantes las diferencias cuyo valor p fue inferior a 0,05.

La actividad de los inhibidores de tripsina fue cuantificada en extractos de proteínas obtenidas de las plantas transformadas en forma transitoria como se describió anteriormente. Estos extractos se incubaron en presencia de tripsina de origen comercial y se midió la actividad proteolítica remanente después de la incubación. La figura VI.9 muestra que la actividad inhibitoria se encontró marcadamente incrementada en aquellas hojas que sobreexpresan el factor de transcripción alcanzando niveles cercanos a los observados en plantas utilizadas como controles e incubadas con MetJA.

El conjunto de resultados indica que la inducción transcripcional mediada por *HAHB4* se ve reflejada en cambios significativos de algunas actividades enzimáticas relacionadas con la respuesta al ataque por insectos o heridas. Además, la activación de HPL indica que el este factor de transcripción no sólo estaría activando los mecanismos directos de defensa (mediados por inhibidores de tripsina y JA) sino también los indirectos (mediados por GLVs).

VI.2.5 – HAHB4 activa los mecanismos de defensa contra insectos en plantas de Arabidopsis y maíz.

Los resultados descriptos hasta este punto del trabajo indicaban que *HAHB4*, cuya expresión es fuertemente inducida por JA y etileno en forma aditiva, participa activamente de los mecanismos de defensa frente al ataque de insectos en girasol a través del incremento de la actividad proteolítica y enzimas implicadas en la biosíntesis de GLVs. La mayor parte de las evidencias experimentales surgieron de ensayos de transformación transitoria de hojas de girasol y pudieron ser corroboradas en el sistema estable de la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, indicando la conservación de estos mecanismos entre ambas especies. A partir de este punto, pareció muy probable que *HAHB4* pudiera convertirse en una herramienta biotecnológica a ser utilizada para mejorar los mecanismos de defensa contra el ataque de insectos. Con el fin de evaluar esta hipótesis utilizamos plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (maíz) transformadas en forma estable. En ambos casos la construcción utilizada fue la que permite la expresión constitutiva de este gen. Para analizar los efectos del transgén en el comportamiento de estas plantas frente al ataque de insectos, las plantas de *Arabidopsis* se enfrentaron a larvas del díptero *Bradysia impatiens* y las de maíz a orugas de *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda*. Estas especies de insectos fueron elegidas por ser plagas naturales de estas plantas. Los controles fueron realizados usando plantas transformadas con vectores vacíos. En estos ensayos se evaluaron varios parámetros. En la figura VI.10A y en la primer columna de la tabla VI.1 se presentan los datos obtenidos de ensayos en los que el parámetro cuantificado fue la actividad predatoria de las larvas. Tanto en plantas de *Arabidopsis* como de maíz, la expresión de *HAHB4* produjo una reducción marcada en la tasa de alimentación de los insectos. Cuando las larvas fueron alimentadas únicamente con plantas *35S:HAHB4* o cuando lo fueron con una mezcla de genotipos, el resultado fue coherente. Cuando existió la opción, las larvas comieron casi exclusivamente hojas de las plantas salvajes. En

concordancia, las larvas de *Bradysia impatiens* alimentadas únicamente con plantas que expresan *HAHB4* presentaron una ganancia de peso diaria notoriamente inferior a la observada en los ejemplares alimentados con plantas salvajes (Figura VI.10D). Esta diferencia en la ganancia de peso repercutió notoriamente en la vitalidad y desarrollo de estos herbívoros. La entrada en estado de pupa se retrasó y el porcentaje de individuos que lo alcanzó lo hizo con un peso mucho menor que sus compañeros alimentados con plantas transformadas con el vector vacío (Tabla VI.1 segunda columna).

Como era de esperar, la tasa de supervivencia de los insectos estuvo íntimamente relacionada con los parámetros medidos, siendo significativamente inferior para los insectos alimentados con plantas del genotipo *HAHB4* (Tabla VI.10 última columna).

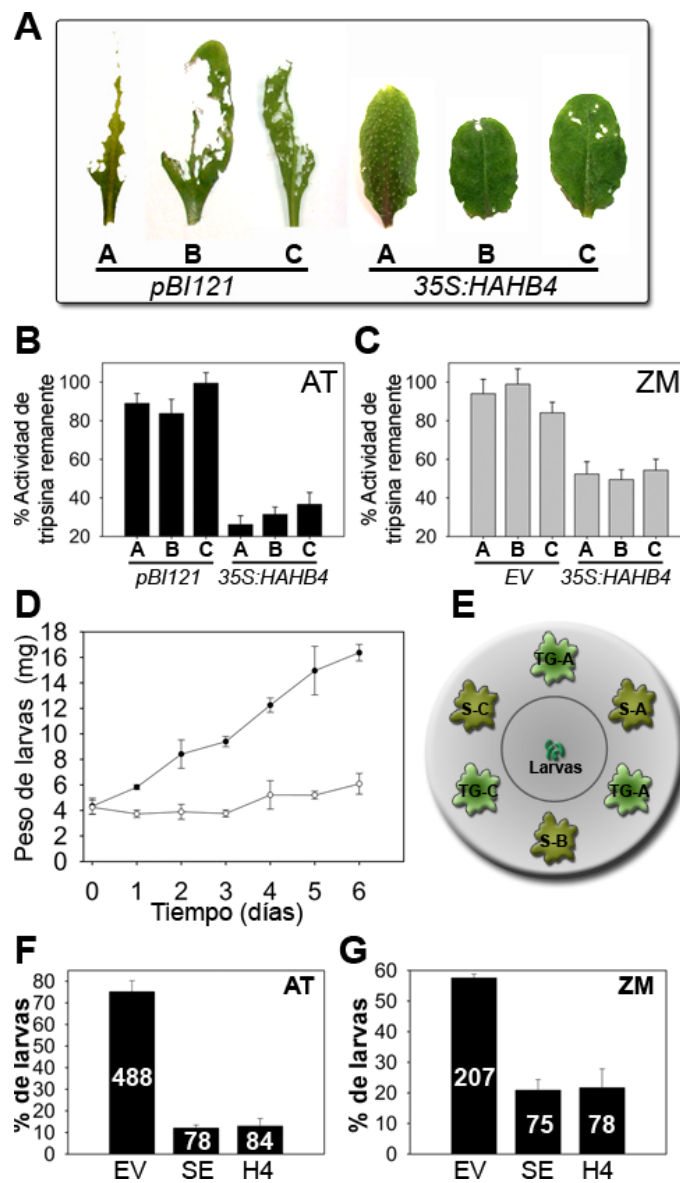


Figura VI.10: *HAHB4* activa los mecanismos de defensa anti-insectos en plantas transgénicas de maíz y Arabidopsis. **A:** Plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan de forma constitutiva el gen *HAHB4* (*35S:HAHB4*, panel derecho, tres líneas

independientes A, B y C) y transformadas con *35S:GUS* (pBI121, panel izquierdo, tres líneas independientes A, B y C) sometidas al ataque de larvas de *Bradysia impatiens*. Las fotografías fueron tomadas un día después de iniciada la alimentación. **B** y **C**: Actividad residual de tripsina comercial incubada con extractos proteicos obtenidos de las plantas. **AT**: Arabidopsis; **ZM**: maíz; **EV**: plantas transformadas con el vector de transformación de maíz, vacío. **D**: Evolución del peso de larvas cuando se alimentaron con plantas que expresan constitutivamente el gen *HAHB4* (○) o con pBI121 (●). **E**: Representación esquemática del diseño de los ensayos de elección realizados en placas. **S**: plantas transformadas con un vector vacío; **TG**: plantas transformadas con *35S:HAHB4*; **A**, **B** y **C** corresponden a tres líneas de plantas transgénicas independientes para cada genotipo. **F** y **G**: Respuesta de las larvas a los compuestos volátiles liberados por las plantas transgénicas de **AT** o **ZM**. Las barras representan el porcentaje de larvas que eligen una dada fuente olfativa: plantas transformadas con vectores vacíos (**EV**), con *35S:HAHB4* (**H4**). Las larvas que no hacen ninguna elección se simbolizan con **SE**. El número dentro de las barras representa la suma total de individuos que eligieron una fuente olfativa en todos los ensayos realizados.

Debido a la gran variabilidad biológica implícita en este tipo de ensayos *in vivo*, cada experimento fue repetido al menos diez veces y los datos fueron usados para calcular el valor estadístico. Todas las diferencias presentan valor $p < 0,05$.

Los estudios hechos por otros autores, en los cuales la expresión de inhibidores de proteasas se indujo por otras vías, mostraron resultados similares a los obtenidos con las plantas que expresan constitutivamente *HAHB4* (Johnson y col., 1989; Zavala y col., 2004). Con el fin de corroborar si los parámetros fisiológicos medidos en los insectos estaban relacionados con el aumento de inhibidores de proteasas en estas plantas, la actividad de estos inhibidores se midió en los distintos genotipos transgénicos tanto de Arabidopsis como de maíz. El resultado, muy similar al observado con plantas de girasol, no nos sorprendió. Los extractos de proteínas de las plantas *35S:HAHB4* presentaron una mayor concentración de inhibidores de tripsina que sus controles, confirmando la idea de que la reducción del desarrollo y supervivencia de las larvas fue una consecuencia, al menos en parte, de la incapacidad de los insectos de digerir estas plantas (Figura VI.10B y C). Una observación interesante que pudimos hacer en estos ensayos, fue que además de aumentar la mortalidad de las larvas, reduciéndose de esta manera la población de insectos, la expresión de *HAHB4* desalentó la subsiguiente alimentación de los insectos, evitando de esta manera, la generación de daños extensivos en la planta.

Líneas AT	Área de hoja comida por día/6 larvas (mm ²)	Tiempo transcurrido desde larva a adulto (días)	Tasa de supervivencia (%)
pBI121 A	83,3 ± 8,7	15 ± 2	94 ± 5
pBI121 B	95,1 ± 7,3	14 ± 3	96 ± 4
pBI121 C	92,9 ± 6,8	15 ± 2	98 ± 2
35S:HAHB4 A	3,5 ± 1,6	23 ± 2	26 ± 5
35S:HAHB4 B	4,7 ± 2,1	21 ± 1	37 ± 7
35S:HAHB4 C	5,6 ± 2,8	21 ± 3	41 ± 3

Líneas ZM	Área de hoja comida por día/6 larvas (mm ²)	Tasa de supervivencia (%)
Vector vacío A	186,5 ± 9,2	95 ± 2
Vector vacío B	189,8 ± 11,4	85 ± 4
Vector vacío C	167,9 ± 14,7	90 ± 3
35S:HAHB4 A	61,1 ± 7,2	10 ± 5
35S:HAHB4 B	52,0 ± 5,6	35 ± 2
35S:HAHB4 C	39,1 ± 8,7	30 ± 3

Tabla VI.1: Evaluación de efectos de la expresión constitutiva de *HAHB4* en plantas de Arabidopsis (AT) y maíz (ZM). Los valores obtenidos están indicados con su correspondiente desviación estándar.

Los ensayos de elección olfatoria en los que los insectos son confrontados con distintos genotipos (que eventualmente emiten distintos olores) si bien no permiten cuantificar ni identificar los compuestos responsables de estos olores, sí presentan un panorama biológico interesante sobre los efectos que se producen sobre los insectos *in vivo* (Kappers y col., 2005; Schnee y col., 2006; Shiojiri y col., 2006). Como habíamos logrado establecer que *HAHB4* es capaz de inducir la expresión de HPL en plantas de girasol y en consecuencia, aumentar la acumulación de compuestos volátiles sintetizados por esta enzima, decidimos ensayar si este efecto también se producía en las plantas transgénicas de Arabidopsis y de maíz. Los ensayos fueron realizados usando tubos de elección o placas cerradas (figura VI.10E). Las plantas transgénicas de Arabidopsis (Ler-0) y maíz de los genotipos 35S:*HAHB4* y salvaje se intercalaron en los dispositivos. En el medio del tubo o placa se colocaron las larvas y se evaluó constantemente su comportamiento. Los resultados obtenidos (Figura VI.10F y G) mostraron una clara tendencia de éstas a evitar la alimentación e incluso a dirigirse hacia las plantas transgénicas de expresión constitutiva, siendo que nunca antes habían

sido alimentadas con ninguno de estos genotipos. Estos ensayos olfativos nos indicaron que además de la respuesta directa, las plantas transgénicas disparan una respuesta indirecta repeliendo a los probables atacantes.

VI.2.6 – El mecanismo de defensa desatado por HAHB4 está conservado entre especies.

Habiendo podido establecer los mecanismos moleculares de defensa tanto directos como indirectos, desatados por *HAHB4* en girasol, nos planteamos analizar si los mismos eran responsables del comportamiento frente a insectos observado en plantas de maíz y de *Arabidopsis thaliana*. Se midieron los niveles de expresión de algunos de los genes involucrados en estas vías de respuesta en las plantas transgénicas. Se seleccionaron genes representativos, homólogos a los estudiados en girasol (*LOX*, *AOS* y *VSP* en AT y *LOX*, *AOS* y *HPL* en ZM) y se cuantificaron en tres líneas transgénicas homocigotas independientes tanto para *Arabidopsis* como para maíz (Figura VI.7). Los resultados graficados en la figura VI.11 indicaron manifiestamente que la expresión de estos genes está marcadamente incrementada en las plantas que expresan constitutivamente el factor de transcripción, confirmando de esta manera que *HAHB4* actúa en las mismas vías moleculares en las tres especies estudiadas.

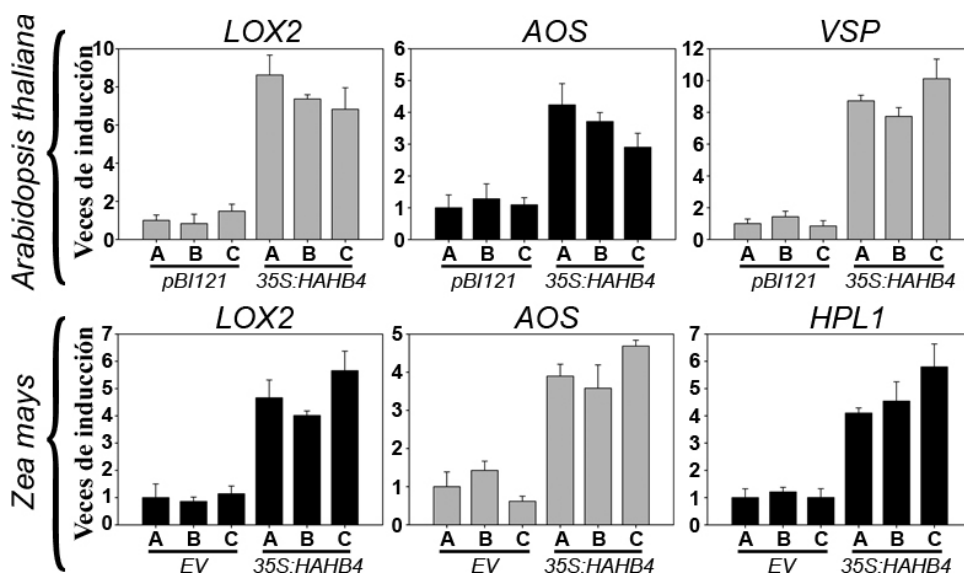


Figura VI.11: Niveles de expresión de algunos genes involucrados en las vías de respuesta a heridas e insectos. A, B y C representan las tres líneas transgénicas independientes usadas para cada ensayo. pBI121 y EV indican los niveles de expresión de estos genes en plantas transformadas en forma estable con los vectores vacíos. VSP: proteína de almacenamiento vegetativo; LOX2 lipoxigenasa 2; AOS: alleno-oxidasa-

sintasa; HPL1: hidroperoxido-liasa 1. Los ensayos fueron repetidos al menos tres veces y se realizaron análisis estadísticos para confirmar los resultados.

VI.2 – Discusión.

Las vías de señalización involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de insectos son verdaderamente complejas y altamente específicas. Es un concepto aceptado el que postula que existe un grupo de factores de transcripción que orquesta esta respuesta. Sin embargo, muy pocos han sido caracterizados e relacionados inequívocamente a estos procesos (Denekamp y Smeekens, 2003; Li y col., 2004a; Miao y Zentgraf, 2007; Paschold y col., 2007). En este trabajo de Tesis hemos presentado evidencias indicando que un factor de transcripción de tipo HD-Zip I de girasol participa activamente en los mecanismos de defensa que esta planta usa para lidiar contra el ataque de insectos y hasta donde sabemos hoy en día, esta es la primera vez en que a un factor de transcripción de girasol se le adjudica una función en este proceso. Esta observación se hace extensiva al resto de las proteínas de tipo HD-Zip I que hasta ahora habían sido relacionadas con la respuesta a situaciones de estrés abiótico, pero no biótico.

Cuando la planta sufre una lesión de cualquier tipo, se disparan mecanismos de defensa que ocasionan un estallido en la acumulación de etileno y de jasmonatos. Estas hormonas activan varias vías de respuesta tanto local como sistémicamente. La mayoría de los cambios ocurren rápidamente, en una ventana temporal que va desde unos pocos minutos hasta unas pocas horas después de ocurrida la lesión. La respuesta suele ser mucho más enérgica si la causa de la herida es el proceso de masticación de un insecto herbívoro, ya que la planta es capaz de reconocer ciertos compuestos presentes en las secreciones orales de los insectos (Alborn y col., 1997; McCloud y Baldwin, 1997; Kahl y col., 2000; von Dahl y col., 2007). Los resultados presentados indicaron que la expresión de *HAHB4* se induce rápidamente cuando las plantas de girasol sufren una lesión y que esta inducción alcanza niveles mayores si la causa de la herida es el ataque de un insecto. Además, esta inducción de *HAHB4* está estrechamente ligada al aumento de JA producido por la lesión.

Las plantas son organismos incapaces de utilizar el movimiento como mecanismo de protección cuando sufren una lesión. Tampoco son capaces de movilizar células especializadas en defensa y curación hacia el sitio de la herida como lo hacen los mamíferos. Sin embargo, ellas han evolucionado y adquirido la capacidad de hacer que

cada célula del organismo active su propia defensa y más importante aún, que cualquier célula pueda disparar una respuesta generalizada para prevenir mayores daños. Esta respuesta depende principalmente de la movilización sistémica de una señal apropiada que active la transcripción a distancia de genes específicos. Se ha demostrado que en la respuesta a heridas, sobre todo a las causadas por agentes bióticos, la sistemina (presente exclusivamente en solanáceas) y el ácido jasmónico actúan como mensajeros móviles y son los responsables de iniciar la respuesta sistémica (Li y col., 2002; Schilmiller y Howe 2005).

Teniendo en cuenta que el JA puede distribuirse en toda la planta como respuesta a una lesión localizada y que la expresión de *HAHB4* se induce significativamente por esta hormona, no es sorprendente encontrar los transcritos correspondientes a este gen distribuidos ampliamente después de producida una herida.

Las plantas sufren los efectos nocivos de distintos factores bióticos y abióticos y se defienden activando y reprimiendo diferentes vías de transducción de señales que involucran principalmente tres hormonas: JA, etileno y ácido salicílico. Para que esta respuesta sea exitosa es necesario que se produzca un balance estrecho y equilibrado entre estas hormonas. Es frecuente que el JA y el etileno actúen en forma sinérgica activando la respuesta de defensa contra insectos y a la vez reprimiendo la defensa contra patógenos. Esta última es activada normalmente por el ácido salicílico (Dong, 1998; Reymond y Farmer, 1998; Maleck y Dietrich, 1999; Pieterse y van Loon, 1999; Paul y col., 2000). Algunos ejemplos de genes regulados en forma sinérgica por el etileno y el JA son los que codifican inhibidores de proteasas, defensinas y algunas proteínas de respuesta a patógenos (O'Donnell y col., 1996; Koiwa y col., 1997, Penninckx y col., 1998; Thomma y col., 1998). En otros casos, la acción de estas dos hormonas en la regulación de la expresión génica tiene un comportamiento antagonista (Zhu-Salzman y col., 1998; Rojo y col., 1999; Kahl y col., 2000; Lorenzo y col., 2003). Un excelente ejemplo de esto, y de cómo los insectos pueden utilizarlo en su provecho, es el efecto producido por las orugas de la especie *Manduca sexta* en plantas de tabaco al alimentarse de ellas. Cuando el insecto ataca, ciertos componentes en sus secreciones orales inducen una fuerte producción de etileno en la planta. La acumulación de etileno, que se mantiene elevada por un largo tiempo, reprime la síntesis de nicotina mediada por JA. Esta alteración en la producción de nicotina genera un ambiente menos tóxico favoreciendo el desarrollo del insecto. En compensación a este fenómeno la planta

exacerba sus defensas indirectas aumentando la cantidad de compuestos volátiles emitidos (Winz y Baldwin, 2001).

En nuestro laboratorio pudimos establecer que la expresión de *HAHB4* responde a un mecanismo aditivo de regulación por etileno y JA. En este sentido se determinó que si bien cada una de estas hormonas es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción individualmente, el efecto se ve potenciado si ambas actúan en simultáneo. La regulación de *HAHB4* por etileno y JA podría ser explicada por cuatro modelos (Figura VI.6B). Los modelos I y II sugieren que la acumulación de una de estas dos hormonas, producida después de que la planta sufre una lesión es la responsable de la producción de la otra y que esta segunda, a su vez, induce la expresión del factor de transcripción. El modelo III postula una inducción sinérgica de *HAHB4* por la acción conjunta de ambas hormonas directamente sobre la expresión del gen o indirectamente a través de un intermediario no identificado. El modelo IV propone que ambas hormonas actúan independientemente y en forma aditiva en la inducción de este gen. Los resultados experimentales presentaron descartaron los primeros tres modelos. Finalmente, el modelo IV es el único que encajó con todos los resultados observados y éste postula que ambas hormonas actúan separadamente pero en forma aditiva para inducir la expresión de *HAHB4*.

Los resultados discutidos hasta este momento permiten concluir que *HAHB4* está, de algún modo, involucrado en la respuesta generada por la planta para defenderse del ataque de insectos. Sin embargo, su función en estos procesos no estaba muy definida. Se utilizaron entonces, varias aproximaciones experimentales con el objetivo de dilucidar el papel de este factor de transcripción en los mecanismos de defensa. Se investigaron los mecanismos moleculares involucrados cuantificando las actividades transcripcionales de varios genes relacionados con la defensa: *LOX2*, *LOX3* y *AOS* (codifican enzimas cruciales en la biosíntesis de JA); *VSP* (codifica una proteína que se acumula masivamente tras cualquier tipo de daño y es considerada un marcador de esta respuesta); *NAC3* (un factor de transcripción de la familia NAC que es regulado por JA y heridas); genes que codifican inhibidores de proteasas como *TII*, *TI2*, *DEF-L* and *SPII* (considerados como los principales protagonistas de los mecanismos de defensa directa) y *HPLI* (codifica la enzima principal en la biosíntesis de GLVs). Todos estos genes mostraron niveles de transcritos más altos en hojas de girasol que sobre-expresan transitoriamente el gen *HAHB4* que en hojas sin transformar. En concordancia, el silenciamiento de la expresión de *HAHB4* produjo una reducción parcial o completa

de la inducción de estos mismos genes cuando las plantas se trataron con MetJA, indicando que *HAHB4* actúa aguas arriba. Una evidencia adicional que respalda esta aseveración es el hecho de que estos genes presentan en su región promotora la secuencia unida *in vitro* por *HAHB4*, hecho que los señala como posibles blancos directos de este factor de transcripción. Los incrementos en los niveles de estos transcritos se correlacionaron perfectamente con la actividad enzimática de las proteínas codificadas por algunos de ellos. Estos son los casos de las lipoxigenasas (LOX), hidroperóxido liasas (HPL) e inhibidores de tripsina (TI). Cada uno de ellos juega un papel crucial en la síntesis de JA (LOX), de GLVs (HPL) y en la defensa directa contra insectos (TI). Estos resultados indicaron que no sólo se produce una inducción de la expresión génica relacionada con la defensa sino que *HAHB4* produce finalmente un incremento en la actividad de las proteínas codificadas, lo que conduce a fomentar la producción de JA, GLV y TI cuando la planta es atacada.

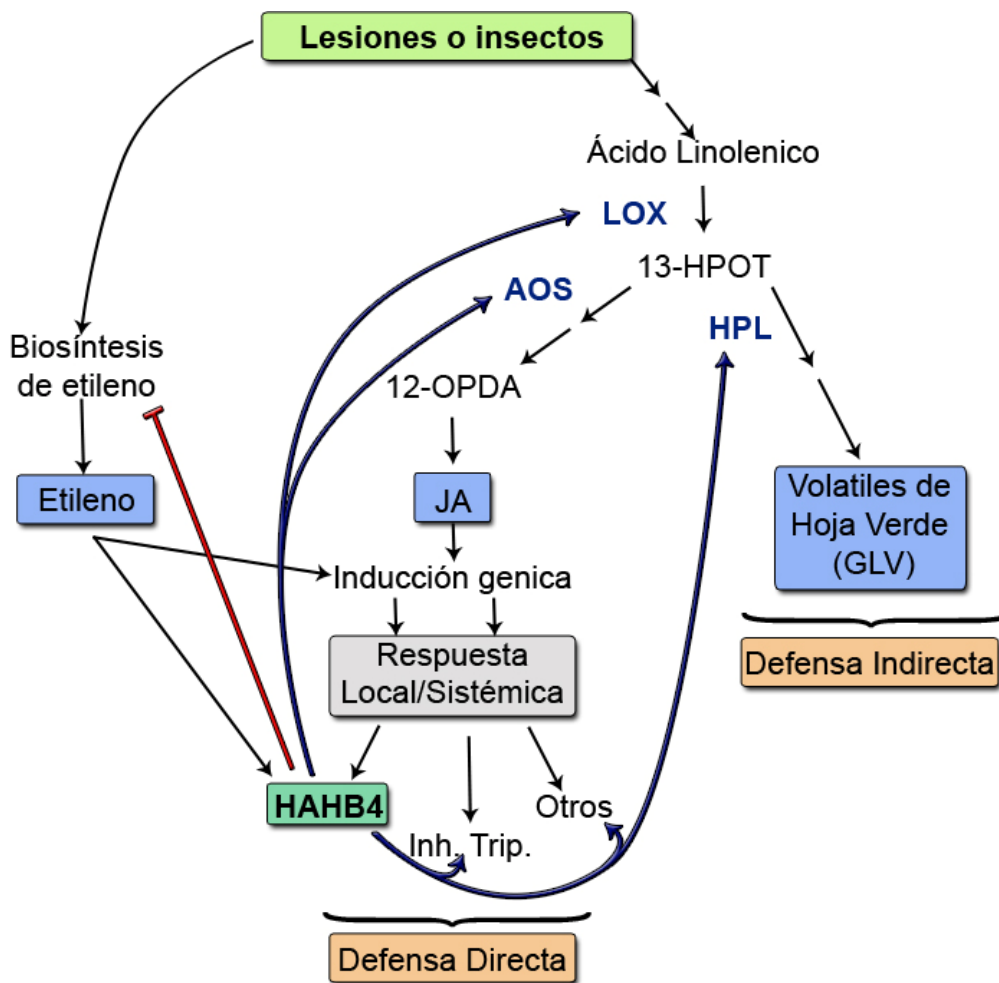


Figura VI.12: Representación esquemática del modelo propuesto para la acción de *HAHB4* en los mecanismos de defensa de las plantas. Las flechas azules indican una regulación positiva mientras que las líneas rojas indican la represión de un proceso.

Considerando todas las evidencias experimentales obtenidas en este capítulo y en el anterior, así como también la información disponible en la literatura, nos permitimos plantear un modelo que explica cómo *HAHB4* participa de la respuesta montada por la planta cuando se lesiona o es atacada por un insecto (Figura VI.12).

En resumen, este modelo propone que: después de que la planta sufre una herida, el ácido linolénico es liberado desde la membrana convirtiéndose en 13-HPOT por la acción de LOX. A su vez el 13-HPOT puede ser transformado tanto en GLVs por la acción de la HPL y disparar de esta forma la defensa indirecta, como en JA por la acción secuencial de varias enzimas, entre ellas la AOS. La síntesis de JA induce, local y sistémicamente, la expresión de una serie de genes de respuesta a heridas entre los que se encuentra *HAHB4*. En paralelo, la misma lesión es capaz de generar un estallido en la síntesis de etileno, el cual *per se* activa la expresión de *HAHB4* potenciando los efectos de JA en la expresión de este gen. La inducción de *HAHB4* produce una retroalimentación positiva sobre la biosíntesis de JA, vía la activación de compuestos enzimáticos involucrados en este procesos (LOX y AOS). Simultáneamente la creciente acumulación de *HAHB4* produce un efecto negativo en la síntesis y percepción de etileno reduciendo los niveles de esta hormona. Este efecto negativo sobre la producción de etileno no es raro ni contradictorio ya que existen informes previos que indican que el estallido de etileno que se produce en la planta después de sufrir una herida es de corta duración (Kahl y col., 2000; von Dahl y col., 2007). Los resultados aquí expuestos indican que *HAHB4* promueve la activación de varios efectores que van a lidiar en forma directa con la fuente de la lesión. Entre estos efectores están los inhibidores de proteasas y la HPL (la cual produce GLVs) quienes en conjunto parecieran ser los principales protagonistas.

Desde otro punto de vista, el biotecnológico, con miras a mejorar los productos del agro, se han hecho enormes esfuerzos en los últimos años para tratar de disminuir el daño causado por el ataque de insectos a los cultivos. Algunas estrategias han sido exitosas en este sentido. Entre ellas, la transformación de plantas expresando el gen Bt, es de las más utilizadas. Estas plantas expresan distintas formas de la endotoxina CRY del *Bacillus thuringiensis*. Cuando los insectos ingieren las hojas, también lo hacen con la endotoxina que llega al intestino medio y se disuelve en ese medio, hecho favorecido por el pH intestinal. Una vez en solución, la toxina es digerida parcialmente por las proteasas intestinales pasando a su forma activa capaz de unirse a la membrana plasmática de las células de la pared intestinal produciendo su lisis. Este proceso

conduce el insecto a la muerte (Schnepf y col., 1998). Esta tecnología presenta principalmente dos problemas: el primero, más bien técnico, es que cada vez aparecen más especies de insectos resistentes y el segundo tiene que ver con la percepción pública y la posición tomada de rechazo de los grupos ambientalistas que cuestionan la introducción de una toxina bacteriana en un cultivo destinado al consumo humano.

Se han desarrollado también otras estrategias, con el fin de mejorar la tolerancia de las plantas al ataque de insectos. Éstas incluyen la manipulación génica para lograr: la generación de mayores cantidades de inhibidores de proteasas (Johnson y col., 1989, Zavala y col., 2004), una mayor biosíntesis de JA (Kessler y col., 2004) o la inducción de la producción de volátiles (Kappers y col., 2005; Schnee y col., 2006; Shiojiri y col., 2006).

Los principales beneficios de estas tecnologías se ven reflejados en la reducción del uso de pesticidas (esta compartida con el uso de Bt), en la posibilidad de rotar los genotipos existentes reduciendo la aparición de especies resistentes y en presentar un mejor impacto en el público ya que usan los mecanismos naturales de defensa de la planta en lugar de toxinas exógenas.

HAHB4 parece ser un excelente candidato para ser usado como herramienta biotecnológica destinada a incrementar las defensas naturales de un cultivo ante el ataque de insectos. Los resultados obtenidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y maíz que expresan en forma constitutiva este factor de transcripción apoyan fuertemente esta idea. Como se muestra en la tabla VI.1 y en la figura VI.10 las larvas alimentadas con hojas provenientes de estas plantas presentan serios deterioros en su viabilidad. Este detrimento en la salud de los insectos se traduce en su imposibilidad de ganar peso, una reducción en el desarrollo de las larvas, una disminución marcada de la superficie comida y un aumento en la mortalidad de los individuos. Todos estos fenómenos son explicados por el aumento en la concentración de inhibidores de proteasas y de JA en estas plantas. Además las plantas presentan una respuesta sistémica que permite disminuir el daño y por ende, la productividad.

La importancia de *HAHB4* como herramienta biotecnológica radica en el hecho de que un solo transgén de origen vegetal, genera una amplia respuesta a través de diferentes mecanismos que cumplen conjuntamente con un único objetivo, defender la población de plantas del ataque de insectos.