

VI - CAPÍTULO 3

El factor de transcripción HAHB4 integra las vías de transducción de señales del ácido jasmónico y del etileno en la respuesta de defensa contra insectos



VI. - CAPITULO 3

El factor de transcripción HAHB4 integra las vías de transducción de señales del ácido jasmónico y del etileno en la respuesta de defensa contra insectos.

VI.1 – Introducción.

VI.1.1 – El sistema de respuesta a heridas de las plantas.

Las plantas en su ambiente natural están continuamente expuestas a sufrir daños, tanto sean de origen mecánico o como consecuencia del ataque de insectos. La generación de cualquiera de estas heridas dispara una respuesta fuerte y rápida que incluye el aumento en la expresión de genes involucrados en la reparación de la herida, la disuasión del atacante y otros procesos relacionados (Maleck and Dietrich, 1999; Reymond y col., 2000; León y col., 2001). Las plantas son capaces de reconocer en cierta medida cuál es el origen de la herida y generar una respuesta específica para lidiar con el agente causal. Si la lesión es causada por un agente mecánico se activan procesos de muerte celular programada en el área de la herida que intentan frenar cualquier tipo de infección que pueda ingresar a través del tejido dañado (Angelini y col., 2008) Al mismo tiempo se sintetizan proteínas que participan en la reparación del tejido (O'Donnell y col., 2003). Cuando el daño es causado por un insecto, la planta reconoce algunos compuestos presentes en las secreciones orales, y activa vías de defensa ligeramente diferentes. En estos casos, se induce adicionalmente la síntesis de compuestos cuya función es disuadir o matar al agente agresor (Alborn y col., 1997; McCloud and Baldwin, 1997; von Dahl y col., 2007).

Como en todas las respuestas biológicas, en esta también actúan como mensajeros una serie de metabolitos. En el caso particular de la defensa contra heridas, la principal protagonista en esta regulación es la hormona ácido jasmónico (JA) junto con algunos de sus intermediarios y derivados (McConn y col., 1997; León y col., 2001).

VI.1.2 – El ácido jasmónico.

Los jasmonatos son un grupo de fitohormonas que incluyen al ácido jasmónico y a sus ésteres. Estructuralmente son ciclopentanonas muy similares a la prostaglandina que se encuentran en mamíferos. Debido a esta similitud es que algunos autores sugirieron que ambos metabolitos tienen un origen ancestral común (Schultz 2002). En la figura VI.1 se esquematizan las estructuras de los jasmonatos más frecuentemente encontrados. Entre ellos, los representantes más relevantes desde el punto de vista fisiológico, son el ácido Jasmónico (- JA), su esteroisómero el ácido 7-isojasmónico (+ JA) y sus ésteres metílicos llamados metil-jasmonatos.

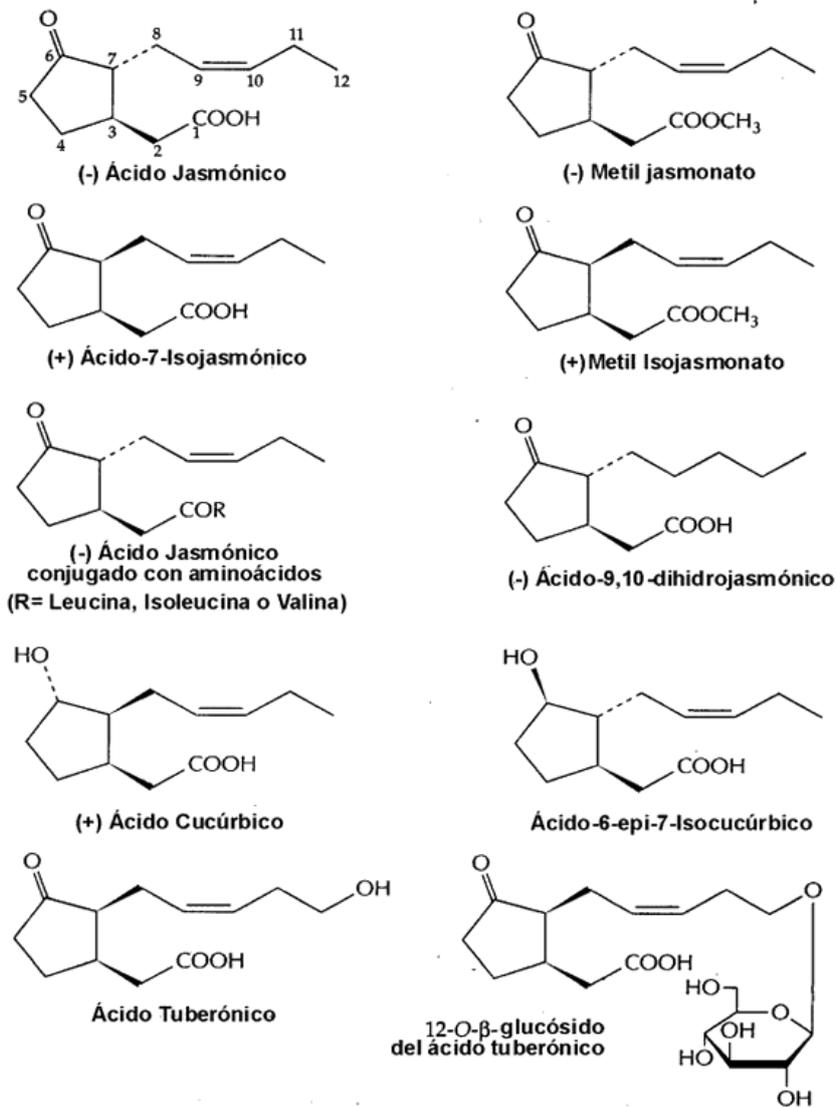


Figura VI.1: Estructuras químicas de las fitohormonas más representativas del grupo conocido como jasmonatos.

Al JA se le han atribuido otras funciones además de la que tiene en los mecanismos de defensa. Entre estas funciones, las más importantes son la inhibición de

la elongación de las raíces, la inducción de la germinación y desarrollo de semillas; la formación de raíces adventicias; la estimulación del ingreso en la senescencia y la abscisión de las hojas (ambos efectos mediados por etileno); el cierre de estomas en condiciones de estrés; la degradación de la clorofila y la regulación de la formación de anteras (Wilén y col., 1991; Creelman y Mullet 1995; Gehring y col., 1997; Ishiguro y col., 2001; He y col 2002; Park y col., 2002; Li y col., 2004b; Nagpal y col., 2005).

VI.1.2.1 – La biosíntesis de JA

La biosíntesis de esta hormona ocurre en toda la planta aunque presenta una mayor actividad en tejidos con alta tasa de crecimiento, como ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces. Todos los jasmonatos derivan de los ácidos linolénico y linoleico (ácidos grasos insaturados) liberados por acción de lipasas a partir de los fosfolípidos de membrana. Esta reacción es impulsada cuando se produce la ruptura de la membrana plasmática vegetal tras sufrir una herida. Posteriormente el ácido linolénico es convertido en ácido 13-hidroperoxilinoico (13-HPOT) a través de una lipoxidación enzimática. El 13-HPOT puede entrar en tres vías metabólicas distintas dependiendo del estado y de las necesidades de la planta (Figura VI.2). Mayoritariamente se convierte en el sustrato de las enzimas allene-óxido sintetasa y ciclasa (AOS y AOC) para dar origen a la primera molécula con funciones fisiológicas conocidas, el 12-OPDA. Según varios informes esta molécula es capaz de cumplir muchas de las funciones atribuidas al JA (Howe y col 1996, Stintzi y col., 2001). Posteriormente, el 12-OPDA sufre tres ciclos de β -oxidación y se transforma en el ácido 7-isojasmónico, que en condiciones naturales se isomeriza y se transforma finalmente en ácido jasmónico. Una vez formada, esta hormona puede ser esterificada para dar sus formas metiladas. Estas formas metiladas se catabolizan por hidroxilación para dar ácido hidroxidi-hidro-jasmónico o por glicosilación formando ésteres en el grupo carboxilo. Se han escrito numerosas revisiones sobre la síntesis de esta hormona (Creelman y Mullet 1997; Turne y col., 2002; Li y col., 2005; Wasternack 2007). Las moléculas de 13-HPOT que no entran en la vía de síntesis de JA pueden ser convertidas en compuestos volátiles, principalmente volátiles de hoja verde (GLV), por la acción de la enzima hidroperóxido-liasa (HPL).

Tomando en cuenta la importancia del JA en la respuesta de la planta frente al ataque de insectos y a la generación de heridas en general, la manipulación genética de la expresión de distintos componentes de la vía de síntesis, especialmente LOX, AOS,

AOC y HPL, ha sido utilizada para obtener plantas con mayor resistencia al ataque de insectos (Johnson y col., 1989; Vancanneyt y col., 2001; Kessler y col., 2004; Zavala y col., 2004; Shiojiri y col., 2006).

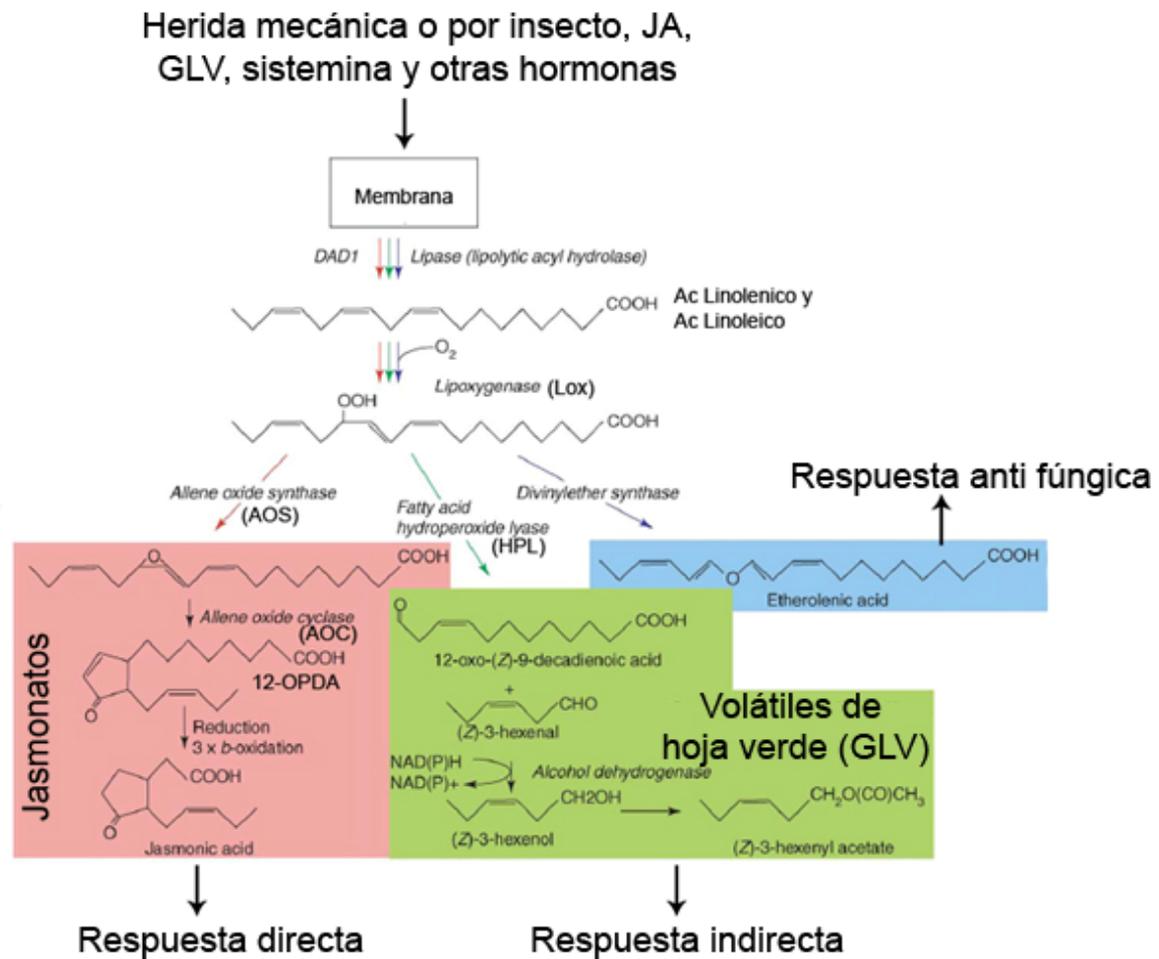


Figura VI.2: Vía de síntesis de jasmonatos en plantas. En rosa están indicados los pasos específicos en la síntesis de jasmonatos, en verde los correspondientes a GLVs y en celeste a compuestos antifúngicos. Imagen extraída de Matsui, 2006.

La síntesis del JA se induce fuertemente, tanto local como sistémicamente, inmediatamente después que la planta sufre una lesión (Creelman y col., 1992; Leon y col., 2001; Turner y col., 2002). Se ha descrito también que el JA estimula su propia síntesis promoviendo la liberación del ácido linolénico de las membranas plasmáticas (Creelman y Mullet 1997). A pesar de que la importancia de la percepción de JA para generar la activación masiva de los genes involucrados en la respuesta a heridas es conocida y aceptada, aún no se ha identificado cuál es el receptor específico al cual se une esta hormona (Creelman y col., 1992; Farmer y col., 1992).

Como sucede con otras hormonas vegetales, las vías de síntesis del ácido jasmónico así como su percepción se pueden inhibir artificialmente. La incubación de plantas con ácido salicílico (SA) o ácido acetil salicílico previene tanto la formación de JA como su percepción (Peña-Cortés y col., 1993; Doares y col., 1995; Baldwin y col., 1996).

Uno de los aspectos más interesantes de la respuesta de las plantas al ataque de insectos es que esta respuesta se dispara y distribuye por toda la planta. Esto genera que las hojas sanas, alejadas del sitio del ataque, disparan en forma preventiva todos los mecanismos de defensa y de esta forma evitan ataques posteriores, preservando así la integridad de la planta (Howe, 2004; Shilmiller y Howe, 2005). Tanto la sistemina como el JA (o una forma conjugada de éste) pueden viajar a través de la planta con el fin de activar esta respuesta sistémica (Rojo y col., 1999; Li y col., 2002; Schilmiller and Howe, 2005).

VI.1.3 – El ácido jasmónico y el etileno.

Existen variaciones en los mecanismos de defensa frente a heridas disparados por las plantas que dependen de la especie (Leon y col., 2001), del tipo de insecto que ataca (Stotz y col., 2000; Reymond y col., 2004) y del tipo de daño provocado (Stotz y col., 2000; Zhu-Salzman y col., 2005; Kempema y col., 2007). Para dar origen a la variedad de respuestas es necesaria la existencia de un balance delicado de la acción de distintas hormonas, como el etileno, JA, ácido salicílico (SA) y ABA (Anderson y col., 2004; Zarate y col., 2007). Dentro de estas interacciones, una de las más interesantes es la que se da entre el etileno y el JA (Xu y col., 1994; O'Donnell y col., 1996; Penninckx y col., 1998; Lorenzo y col., 2003). La síntesis de estas dos hormonas se estimula rápidamente en las hojas cuando sufren una lesión. Por su parte, el etileno es capaz de fomentar la síntesis del ácido jasmónico. La acción de ambas hormonas regulando sinérgicamente la expresión de muchos genes, se interrelaciona dando lugar a la respuesta en la defensa frente a heridas. Muchos genes son regulados independientemente por ambas hormonas mostrando una mayor inducción cuando éstas actúan simultáneamente. Otros sólo se expresan si existe una acción conjunta de etileno y JA (Penninckx y col., 1998; Maleck y Dietrich 1999; Winz y Baldwin 2001; Lorenzo y col., 2003). También se han descrito casos en los cuales las acciones de estas dos hormonas no sólo no son cooperativas en la respuesta a heridas, sino que además presentan efectos completamente antagónicos (Xu y col., 1994; Zhu-Salzman y col.,

1998; Rojo y col., 1999; Kahl y col., 2000; Lorenzo y col., 2003; Zhou y col., 2005). Dado que en una planta lesionada los tejidos que sintetizan estas dos hormonas no se solapan completamente, las distintas regiones presentan patrones de expresión génica diferenciales. En la Figura VI.3 se muestra un esquema que ilustra las regiones en las que actúa cada una de estas dos hormonas. En la zona azul (zona adyacente a la lesión) se produce un pico transitorio de síntesis de etileno; esta hormona va a generar la primera barrera de defensa tratando de evitar cualquier posible infección con patógenos y va a disparar la muerte celular programada activando al mismo tiempo la expresión de los genes encargados de la reparación de tejidos. En esta zona no se sintetiza JA y además, el etileno reprime muchos de los genes de respuesta a JA. El etileno presente en este área, a través de la inducciones de ciertos genes, estimula la síntesis de JA y GLV en la zona amarilla (área local). En un lapso relativamente corto de tiempo la síntesis de etileno es reprimida mientras que la de JA permanece activa. En la zona amarilla el ácido jasmónico toma un papel protagónico. Esta hormona va a desencadenar toda una batería de mecanismos de defensa, activando la síntesis de inhibidores de proteasas, toxinas y GLVs. Simultáneamente y al igual que la sistemina (en solanáceas) comienza a viajar por la planta sistémicamente (zona roja) para disparar una respuesta similar, aunque más débil, a la que dispara en el área local (Li y col., 2002; Howe, 2004; Shilmiller y Howe, 2005). En forma resumida en el área azul se van a activar genes de respuesta a etileno, en la amarilla muchos genes co-activados y aquellos activados por JA, mientras que en la roja van a ser principalmente los de respuesta a JA los que se expresen. Cabe hacer notar que esta localización de las hormonas y de sus genes de respuesta no es tan absoluta y simplificada como en el esquema; se pueden encontrar niveles bajos de ambas en las zonas no descriptas para su acción.

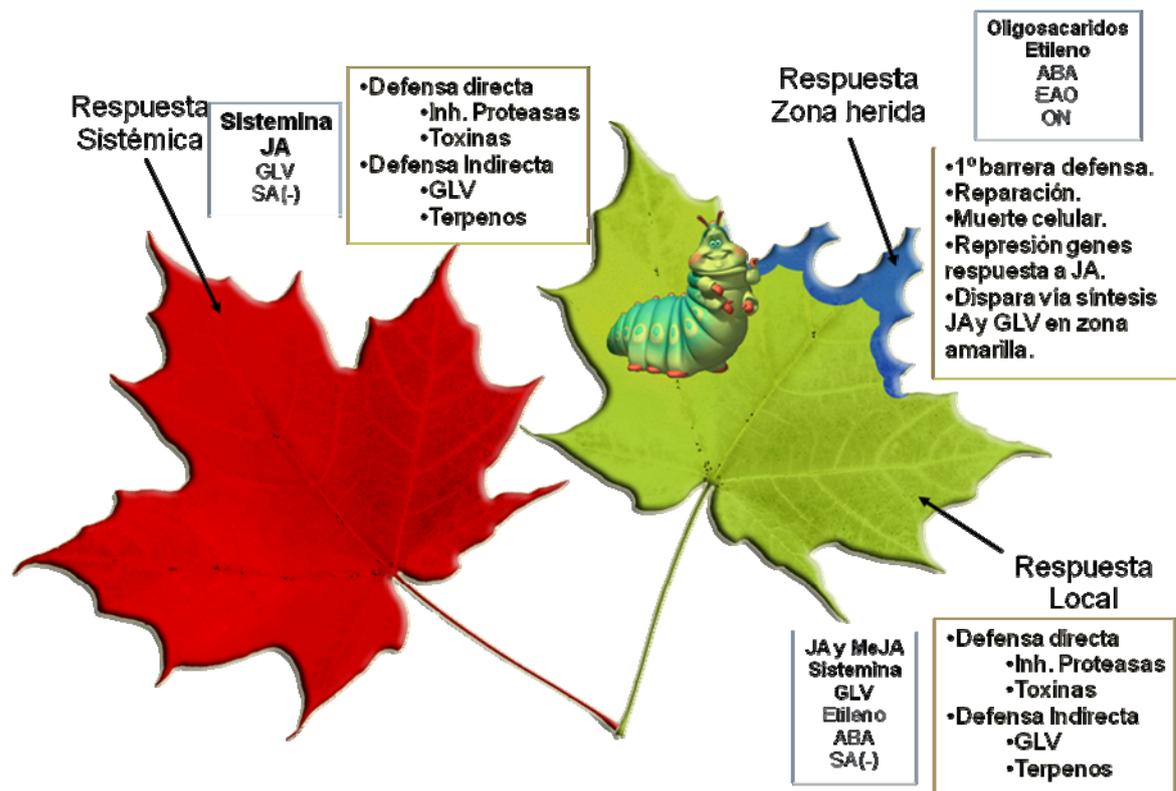


Figura VI.3: Representación esquemática de los principales eventos que ocurren en una hoja dañada. Los cuadros celestes representan las moléculas que actúan en cada zona, en negrita están descritas las funciones principales. En los cuadros naranjados se describen brevemente los efectos que estas moléculas producen en cada zona. Abreviaturas: JA: ácido jasmónico; MeJA: ácido metil jasmónico; GLVs: volátiles de hoja verde; SA (-): efectos antagónicos con ácido salicílico; ABA: ácido abscísico; EAO: especies activas del oxígeno; ON: óxido nítrico.

En síntesis, las vías de transducción de señales mediadas por JA incluyen varios eventos: el reconocimiento primario de la herida, la inducción de la síntesis de la hormona, su percepción, la inducción de las respuestas local y sistémica y finalmente la integración de esta vía con las mediadas por etileno, ABA y SA.

VI.1.4 – Los mecanismos de defensa de las plantas.

Cuando se activa la respuesta mediada por JA en la planta atacada, ésta despliega una batería de mecanismos de defensa en pos de disuadir o hasta incluso matar al organismo agresor. Esos mecanismos han sido clasificados en dos categorías, directos e indirectos (Walling, 2000; Kessler and Baldwin, 2002).

VI.1.4.1 – Los mecanismos de defensa directa.

Los mecanismos directos implican la producción de varios compuestos que van a afectar al organismo agresor. Algunas plantas generan toxinas, como la nicotina en tabaco, que son capaces *per se* de matar al predador (Baldwin, 1999) La mayoría activa la síntesis de inhibidores de proteasas, proteínas pequeñas y altamente estables que bloquean las proteasas intestinales del insecto reduciendo de esta manera su capacidad de digerir los alimentos. Este efecto repercute directamente con el estado de salud del atacante reduciendo su vitalidad, su fertilidad, desalentando subsiguientes ataques y finalmente aumentando su mortalidad (Farmer y col., 1992; Van Dam y col., 2001; Zavala, 2004).

VI.1.4.2 – Los mecanismos de defensa indirecta.

Las vías indirectas de respuesta implican la participación de otros componentes del hábitat como los depredadores naturales, las enfermedades y parásitos de los insectos atacantes (Arimura y col., 2005). En estos casos no son las plantas las que atacan directamente al insecto sino los otros organismos. Las principales moléculas involucradas en este tipo de defensa son los llamados compuestos orgánicos volátiles inducibles (IVOCs). Entre ellos, los más importantes son los terpenos y los volátiles de hojas verdes (GLVs). Estos compuestos son emitidos por las hojas de las plantas después del ataque de un insecto (Kessler y col., 2001, Matsui y col., 2006) y actúan repeliendo a los herbívoros (De Moraes y col., 2001; Heil, 2004) o atrayendo parásitos y depredadores de los atacantes (Shiojiri y col., 2006). Algunos autores han postulado que estos compuestos volátiles estarían activando la síntesis de jasmónico en las plantas vecinas actuando de esta forma como un sistema de alarma para toda una población de plantas cercanas, lo que minimizaría los daños provocados por una plaga de insectos (Holopainen 2004; Matsui 2006; Paschold y col., 2006).

VI.1.4.3 – Los mecanismos de evasión.

Los insectos por su parte, han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten evadir la defensa de la planta (Zhu-Salzman 2005). Dentro de los mecanismos más comunes se encuentran:

- Es habitual que un insecto se alimente brevemente de una hoja y luego se mude a otra planta antes de que se activen los mecanismos de defensa.
- Los insectos especialistas desarrollaron mecanismos de detoxificación.
- Algunos insectos tienen proteasas específicas resistentes a los inhibidores.

- La saliva de algunos insectos produce una muerte celular masiva previniendo cualquier tipo de señalización.
- Los áfidos activan la vía de síntesis de SA, el cual reprime la respuesta mediada por JA.
- En tabaco, *Manduca sexta* activa la síntesis de etileno y éste inhibe la formación de nicotina mediada por JA.
- Algunos insectos que se alimentan por succión, ingieren su alimento del floema de la planta evitando el daño de las membranas y previniendo de este modo la liberación de ácido linolénico.

VI.1.5 – HAHB4 y los mecanismos de defensa.

La respuesta a heridas, al igual que la mayoría de las vías metabólicas en plantas, está regulada delicadamente a nivel transcripcional. Esta fina regulación es la clave para poder generar una amplia variedad de respuestas específicas en presencia de un número limitado de efectores disponibles.

Como describimos en el primer capítulo de esta Tesis, el análisis transcriptómico de plantas que expresan en forma constitutiva el gen *HAHB4*, reveló que este factor de transcripción podría estar actuando en la regulación de las vías de respuesta en las que participa el ácido jasmónico. Asimismo en el capítulo anterior se presentaron evidencias experimentales sobre la participación de *HAHB4* en la regulación de la síntesis y percepción de etileno. Las acciones del etileno y del JA están muy interconectadas, lo que convierte a *HAHB4* en un excelente candidato para mediar la respuesta a heridas en girasol. Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió determinar si este factor de transcripción tenía alguna participación en la respuesta a heridas en plantas de girasol e investigar la posibilidad de una conexión mediada por *HAHB4* entre el etileno y el JA en estas plantas.

VI.2 – Resultados.

VI.2.1 – La expresión de HAHB4 se activa local y sistémicamente tanto por el tratamiento con ácido jasmónico como al producirse una herida mecánica o mordida de insecto.

Para determinar si el factor de transcripción *HAHB4* participa en la respuesta de girasol frente a heridas, realizamos una serie de ensayos cinéticos en los que medimos los niveles de expresión de este gen en función de la aparición de heridas. Para llevar a

cabo este ensayo se lesionó completamente la superficie de la mitad de las hojas de una planta de girasol usando pinzas y/o agujas. Transcurridos distintos lapsos de tiempo, según se indica en las correspondientes figuras, se colectaron muestras de las cuales se extrajeron los ARNs. Las muestras fueron tomadas tanto de las hojas lesionadas como de las que permanecieron sanas con el objeto de cuantificar los niveles del transcripto tanto en la zona lesionada (respuesta local) como en zonas distanciadas (respuesta sistémica).

La figura VI.4 (barras negras y blancas) muestra que la expresión de este factor de transcripción aumenta significativamente tanto en forma local como sistémica cuando la planta de girasol sufre una herida. Los niveles máximos de inducción fueron detectados una hora después de comenzado el ensayo y luego fueron bajando paulatinamente. Teniendo en cuenta que en forma natural la mayor parte de las lesiones que sufre una planta es causada por el ataque de insectos y que el ácido jasmónico es el principal mediador en la respuesta desatada, decidimos analizar la influencia de estos dos factores sobre la expresión de *HAHB4*. Los resultados, presentados en la figura VI.4 (barras grises oscuras y claras), indican claramente que ambos tratamientos activan fuertemente la expresión de *HAHB4*, siendo el ataque de insectos el que presenta un efecto más marcado. Otros autores observaron resultados similares al analizar genes de respuesta a heridas. La explicación más plausible fue que esta diferencia de reacción es la consecuencia de la reacción de las plantas frente a compuestos presentes en las secreciones orales de los insectos atacantes (Kahl y col., 2000; Halitschke y col 2001; von Dahl y col., 2007).

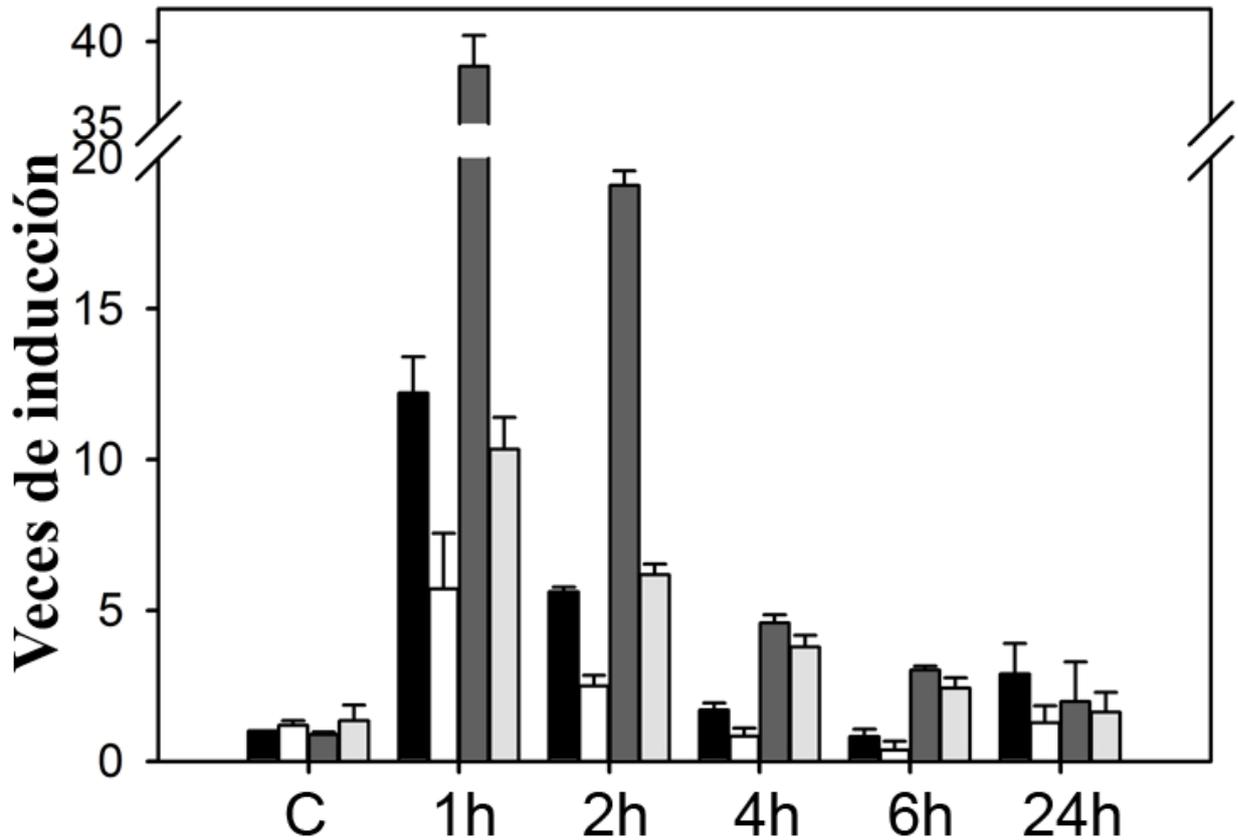


Figura VI.4: Cinética de inducción de la expresión de *HAHB4* en hojas de girasol frente a distintas condiciones ensayadas. Las muestras fueron tomadas a tiempo 0 (C), cuando las plantas fueron lesionadas mecánicamente (barras negras), atacadas por larvas de *Spilosoma virginica* (barras grises oscuras) o tratadas con 200 μM MetJA (barras grises claras). Las barras blancas representan los niveles de transcripto de *HAHB4* en hojas alejadas no lesionadas. Los niveles de transcriptos fueron medidos por PCR cuantitativa y las desviaciones estándar calculadas a partir de al menos tres experimentos independientes en los cuales los niveles del transcripto *Actina* fueron usados como controles internos para normalizar la cantidad de ARN presente en cada muestra. Toda diferencia fue considerada significativa cuando el valor p estadístico fue menor a 0,05.

Con el fin de establecer si esta activación de la expresión de *HAHB4* se produce a nivel transcripcional, se transformaron en forma transitoria hojas de girasol con una construcción que contiene al promotor del gen clonado aguas arriba de la secuencia codificante del gen reportero *GUS* (*PEL:GUS*). Una vez transformadas y pasado un período de estabilización, las hojas se sometieron a un daño mecánico y aparte se las enfrentó con una larva hambrienta de *Spilosoma virginica* (comúnmente llamada gata peluda). Una hora después de comenzado el ensayo, se procedió con el análisis

histoquímico. Para evitar los posibles efectos de factores ajenos a los estudiados, como la oscuridad y el calor en la actividad del promotor, se realizaron todos los ensayos histoquímicos durante períodos cortos de tiempo (entre 1-3 horas) y dejando las muestras continuamente en luz. En la figura VI.5A se puede observar claramente el efecto del ataque de un insecto así como también el del daño mecánico. En ambos casos, se ve claramente la expresión de *GUS* dirigida por el promotor de *HAHB4* en la zona de la lesión. Los controles hechos transformando las hojas con una construcción que expresa el reportero en forma constitutiva (pBI121) confirman la eficiencia del proceso de transformación transitoria. Por su lado, las hojas transformadas con el ADNc de *GUS* sin ningún promotor que dirija su expresión (pBI101) no muestran señales, como era de esperar.

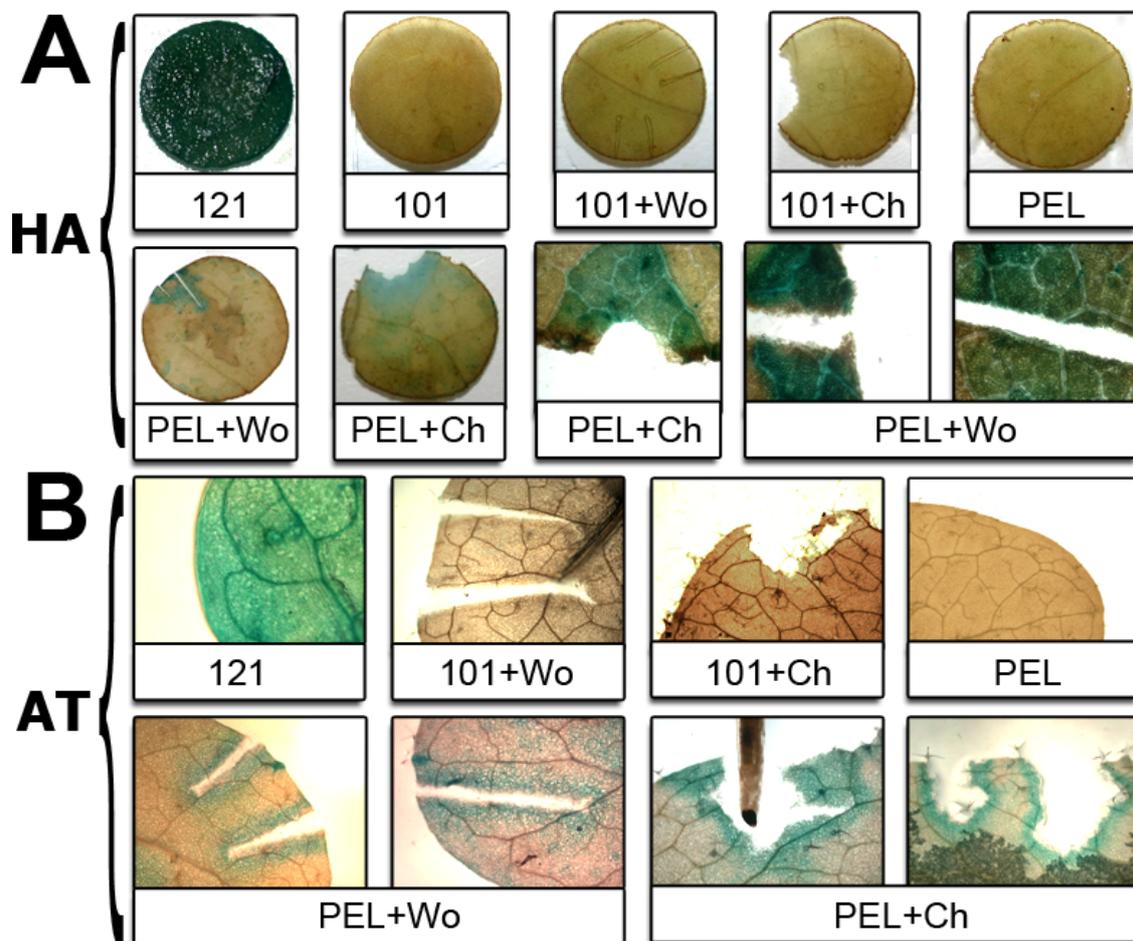


Figura VI.5: La regulación de *HAHB4* por heridas o ataque de insectos se produce a nivel transcripcional. **A:** Discos de hojas de plantas de girasol (HA) transformadas en forma transitoria. **B:** Hojas de plantas de *Arabidopsis* (AT) transformadas en forma estable. Las plantas fueron transformadas con las construcciones que contienen el promotor de *HAHB4+GUS* (PEL); *35S+GUS* (121) o el ADNc del gen *GUS* (101) y sometidas a daño mecánico (Wo), al ataque de insectos (Ch) o no tratadas.

Con el fin de descartar cualquier posible artefacto producido por la metodología de transformación transitoria, se repitió el mismo ensayo en hojas de Arabidopsis transformadas en forma estable con las mismas construcciones. Como se puede apreciar en la figura VI.5B los resultados obtenidos en este sistema se correlacionan perfectamente con los observados en girasol.

VI.2.2 – Tanto el etileno como el ácido jasminico inducen en forma independiente la expresión de HAHB4, pero sus efectos son cooperativos.

En numerosos trabajos previos se ha destacado la importancia de la interacción entre el ácido jasmónico y el etileno en la regulación de genes involucrados en la respuesta a heridas (Xu y col., 1994; O'Donnell y col., 1996; Lorenzo y col., 2003; von Dahl y col., 2007). Como hemos descrito en el capítulo anterior, la expresión de *HAHB4* se activa por la acción del etileno y este gen regula a su tiempo la biosíntesis y transducción de señales de esta hormona (Manavella y col., 2006). Este hecho, más los resultados presentados en este capítulo nos llevaron a plantear la hipótesis de que *HAHB4* podría estar relacionando la acción de las dos hormonas y optimizando la respuesta de la planta cuando sufre heridas o ataques. Los primeros ensayos que nos planteamos para corroborar nuestra hipótesis tendieron a contestar la pregunta de cómo se relacionaban estas hormonas en la regulación de la expresión del gen. Medimos los niveles del transcripto *HAHB4* en plantas de girasol tratadas con cada una de estas hormonas de forma independiente o conjunta. En la figura VI.6A se grafican los resultados obtenidos que indican que *HAHB4* alcanza niveles de expresión mucho más elevados cuando las dos hormonas actúan simultáneamente que cuando cada una lo hace de forma separada.