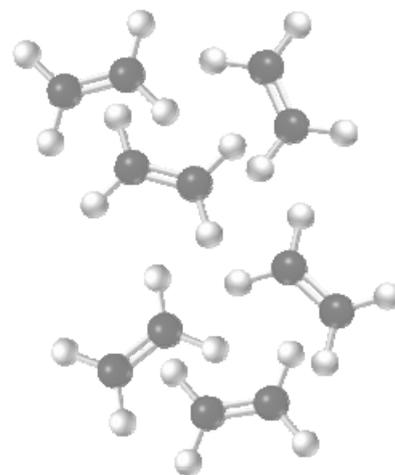


VIII – DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES



No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela.
Si no puedo dibujarlo, es que no lo entiendo.

Albert Einstein

VIII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VIII.1 – Discusión.

En el presente trabajo de Tesis se han presentado resultados experimentales que en conjunto y con las discusiones particulares conducen a una profunda caracterización funcional de *HAHB4*. En este sentido, se han descrito los distintos procesos en los que participa este factor de transcripción, discutiendo para cada uno de ellos su relación con otras vías conocidas. Se ha discutido también en forma individual y por capítulo la relación que establece este factor de transcripción con ciertos metabolitos y la regulación conjunta de procesos tan cruciales como el ingreso en el estadio de senescencia, la defensa de las plantas cuando son heridas, la tolerancia a sequía y la fotosíntesis.

Llegando al final del trabajo experimental y habiendo acumulado una considerable cantidad de información sobre la función de esta proteína en plantas, se nos presentó un nuevo desafío, que fue el de responder a preguntas que sólo surgen de la evaluación y análisis global de todos los resultados individuales: ¿Existe una interpretación global y coherente de todos los resultados individuales?, ¿Los resultados obtenidos en cada capítulo son compatibles con los alcanzados por otros autores? ¿Podemos a partir de todos ellos plantear un modelo único de acción para *HAHB4*? En este sentido y a modo de ejemplo, podríamos encontrar informes que indiquen que la síntesis de ácido jasmónico se reprime durante la noche, y esto sería poco explicable a partir de nuestros estudios: *HAHB4*, es un por un lado capaz de inducir la síntesis de jasmónico y por otro aumenta sus niveles de expresión marcadamente durante la noche.

En la presente sección nos planteamos analizar y discutir de manera global las funciones que ejerce *HAHB4* en plantas de girasol y en las plantas transgénicas, así como las relaciones entre las distintas vías de transducción de señales en las que participa. Con este objetivo, analizaremos el conjunto de los resultados obtenidos en los distintos capítulos y los obtenidos por otros grupos de investigadores.

VIII.1.1 – La sequía y las vías en las que participa el ácido jasmónico.

Los resultados obtenidos demuestran que *HAHB4* participa en la respuesta a estas dos condiciones estresantes (sequía y heridas). La tolerancia a sequía ya había sido

descrita por Dezar y col. (2005a) y la respuesta local y sistémica frente al ataque de insectos ha sido descrita en detalle en el capítulo 3 de esta Tesis. Lo que quisiéramos discutir ahora es si la acción de este gen en estos dos procesos es o no, compatible.

Según nuestros resultados, al inducirse la expresión de *HAHB4* por ambas condiciones (sequía o ataque de insectos), se podría esperar que el aumento de la expresión del gen, mediado por una de las dos condiciones, produzca una respuesta de tolerancia a la otra condición y viceversa. Siguiendo este razonamiento, un aumento de *HAHB4* mediado por jasmónico debería reflejarse en una mayor tolerancia al estrés hídrico. Si bien nosotros no presentamos ninguna evidencia experimental directa que corrobore que esto suceda realmente, los informes de otros autores apoyan esta idea, ya que en numerosos trabajos se establece que el aumento de los niveles de JA genera una mayor tolerancia a sequía (Wang, 1999; Gao y col., 2004). El mecanismo por el cual esto sucede es causado, al menos en parte, por un aumento en la síntesis de compuestos osmoprotectores. En sentido recíproco ocurre algo similar, ya que al someter a las plantas a condiciones de estrés hídrico se produce un aumento marcado de la síntesis de jasmonatos con una concomitante reducción en el ataque de insectos (Yan Ping y col., 2004). La figura VIII.1 muestra un esquema en el que los procesos de regulación que involucran estas dos vías de respuesta se relacionan con la hipotética acción que en ellas cumpliría *HAHB4*.

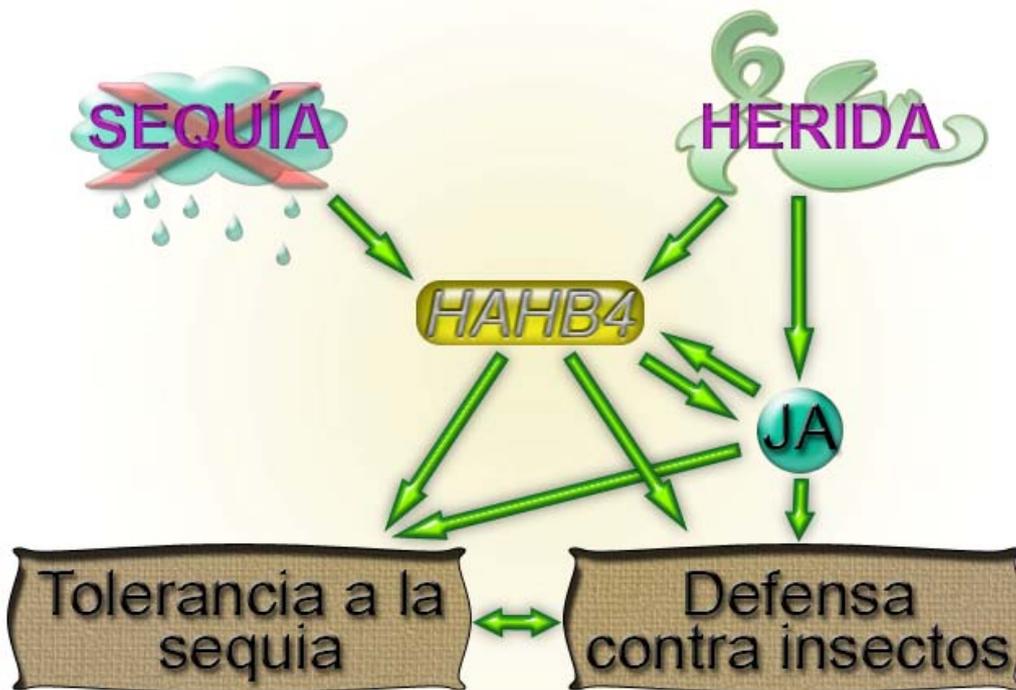


Figura VIII.1: Relación entre las vías de respuesta a heridas y a sequía mediada por *HAHB4*. Esquema de la regulación cruzada de estos procesos. Las flechas verdes indican acciones inductoras y/o agonistas.

VIII.1.2 – La sequía y el etileno.

Como ya hemos discutido ampliamente en el capítulo 2 de esta Tesis, el etileno cumple funciones variadas en la respuesta a sequía. En plantas que se encuentran en condiciones de déficit hídrico, aún si este estrés es relativamente leve, la producción de etileno se incrementa notoriamente. Sin embargo, la función de la hormona en esta respuesta no ha sido dilucidada completamente. Según los informes disponibles, en estas situaciones el etileno fomenta la abscisión de las hojas reduciendo así el consumo de agua (Berumen y Lownds, 1996). Esto genera como efecto secundario, la movilización de nutrientes desde las hojas hacia las semillas favoreciendo la maduración de las mismas y el progreso de la senescencia (Khanna-Chopra y Sinha, 1988, Dolan, 1997; He y col., 2002). Este mecanismo de acción de la hormona tiende a asegurar la progenie de la especie, priorizando la generación de semillas a expensas de la supervivencia de la propia planta.

Nuestros resultados y los de otros autores demostraron por otro lado, que reduciendo la síntesis de etileno o inhibiendo su percepción, las plantas pueden tolerar mucho mejor una situación de déficit hídrico. (capítulo II de esta Tesis; Rivero y col., 2007). Aún mirando solamente las plantas de girasol, fue evidente que *HAHB4* actúa controlando la generación y percepción de esta hormona en las situaciones de sequía. De esta forma, si no hay agua disponible, *HAHB4* se activa y genera un provecho para la planta. Si el estrés no es extremo o prolongado, la planta no se “inmola” y puede esperar un momento más propicio para el llenado de granos. La figura VIII.2 esquematiza esta situación. Aunque es un poco especulativo, este mecanismo mediado por *HAHB4* podría explicar por qué el girasol es capaz de crecer y producir semillas en zonas con regímenes pluviales pobres. Esta especulación toma en cuenta el hecho de que no se haya encontrado un gen ortólogo en *Arabidopsis* y que los más homólogos no confieren tolerancia a sequía cuando son sobre-expresados

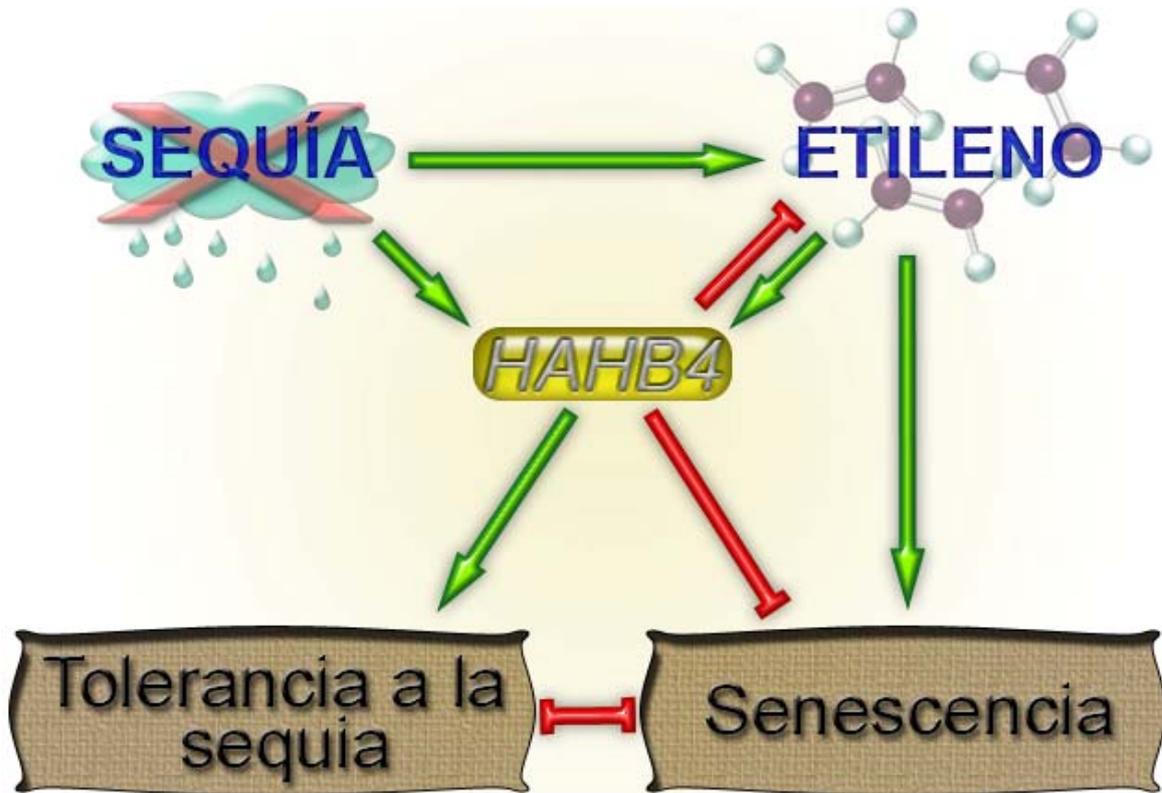


Figura VIII.2: Efecto de *HAHB4* sobre la comunicación entre las vías de respuesta a sequía y del etileno. Las flechas verdes indican acciones inductoras mientras que las rojas indican represión o antagonismo.

VIII.1.3 – La sequía y la fotosíntesis.

Como ya hemos mencionado y discutido en capítulos anteriores, el estrés hídrico, en especial si es severo, genera una reducción marcada en la eficiencia fotosintética. Esta reducción se produce porque la falta de agua y de CO₂ (debido al cierre estomático), constituyen en sí una limitación en los sustratos necesarios para este proceso vital (Boyer, 1970, Flexas y Medrano, 2002; Pastenes y col., 2005; Flexas y col., 2006; Taiz y Zeiger, 2006). En segundo lugar, es importante aclarar que una reducción en la actividad fotosintética y en la síntesis de los componentes necesarios para llevarla a cabo, mejoran las chances de la planta de soportar un período de sequía porque en el caso contrario, se produciría un exceso de electrones que provocaría efectos muy nocivos.

Existen varios informes recientes que indican que algunos genes (varios de ellos codifican factores de transcripción) aumentan sus niveles de expresión en condiciones de sequía y actúan como represores de la expresión de genes que codifican componentes fotosintéticos. En algunos casos, esta inducción/represión combinada mejoró la

capacidad de la planta de tolerar períodos de déficit hídrico (Sakamoto y col., 2004; Shou y col., 2004; Lin y col., 2007). En forma concordante, nuestros resultados indicaron que el aumento en la expresión de *HAHB4* provocó una represión de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en casi todas las etapas de la fotosíntesis. Si bien este efecto no disminuyó la eficiencia fotosintética de plantas transgénicas, sí pudo estar previniendo el daño putativo que se hubiese producido por un exceso de energía en situación de estrés hídrico. La figura VIII.3. es una representación gráfica de lo que podría estar pasando en estas situaciones relacionadas.

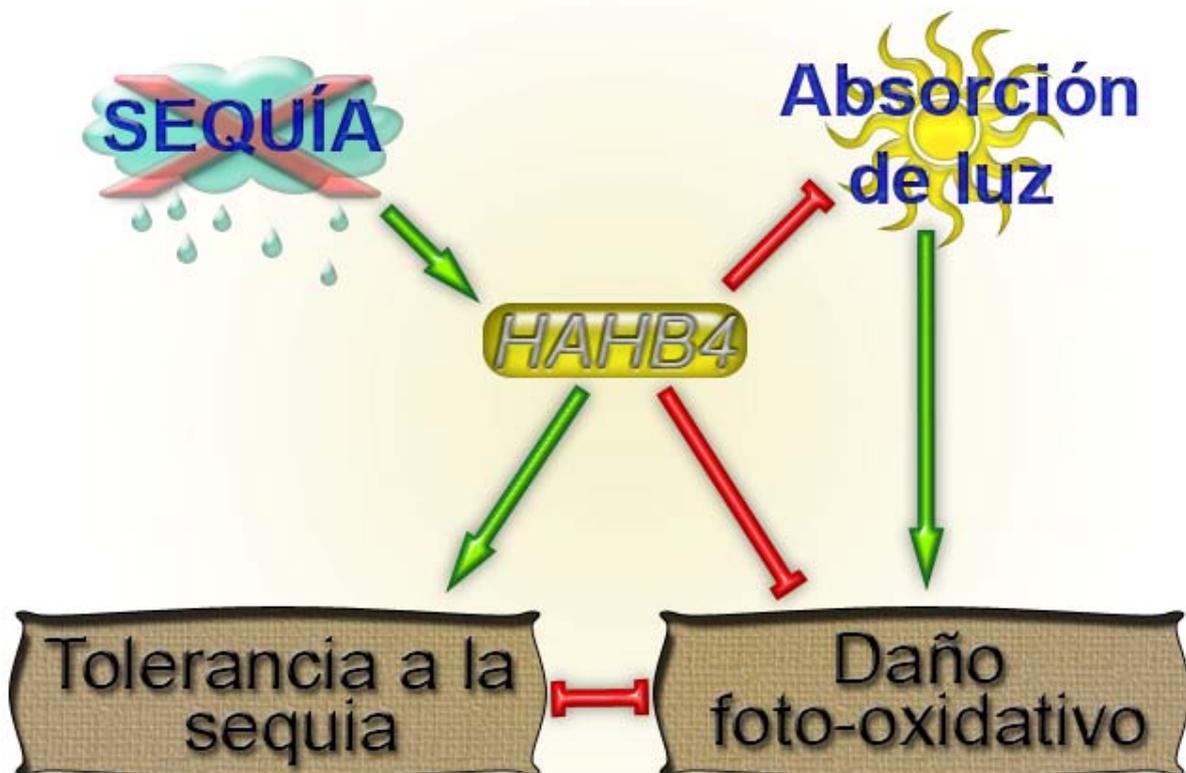


Figura VIII.3: Posible efecto protector de *HAHB4* sobre el daño foto-oxidativo producido durante períodos de sequía.

VIII.1.4 – El ácido jasmónico y el etileno.

Como se estableció y discutió en el capítulo III de esta Tesis, *HAHB4* juega un papel importante en la relación entre las vías de estas dos fitohormonas. Las dos hormonas inducen la expresión de este gen en plantas de girasol lesionadas o atacadas por insectos y éste activa a su vez, mecanismos específicos de defensa. En la figura VIII.4 presentamos un modelo simplificado de la relación de estos tres factores.

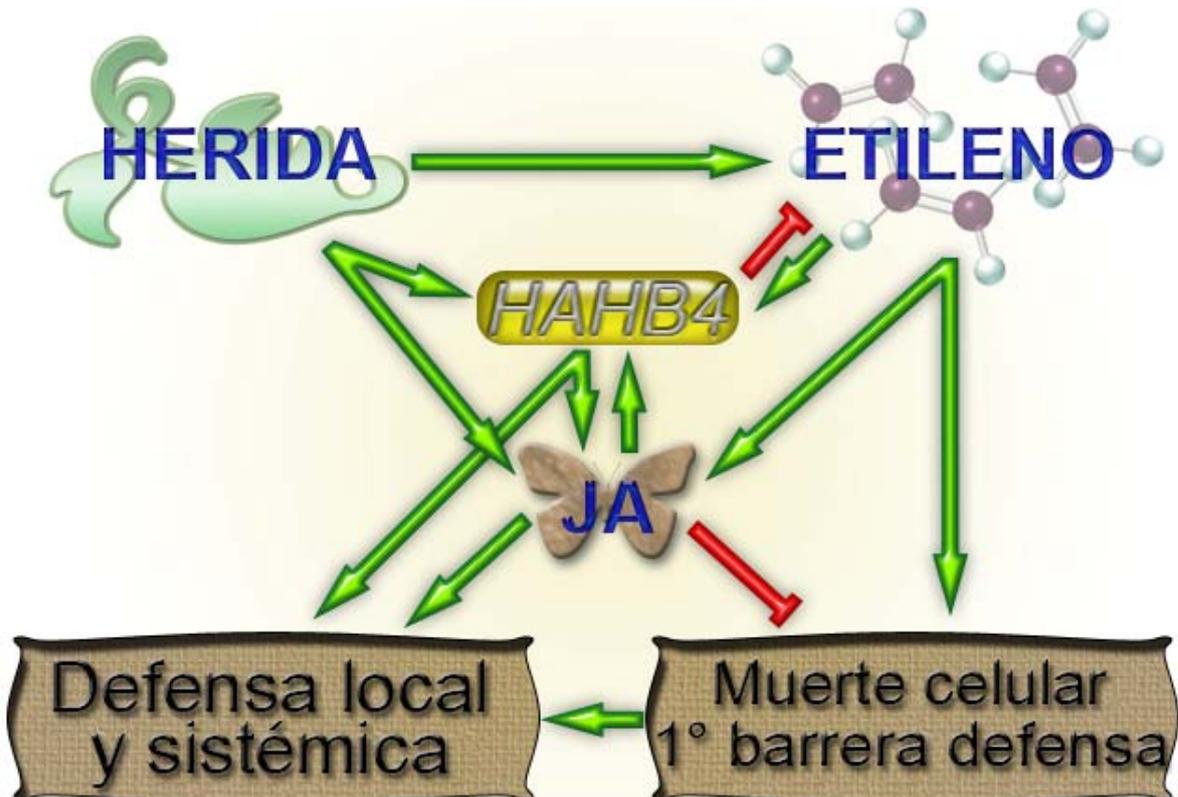


Figura VIII.4: Comunicación entre las vías de transducción de señales de etileno y de ácido jasmónico en los procesos de defensa frente a lesiones y ataques de insectos. En el diagrama se incluye al factor de transcripción HAHB4 y su intervención en estas vías.

VIII.1.5 – El ácido jasmónico y la oscuridad.

La mayoría de los insectos herbívoros tienen hábitos nocturnos y es durante la noche cuando se produce la mayor tasa de ataque. Los insectos se ocultan en la oscuridad de sus depredadores y aprovechan además las temperaturas nocturnas, más frescas y adecuadas para alimentarse, aparearse y ovar. Gran parte del proceso de polinización mediado por insectos también ocurre durante la noche. Estos hechos relacionan en forma lógica las vías de defensa mediadas por el ácido jasmónico (en especial la defensa indirecta) y el período nocturno de oscuridad. Existen varios informes que indican que los niveles de JA durante la noche son marcadamente mayores a los observados durante el día o cuando la planta sufre algún tipo de lesión. En este último caso se incrementan aún más (Engelberth y col., 2004; Arimura y col., 2007). De esta forma, las plantas emiten grandes cantidades de compuestos orgánicos volátiles, especialmente GLVs durante la noche (De Moraes y col., 2001; Colazza y col., 2004; Dudareva y col., 2004; Engelberth y col., 2004). Los GLVs previenen el ataque de insectos, ya sea repeliéndolos o atrayendo a sus depredadores naturales. Además se ha

postulado que el aumento en la emisión de GLVs atrae a los insectos polinizadores permitiendo la diseminación de los granos de polen. Una información adicional importante en este sentido es que el aumento de JA trae aparejado una reducción en la expresión de genes relacionados a la fotosíntesis produciendo una rápida pérdida de clorofilas (Weidhase y col., 1987; Parthier, 1990; Maslenkova y col., 1992; He y col., 2002)

Todos estos precedentes nos indican que nuestros resultados globales encajan perfectamente en el plano fisiológico de las plantas presentando un panorama perfecto para incluir a *HAHB4* en la ecuación, por muy compleja que ésta sea (Figura VIII.5).

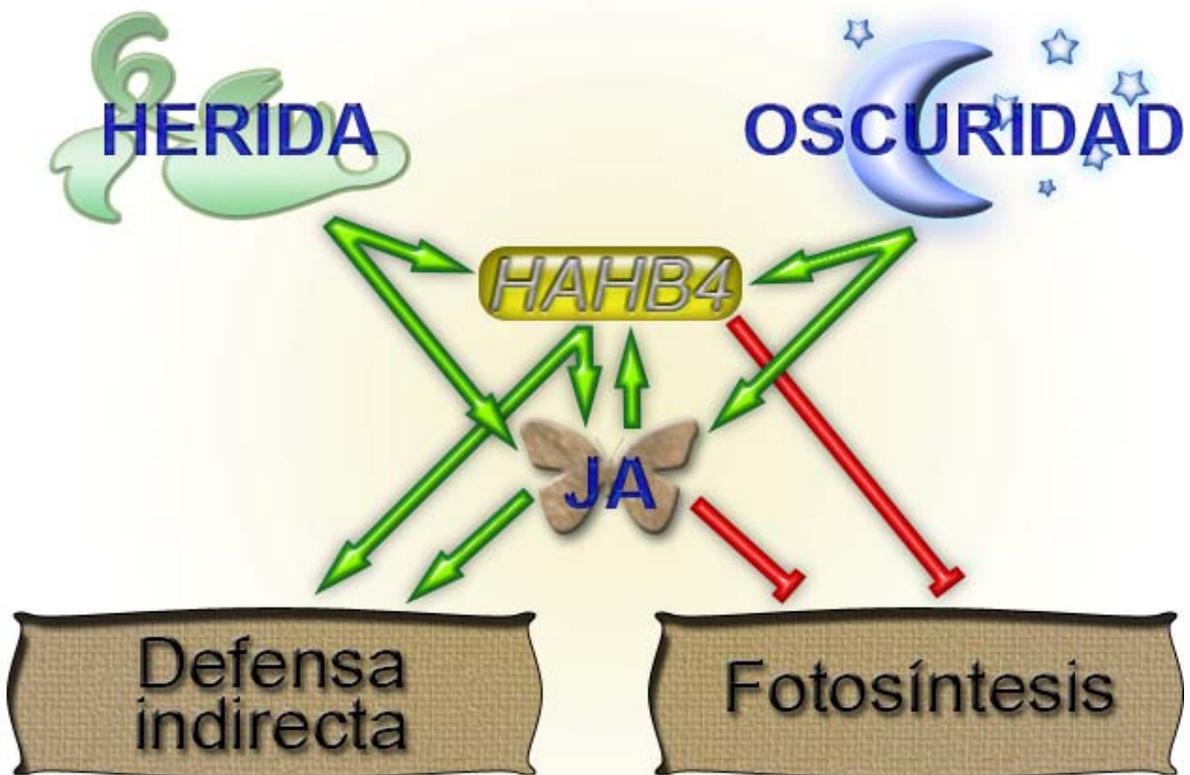


Figura VIII.5: Posibles efectos de *HAHB4* en los procesos mediados por JA que ocurren durante la noche como un mecanismo natural de defensa y atracción de polinizadores.

VIII.1.6 – El etileno y la fotosíntesis.

Para analizar la relación entre estas dos vías, el mejor ejemplo lo constituye el efecto del etileno sobre la maquinaria fotosintética, durante la senescencia. Ha sido establecido experimentalmente que esta hormona en el estadio senescente provoca una represión masiva de la expresión de genes involucrados en fotosíntesis que se traduce en una reducción en la tasa fotosintética concomitantemente con una pérdida creciente de

clorofila (Jiang y col., 1993; Humbeck y Krupinska, 2003; Hortensteiner, 2006; Park y col., 2007). Sin embargo, el papel de *HAHB4* en la relación entre estos dos procesos es bastante menos claro. Podríamos asumir que durante la senescencia el aumento de *HAHB4* generado por la acción del etileno estaría colaborando en la represión de los genes involucrados en la fotosíntesis. Esta presunción es factible ya que sabemos que estos procesos ocurren, *HAHB4* se activa por la acción del etileno y este gen provoca una caída en la biogénesis de la maquinaria fotosintética. Sin embargo, se presenta una contradicción ya que *HAHB4* está retrasando la entrada a la senescencia. Lo que podría explicar la intervención de *HAHB4* en esta situación, es la existencia de una regulación fina del balance entre la necesidad de entrar en senescencia y llenar granos mientras se reduce la tasa fotosintética.

VIII.1.7 – Consideraciones finales.

En esta última sección de la Tesis presentamos evidencias bibliográficas con el objetivo de respaldar nuestros resultados y conclusiones. Si bien no pretendemos establecer que *HAHB4* sea el único eslabón que vincula los procesos de tolerancia a la sequía, senescencia, vías de defensa contra insectos y fotosíntesis, sí queremos resaltar que este gen actúa corriente arriba en estas vías y participa activamente de la relación entre ellas. Somos conscientes que con la excepción de las relaciones probadas experimentalmente (etileno-sequía y etileno-jasmónico), en las demás relaciones caemos un poco en el terreno de la especulación. Ahora bien, las relaciones entre los otros procesos han sido probadas y documentadas por otros autores y esas evidencias experimentales encajan bastante bien con nuestros resultados. Esto le da a las especulaciones un componente más científico y las lleva al terreno de las hipótesis plausibles de corroboración en un futuro.

Tenemos una clara noción de que una parte del rompecabezas aún permanece oculta. Los procesos que controlan el balance entre las respuestas a distintos tipo de señal son extremadamente complejos. Esta complejidad es fácilmente visible en la figura *VIII.6* la cual presenta una integración global de los resultados obtenidos y coordinados con la información bibliográfica disponible. En este complejo esquema faltan muchos actores, entre los cuales puede haber otros factores de transcripción, otras hormonas y moléculas de señalización. Como estrategia para poder completar el esquema, y tal vez corregirlo, tendríamos que identificar con qué otras proteínas interactúa *HAHB4* y cuáles son las que participan en la inducción de este gen mediada

por los distintos estímulos. Como planteamos en la sección de objetivos, nos planteamos algunos al inicio, surgieron otros y al finalizar, siguen surgiendo preguntas a responder en este tema fascinante que es la regulación de los procesos vitales de las plantas para sobrevivir y perpetuarse.

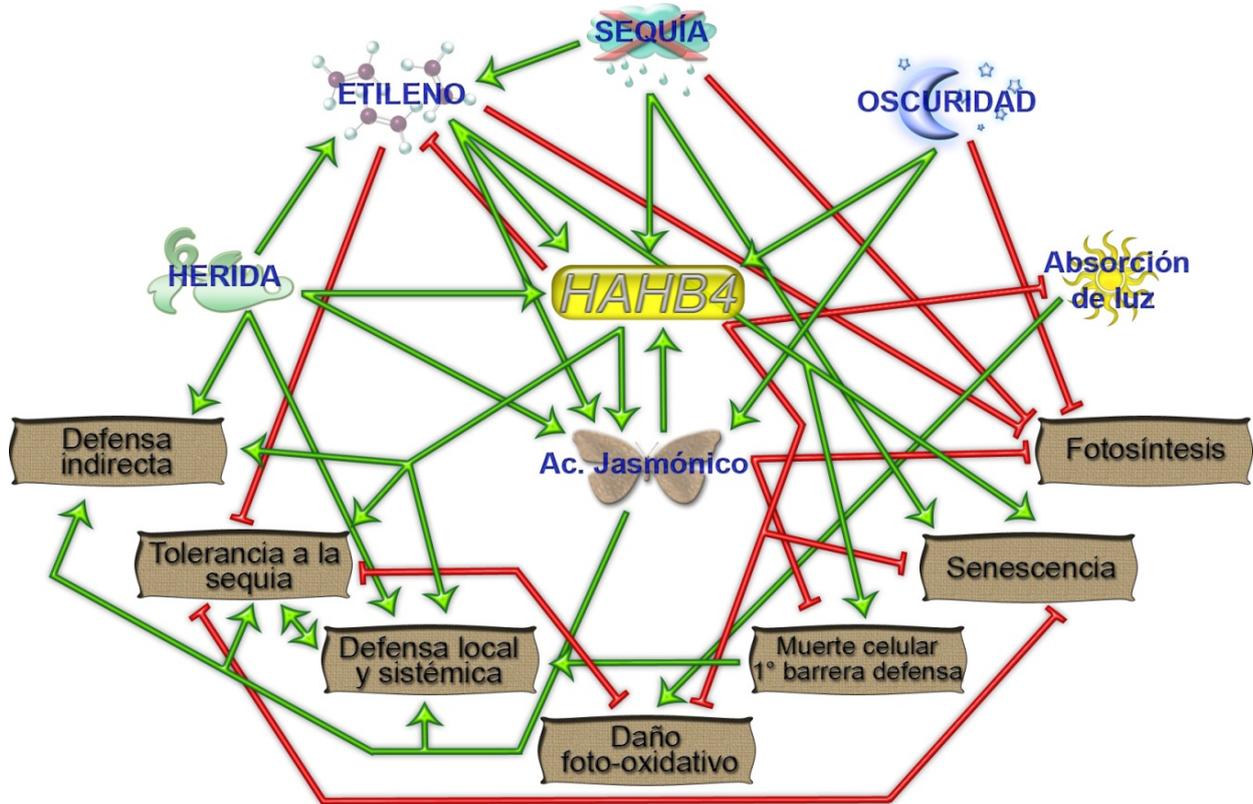


Figura VIII.6: Figura esquemática de parte de la red de regulación (*reguloma*) de la que *HAHB4* forma parte. Las flechas verdes indican procesos agonistas o inducción mientras que las líneas rojas representan efectos antagónicos y represión.

VIII.2 – Conclusiones.

A modo de cierre de este trabajo de Tesis y con el objetivo de tener una visión global y resumida de los logros alcanzados durante su desarrollo, vamos a presentar una lista resumida y concisa de las principales conclusiones arrojadas por el trabajo experimental desarrollado.

1. La expresión transgénica de *HAHB4* genera cambios significativos en el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* modificando la expresión de más de 700 genes.

2. La expresión de *HAHB4* es fuertemente inducida por la acción de etileno, del ácido jasmónico, de la aparición de heridas y cuando las plantas están en oscuridad.
3. Se pudieron identificar los elementos en *cis* responsables de la activación del promotor de *HAHB4* por etileno y oscuridad.
4. *HAHB4* reprime la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de etileno en plantas de *Arabidopsis thaliana* y de girasol.
5. La expresión constitutiva de este gen en plantas de *Arabidopsis* le produce un retraso en la entrada en senescencia y una marcada insensibilidad a la acción del etileno.
6. El etileno y el ácido jasmónico actúan de forma independiente pero aditiva para inducir la expresión de *HAHB4*.
7. En plantas de girasol, *HAHB4* induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de JA y en la respuesta frente al ataque de insectos aumentando la concentración de moléculas de defensa como los inhibidores de tripsina y los GLVs.
8. La expresión constitutiva de este gen en plantas de *Arabidopsis* y maíz les confiere una notable resistencia al ataque de insertos.
9. La expresión de *HAHB4* es reprimida activamente cuando la planta tiene disponibilidad de luz.
10. La expresión nocturna de *HAHB4* inhibe la transcripción de genes involucrados en la fotosíntesis.
11. La represión de estos genes se ve reflejada en una menor concentración de clorofila pero no afecta la tasa fotosintética.
12. Los efectos de *HAHB4* sobre la biosíntesis y percepción de etileno junto a los producidos sobre la maquinaria fotosintética pueden explicar la tolerancia a condiciones de estrés hídrico que presentan las plantas de *Arabidopsis* que expresan este gen.