

Compuestos orgánicos volátiles en macroalgas. Efecto del etileno sobre la tetraesporogénesis

PILAR GARCÍA-JIMÉNEZ Y RAFAEL ROBAINA ROMERO

Dpto. Biología. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Campus Universitario de Tafira s/n. 35017 Las Palmas de Gran Canaria.

pgarcia@dbio.ulpgc.es; rrobaina@dbio.ulpgc.es

Introducción

Los vegetales superiores producen un amplio espectro de compuestos orgánicos volátiles, que pueden ser constitutivamente emitidos o inducidos y definir estados específicos de desarrollo, floración, situaciones de estrés, o defensa frente a patógenos (Holopainen & Gershenzon 2010, Loreto & Schnitzler 2010). De manera general, las rutas biosintéticas más relevantes, para estos compuestos, son aquellas que utilizan el S-adenosilmetionina (SAM) como sustrato para multitud de reacciones enzimáticas relacionadas con la transferencia de grupos metilos. Las metil-transferasas dependientes de SAM participan en las distintas etapas del metabolismo primario y secundario de las plantas. El SAM es también precursor tanto en la síntesis de etileno como de poliaminas (Roje 2006, Yang & Hoffmann 1984). Por su parte, la biosíntesis del etileno se cataliza vía SAM en dos pasos; inicialmente la enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) sintasa cataliza la conversión de SAM a ACC. Por su parte, la ACC oxidasa actúa sobre este último y rinde etileno. El etileno también participa en la regulación del crecimiento y desarrollo, así como, en respuestas al estrés y ataque de patógenos (Guo & Ecker 2004).

En macroalgas marinas, los efectos de los compuestos volátiles y el papel fisiológico que podrían desempeñar son menos conocidos que en vegetales terrestres. Existen evidencias que llevan a pensar que determinados fenómenos como la desaparición completa de talos de una especie algal y su sustitución por otra, o la propia alternancia de fases entre las especies, se debe a sustancias gaseosas, pero no existen estudios encaminados al desenmascaramiento de estos patrones. No obstante, el dimetil sulfuro (DMS), gas liberado por el fitoplancton y clorofitas, se le atribuye efectos sobre el clima. La liberación de DMS ocurre por acción de la enzima DMSP liasa (*a priori* enzima llave en la síntesis de etileno en algas) sobre el dimetil sulfopropionato (DMSP), liberando conjuntamente metacrilato que a su vez se convertirá en etileno (Ross et al. 2007).

Lo que cada vez parece más claro es que no son los factores abióticos (luz, temperatura, salinidad, etc) los que afectan únicamente al desarrollo de las algas, sino que existen compuestos con actividad hormonal. Se sabe que el crecimiento, desarrollo y reproducción de las macroalgas rojas está controlado por las poliaminas (PAs): papel en el crecimiento y desarrollo, cambios en los niveles endógenos de PAs, actividades enzimáticas relacionadas, expresión diferencial del gen codificante de la ODC han sido ampliamente estudiados (García-Jiménez et al. 1998, Marián et al. 2000, Guzmán-Urióstegui et al. 2002, Sacramento et al. 2004, 2007, García-Jiménez et al. 2009).

En este estudio, hemos valorado la emisión de compuestos volátiles emulando, *in vitro*, el efecto de desecación al que las algas intermareales están sometidas. Asimismo hemos evaluado las respuestas morfológicas y moleculares del etileno sobre la tetraesporogénesis del alga roja *Pterocladia capillacea*.

Material y métodos

Valoración de los compuestos volátiles emitidos

Se diseñaron 3 métodos para la identificación de i) un amplio espectro de volátiles, ii) aquellos con una baja temperatura de volatilización y finalmente, iii) uno específico para etileno. Los picos se identificaron mediante la base de datos NIST98, las ratio m/z y cuando fue posible con la inyección de estándares. Los especímenes fueron expuestos a luz constante de amplio espectro de $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e incremento de temperatura 1°C h^{-1} durante un periodo total de 4 h con el fin de emular el efecto de desecación de una bajada de marea. La valoración de volátiles también se determinó en oscuridad en las mismas condiciones de desecación.

Respuesta morfológica al etileno

Para chequear como *P. capillacea* respondía al etileno, se contabilizaron cuántos ramas tetraesporangiales inmaduras, sin esporas evidentes, maduraban hasta la observación de esporas, incluso liberación de las mismas. El experimento comenzó cuando las ramas se dispusieron en vasijas conteniendo agua de mar y se aplicó etileno durante periodos de 30 s, 1 min, 15 min, 30 min y 3 h a un flujo de 0.5 L min^{-1} . Para verificar el efecto genuino del etileno, se empleó un inhibidor de la percepción del etileno (STS). Los experimentos y controles correspondientes se llevaron a cabo durante 7 días a $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $19 \pm 2^\circ\text{C}$ y 18 h luz.

Producción de etileno y enzimas relacionadas

La producción de etileno se cuantificó con disoluciones seriadas de etileno puro (100 ppm en aire). Se determinaron las actividades ACC sintasa y ACC oxidasa de acuerdo a Kato & Hyodo (2002). La producción de ACC se midió forzando su conversión a etileno mediante la adición de HgCl_2 (20 mM) y una mezcla 1:1 de NaOH saturada: 5% NaOCl. La producción de etileno se expresó nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{pf}$. Las actividades específicas se expresaron como nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Efectos moleculares de etileno

Para comprobar si la producción de poliaminas estuvo afectada por el etileno, se midieron los niveles putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), 24 h después de los tratamientos de etileno. La especificidad de los efectos observados se valoró con la incubación previa en STS durante periodos de 30 min o toda la noche, y dos concentraciones (1mM ó 4 mM) y posterior tratamiento de 15 min en etileno.

Para evaluar la presencia de transcritos, se cuantificó la cantidad de RNA total tras los diferentes tratamiento de etileno.

Resultados y discusión

Valoración de los compuestos volátiles emitidos

Los compuestos volátiles se pudieron relacionar con i) la posible actividad de las metiltransferasas (aminas, grupos metoxilo y radicales metilo); ii) otro con la producción específica de etileno; iii) la posible oxidación de los lípidos (alquenos, ácidos carboxílicos y oxigenados de bajo peso molecular), iv) moléculas halogenadas y v) con contenido en azufre respectivamente. De esta manera, el perfil de compuestos volátiles obtenidos mostró diferencias entre aquellos talos bajo luz y aquellos otros en oscuridad. Si bien en oscuridad permitió capturar compuestos con radicales metilo mayoritariamente (97%), en presencia de luz se observó además, la presencia de compuestos oxigenados de bajo peso molecular (5%), halogenados (2%), baja proporción de alquenos (1%). y compuestos con grupos funcionales metoxilo (32%). La presencia de los compuestos oxigenados estarían indicando cierta oxidación de los lípidos de membrana, mientras que, los grupos metoxilo relacionados con O-metiltransferasas serían de protección a la luz. Los métodos específicos para la determinación de compuestos de baja volatilización y del etileno definieron la presencia de compuestos aminados, que junto a los compuestos carboxílicos, azufrados y el propio etileno reportados específicamente en luz diseñaron un patrón diferencial. Las moléculas azufradas representadas por DMS tienen su importancia debido al papel del azufre en el medio marino y la posible actividad de dos enzimas como las tiol-metil transferasas o la DMSP liasa descrita en los organismos marinos. El papel del etileno se ha analizado específicamente.

Respuesta morfológica al etileno

Al final del día 7, el máximo número de ramas tetraesporangiales maduras fueron contabilizados en los periodos de 15 y 30 min de etileno respectivamente. Este incremento fue cerca de 200 veces superior a aquel obtenido en las ramas control. Las ramas expuestas a 3 h de etileno no mostraron diferencias significativas con respecto a aquellos que fueron tratados con tan solo 30 s (Fig 1). El hecho que el STS haya afectado negativamente a estos efectos indica que los resultados son genuinos y el etileno es un regulador de la tetraesporogénesis.

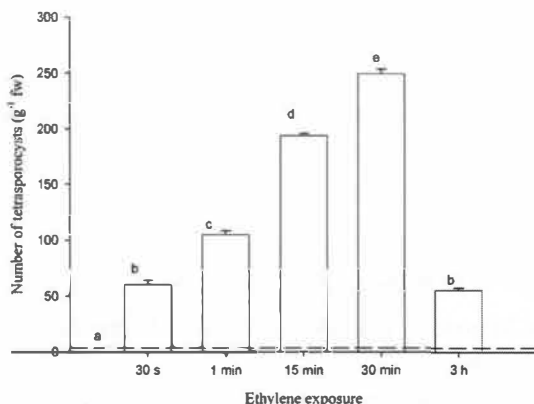


Figura1: número de ramas tetraesporangiales maduras (g^{-1} fw) observadas en *P. capillacea* 7 días después de los tratamientos en etileno (30 s, 1 min, 15 min, 30 min, 3h). Las barras indica la media $\pm$ desviación estándar, $n=2$. Letras diferentes indican diferentes significativas La línea discontinua son los datos correspondientes (1.59 ± 0.1 , $n=32$) a los talos tratados con aire y con STS.

Pterocladia capillacea produjo etileno a una tasa de 1.12 ± 0.06 nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ pf. Las actividades ACS y ACO se detectaron aunque no fueron significativamente diferentes entre ellas. La actividad ACS fue 6.70 ± 0.72 nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ pf y para la ACO, 7.10 ± 0.01 nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ pf. Las actividades específicas fueron 11.21 ± 1.19 nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína para ACS y 7.125 ± 0.11 nmol etileno $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína para ACO.

Los tratamientos de etileno favorecieron el incremento de la fracción libre de la putrescina comparados con el control. Este incremento fue significativamente superior a 15 y 30 min (15 min, $0.15 \pm 6 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol Put g}^{-1}\text{pf}$) en comparación con los tiempos de incubación en etileno más cortos (30 s, $0.016 \pm 10^{-3} \mu\text{mol Put g}^{-1}\text{pf}$). Los tratamientos prolongados (3 h) disminuyó los niveles de putrescina cerca del control ($0.05 \pm 10^{-3} \mu\text{mol Put g}^{-1}\text{pf}$). Los niveles de espermidina y espermina no cambiaron significativamente con respecto sus controles ($0.12 \pm 10^{-3} \mu\text{mol Spd g}^{-1}\text{pf}$ y $0.011 \pm 10^{-3} \mu\text{mol Spm g}^{-1}\text{pf}$ respectivamente). Los niveles de Spm, descrita como agente regulador en la reproducción de las algas rojas, no se vieron alterados, así que, da cuenta que el efecto del etileno es propio sobre la tetraesporogénesis.

Los niveles de Put también se vieron afectados por la presencia de STS, siendo este efecto inhibitorio dependiente de la concentración y duración de la incubación en STS (0 STS, $0.043 \pm 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol Put g}^{-1}\text{pf}$; 4 mM STS toda la noche, $0.010 \pm 10^{-4} \mu\text{mol Put g}^{-1}\text{pf}$).

La cantidad de RNA total incrementó de manera proporcional al tiempo de exposición al etileno. La concentración de RNA fue 5 veces más alta en talos expuestos a etileno durante 3 h ($34.13 \pm 9 \cdot 10^{-2} \mu\text{g RNA g}^{-1}$ tejido) que en aquellos control ($0.82 \pm 9 \cdot 10^{-2} \mu\text{g RNA g}^{-1}$ tejido). Esta alteración del transcriptoma parece indicar que múltiples genes pueden verse implicados. Considerando que el etileno tiene sus efectos, y que su percepción pudo ser inhibida por STS que actúa específicamente sobre receptores de etileno, nos hemos centrado en la caracterización de receptores de esta molécula. Hasta la fecha ninguno de los intentos de clonación realizados mediante el uso de primers degenerados han dado resultado. Actualmente, trabajamos en distintas y nuevas aproximaciones como la hibridación substractiva sustitutiva (SSH) de simplificación de muestras de ARN, combinadas con secuenciación masiva y ensamblaje *de-novo* del transcriptoma.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias al BFU 2010-17248. Los autores desean agradecer a D. Olegario Brito Mendoza su colaboración en el desarrollo de los sistemas de incubación del etileno.

Bibliografía

- García-Jiménez, P, Rodrigo M & Robaina RR. 1998. J. Appl. Phycol. 10(1):95-100.
- García-Jiménez P, García-Maroto F, Garrido-Cárdenas J, Ferrandiz C & Robaina RR. 2009. J. Plant Physiol. 166:1745-54.
- Guo H & Ecker JR. 2004. Curr Opin Plant Biol 7: 40-49
- Guzmán-Urióstegui A, García-Jiménez P, Marián FD, Robledo D & Robaina RR. 2002. J. Phycol. 38:1169-75.
- Holopainen JK & Gershenzon J. 2010, Trends in Plant Science 15 (3): 176-184

- Holopainen JK. 2004. Trends in Plant Science Vol 9 (11)
- Kato M. & Hyodo H. 1999. J Japan soc Hort Sci. 68(3): 551-557
- Lerdau M, Guenther A & Monson R. 1997. BioScience. 47 6): 373-383
- Loreto F & Schnitzler JP. 2010. Trends in Plant Science 15(3) : 154-166
- Marián FD, García-Jiménez P & Robaina RR. 2000. Physiol. Plant. 110: 530-534.
- Peñuelas J & Llusia J. 2003. Trends in Plant Science 8 (3): 105-109
- Roje S. 2006. Phytochemistry 67 : 1686-1698
- Sacramento AT, García-Jiménez P. & Robaina R.R. 2007. Plant Growth Reg. 53:147-54.
- Sacramento AT., García-Jiménez P., Alcázar R., Tiburcio A. & Robaina R.R. 2004. J. Phycol. 50: 887-94.
- Steinke G, Malin SM & Turner PS. 2000. J Sea Res. 43: 233-244
- Yang SF & Hoffmann NE. 1984. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 155-189.