

La senescencia foliar: incógnitas del desmantelamiento celular

Juan J. Guiamet, Instituto de Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de La Plata, cc 327, 1900 - La Plata. E-mail: jguiamet@fcnym.unlp.edu.ar

Agradecimientos: Mi agradecimiento a los colegas y doctorandos que han participado o contribuido en los trabajos sobre senescencia de nuestro grupo, y a los organismos que financian nuestras investigaciones: FONCYT, CONICET, CICBA y UNLP.

La senescencia es el último estadio en el desarrollo ontogénico de una hoja. Comúnmente definimos la senescencia como un proceso de desmantelamiento celular, que finaliza con la muerte de células, tejidos u órganos. El proceso de la senescencia foliar puede ser dividido en dos etapas: -1 un período inicial de redistribución de nutrientes que implica principalmente la degradación de los cloroplastos y la exportación del N y otros nutrientes liberados hacia otros órganos (v.g., semillas, tubérculos, etc); y -2 un proceso final de muerte celular una vez que la redistribución de nutrientes ha sido completada. Aunque el término “senescencia” usualmente evoca la idea de irreversibilidad, el proceso de degradación de los cloroplastos y redistribución de nutrientes es reversible, y las hojas pueden “reverdecir” aún después que han perdido el 90% de la clorofila y proteínas (v.g., Zavaleta-Mancera et al. 1999).

La senescencia foliar es un proceso de importancia económica. Por ejemplo, los procesos de senescencia acortan la vida post-cosecha de muchas hortalizas de hoja, y en especies forrajeras pueden reducir la cantidad y calidad nutricional del forraje. Pero el mayor interés por controlar la senescencia se centra en los cultivos de grano, donde es razonable pensar que un retraso de la senescencia, y por lo tanto la prolongación de la actividad asimilatoria del canopeo podría contribuir a aumentar el rendimiento de algunas especies.

Desmantelamiento celular durante la senescencia

El síntoma inicial y distintivo de la senescencia foliar es la degradación de los cloroplastos. Tras la dilucidación de la vía de degradación de clorofila (Thomas et al. 2001), el principal enigma en este campo es el mecanismo de desmantelamiento de los cloroplastos y degradación de sus proteínas. Aunque por su abundancia parecerían un objeto sencillo de estudio, se desconoce casi por completo el mecanismo involucrado en la degradación de proteínas cloroplásticas durante la senescencia. Los esfuerzos de investigación se han orientado a la búsqueda de enzimas hidrolíticas (fundamentalmente proteasas) localizadas en los plástidos y expresadas preferencial o específicamente durante la senescencia. Sin embargo, estudios de fraccionamiento subcelular muestran que la mayor parte de la actividad proteolítica en las células senescentes reside en la vacuola. Los numerosos estudios sobre cambios en la expresión génica han arrojado una larga lista de proteasas, en gran parte proteasas cisteínicas, cuya expresión (niveles de ARNm) aumenta durante la senescencia; paradójicamente, algunas de estas proteasas son enzimas vacuolares o extracelulares, muchas otras tienen una localización desconocida, y solamente unas pocas residen en el cloroplasto (Gepstein et al. 2003). Sin trabajos donde se manipule la expresión de las proteasas asociadas a la senescencia es difícil establecer sus funciones, pero la abundancia de proteasas no-cloroplásticas y de proteasas de procesamiento vacuolar (v.g., Kinoshita et al. 1999) sugiere que al menos parte de la degradación de proteínas podría

ocurrir en otros compartimientos celulares. En este sentido son interesantes distintas observaciones que indican que algunos componentes fotosintéticos pueden ser exportados desde los cloroplastos de las hojas senescentes. En hojas senescentes de soja, por microscopía confocal *in vivo* observamos glóbulos con características espectrales similares a las de la clorofila rodeando a los cloroplastos, probablemente exportados desde los cloroplastos (Guamet et al. 1999). En hojas senescentes de trigo aparecen fuera de los cloroplastos cuerpos de 1-2 μm de diámetro que contienen Rubisco (Chiba et al. 2003). Sorprendentemente, cuando se marca la actividad proteolítica de las células senescentes con un sustrato fluorescente específico para proteasas cisteínicas, la mayor actividad aparece concentrada en pequeñas vacuolas (Fig. 1, Otegui, Noh, Martínez, Vila-Petroff, Staehelin, Amasino y Guamét, resultados no publicados). Estas vacuolas difieren de la vacuola central por su tamaño y también en términos de la composición del tonoplasto (i.e., carecen de la acuaporina γ -TIP); además, -1 aparecen específicamente en células senescentes, y no son detectables en hojas maduras, -2 acumulan la proteasa asociada a la senescencia SAG12, -3 concentran gran parte de la actividad proteolítica de las células, y -4 ocurren en el mesófilo (i.e., células con cloroplastos) y no en las células sin cloroplastos de la epidermis. Con las evidencias disponibles es prematuro establecer el papel de estas nuevas vacuolas durante la senescencia, o determinar si las proteínas de los cloroplastos son degradadas *in situ* o exportadas a otros compartimientos celulares. Sin embargo, dado que

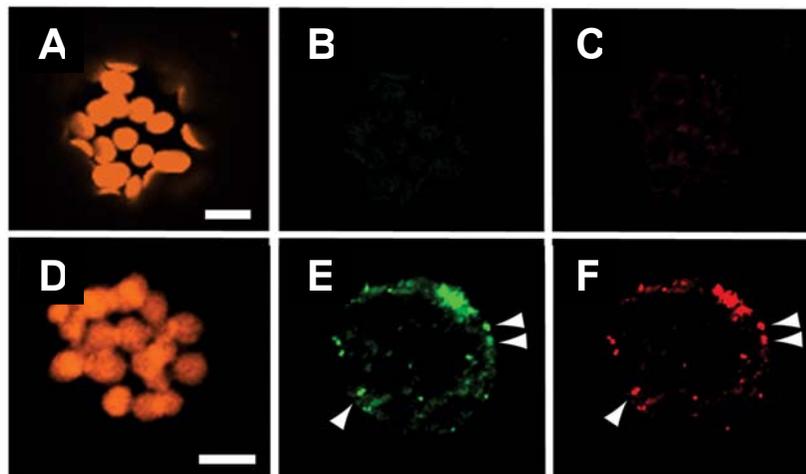


Figura 1 – Detección de vacuolas asociadas a la senescencia por microscopía confocal *in vivo*. Se incubaron protoplastos con un sustrato para proteasas cisteínicas (rhodamine 110, bis-CBZ-L-phenylalanyl-L-arginine amide, B y E) y con el marcador de vacuolas Lysotracker Red (C y F). A, B y C, protoplasto aislado de una hoja madura (no-senescente) de *Arabidopsis*; D, E y F protoplasto aislado de una hoja senescente. Claramente se puede observar la presencia de pequeñas vacuolas (puntas de flecha) en células senescentes (F), con significativa actividad proteolítica (E), e indetectables en protoplastos de hojas no-senescentes (B y C). La sección que se observa es cortical y no incluye la vacuola central. La barra horizontal representa 10 μm .

los cloroplastos de hojas senescentes de trigo pueden degradar parcialmente la subunidad grande de Rubisco, pero son incapaces de completar la degradación del fragmento de 44 kDa resultante (Kokubun et al. 2002), la posibilidad de que parte de la degradación de proteínas cloroplásticas ocurra en otros compartimientos celulares debería ser considerada seriamente. En el futuro inmediato es posible vislumbrar avances en el estudio del mecanismo de degradación del aparato fotosintético utilizando métodos de biología celular, y nuestro grupo está utilizando proteínas cloroplásticas fusionadas a GFP, y mutantes “*knock out*” para las proteasas asociadas a la senescencia con el fin de obtener información sobre el sitio donde ocurre la degradación de proteínas cloroplásticas y las proteasas involucradas.

Regulación de la senescencia

Es evidente que el inicio y el ritmo con que se desarrolla la senescencia deben estar estrictamente regulados. Muchas evidencias indican que el desarrollo de la senescencia involucra la expresión relativamente específica de una batería de “genes asociados a la senescencia” (Gepstein 2004). Muchos de los “genes asociados a la senescencia” codifican hidrolasas, o enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos exportables (v.g., asparagina), pero otros tienen un rol regulador. La expresión de varios factores transcripcionales, genes involucrados en la biosíntesis de etileno, y genes involucrados en vías de señalización aumenta durante la senescencia (Gepstein 2004) y se han identificado “blancos” de la acción de factores transcripcionales asociados a la senescencia (Robatzek y Somssich 2002). En la mayoría de los casos, se desconoce la función de estos genes en la regulación de la senescencia, y sólo recientemente se ha comenzado a manipular su expresión (Lim et al. 2003).

Una aproximación alternativa en el estudio de la regulación genética de la senescencia consiste en la utilización de la variabilidad natural presente en poblaciones o variedades de una especie. La ventaja de este enfoque es que permitiría identificar genes con una función importante en el control de la senescencia; desafortunadamente, la mayoría de las numerosas mutaciones “*stay green*” que se han estudiado no han podido ser identificadas a nivel molecular. Algunos de estos genotipos “*stay green*” son particularmente interesantes; por ejemplo en soja la combinación homocigótica de los alelos recesivos en los loci *dl* y *d2* causa una marcada inhibición de la degradación de clorofila y Rubisco (Guiamet y Gianibelli 1996), operando probablemente corriente abajo del/os sitio/s donde ejercen su influencia promotora de la senescencia el etileno, el ácido abscísico y el ácido jasmónico (Guiamet y Gianibelli 1994). Otra mutación interesante es *cytG*, una mutación de herencia citoplasmática (¿un gen cloroplástico?) que afecta específicamente la degradación de clorofila b y del complejo recolector de luz del fotosistema II (LHCII, Guiamet et al. 1991), probablemente alterando la regulación de la fosforilación de LHCII (resultados no publicados). La identificación de los genes mutados en los genotipos “*stay green*” indudablemente aportaría información relevante sobre el control y/o mecanismo de la senescencia foliar, pero es probable que esto requiera un mayor desarrollo de las herramientas genómicas en las especies involucradas.

El conocimiento actual sobre la regulación de la senescencia foliar ofrece entonces una larga lista de genes y mutaciones asociadas con el desarrollo de este proceso. Distintos sets de “genes asociados a la senescencia” se expresan dependiendo del factor inductor de la senescencia, las condiciones ambientales (luz u oscuridad), presencia de factores de estrés, o por la acción de distintas hormonas (Weaver et al. 1999; He et al. 2001). Estas

observaciones sugieren que pueden existir distintas vías regulatorias que controlan el desarrollo temporal de la senescencia de las hojas. En forma recíproca, las mismas mutaciones que inhiben la degradación de componentes cloroplásticos durante la senescencia foliar en soja aumentan la susceptibilidad de las plantas frente al déficit hídrico (Luquez y Guiamet 2002), indicando que algunas vías de señalización pueden ejercer efectos pleiotrópicos y controlar tanto el desarrollo de la senescencia como las respuestas a factores de estrés.

Finalmente, es esperable que un mayor conocimiento del mecanismo y regulación de la senescencia nos permita intervenir para retrasar este proceso durante la postcosecha de productos hortícolas, en especies forrajeras, o en cultivos donde el rendimiento pueda ser sensible a la prolongación de la actividad de la fuente. Resulta paradójico que desconozcamos el mecanismo de degradación de la proteína más abundante sobre el planeta (Rubisco), aunque el advenimiento reciente de la transcriptómica y proteómica, y de nuevos conocimientos en el área de la biología celular de plantas probablemente contribuyan a develar esta y otras incógnitas de la senescencia foliar en un futuro cercano.

Referencias

- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A., Mae, T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 44: 914-921.
- Gepstein, S. (2004) Leaf senescence – not just a “wear and tear” phenomenon. *Genome Biol.* 5: 212 (<http://genomebiology.com/2004/5/3/212>).
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.-J., Hajouj, T., Falah, M., Nesher, O., Yariv, I., Dor, C., Bassani, M. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* 36: 629-642.
- Guiamet, J.J., Schwartz, E., Pichersky, E., Noodén, L.D. (1991) Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean. *Plant Physiol.* 96: 227-231.
- Guiamét, J.J., Giannibelli, M.C. (1994) Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear “stay green” mutants of soybean. *Physiol. Plant.* 91:395-402.
- Guiamét, J.J., Giannibelli, M.C. (1996) Nuclear and cytoplasmic “stay green” mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence. *Physiol. Plant.* 96: 655-661.
- Guiamét, J.J., Pichersky, E., Noodén, L.D. (1999) Mass exodus from senescing chloroplasts of soybean. *Plant Cell Physiol.* 40: 986-992.
- Kinoshita, K., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* 19:43-53.
- He, Y., Tang, W., Swain, J.D., Green, A.L., Jack, T.P., Gan, S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* 126: 707-716.
- Kokubun, N., Ishida, H., Mae, T. (2002) The degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase into the 44 kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiol.* 43: 1390-1395.
- Lim, P.O., Woo, H.R., Nam, H.G. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 8: 272-278.
- Luquez, V., Guiamet, J.J. (2002) The stay green mutations *d1* and *d2* increase water stress susceptibility in soybeans. *J. Exp. Bot.* 53: 1421-1428.
- Robatzek, S., Somssich, I. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development* 16: 1139-1149.

- Thomas, H., Ougham, H., Hörstensteiner, S. (2001) Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism. *Adv. Bot. Res.* 35:2-52.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 455-469.
- Zavaleta-Mancera H.A., Franklin K.A., Ougham, H.J., Thomas, H., Scott, I.M. (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *J.Exp.Bot.* 50: 1677-1682.