



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

# ***Aportes de prolina deshidrogenasa a la defensa contra patógenos en Arabidopsis***

**Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas**

**Autora: Yanina Soledad Rizzi**

**Directora de Tesis: Dra. María Elena Álvarez**

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba  
(CIQUIBIC-CONICET)  
Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica  
Universidad Nacional de Córdoba

**2017**

**Director de Tesis:**

Dra. María Elena Álvarez

**Comisión de Tesis:**

Dr. José Luis Cabrera

Dr. Javier Valdez Taubas

Dra. Miriam Virgolini

**Evaluadora Externa:**

Dra. María Fabiana Drincovich

Esta Tesis de Doctorado fue realizada gracias al apoyo de las siguientes Instituciones:

- Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología (FONCyT).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).
- Secretaría de Ciencia y Técnica-Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC).
- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

## AGRADECIMIENTOS

- A mis padres que me transmitieron el amor por la biología. Su apoyo incondicional y consejo me acompañó en las distintas decisiones y proyectos que he emprendido. Todos mis logros se los debo a ellos.
- A mi hermano, mi mejor amigo, que me ha acompañado y dado fortaleza para enfrentar todos los desafíos que me he propuesto.
- A mis abuelos que son el ejemplo de personas que trato de seguir cada día.
- A mi familia (padres, hermano, abuelos, tíos y primos), que siempre me acompañó y que con sus charlas me permitieron desarrollar el pensamiento.
- A mis amigos de la vida que siempre estuvieron, comprendieron mis ausencias, y fueron la fuente de alegría y energía con la que siempre conté.
- A Malena por darme un lugar en el laboratorio para realizar mi Tesis, por su paciencia y continua estimulación para mejorar mi desarrollo profesional.
- A mis compañeros de laboratorio que se convirtieron en amigos, por las charlas de ciencia y no-ciencia, aprendí mucho de cada uno tanto en lo profesional como de la vida. En especial quiero agradecer a mis hermanos de laboratorio, Georgina a la cual consulté hasta el hartazgo, a Damián y a Flor que siempre estuvieron para ayudarme, aconsejarme y me tuvieron mucha paciencia.
- A Nores y Pitty, a ellos recurrí muchas veces por consejo, me hicieron reír y dieron energía para avanzar.
- A cada uno de los integrantes de los laboratorios de los doctores Smania, Argaraña y Barra, a los cuales recurrí constantemente pidiendo elementos y consejos, encontrando siempre la puerta abierta y la mejor predisposición. En especial a Alín que siempre estuvo para darme aliento en nuestras charlas dominicales.
- Al CIQUIBIC y a cada uno de sus integrantes, los que siempre mantuvieron las puertas abiertas para cada consulta, pedido y consejo. Siempre con buen humor, predisposición dando la respuesta o sugerencias de donde obtenerla. Además les agradezco por todas las conversaciones de pasillo tanto de ciencia como de la vida.

- A la Dra. Carola Grosso de CEMECO, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, que me ayudo en el desarrollo de los ensayos de HPLC.
- A los miembros de mi Comisión de Tesis Dr. José Luis Cabrera, Dr. Javier Valdez Taubas y Dra. Miriam Virgolini que me brindaron siempre la mejor predisposición para escucharme, aconsejarme y me tuvieron mucha paciencia.
- A la evaluadora externa Dra. María Fabiana Drincovich que se tomó el tiempo para leer y evaluar mi tesis.
- A CONICET y la Universidad Nacional de Córdoba, que me sustentaron todos estos años.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	17
Metabolismo de Prolina (Pro) .....	18
Síntesis de Pro en plantas .....	19
Vía iniciada en Glutamato.....	19
Vía iniciada en Ornitina .....	20
Catabolismo de Pro en plantas .....	21
ProDH1 y ProDH2 .....	25
Transporte de Pro, P5C y Glu .....	26
Pro y estrés abiótico .....	27
Patogénesis e inmunidad vegetal .....	31
Respuesta hipersensible .....	34
Mitocondrias y cloroplastos en respuesta de defensa .....	35
Hormonas de defensa .....	38
Vía de señalización de ácido salicílico.....	38
Vía de señalización de ácido jasmónico .....	39
Intercomunicación entre vías de ácido salicílico y ácido jasmónico .....	41
Metabolismo de Pro en patogénesis .....	43
<b>OBJETIVOS</b> .....	48
<b>RESULTADOS</b> .....	50
<b>Capítulo I: Contribución de <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> a la defensa contra patógenos</b> .....	51
ProDH1 y ProDH2 .....	52
Plantas mutantes <i>prodh1</i> , <i>prodh2</i> y silenciadas <i>siPD</i> .....	52
Niveles de ProDH1 y ProDH2 en simples mutantes .....	57
Respuesta a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpm1</i> .....	59
Regulación de la expresión de <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> .....	61
Expresión de <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> en patogénesis .....	64
Respuesta a hormonas exógenas .....	65
<i>ProDH2</i> en tejidos infectados .....	66
<i>ProDH1</i> en tejidos infectados .....	68

Respuesta a patógenos necrótrofos .....	70
Inter-regulación entre <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> .....	73
<b>Capítulo II: Coordinación entre catabolismo y síntesis de Pro en estrés</b> .....	76
Síntesis de Pro en infecciones con <i>Pst-AvrRpm1</i> .....	77
Acumulación de Pro en mutantes <i>prodh</i> .....	77
Acumulación de Pro en fase III de HR en plantas salvajes y <i>p5cdh</i> .....	77
Síntesis y transporte de Pro .....	80
Efecto de ProDH sobre la síntesis de Pro bajo otra condición de estrés .....	81
Contenido de Pro .....	83
Catabolismo de Pro .....	84
Síntesis de Pro .....	86
<b>Capítulo III: Posibles mecanismos por los que ProDH afecta producción de ROS apoplástico</b> .....	89
Efecto de ProDH sobre en la generación de aROS de PTI .....	89
Efecto de ProDH sobre la expresión de <i>FLS2</i> y <i>RBOHD</i> .....	90
Efecto de ProDH sobre el estado redox citosólico .....	91
Participación de P5CR y P5CDH en la generación de aROS .....	91
Actividad G6PDH en mutantes <i>prodh1</i> y <i>prodh2</i> .....	92
NPR1-GFP como marcador de estado redox citosólico .....	94
Posible efecto de ProDH a nivel mitocondrial .....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	97
Defensas contra patógenos con estilos de vida diferentes .....	98
Respuestas diferenciales de <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> en tejidos infectados .....	99
Regulación transcripcional de <i>ProDH2</i> en infección .....	102
Regulación transcripcional de <i>ProDH1</i> en infección .....	103
Inter-regulación entre <i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i> .....	104
ProDH estimula la síntesis tardía de Pro .....	105
Ornitina aportaría a la síntesis de prolina en infección .....	107
Efectos de ProDH sobre la generación de ROS apoplástico .....	108
Efectos de ProDH sobre el estado redox citosólico .....	108
Efectos de ProDH sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	111
Conclusión final .....	113
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	114
Condiciones de crecimiento de plantas .....	115

Crecimiento en Pro exógena .....	115
Tratamientos con patógenos.....	115
Condiciones de crecimiento e infección de patógenos bacterianos .....	115
Curvas de crecimiento de <i>Pst</i> .....	116
Condiciones de crecimiento e infección fúngica .....	116
Tinción con azul de tripano de <i>B. cinerea</i> .....	117
Tratamiento con ácido jasmónico exógeno .....	117
Inducción HopX1 y tratamiento con ácido salicílico .....	117
Tratamiento con antimicina A .....	118
Generación de aROS por tratamiento con flg22 .....	118
Extracción de ácidos nucleicos .....	118
Pulverización de muestras .....	118
Extracción de DNA genómico .....	118
Extracción de RNA .....	118
Ensayos de RT-PCR .....	119
PCR y PCR semicuantitativa (sqPCR) .....	119
PCR cuantitativa (qPCR) .....	119
Análisis <i>in silico</i> de promotores .....	121
Extracción de proteínas y Western blot .....	122
Cuantificación de aminoácidos .....	122
Cuantificación de Pro por colorimetría .....	122
Cuantificación de Pro, Glu y Orn por HPLC .....	123
Actividades enzimáticas .....	123
Actividad ProDH <i>in vitro</i> .....	123
Actividad G6PDH <i>in vitro</i> .....	124
Detección de muerte celular por azul de tripano .....	125
<b>ANEXO</b> .....	<b>126</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>133</b>



## ABREVIATURAS

**6PGDH** 6-fosfogluconato deshidrogenasa

**AOX** oxidasa alternativa

**aROS** ROS apoplástico

**ATP** adenosina trifosfato

**Avr** factores de avirulencia

**bZIP**: *basic leucine zipper motif transcription factor*, factor de transcripción con región básica y motivo de cierre de leucinas.

**cETC** cadena de transporte de electrones cloroplástica

**COI1** *Coronatins insensitive 1*, receptor de JA-Ile

**COR** coronatina

**cROS** ROS cloroplástico

**DAMPs** *Damage Associated Molecular Patterns*, patrones moleculares asociados a daños

**ETI** *Effector-Triggered Immunity*, inmunidad disparada por efectores

**FAD/FADH** flavina adenina dinucleótido en estados oxidado y reducido

**flg22** péptido de 22 aminoácidos de una región conservada de flagelina que activa PTI

**FLS2** *Flagellin Sensitive 2*, receptor de membrana que reconoce a flg22

**FT** factor de transcripción

**G6PDH** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**GapC** gen que codifica para Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**Glu-6P** glucosa-6-fosfato

**Glu** L-glutamato

**GSSG/GSH** glutatión oxidado y reducido

**hpi** horas post-infección

**HPLC** *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**hpt** horas post-tratamiento

**HR** *Hypersensitive Response*, Respuesta Hipersensible

**ICS1** isocorismato sintetasa 1

**JA** ácido jasmónico

**JA-Ile** jasmonato isoleucina forma bioactiva de JA

**JAR** *JA responsive 1*, conjuga JA con isoleucina generando JA-Ile

**JAZ** *Jasmonate-ZIM*, inhibidor de la vía de JA.

**LSR** *large subunit of Rubisco*, subunidad mayor de Rubisco,

**meJA** metil jasmonato

**mETC** cadena de transporte de electrones mitocondrial

**mROS** ROS mitocondrial

**NAD<sup>+</sup>/NADH** dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma oxidada y reducida

**NADP<sup>+</sup>/NADPH** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada y reducida

**NPR1** Non-Expressor of PR genes 1, regulador central de la vía de SA

**OAT** Orn- $\delta$ -aminotransferasa

**OAT/oat** presencia/ ausencia del gen *OAT*

**OPP** *Oxidative Pentose Phosphate Pathway*, vía oxidativa de las pentosas fosfato

**Orn** L-ornitina

**P5C**  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato  
**P5CDH**  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa  
**P5CDH/ p5cdh** presencia/ausencia del gen de  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa  
**P5CR**  $\Delta$  1-pirrolina-5-carboxilato reductasa  
**P5CR/ p5cr** presencia/ ausencia del gen *P5CR*  
**P5CS**  $\Delta$  1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa  
**P5CS/ p5cs** presencia/ ausencia del gen *P5CS*  
**PAMPs** *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos  
**PF** peso fresco  
**Pro** L-prolina  
**ProDH** prolina deshidrogenasa  
**ProDH/prodh** presencia/ ausencia del gen *ProDH*  
**PRR** *Pattern Recognition Receptors* receptores de reconocimiento de los patrones  
**PRs** *Pathogenesis Related proteins*, proteínas relacionadas a patogénesis  
**Pst** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
**Pst-AvrRpm1** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 llevando el gen de avirulencia *AvrRpm1*  
**PTI** *PAMPs-Triggered Immunity*, inmunidad activada por PAMPs  
**qPCR** Análisis cuantitativo de la reacción de la polimerasa en cadena  
**RBOHD** NADPH oxidasas de membrana homólogas a la de mamíferos, *respiratory burst oxidase homologs*  
**RNS** especies reactivas del nitrógeno  
**ROS** *Reactive Oxygen Species* especies reactivas del oxígeno  
**Ru-5-P**: ribulosa-5-fosfato  
**SA** ácido salicílico  
**SID2** *SA Induction-Deficient 2* (isocorismato sintetasa 1)  
**sqPCR** Análisis semicuantitativo de la reacción de la polimerasa en cadena  
**UBQ5** gen que codifica para Ubiquitina 5  
**ufc** unidades formadoras de colonia  
**UQ** ubiquinona

RESUMEN

El metabolismo de prolina (Pro), ha sido ampliamente estudiado en condiciones de estrés abiótico, donde la síntesis y el catabolismo son regulados en paralelo generando un incremento de Pro que generalmente, aumenta la tolerancia a las condiciones desfavorables. Recién en el año 2011 se describió que este metabolismo, también participa positivamente en las defensas contra patógenos con estilo de vida biótrofa. En este caso, se observó que la enzima Pro deshidrogenasa (ProDH), es requerida para la resistencia contra bacterias que son contrarestadas mediante el desarrollo de una Respuesta Hipersensible (HR), en la que se genera un incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS) y muerte celular.

ProDH es la enzima limitante del catabolismo de Pro que tiene lugar en la mitocondria. En *Arabidopsis* se encuentra codificada por dos genes, *ProDH1* y *ProDH2*. Hasta el momento, todas las funciones que se le han asignado a esta enzima son desarrolladas por la isoforma 1. ProDH2 ha sido muy poco estudiada habiéndose descrito recientemente que es una enzima funcional. Los genes *ProDH* son diferencialmente regulados a nivel tisular y en respuesta a distintos estreses abióticos, presentando un bajo grado de co-expresión. Las interacciones con patógenos constituyen una de las pocas condiciones que activan al gen *ProDH2* y aumenta la co-expresión con *ProDH1*.

Conociendo que plantas silenciadas en ambos genes *ProDH* reducen el desarrollo de la HR contra *Pst-AvrRpm1*, uno de ellos o ambos podrían ser reponsables de este fenotipo. Además, *ProDH1* y *ProDH2* podrían participar diferencialmente en interacciones con patógenos de distinta naturaleza. Nos propusimos evaluar la participación de cada gen *ProDH* en la inmunidad contra biótrofos y necrótrofos, así como los factores que regulan su expresión en esas condiciones. Al infectar simples mutantes *prodh1* y *prodh2*, con *Pst-AvrRpm1*, *Pst* DC3000 (hemibiotrófos avirulento y virulento, respectivamente) y *B. cinerea* (necrótrofo virulento) detectamos que ambos genes son necesarios para activar la resistencia contra todos estos patógenos. Sin embargo, la mutante *prodh2* tiene mayor susceptibilidad al hongo necrótrofo que la mutante *prodh1*, evidenciando la primera condición de estrés en la cual ProDH2 tiene mayor relevancia que ProDH1. En condiciones de infección los dos genes *ProDH* responden a distintos factores. *ProDH1* es regulado por SA y por el balance de SA y ácido jasmónico (JA), mientras que *ProDH2* responde sólo a JA. A su vez, describimos la existencia de inter-regulación a nivel transcripcional entre estos genes que manifiesta distintos rasgos en condición basal y en infección. Estos resultados indican que las isoformas ProDH1 y ProDH2 no cumplirían funciones redundantes pero si probablemente

complementarias durante la infección con patógenos microbianos. Este es el primer reporte de la contribución relativa de cada isoforma de ProDH en una condición de estrés.

En algunas condiciones de estrés abiótico, la síntesis y el catabolismo de Pro se activan en distintas partes de la planta (hojas, raíz). Para conocer si esto se reproduce en la infección, evaluamos la procedencia de la Pro degradada por ProDH. Observamos que ésta es generada en el tejido infectado por estimulación de la síntesis. Además, detectamos que ProDH puede activar las dos vías anabólicas de Pro conocidas. Estas utilizan a glutamato (Glu) u ornitina (Orn) como precursores. La segunda enzima del catabolismo de Pro 1 $\Delta$ -pyrrolina-5-carboxilato (P5C) deshidrogenasa (P5CDH) no es determinante para la acumulación de Pro pero si para la selección de la vía de síntesis a partir de Glu. Resultados similares se obtuvieron en condiciones de estrés abiótico por exposición a Pro exógena. El uso de Orn como precursor en la síntesis de Pro resultó novedoso, ya que esta vía no se había detectado activa en estadio de planta adulta ni en estrés.

Dado que el ROS apoplástico (aROS) señala la resistencia contra patógenos biótropos y que ambas ProDHs potencian la actividad de la NADPH oxidasa de membrana comenzamos a evaluar cómo la enzima mitocondrial afecta a la de membrana plasmática. En particular, estudiamos si esto involucra alteraciones del balance  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  del citosol. Observamos que ProDH1 y ProDH2 modulan la homeostasis redox de esta dupla en respuesta a elicitores. La coordinación de ambas ProDHs con las vías de síntesis y su efecto sobre la homeostasis redox, sugiere que en tejidos infectados se estaría transportando poder reductor desde el citosol a la mitocondria pudiendo participar así de la regulación redox de ambos compartimentos. Estas alteraciones podrían ser determinantes para estimular a la NADPH oxidasa de membrana, y con ello la resistencia contra patógenos. Estos hallazgos establecen un nuevo enfoque para el estudio del mecanismo de acción de ProDH en la inmunidad vegetal.

Proline (Pro) metabolism has been extensively studied in plants under abiotic stresses. In these conditions, Pro synthesis and catabolism are regulated in parallel, generating a rise in Pro levels that often increases stress tolerance. Recently, Pro metabolism was also associated to defenses against pathogens. In this case, Pro dehydrogenase (ProDH) was found to be necessary for resistance against hemi-biotrophic bacteria. These pathogens are typically counteracted by the hypersensitive response (HR), a defense program characterized by generation of reactive oxygen species (ROS) leading to cell death.

ProDH is the limiting enzyme in Pro catabolism that takes place at the mitochondria. In Arabidopsis ProDH is encoded by two genes, *ProDH1* and *ProDH2*. Until now, all functions ascribed to this enzyme were assigned to isoform 1. In contrast, ProDH2 has been poorly studied as its activity was recently reported. *ProDH* genes have low co-expression and are differentially regulated at the tissue and developmental levels, as well as in response to abiotic stresses. However, during plant-pathogen interactions *ProDH1* and *ProDH2* are highly induced.

Although plants silenced in both *ProDH* genes reduce the development of HR lesions it is unknown how each gene is responsible for this phenotype. In addition, *ProDH1* and *ProDH2* could be specific for resistance against pathogens with different life style. In this work we evaluated the contribution of each *ProDH* gene to defenses against biotrophic and necrotrophic pathogens. In addition, we analyzed the factors regulating *ProDH* genes expression in these conditions. Arabidopsis *prodh1* and *prodh2* mutant plants were infected with avirulent and virulent hemi-biotrophic (*Pst-AvrRpm1*, *Pst* DC3000, respectively) and a necrotrophic (*Botrytis cinerea*) pathogens and plant resistance was determined in each case. Both genes were required to achieve full resistance against these pathogens, but *ProDH2* was mainly required to counteract the initial necrotrophic fungal growth. This is the first stress conditions where ProDH2 is more relevant than ProDH1. Curiously, under infection conditions the two ProDH genes respond to different factors. *ProDH1* is regulated by SA and the balance of SA and jasmonic acid (JA), while *ProDH2* only responds to JA. In addition, we detected a transcriptional inter-regulation between these genes that is different in basal and infection conditions. These results indicate that ProDH1 and ProDH2 isoforms would not be fully redundant in their role against pathogens attack but may have complementary functions. This study provides the first description about the relative contribution of each ProDH isoform in a stress condition.

In some abiotic stresses, Pro synthesis and catabolism are activated in different organs of the plant (leaves, roots). To investigate if this behavior is maintained in response to pathogens, we evaluated the source of Pro that was being degraded by ProDH. Pro derived from stimulation of biosynthesis in the infected tissues. Also, we detected that the ProDH induces two different Pro anabolic pathways that use either glutamate (Glu) or ornithine (Orn) as precursors. Interestingly, 1 $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate (P5C) dehydrogenase (P5CDH), the second enzyme in Pro catabolism, is required to select the Pro biosynthetic pathway, even though it does not affect Pro accumulation in infection. In parallel, we obtained similar results under the abiotic stress conditions caused by exogenous Pro treatments. The use of Orn as precursor of Pro has not been described previously in adult plants under stress.

Both ProDH genes potentiate the activity of the plant plasma membrane NADPH oxidase. The last enzyme is responsible to produce the apoplastic ROS (aROS) that signal resistance against biotrophic pathogens. We began to evaluate how the mitochondrial enzyme affects that of plasma membrane. In particular, we investigated whether this effect involves alterations of the NADP<sup>+</sup>/NADPH balance at the cytosol. We observed that ProDH1 and ProDH2 modulate the homeostasis of this redox couple in response to elicitors. The coordination of both ProDHs isoforms with the Pro synthetic pathways and their effect on redox homeostasis suggest that in infected tissues the reducing power would be transported from cytosol to mitochondria. These redox alterations could be determinant to stimulate the membrane NADPH oxidase, and thereby resistance against pathogens. These findings establish a new approach for the study of the mechanism by which ProDH potentiates plant immunity.

Durante esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

- Monteoliva MI, Rizzi YS, Cecchini NM, Hajirezaei MR, Alvarez ME. "Context of action of Proline Dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of Arabidopsis". *BMC Plant Biology*, 2014 14:21. doi:10.1186/1471-2229-14-21.

- Rizzi YS, Monteoliva MI, Fabro G, Grosso CL, Laróvere LE y Alvarez ME "P5CDH affects the pathways contributing to Pro synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions". *Frontiers in Plant Science*, 2015 6:572. doi:10.3389/fpls.2015.00572.

- Fabro G, Rizzi YS y Alvarez ME. "Arabidopsis proline dehydrogenase contributes to flagellin mediated PAMP-triggered immunity by affecting RBOHD". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016 29:620. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0003-R>

- Rizzi YS, Cecchini NM, Fabro G y Alvarez ME. "Differential control and function of Arabidopsis *ProDH1* and *ProDH2* genes upon infection with biotrophic and necrotrophic pathogens". *Molecular Plant Pathology*, 2016. DOI:10.1111/mpp.12470.



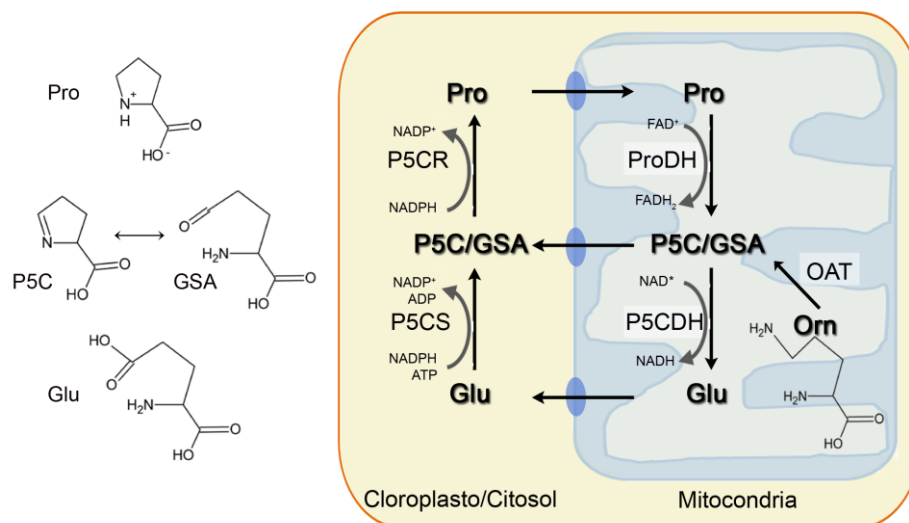
# INTRODUCCIÓN

## Metabolismo de prolina (Pro)

Pro es un aminoácido proteínogénico cíclico, no polar, que juega un rol preponderante en las respuestas al estrés. Se especula que esta capacidad se asocia tanto a las propiedades intrínsecas de la molécula, como los efectos derivados de su metabolismo. Una característica importante del metabolismo de Pro en plantas es su compartimentalización intracelular, dado que la síntesis se desarrolla principalmente en el citosol y los cloroplastos, y el catabolismo se produce exclusivamente en las mitocondrias.

En células vegetales Pro puede sintetizarse por dos rutas alternativas. Estas utilizan glutamato (Glu) u ornitina (Orn) como sustrato y ambas dan lugar a la producción de  $\gamma$ -glutamil semialdehído (GSA) por acción de las enzimas P5C sintetasa (P5CS) u Orn  $\delta$ -amino transferasa (OAT), respectivamente (Figura 1). El GSA es espontáneamente transformado en 1 $\Delta$ -pyrrolina-5-carboxilato (P5C), y este segundo compuesto es convertido en Pro por la enzima P5C reductasa (P5CR). La síntesis a partir de Glu es considerada prevalente bajo estrés y ocurre en citosol o plástidos.

En la vía catabólica, Pro se oxida a P5C y este a Glu por acción de las enzimas Pro deshidrogenasa (ProDH) y P5C deshidrogenasa (P5CDH), respectivamente.



**Figura 1. Metabolismo de Pro.** Las enzimas P5CS y P5CR catalizan la síntesis de Pro a partir de Glu en el citosol y los cloroplastos. La enzima OAT se localiza en la mitocondria donde genera GSA/P5C a partir de Orn. El catabolismo ocurre en la mitocondria donde ProDH y P5CDH oxidan Pro a Glu. P5C actúa como un intermediario de las vías de síntesis y catabolismo.

## **Síntesis de Pro en plantas**

### Vía iniciada en Glutamato

La reacción limitante de esta vía es catalizada por P5CS, una enzima bifuncional que agrupa las actividades de  $\gamma$ -glutamil quinasa y glutámico- $\gamma$ -semialdehído deshidrogenasa, produciendo la fosforilación y reducción de Glu con consumo ATP y NADPH (Hu y col., 1992; Delauney y col., 1993; Savoure y col., 1995).

La mayoría de las plantas vasculares presentan dos o más genes que codifican para esta enzima. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Fam. Brassicaceae, Arabidopsis), contiene dos genes, *P5CS1* (At2g39800) y *P5CS2* (At3g55610), que codifican productos proteicos con alto nivel de homología (93 %) y difieren en la región no codificante (Strizhov y col., 1997). Esta enzima está regulada principalmente a nivel transcripcional, correlacionándose su mayor nivel de expresión génica con un aumento en el contenido de Pro (Yoshiba y col., 1995; Hayashi y col., 2000; Fabro y col., 2004). Los genes *P5CS* de Arabidopsis responden diferencialmente a las condiciones de estrés. Se sugiere que *P5CS1* participa en la resistencia al estrés abiótico y *P5CS2* en la respuesta al estrés biótico. Además, *P5CS2* sería responsable de aportar Pro durante el crecimiento de la planta y el desarrollo floral, mostrando una función bien diferenciada de *P5CS1* (Strizhov y col., 1997; Armengaud y col., 2004; Fabro y col., 2004; Székely y col., 2008; Xue y col., 2009; Funck y col., 2012). En Arabidopsis, ambas isoformas se localizan normalmente en el citosol, pero bajo estrés osmótico o salino *P5CS1* puede acumularse en cloroplastos (Székely y col., 2008). Hasta el momento, no se conoce la existencia de modificaciones post-traduccionales de esta enzima, y aunque *P5CS1* podría ser fosforilada, no se ha determinado un efecto asociado a la misma. Respecto a su actividad enzimática, si bien la *P5CS* de *Vigna aconitifolia* presenta retroalimentación negativa por Pro, hasta el momento no se ha reportado un control similar en la enzima de Arabidopsis (Hu y col., 1992; Zhang y col., 1995).

La segunda enzima de esta vía es P5CR que cataliza la generación de Pro utilizando P5C como sustrato. La P5CR de espinaca (*Spinacea oleraciae*) tiene preferencia por la utilización de NADPH como donador de electrones (Murahama y col., 2001). En la mayoría de las plantas, esta enzima es codificada por un único gen. En Arabidopsis éste es *At5g14800*, considerado

esencial para la planta dado que sus mutantes nulas son inviables por defectos en la germinación (Funck y col., 2012). Aunque en la mayoría de las condiciones de estrés abiótico *P5CR* no presenta regulación transcripcional y el incremento de su expresión no redundando en el aumento de actividad (Szoke y col., 1992; Delauney y col., 1993; Verbruggen y col., 1993; Hua y col., 1997; Hua y col., 2001; Sharma y Verslues, 2010), existen excepciones en las cuales su inducción transcripcional se correlaciona con una mayor generación de Pro (Cecchini y col., 2011a).

En *Arabidopsis* *P5CR* se localiza en citosol, tanto en condiciones basales como de estrés osmótico. Sin embargo, en ensayos de fraccionamiento subcelular de hojas de soja (*Glycine max*) y en protoplastos de arveja (*Pisum sativum*) se detectó su presencia y actividad también en cloroplastos (Rayapati y col., 1989; Szoke y col., 1992). *P5CR* está sujeta a regulación post-transcripcional. Una región de 92 pb de su extremo 5'UTR puede afectar la estabilidad del mRNA e inhibir su traducción en condiciones de alta temperatura y estrés salino (Hua y col., 2001). Además, estudios enzimáticos con *P5CR* de *Arabidopsis* demostraron una compleja regulación de esta enzima por el estado redox del NAD(P)/NAD(P)H (Giberti y col., 2014). Particularmente, esta proteína presenta una vida media muy elevada al ser mantenida a 25 °C. A diferencia de la enzima de *E. coli* cuya vida media bajo esta condición es de 24 h, la enzima purificada de células de *Arabidopsis* así como la expresada en forma heteróloga en *E. coli* tienen una vida media aproximada de 25 días (Funck y col., 2012). Estos resultados sugieren una regulación post-transcripcional y en menor medida transcripcional para *P5CR in vivo*.

#### Vía iniciada en Ornitina

Esta vía es iniciada por la enzima  $\delta$ -OAT que cataliza la generación de GSA/*P5C* y glutamato por transaminación de ornitina y 2-oxoglutarato (Delauney y col., 1993). Al igual que la vía de Glu, esta ruta depende de *P5CR* para generar Pro a partir de *P5C*.

En plantas, la  $\delta$ -OAT se encuentra codificada por un único gen. El de *Arabidopsis* es el gen *At5g46180* (Roosens y col., 1998). Tanto el nivel de transcripto, como la actividad de OAT, varían con el estrés y con la edad de la planta. Así, dos grupos de plantas sometidos a las mismas condiciones de estrés salino muestran respuestas diferentes, siendo la actividad OAT 10 veces mayor en plántulas de 12 días que en plantas de 4 semanas y detectándose su expresión génica solo en las primeras (Roosen y col., 1998). En este sentido, existe una alta

correlación entre la expresión de OAT, su actividad y el contenido de Pro en plantas de *Arabidopsis* tratadas con NaCl, y en plántulas transgénicas de *Nicotiana plumbagifolia* y arroz que sobre-expresan OAT (Roosen y col., 1998; Roosen y col., 2002; Wu y col., 2003; You y col., 2012). Sin embargo, ensayos de pérdida de función generaron puntos de vista contrapuestos respecto a su aporte en la síntesis de Pro. Ensayos con mutantes *oat* de *Arabidopsis* mostraron que esta enzima no es requerida en el ciclo de vida normal de la planta y desestimaron su función en la síntesis de Pro durante la respuesta al estrés salino (Funck y col., 2008). Por el contrario, la inhibición de la actividad OAT impidió la acumulación de Pro en plántulas de *Raphanus sativus* sometidas a este mismo estrés (Hervieu y col., 1995). Así hasta el momento, en términos generales, se propone que la función de OAT se restringe a la fase de desarrollo de las plántulas, siendo la vía de Glu la principal en la síntesis de Pro en plantas adultas y en condiciones estrés (Verslues y Sharma 2010).

OAT es una enzima mitocondrial (Delauney y col., 1993; Funck y col., 2008). Esta localización no coincide con la de P5CR, sugiriendo que el P5C generado por OAT debe ser transportado al citosol para ser sustrato de P5CR. Por esta razón, algunos autores proponen que este P5C también podría ser sustrato de P5CDH para la síntesis de Pro a partir Glu (Funck y col., 2008; Kishor y col., 2014).

Además Orn podría aportar a la generación de Pro de una manera directa e independiente de P5CR, tal como ocurre en bacterias a partir de enzimas ornitina ciclodeaminasas (OCD). En esta reacción, Orn es simplemente desaminada generando Pro y amonio utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. Sin embargo, ensayos realizados con plantas de *Arabidopsis* mutantes o sobre-expresantes en *OCD* así como ensayos *in vitro* con la enzima recombinante expresada en *Escherichia coli*, mostraron que *OCD* no afecta los niveles de Pro, ni consume Orn (Verslues y Sharma 2010; Sharma y col., 2013).

### **Catabolismo de Pro en plantas**

Hasta el momento, la única vía de catabolismo de Pro conocida en plantas involucra su conversión a Glu por ProDH y P5CDH. Curiosamente, estas dos proteínas pueden asociarse en una misma enzima bifuncional en bacterias *Bradyrhizobium japonicum*, *Helicobacter pylori* y *Helicobacter hepaticus*. En *E. coli*, además de estas dos funciones la enzima (PutA) presenta la función de factor de transcripción autógeno del regulón Put, por lo que es trifuncional. En otros organismos como la bacteria *Thermus thermophilus*, el hongo *Saccharomyces*

*cereviseae*, humanos, y las plantas *Arabidopsis* y *Nicotiana tabacum* las actividades ProDH y P5CDH son desarrolladas por dos enzimas monofuncionales (Cecchini y col., 2011b).

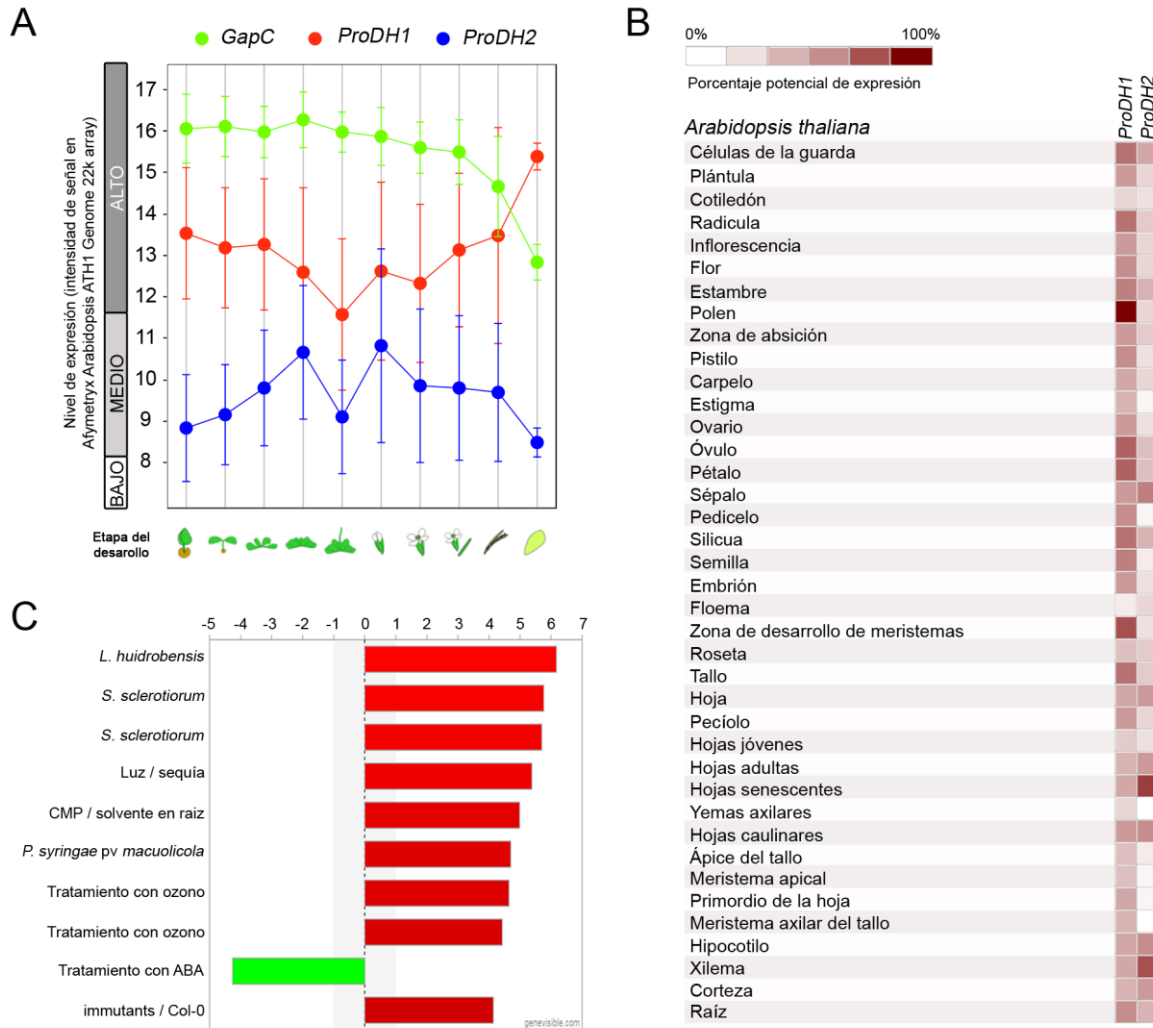
ProDH es la primera enzima y limitante de esta vía y cataliza la oxidación de Pro a GSA/P5C. Análisis estructurales y espectroscópicos de la ProDH de bacterias y levaduras confirmaron la presencia de flavina unida al polipéptido. Dada su homología con la enzima de plantas y animales, se especula que en estos, FAD también sería el aceptor de electrones de la actividad ProDH (Tsuge y col., 2005; White y col., 2007; Tanner, 2008).

En plantas y animales existen dos o más genes ProDH, mientras que en invertebrados, algas y hongos solo existe una copia por genoma (Servet y col., 2012). En vertebrados, las dos isoformas de ProDH presentan bajo porcentaje de identidad y cada una utiliza un sustrato distinto, Pro o hidroxiprolina (Phang y col., 2010). En *Arabidopsis*, ProDH es codificada por dos genes, *ProDH1* (*At3g30775*) y *ProDH2* (*At5g38710*) cuyos productos tienen alto grado de homología a nivel de aminoácidos (79 %) y conservan una Tyr asociada con el reconocimiento de Pro como sustrato, en el sitio catalítico (Y464 en ProDH1 y Y443 en ProDH2; Figura A1 de Anexo) (Kiyosue y col., 1996; Mani y col., 2002; Funck y col., 2010; Servet y col., 2012)

Esta enzima es regulada principalmente a nivel transcripcional. En *Arabidopsis*, los genes *ProDH* de *Arabidopsis* tienen patrones de expresión diferenciales. *ProDH1* es activo en la mayoría de los tejidos y estadios de desarrollo de la planta, principalmente en estigma y polen (Nakashima y col., 1998; Funck y col., 2010; Genevestigator) (Figuras 2 A, B). Por su parte *ProDH2* presenta elevados niveles de transcritos en hojas senescentes y tejido vascular especialmente en xilema (Figuras 2 A, B) (Funck y col., 2010; Genevestigator). Se propone que ProDH1 sería la principal involucrada en las respuestas de tolerancia a estreses abióticos (Verslues y Sharma, 2010).

Tanto la actividad como la proteína ProDH se han detectado asociadas a la membrana interna mitocondrial exponiendo el sitio activo hacia la matriz (Elthon y Steward, 1981; Kiyosue y col., 1996; Cabassa-Hourton y col., 2016). Asimismo, ensayos bioquímicos y estudios de microscopía en protoplastos transformados con construcciones ProDH1-GFP indican que ProDH1 tiene localización mitocondrial (Kiyosue y col., 1996; Mani y col., 2002; Funck y col., 2010). Por su parte, ProDH2 ha sido detectada en la mitocondria y en el cloroplasto de protoplastos transformados con el transgen ProDH2-GFP (Funck y col., 2010; Van Aken y col., 2009). De este modo, estas isoformas pueden llegar a presentar una

localización subcelular distinta. A diferencia de P5CS no se ha analizado si las isoformas de ProDH alteran su localización bajo estrés.



**Figura 2. Expresión diferencial de *ProDH1* y *ProDH2*.** Se analizan distintos estadios de desarrollo (A) o en distintos tejidos (B) de *Arabidopsis*. *GapC* es utilizado como gen constitutivo (A). Se listan los 10 tratamientos que generan las mayores variaciones en los niveles de expresión de *ProDH2* (inducción en rojo; represión en verde; C). Los datos han sido extraídos de análisis de transcriptómica publicados por Genevestigator (<http://www.genevestigator.com/>).

La regulación post-transcripcional así como los parámetros cinéticos de esta proteína, han sido escasamente caracterizadas en plantas. A nivel post-traducciona en bacterias se detectó fosforilación de PutA que podría ser determinante para su asociación a la membrana o al DNA (Ostrovsky y Maloy, 1995; Servet y col., 2012). Sin embargo, este tipo de modificaciones no se han descrito para eucariotas. Por otro lado, hasta el momento no se

ha logrado expresar heterológicamente en *E. coli* los genes *ProDH* de plantas, por lo que los detalles finos de la actividad enzimática de cada isoforma se desconocen.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios de esta tesis se enfocan en las dos isoformas de ProDH, por lo que características adicionales de las mismas se detallan más adelante.

P5CDH es la segunda enzima del catabolismo de Pro, y responsable de la conversión del intermediario P5C en Glu. Ensayos con la enzima purificada a partir de células en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) demostraron que P5CDH puede utilizar tanto NAD<sup>+</sup> como NADP<sup>+</sup> como aceptor de electrones, pero tiene preferencia por el primero (Forlani y col., 1997).

En todas las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas analizadas hasta el momento se ha detectado un solo gen codificante para esta enzima. En Arabidopsis, este gen es *At5g62530* (Deuschle y col., 2001; Ayliffe y col., 2005; Mitchell y col., 2006). Su nivel de transcripción es bajo en todos los tejidos de Arabidopsis, excepto en las inflorescencias y los meristemas apicales donde su expresión es elevada (Deuschle y col., 2001). Su regulación es variable bajo condiciones de estrés. El tratamiento con Pro exógena y la exposición a bajo potencial hídrico inducen a este gen (Deuschle y col., 2001; 2004; Miller y col., 2009; Sharma y Verslues, 2010). Por otra parte, condiciones de salinidad activan un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por ARNs de interferencia pequeños (24-nt y 21-nt siARN) que lleva a la degradación del transcripto de *P5CDH*. Estos siRNA son generados por solapamiento del extremo 3' UTR de este gen con el transcripto del gen *SRO5* (*Similar to RCD One 5*) (Borsani y col., 2005).

La proteína P5CDH se localiza en la mitocondria, y ensayos bioquímicos detectaron su actividad en la matriz de esta organela (Deuschle y col., 2001; Elthon y Steward, 1981). A nivel funcional, la información disponible surge de estudios con líneas mutantes de Arabidopsis. Las mismas, mantienen un elevado contenido de Pro bajo condiciones que estimulan su catabolismo (recuperación de estrés y tratamiento con Pro exógena), indicando que la enzima sería importante en el consumo rápido de Pro (Deuschle y col., 2004; Borsani y col., 2005; Miller y col., 2009; Verslues y Sharma 2010).



### **ProDH1 y ProDH2**

ProDH1 también llamado ERD5 (*Early Response to Dehydration 5*) fue la primer isoforma descrita. Desde el año 1996, se ha estudiado su función en el catabolismo de Pro (Kiyosue y col., 1996). Recientemente, Funck y col. (2010) describieron que *Arabidopsis* expresa a la isoforma ProDH2 que es también funcional. La expresión heteróloga de esta enzima complementa a la mutante PutA de levadura y a la mutante *prodh1* de *Arabidopsis* (Funck y col., 2010). En general *ProDH1* tiene un nivel de transcripto alrededor de un orden de magnitud mayor al de *ProDH2* (Figura 2 A), habiéndose determinado que tanto las funciones basales de crecimiento como las respuesta al estrés serían desarrolladas por la isoforma ProDH1. En este sentido, recientemente se ha descrito que ProDH1 sería el principal responsable en la generación de ATP en la cadena de transporte de electrones mitocondrial utilizando L-Pro como única fuente de energía (Cabassa-Hourton y col., 2016). Así, hasta el momento ProDH1 ha sido considerada preponderante respecto a ProDH2 en todas las condiciones evaluadas.

En otras especies como *N. tabacum*, donde se han identificado dos genes que codifican para ProDH, los análisis de expresión permitieron sugerir que una funcionaría en el mantenimiento general de la planta y la otra en la respuesta al estrés (Ribarits y col., 2007). Por otra parte, *Brassica napus* presenta 8 genes codificantes para ProDH, seis altamente homólogos a la isoforma *ProDH1* de *Arabidopsis* y dos homólogos a *ProDH2*. El patrón de expresión de estos dos grupos de genes es parecido al observado en *Arabidopsis* ya que los *BnaProDH1* presentan niveles de expresión más elevados y ubicuos que los *BnaProDH2* y estos últimos se expresan más en hojas senescentes y tejidos vasculares (Fäes y col., 2014). Por ello, se ha propuesto que cada grupo cumpliría funciones no redundantes.

Como mencionamos anteriormente, los genes *ProDH* de *Arabidopsis*, presentan regulaciones diferentes tanto a nivel tisular, como en condiciones de estrés. *ProDH1* es reprimido por bajo potencial hídrico, deshidratación, salinidad, luz y sacarosa, mientras que es inducido en oscuridad, en la recuperación de los estreses antes mencionados y por Pro exógena (Kiyosue y col., 1996; Verbruggen y col., 1996; Peng y col., 1996; Yoshida y col., 1997; Nakashima y col., 1998; Hayashi y col., 2000; Satoh y col., 2002; Verslues y col., 2007; Funck y col 2010; Sharma y Verslues, 2010). *ProDH2*, al igual que *ProDH1*, es fuertemente inducido por Pro exógena, y es inhibido por el tratamiento con sacarosa. Sin embargo, su expresión es menos alterada por el estrés que la de *ProDH1*. Así por ejemplo, *ProDH2* es solo

levemente activado por la liberación del estrés por bajo potencial hídrico (Satoh y col., 2004; Hanson y col., 2008; Sharma y Verslues, 2010; Funck y col., 2010; Verslues y Sharma 2010). Por otra parte, estos genes son opuestamente regulados por el estrés salino. En esta condición, se reprime la expresión de *ProDH1* y se induce la de *ProDH2* (Funck y col., 2010). Sugiriendo que, estos genes deben ser regulados diferencialmente. En el promotor de *ProDH1* existen dos regiones con secuencia ACTCAT conocidos como elementos de respuesta a Pro e hiposmolaridad (PRE). Estos elementos son requeridos para la inducción de este gen por Pro exógena. A estos sitios se unen factores de transcripción bZIP (*basic leucin zipper protein*) del grupo S como AtbZIP53 y C como bZIP10 y bZIP63 formando heterodímeros que estimulan la expresión de *ProDH1* (Satoh y col., 2002; 2004; Weltmeier y col., 2006). Por su parte, en el promotor de *ProDH2* no se han detectado sitios PRE, pero sí se conoce que el factor de transcripción bZIP11 del grupo S, modula su expresión en respuesta a sacarosa (Hanson y col., 2008). Las diferencias detectadas en los niveles de expresión de cada gen y su regulación transcripcional a nivel tisular y bajo condiciones de estrés, sugieren que las dos isoformas de ProDH podrían cumplir roles distintos, como también se ha propuesto en otras especies (Ribarits y col., 2007; Funck y col., 2010; Fäes y col., 2014).

Hasta el momento no se conoce acabadamente la regulación de estos genes bajo estrés biótico. En especial la expresión de *ProDH2* ha sido escasamente estudiada. Se ha detectado que este gen presenta leves variaciones de expresión frente a muchas condiciones de estrés mientras que en patogénesis está fuertemente inducido al igual que *ProDH1* (Figura 2 C). Por esta razón, es interesante evaluar los factores que regulan a cada gen y la función de cada isoforma en el desarrollo de defensas contra patógenos.

### **Transporte de Pro, P5C y Glu**

Como se mencionó anteriormente, las vías de síntesis y catabolismo de Pro están compartimentalizadas a nivel subcelular en plantas. Esto requiere que Pro y los metabolitos asociados sean vehiculizados entre el citosol/cloroplastos y las mitocondrias para su procesamiento.

Ensayos de captación de Pro realizados con mitocondrias aisladas de espinaca (*Spinacia oleracea*) demostraron que a bajas concentraciones, Pro es transportada hacia la matriz mitocondrial de manera activa (con requerimiento de ATP) evidenciando la existencia de transportador/es (Yu y col., 1983). Años más tarde, dos transportadores de Pro fueron

caracterizados en mitocondrias de trigo (*Triticum durum*), uno de ellos corresponde a un uniporter de Pro que transporta el aminoácido hacia la matriz mitocondrial y el otro a un antiporter Pro/Glu (Di Martino y col., 2006). Sin embargo, los genes que codifican para estas proteínas aún no han sido identificados en ninguna especie de planta. Además, existen varios transportadores básicos de aminoácidos (BAC) que podrían trasladar Pro (Toka y col., 2010) Orn, y Arg (Hoyos y col., 2003; Palmieri y col., 2006) a través de la membrana mitocondrial. Por el contrario, existe menos conocimiento sobre el transporte de Pro desde los cloroplastos, lo que sería necesario para sostener la síntesis de Pro en esta organela.

En lo que respecta al transporte intercelular de Pro, en *Arabidopsis* se han identificado tres transportadores por comparación de secuencia y complementación de mutantes de levadura. Estos son, ProT1 (*Proline Transporter 1*), ProT2 y ProT3. Los tres se localizan en la membrana plasmática, y permiten transportar Pro, GABA y glicina betaína con distintas afinidades (Rentsch y col., 1996; Grallath y col., 2005). Por otra parte, otros transportadores de aminoácidos de la familia de los aminoácidos/auxinas/permeasa (AAP, a la que pertenecen los ProT) y de la familia aminoácidos/poliaminas/colinas pueden participar en el transporte de Pro a través de la membrana plasmática (Lehmann y col., 2010; 2011; Rentsch y col., 2007).

Un estudio reciente a nivel de organismo demostró que bajo condiciones de estrés hídrico la síntesis y el catabolismo de Pro ocurren en órganos distintos. Mientras el anabolismo de Pro se activa en la parte aérea de la planta, su consumo ocurre en el ápice radicular, sugiriendo un transporte de Pro desde los tejidos que actúan como fuente a otros que lo hacen como sumidero (Sharma y col., 2011). Como se menciona más adelante, este hallazgo indica que bajo estrés las plantas podrían movilizar el poder reductor generado desde tejidos donde su acumulación puede resultar tóxica, a otros donde se lo utiliza como fuente de energía para el crecimiento.

## **Pro y estrés abiótico**

La acumulación de Pro ocurre en numerosas especies de plantas crecidas en condiciones ambientales extremas como salinidad, estrés osmótico, exposición a temperaturas extremas, metales pesados, exceso de luz o radiación uv (Szabados y Savoure, 2010; Verslues y Sharma

2010). En plántulas expuestas a estrés osmótico este aminoácido puede alcanzar niveles 100 veces mayores al contenido basal (Verbruggen y Hermans 2008). Esta acumulación, se asocia con la inducción de las vías de síntesis y la represión de las vías de catabolismo. Luego, durante la recuperación, se activa la degradación del aminoácido que aporta energía para el tejido en recuperación (Verslues y Sharma 2010; Szabados y Savoure, 2010). Estas variaciones responden principalmente a la regulación transcripcional de *P5CS1* y *ProDH1* (Kiyosue y col., 1996; Nanjo y col., 1999; Mani y col., 2002; Miller y col., 2009; Sharma y Verslues, 2010). El incremento de Pro se considera una respuesta adaptativa a condiciones desfavorables, habiéndose demostrado una correlación entre dicha acumulación y la tolerancia al estrés. Sin embargo, aún no está claro cómo la acumulación de Pro favorece temporal y espacialmente la resistencia (Verslues y Sharma, 2010; Szabados y Savoure, 2010). Las características propias de Pro, y la estimulación de su metabolismo, podrían contribuir a esta tolerancia de diversas maneras:

- Ajuste osmótico. Pro es un osmolito compatible, una molécula de bajo peso molecular, normalmente en estado zwitteriónico, altamente soluble que puede acumularse a altos niveles sin afectar la homeostasis celular. Su incremento permite compensar la reducción del potencial hídrico de suelo manteniendo el contenido de agua y turgor celular.
- Protección de estructura celular. Pro puede establecer interacciones hidrofílicas y puentes de hidrógeno que permiten mantener la conformación estructural de proteínas en condiciones de deshidratación. Además, puede funcionar como una chaperona que protege la integridad de proteínas y mejora su actividad. Esto ha sido observado en estudios con la M4-lactato deshidrogenasa bajo temperaturas extremas, con la nitrato reductasa en estrés osmótico y en respuesta a metales pesados y con ribonucleasas y reductasas expuestas a arsenato (Rajendrakumar y col., 1994; Sharma y Dubey, 2005, Mishra y Dubey, 2006). En ese sentido, también se ha detectado que Pro puede proteger al Complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC) bajo estrés salino, lo que le permitiría funcionar estabilizando la mETC (Hamilton y Heckathorn, 2001).
- Buffer redox. El metabolismo de Pro puede regular el balance redox celular gracias a su compartimentalización. Las enzimas de síntesis consumen poder reductor en citosol y/o cloroplasto, mientras que las de catabolismo aportan poder reductor a la mitocondria, permitiendo su relocalización. Por un lado, esta capacidad podría ser importante para impedir la fotoinhibición que normalmente ocurre durante periodos de estrés. En esta

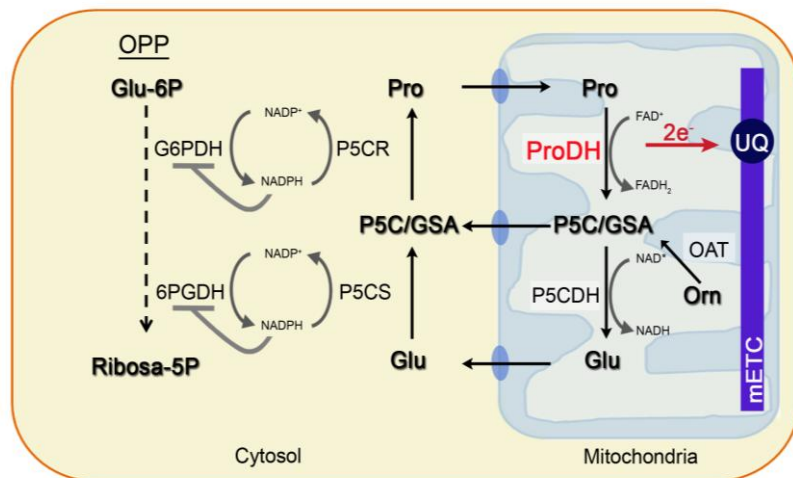
condición, el ciclo de Calvin se ralentiza y disminuye el consumo de NADPH y la generación NADP<sup>+</sup> en la cadena respiratoria cloroplástica (cETC). El NADP<sup>+</sup> que normalmente funciona como aceptor de electrones es bajo y el exceso de electrones es transferido al oxígeno molecular generando así especies reactivas del oxígeno (ROS). Por esto, la síntesis de Pro en cloroplasto, permite incrementar los niveles de NADP<sup>+</sup> y mantener un flujo normal de electrones en la cETC evitando el daño oxidativo.

Por otra parte, el metabolismo de Pro también puede participar en la regulación de la vía de las pentosas fosfato (OPP) (Figura 3). La etapa inicial u oxidativa de ésta ocurre tanto en el citosol como en los cloroplastos. Esta etapa es catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6GPDH) que generan NADPH. La primera enzima es la encargada de catalizar el paso limitante de esta vía y ambas son inhibidas por altas concentraciones de este pirimidin-nucleótido. Por ello, el consumo de NADPH que acompaña a la síntesis de Pro en citosol y cloroplasto, podría permitir que las enzimas G6PDH y 6GPDH sigan funcionando mientras aportan NADPH.

- Almacenamiento y transferencia de poder reductor y nitrógeno. En concomitancia con el punto anterior, la compartimentalización, transporte y temporalidad en síntesis y catabolismo permiten redistribuir y almacenar poder reductor y nitrógeno. Estos son rápidamente utilizados durante la recuperación cuando se activa el catabolismo, permitiendo reanudar el crecimiento de la planta, siendo esto importante en la tolerancia al estrés (Hayano-Kanashiro y col., 2009; Sharma y col., 2011).
- Almacenamiento de energía. El catabolismo completo de una molécula de Pro genera 30 equivalentes de ATP. De este modo, en asociación con los puntos anteriores la acumulación de este aminoácido puede permitir una rápida y fácil disponibilidad de energía durante la recuperación. Por ejemplo, en insectos se produce un alto consumo de Pro durante el vuelo indicando que puede ser una importante fuente de ATP (Crabtree y col., 1970; Barker y Lehner, 1972).
- Neutralizante de ROS. En el año 1989 Smirnoff y Cumbes propusieron que Pro podría actuar por sí misma como antioxidante de ROS. Posteriormente, sugerencias de que actuaría eliminando oxígeno singlete fueron descartadas (Alia y col., 2001; Signorelli y col., 2013a). Sin embargo, Signorelli y col. (2014) propusieron que Pro sería capaz de secuestrar el radical oxidrilo (OH<sup>·</sup>) por un ciclo Pro-P5C-Pro, en el cual fija OH<sup>·</sup> generando dos moléculas de agua y P5C, el cual probablemente P5CR transforma a Pro. Hasta el

momento, no se ha comprobado este mecanismo *in vivo* pero, el efecto antioxidante de Pro se ha observado en hongos, levaduras, células humanas y plantas, ya sea en tratamientos con Pro exógena, sobre-expresantes o mutantes *P5CS* (Székely y col., 2008; Szabados y Savoure, 2010; Ben Rejeb y col., 2014). Además, Pro podría participar indirectamente en la detoxificación de ROS estabilizando la actividad de enzimas antioxidantes (Hoque y col., 2009; Islam y col., 2009). En ese sentido, bajo estrés salino la mutante *p5cs1* reduce la actividad de enzimas del ciclo glutatión-ascorbato, acumula  $H_2O_2$ , e incrementa la peroxidación lipídica y el daño oxidativo de la clorofila (Székely y col., 2008).

Como puede observarse, la versatilidad que presenta Pro y su metabolismo permitirían estimular la tolerancia de las plantas al estrés de muy diversas maneras. Incluso en distintos estreses podría tener una función diferente. Así en salinidad por ejemplo, podría llevar a cabo ajustes asociados a regulación de ROS, mientras en estrés osmótico podría asociarse principalmente a respuestas como osmoprotector y regulador redox u otras funciones metabólicas (Verslues y Sharma, 2010).



**Figura 3. Inter-relación entre el metabolismo de Pro y la vía oxidativa de las pentosas fosfato OPP.** Resumen de la vía OPP mencionando solo el producto inicial (glucosa-6 fosfato; Glu-6P) y final (ribosa-5P). Se destacan las dos enzimas que participan de los pasos iniciales de la OPP que generan NADPH y son inhibidas por este producto. Estas reacciones pueden ocurrir tanto en citosol como en cloroplasto, al igual que la síntesis de Pro, sugiriendo que el consumo de NADPH por P5CS y P5CR podría evitar la inhibición de la OPP.

Curiosamente, la aplicación exógena de Pro en tejidos de plantas tiene distintos efectos dependiendo de su concentración. A altos niveles este tratamiento puede resultar tóxico y a

bajas concentraciones puede promover la tolerancia al estrés. Una de las hipótesis para explicar este comportamiento diferencial es que en el primer caso se inhibiría la síntesis de Pro y con ello su actividad como regulador redox (Hayat y col., 2012), mientras que en el segundo la activación de la síntesis y el catabolismo actuarían como buffer redox, produciendo en paralelo ATP. Por otra parte, la acumulación de P5C también se ha descrito que es tóxica tanto en levaduras como plantas, efecto que se ha asociado con la producción de ROS (Deuschle y col., 2004; Nomura y Takagi 2004), aunque no se han aportado suficientes evidencias que sustenten este tipo de efecto.

## Patogénesis e inmunidad vegetal

Las plantas pueden ser atacadas por una amplia variedad de patógenos microbianos e insectos herbívoros. Estos organismos se clasifican básicamente en biótrofos y necrótrofos de acuerdo a su estilo de vida. Los primeros toman nutrientes de tejidos vivos del hospedante y los segundos promueven la muerte de las células vegetales, generando fitotoxinas y enzimas que degradan la pared celular, para luego alimentarse a partir de los residuos celulares. Existen patógenos que exhiben los dos comportamientos en distintos estados del ciclo de vida y son denominados hemibiótrofos (Glazebrook y col., 2005).

*Arabidopsis* es infectada por los tres tipos de patógenos. Entre ellos, los más estudiados son los oomicetes *Phytophthora parasitica*, *Hyaloperonospora* y el hongo *Golovinomyces orontii* como modelos biótrofos y los hongos *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola* y la bacteria *Pectobacterium caratovara* como modelos necrótrofos. Finalmente, la bacteria *Pseudomonas syringae*, es el modelo clásico de patógeno hemibiótrofo.

*Pseudomonas syringae* ingresa a la planta por estomas o lesiones y se multiplica en los espacios intercelulares del mesófilo y las regiones perivasculares (Figura 4 A). En estadios tardíos de la infección desencadena diversas alteraciones que terminan ocasionando la clorosis y muerte del tejido vegetal. Sin embargo, normalmente se estudia la fase temprana o biótrofa de su infección y esta es la fase que se analiza mayormente en esta tesis. La cepa DC3000 del patovar tomato (*Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000; *Pst* DC3000) libera diversos compuestos que contribuyen a su patogénesis, entre ellos coronatina (COR). Además, utiliza un Sistema de Secreción Tipo III para transportar activamente proteínas y otros compuestos dentro de la célula vegetal.

Por otra parte, el proceso infectivo de *Botrytis cinerea* se inicia cuando un conidio (estructura reproductiva asexual) alcanza el tejido vegetal y comienza a geminar y desarrollar estructuras en forma de garras (apresorios) que utiliza para penetrar la superficie vegetal, el acceso a las hojas suele verse favorecido en heridas o estomas (Figura 4 B). El micelio (conjunto de hifas) crece sobre la epidermis, y secretan factores de virulencia como enzimas, toxinas (ej. boctinolide y botridial) y ácido oxálico (AO), que estimulan la muerte de las células del hospedante. Luego estas hifas crecen sobre los restos de tejidos vegetales y se alimentan de los mismos. Posteriormente, generan conidióforos que permiten dispersar conidios para la infección de nuevos tejidos vegetales (Van Kan y col., 2006; Choquer y col., 2007; Windram y col., 2012).

El sistema inmune en plantas carece de células inmunes móviles que detecten compuestos propios y exógenos. Sin embargo, las plantas son capaces de establecer respuestas inmunes con alta especificidad, con restricción de la autoinmunidad, pudiendo frecuentemente desarrollar un sistema de memoria, que se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Spoel y Dong, 2012).

Las plantas presentan defensas estructurales generales, que impiden el avance de agentes exógenos, y defensas inducibles específicas, que se activan por reconocimiento del patógeno. Las defensas estructurales son la primera barrera contra los fitopatógenos. Entre ellas se puede mencionar la cutícula, ceras, la pared celular, metabolitos secundarios antimicrobianos, tamaño de estomas y estructura de la epidermis.

Las defensas inducidas involucran el reconocimiento del patógeno por la planta y la activación de cascadas de señales que determinan la resistencia. En relación a la inmunidad contra hemi/biótrofos un modelo de respuestas a patógenos es el de zigzag (Figura 4). Según este existen defensas inducibles basales (PTI) más ancestrales y respuestas más específicas activadas por el reconocimiento de cepas infectivas que secretan efectores (ETI; Figura 4 C; Jones y Dangl, 2006)

La PTI o Inmunidad activada por PAMPs (*PAMP-triggered immunity*) se induce tras el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) o Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs) tales como, flagelina, quitina, glicoproteínas, lipopolisacáridos, el factor de elongación Ef-Tu o de moléculas propias de la planta producidas durante los daños causados por la infección de patógenos llamadas, Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMPs) como por ejemplo, oligogalacturónidos derivados

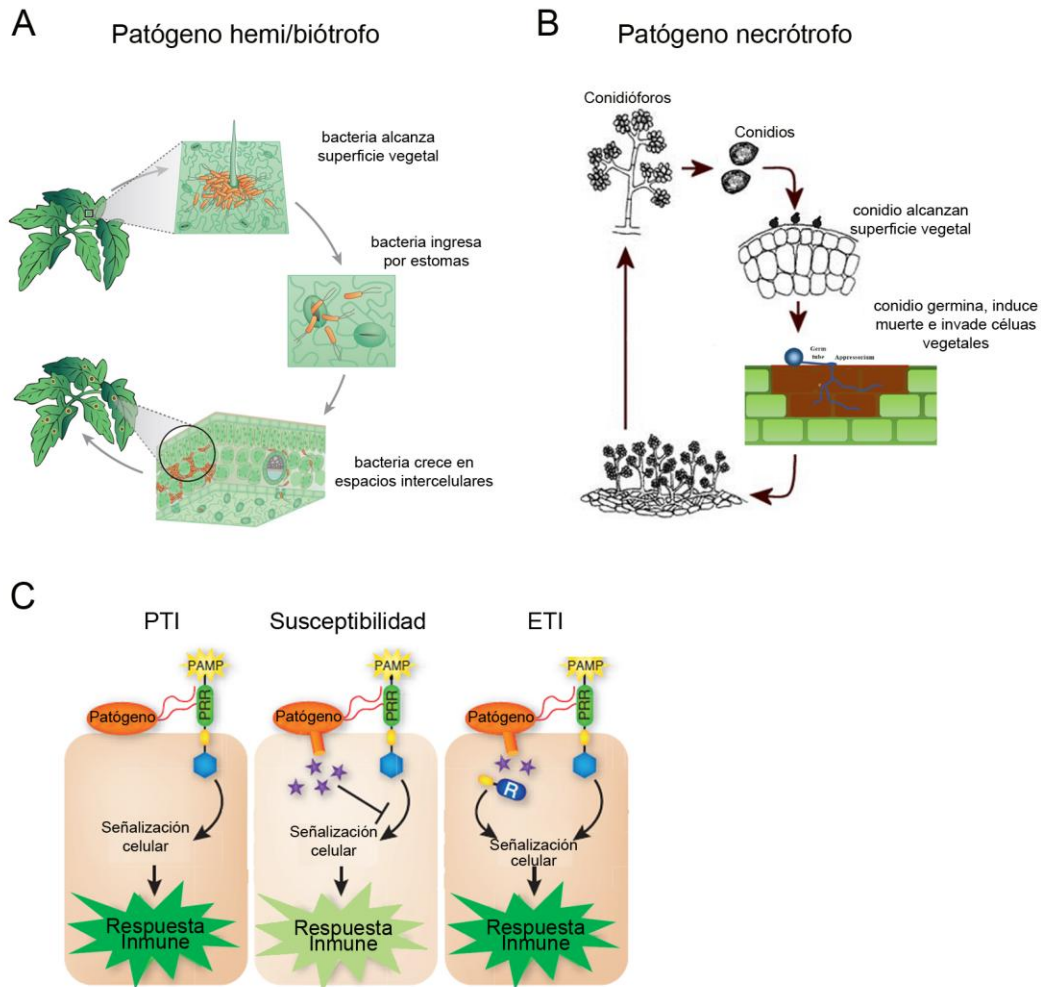


de la degradación de la pectina de la pared celular. El reconocimiento de los mismos se lleva a cabo por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs Patterns Recognitions Receptors) localizados en membrana celular de la planta. Este reconocimiento desencadena una serie de señales que involucra estimulación de fosforilación dependiente e independiente de MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*), apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^{+}$ , generación rápida y transitoria de ROS apoplástico (aROS), que activan el cierre de estomas, la deposición de calosa en la pared celular y la inducción de genes de defensa (Kadota y col., 2015; Mersmann y col., 2010; Galleti y col., 2008; Asai y col., 2002; Pandey y Somssich, 2009).

Estas defensas pueden ser efectivas en detener el crecimiento de numerosos microorganismos. Sin embargo, algunas cepas de patógenos, a las que se denomina “virulentas” (vir), evolutivamente adquirieron la capacidad de suprimir la defensa basal y pueden crecer en el hospedador. Estos patógenos denominados “adaptados” producen factores de virulencia llamadas “efectores” que inhiben la PTI afectando la detección de PAMPs, cascadas de fosforilación, expresión génica, señalización de fitohormonas o tráfico vesicular (Chinchilla y col., 2007; Zhang y col., 2007; Göhre y col., 2008; Navarro y col., 2008; Gimenez-Ibanez y col., 2014).

Las plantas a su vez, habrían coevolucionado con estas cepas virulentas adaptadas y adquirido una segunda línea de defensa en la cual receptores intracelulares (proteínas R) reconocen a estos efectores específicos del patógeno desencadenando la Inmunidad Activada por Efectores (*Effector-triggered immunity*, ETI) (Jones y Dangl, 2006). La ETI es una respuesta acelerada y amplificadora que usualmente genera muerte celular en lo que se conoce como Respuesta Hipersensible (HR). Las cepas que activan la ETI se denominan “avirulentas” (avr).

La resistencia contra necrótrofos está menos estudiada pero se conoce que existen interacciones donde la activación de las defensas de la planta favorece el crecimiento del patógeno. Así, por ejemplo, los patógenos necrótrofos exponen PAMPs (quitina y endopoligalacturonidas) durante la infección y producen DAMPs (oligogalacturonidos) que activan defensas que son contrarrestadas por la liberación de toxinas por parte del patógeno (Faris y col., 2010; Kim y col., 2011). A su vez, el crecimiento del necrótrofo puede ser favorecido por algunas defensas de la planta que promueven la muerte celular (Cook y col., 2015).



**Figura 4. Interacciones planta-fitopatógenos.** (A) Diagrama del ciclo de infección de *P. syringae*, las bacterias alcanzan la superficie de una hoja sana, se acumulan e ingresan por estomas al mesófilo donde crecen en los espacios intercelulares. Adaptada de Xin y col. (2013). (B) Diagrama del ciclo de vida de *B. cinerea*, los conidios alcanzan la superficie de una hoja, germinan, producen apresorios y liberan toxinas que generan la muerte de las células vegetales sobre las que las hifas crecen y alimentan. (C) Modelo de zigzag de interacción planta-patógeno. Las plantas desencadenan una respuesta de defensa primaria, PTI frente al reconocimiento de PAMPs o DAMP por parte de los receptores PRR. Esta defensa puede detener el avance del patógeno, pero estos a su vez pueden liberar efectores que detengan la PTI. La planta puede reconocer efectores a partir de proteínas R de resistencia y desencadenar una respuesta ETI como la HR. Adaptado de Pieterse y col. (2009).

### **Respuesta Hipersensible (HR)**

En esta respuesta la detección del efector patogénico o factor de avirulencia (avr) por receptores R de la planta activa cascadas de señalización que finalmente determinan el desarrollo de muerte celular restringida al sitio de infección. Es una defensa efectiva contra patógenos biotrofos ya que se caracteriza por el desarrollo de una lesión seca, localizada y de

bordes definidos que evita el acceso del patógeno a agua y nutrientes y de ese modo, su crecimiento (Mur y col., 2008). Entre los eventos tempranos de la HR se destaca la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, la producción de ROS apoplástico y especies reactivas del nitrógeno intracelulares (RNS) (Delledonne y col., 1998; 2001, Durner y col., 1998). La principal fuente de aROS es la NADPH oxidasa de membrana, denominada “*Respiratory burst oxidase homologs*” (RBOH). En *Arabidopsis*, existen 10 genes que codifican para esta proteína sin embargo, se ha detectado que las isoformas RBOHD y RBOHF son las principales responsables de la generación de ROS durante la HR (Torres y Dangl, 2005; Torres y col., 2010). Además, las peroxidasas PRX33 y PRX34 podrían participar en la generación de aROS como lo hacen en algunas respuestas de PTI (Bolwell y col., 2002; Mur y col., 2008; O’Brien y col., 2012). Por otra parte, la generación de ROS mitocondrial y cloroplástica también son importantes durante esta respuesta siendo determinantes en la muerte celular (Krause y Durner, 2004; Mittler y col., 2004; Yao y col., 2004; Mur y col., 2006; Mur y col., 2008). Sin embargo, se desconocen las enzimas que generan ROS en estas organelas durante la HR.

Otra de las características de la HR, es la acumulación de la fitohormona ácido salicílico (SA), la cual estimula la producción ROS y RNS, siendo estas a su vez activadoras de la vía de SA. Esta hormona activa la transcripción de numerosos genes que participan de la defensa tales como los que codifican para proteínas relacionadas a la patogénesis (*Pathogenesis Related*, PRs). Además, el SA también estimula el desarrollo del SAR que inmuniza a la planta frente a futuras infecciones de amplio rango (Dempsey y Klessig, 2012; Fu y Dong, 2013).

Tras el reconocimiento específico del efector, también se generan metabolitos secundarios antimicrobianos (defensinas y fitoalexinas), proteínas PRs, (quitinasas y glucanasas) y se activan proteasas tipo caspasas, que probablemente actúan como enzimas de procesamiento vacuolar (VPEs), que dirigen finalmente a la ruptura del tonoplasto, y generación “autofagosomas” (Mur y col., 2008).

### **Mitocondria y cloroplastos en respuestas de defensa**

El funcionamiento de la mitocondria afecta el desarrollo de distintas defensas contra patógenos. En fases tardías de HR, estas organelas se dilatan y presentan poros en su membrana que favorecen la liberación de citocromo C al citosol y la pérdida del potencial de membrana que lleva a la inhibición de la producción de ATP (Bestwick y col., 1995; Naton y col., 1996; Xie y Chen, 2000; Møller, 2001; Yao y col., 2002; Krause y Durner, 2004; Yao y

Greenberg, 2006). Sin embargo, en etapas previas a la disfunción de la mitocondria se detectan cambios que mantienen su integridad y estimulan la producción de ROS en esta organela, necesarios para el normal desarrollo de la posterior muerte celular programada (Møller, 2001; Yao y col., 2002; Yao y Greenberg, 2006; Mur y col., 2008).

La mitocondria es blanco de regulación tanto por parte del sistema de defensa (JA, SA, NO), como de efectores bacterianos (HopG1) que alteran su función modificando ya sea la respiración, el potencial de membrana y producción de ATP o la generación de ROS mitocondrial (mROS) (Xie y Chen, 1999; Lam y col., 2001; Krause y Durner, 2004; Norman y col., 2004; Mur y col., 2008; Zhang y Xing, 2008; Block y col., 2010). El funcionamiento del metabolismo mitocondrial y especialmente de la mETC son necesarios para el desarrollo de ETI y PTI. Durante estas respuestas se ha detectado generación de ROS en esta organela. En *N. tabacum* se produce una rápida acumulación de  $O_2^-$  mitocondrial en respuesta a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012), y en *Arabidopsis* se acumulan mROS luego del tratamiento con el péptido harpin Z de *P. syringae* (Krause y Durner, 2004). En el mismo sentido, la inhibición de los Complejos I y II de la mETC desacopla el transporte de electrones, la producción de ROS por la RBOHD y las respuestas de defensa tanto de PTI como ETI (Gleason y col., 2011; Fabro y col., 2016). Además, defectos asociados a la fotorespiración como a la deficiencia de la ATPasa mitocondrial AtOM66, reducen la producción de mROS, afectando el desarrollo de la ETI (Moreno y col., 2005; Zhang y col., 2014). En sentido inverso una mutante en AtPAM16 que forma parte del motor de importación de la membrana interna mitocondrial y participaría del transporte de reguladores negativos de las defensas hacia el interior de la mitocondria, es más resistente a patógenos biótrosos (Huang y col., 2013). Además las alteraciones de la mETC podrían generar una señal retrograda y activar genes de defensa en el núcleo (Amirsadeghi y col., 2007).

Respecto a las defensas contra necrótrofos, alteraciones del Complejo II y de la fotorespiración mitocondriales generan susceptibilidad a *Rhizoctonia solani*, *A. brassicola*, y *B. cinerea* (Moreno y col., 2005; Gleason y col., 2011). Por otro lado, la infección de tomate con *B. cinerea* reduce la capacidad antioxidante de la mitocondria disminuyendo el contenido de ascorbato y glutatión, con acumulación de sus formas oxidadas (Kuzniak y Sklodowska, 2004),

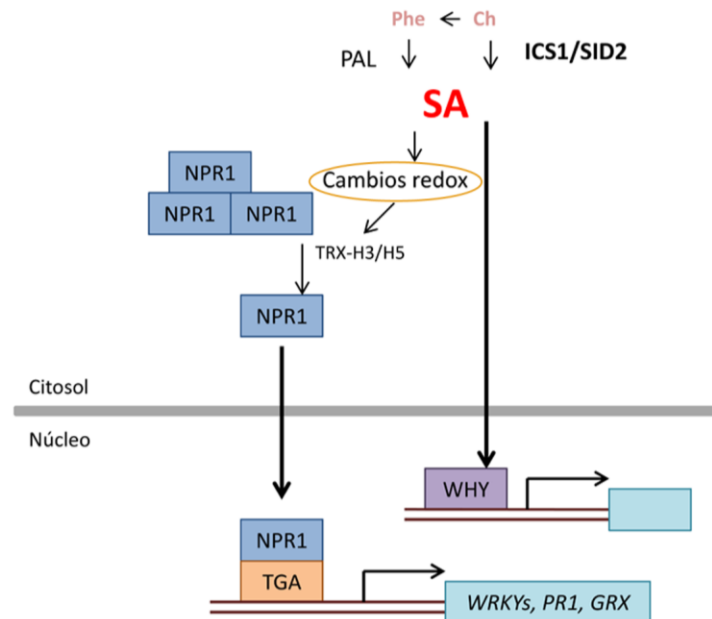
por lo que la mitocondria podría ser un blanco del patógeno para estimular la producción de ROS.

En cuanto a la participación de los cloroplastos en la inmunidad vegetal, muchos de los genes de defensa así como la formación de una lesión similar a la HR son afectados por luz. Esto sugiere que los cloroplastos participan en el desarrollo de estas respuestas (Dietrich y col., 1994; Greenberg y col., 1994; Genoud y col., 2002). Por un lado, en esta organela ocurre parte de la síntesis de SA (Wildermuth y col., 2001; Nawrath y col., 2002). Por otra parte, el cloroplasto es una importante fuente de ROS (cROS) y la alteración de su metabolismo puede incrementar su producción y activar respuestas tipo HR (Mock y Grimm, 1997; Mock y col., 1999). Existen efectores bacterianos que afectan a esta organela. Entre ellos HopI1 se une a la proteína chaperona Hsp70, altera la estructura de los tilacoides, reduce la producción de SA y afecta la defensa contra *P. syringae* (Kelley y col., 1998; Jelenska y col., 2007). El otro efector de *P. syringae* HopN1, es una cistein-proteasa que degrada la proteína PsbQ del Fotosistema II, inhibe el desarrollo de muerte y producción de ROS en interacciones huésped y no huésped en tomate, *N. tabacum* y Arabidopsis (Lopez-Solanilla y col., 2004; Rodriguez-Herva y col., 2012). A su vez efectores del hongo *Melanopsora* sp. CTP1, CTP2, CTP3, y de *Puccinia stiiforme* PST02549, PST03196, y PST18220 se localizan en cloroplasto siendo el primero también detectado en mitocondria (Petre y col., 2015 a, b). La generación cROS es importante en el desarrollo de las defensas. Plantas transgénicas de tabaco que expresan una flavodoxina de la cianobacteria *Anabaena* sp. que reduce el nivel de cROS, genera una respuesta similar a HR reducida frente la infección de *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Zurbriggen y col., 2009). Además los fitocromos regulan respuestas de defensas, ya que mutantes en los sistemas de detección de rojo (R) y rojo lejano (FR) reducen las defensas tanto al necrótrofo *Fusarium oxysporum*, como a *Pst*. Así también la baja relación FR/R genera susceptibilidad a *B. cinerea* (Genoud y col., 2002; Cerrudo y col., 2012; Kazan y col., 2012).

## Hormonas de defensa

Distintas fitohormonas activan las vías de inmunidad. Las más estudiadas son el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs), auxinas, citoquininas (CKs), brasinosteroides, y óxido nítrico (NO). La concentración, sincronización e interacción (sinérgicas o antagónicas) entre ellas, permiten ajustar la respuesta de defensa contra cada tipo de patógeno. De todos estos compuestos, SA y JA son reconocidas como las principales inductoras de defensa biótica (Pieterse y col., 2012).

Vía de señalización de ácido salicílico (Figura 5): es generalmente efectiva contra patógenos biótropos. El SA es un compuesto fenólico generado a partir del corismato por dos vías alternativas. Una de ellas involucra a la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y la otra a la enzima isocorismato sintetasa (ICS/SID2). Esta última es la principal vía responsable de la acumulación de SA en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *P. syringae* (Wildermuth y col., 2001).



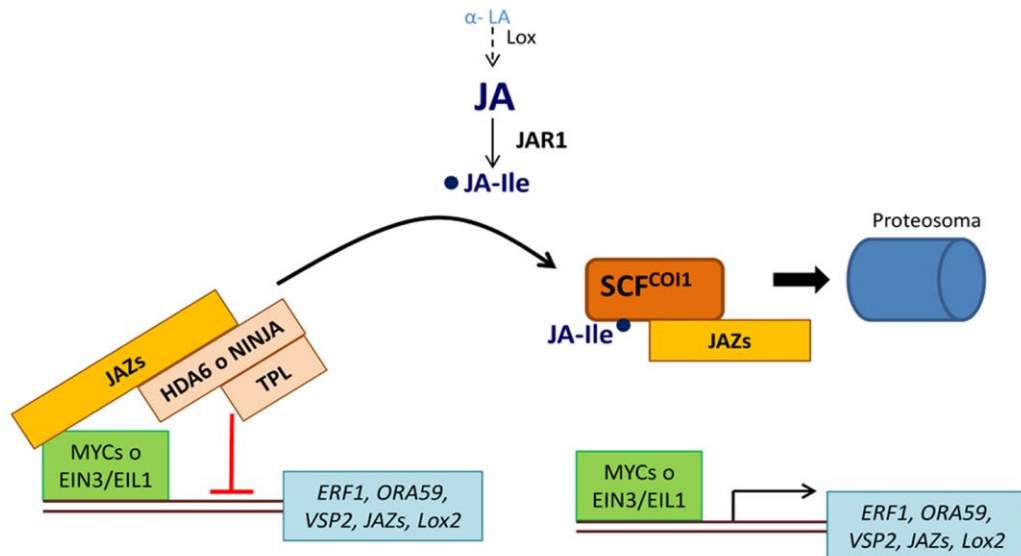
**Figura 5. Vías de señalización sensible a SA.** El SA se sintetiza a partir de corismato (Ch) o fenilalanina (Phe) a partir de la ICS1 o PAL, respectivamente. Su acumulación genera variaciones redox que resultan en la reducción de NPR1 por TRX3/5 y la formación de monómeros que ingresan al núcleo donde NPR1 controla la expresión génica por asociación a los factores de transcripción (FT) TGA. Una vía independiente de NPR1 es regulada por TF de la familia Whirly (WHY). Adaptado de Pieterse y col. (2012).

El regulador central de la vía de SA es la proteína NPR1 (*Non-Expressor of PR genes 1*), que actúa como un co-activador transcripcional de numerosos genes de defensa (Dong, 2004; Moore y col., 2011; Caarls y col., 2015). NPR1 es modulado por SA a través de distintos mecanismos. Por un lado, el SA induce variaciones redox las cuales estimulan la reducción de NPR1 por las tioredoxinas 3 y 5 (TRX-H3 y TRX-H5). Este proceso produce la monomerización de NPR1, desfavoreciendo su conformación oligomérica que determina su residencia en el citosol. Como monómero NPR1 ingresa al núcleo donde regula la expresión génica al interactuar con factores de transcripción TGA (Mou y col., 2003). Esta vía lleva a la inducción de los genes *PR* que conforman un grupo diverso que codifica para distintas proteínas con actividad antimicrobiana (Van Loon y col., 2006). Entre ellos, el mejor caracterizado es *PR1*, considerado un marcador robusto de la respuesta al SA. Por otro lado, el SA regula a NPR1 en su estado monomérico nuclear. Los homólogos NPR3 y NPR4 pueden unirse a NPR1 y determinar su degradación, dependiendo de la concentración del SA (ya sea alta o baja), mientras que a concentraciones intermedias NPR1 se acumula en el núcleo. Además, la proteólisis de NPR1 también es importante en el desarrollo de la muerte celular programada durante la HR (Fu y col., 2012).

Por otra parte, existen vías reguladas por SA de manera independiente a NPR1, las cuales responden principalmente a factores de transcripción de la familia WHIRLY (WHY) y se sugiere que WHY y NPR1 actuarían en paralelo en la regulación de la vía de SA (Vlot y col., 2009).

Vía de señalización de ácido jasmónico (Figura 6): esta cascada se activa principalmente en respuesta a patógenos necrótrofos y frente al ataque de insectos (herbivoría). El JA es producido a partir de oxilipinas, cuya síntesis se inicia a partir de la liberación de ácido  $\alpha$ -linoleico de la membrana plasmática (Gfeller y col., 2010). Una vez sintetizado el JA puede generar metil-jasmonato (meJA) por acción de la JA carboxil metiltransferasa (JMT) o puede ser conjugado a aminoácidos como por ejemplo isoleucina (Ile) por la enzima JAR1 (*JA responsive 1*), que genera jasmonil-isoleucina (JA-Ile), la forma bioactiva de JA en la defensa (Staswick y Tiryaki, 2004; Fonseca y col., 2009).

Los reguladores centrales de la vía de JA son la proteína F-box COI1 (*Coronatin insensitive 1*) y las proteínas represoras JAZ (*Jasmonate-ZIM*). En ausencia de JA, JAZ se asocia ya sea a los co-represores TPL (*TOPELESS*) vía la enzima adaptadora NINJA, o a HDA6 (*Histone deacetylases 6*). De este modo, se reprime la expresión de factores de transcripción de la vía de JA, entre ellos MYC2, EIN3 y EIL1. Por otra parte, COI1 es parte del complejo E3 ubiquitin ligasa SKP1-Culin-F-box ( $SCF^{COI1}$ ), que se une a las proteínas JAZ en presencia de JA-Ile. Eso induce la ubiquitinación de las proteínas JAZ y su subsecuente degradación vía proteosoma (Yang y col., 2009; Sheard y col., 2010; Pauwels y col., 2010; Pauwels y Goossens, 2011). De este modo, la vía de JA se mantiene constitutivamente reprimida y se des-reprime al sintetizarse JA (Memelink y col., 2009).



**Figura 6. Vías de señalización sensible a JA.** Tras el reconocimiento del patógeno, se activa la síntesis de JA a partir de ácido α-linoleico de membrana. JA es conjugado por JAR1 a Ile para generar la forma bioactiva JA-Ile. La unión de JA-Ile a  $SCF^{COI1}$  le permite unirse a JAZ y determinar su degradación. Este proceso permite la des-represión y expresión de genes de la vía de JA. Adaptado de Pieterse y col. (2012).

La cascada de señalización de JA tiene dos grandes ramas. Una vía involucra a factores de transcripción tipo Myc y es co-regulada entre ABA y JA. La otra, incluye a factores de respuesta a etileno/Apetala 2 (Ap2/ERF) y es co-regulada por JA y ET. Entre los genes marcadores de la vía de JA más estudiados podemos mencionar a *VSP2* (*Vegetative Storage Protein 2*), *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*) y *LOX 2* (*Lipoxygenasa 2*). Este último, codifica una



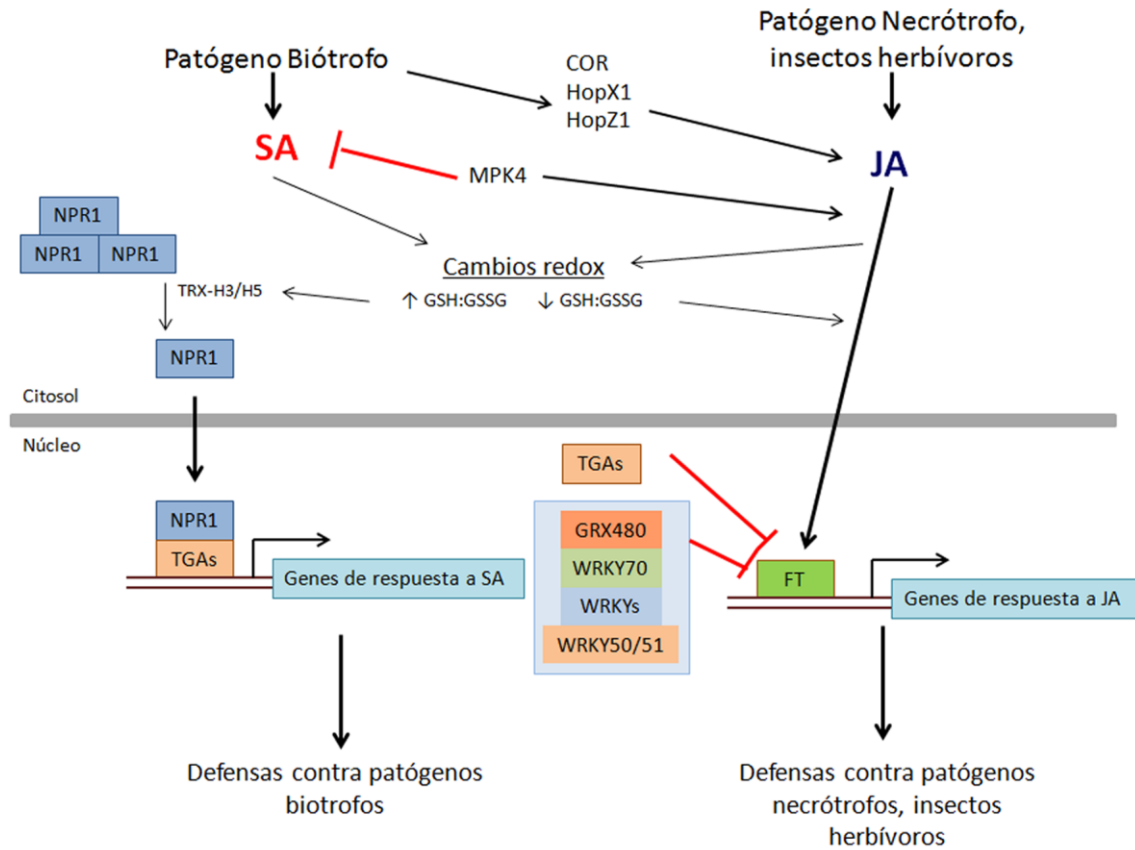
de las enzimas de síntesis de JA, por lo que es parte de una retroalimentación positiva de la vía. A su vez, entre los genes activados por JA también se encuentran aquellos que codifican para proteínas JAZ, generándose a su vez una retroalimentación negativa (Chini y col., 2007).

Intercomunicación entre vías de ácido salicílico y ácido jasmónico (Figura 7): Las vías de respuesta a SA y JA presentan interdependencia entre ellas y actúan en complejas interacciones. Otras hormonas también pueden participar y consecuentemente modular la respuesta final. ABA y ET actúan sinérgicamente en distintas respuestas señalizadas por JA. A su vez, auxinas, CKs y GA pueden inhibir procesos de defensa priorizando el crecimiento de la planta (Pieterse y col., 2012).

La interacción entre la vías de SA y JA puede ser antagónica, sinérgica o neutra, dependiendo del contexto en el que ocurra, siendo la primera condición la más generalizada. En las interacciones de *Arabidopsis* con *Pst* DC3000, *Pst AvrRpt2* o *B. cinerea*, aumentan los niveles de SA y de JA, pero una de las vías es preponderante en la inducción de defensas (De Vos y col., 2005; Liu y col., 2015; de Torres Zabala y col., 2015). La combinación de concentraciones de cada hormona, la cronología y la secuencia de activación de estas vías son determinantes para definir la preponderancia de una vía sobre la otra. Además, estos factores también afectan las asociaciones sinérgicas o antagónicas entre ellas (Mur y col., 2006; Koornneef y col., 2008; Leon-Reyes y col., 2010).

La interacción antagónica entre las vías de SA y JA afectan la resistencia contra patógenos con distintos estilos de vida. Por ejemplo, infecciones con los biótrosfos *Pst* o *H. arabidopsidis* que activan defensas dependientes de SA aumentan la susceptibilidad a patógenos que activan defensas dependientes de JA, tales como *Alternaria* y *B. cinerea* (Koornneef y col., 2008; Govrin y Levin 2000). A su vez, algunos patógenos evolutivamente adquirieron mecanismos para activar una vía en detrimento de la otra. Entre ellos, *P. syringae* libera la fitotoxina coronatina (COR) durante la infección de *Arabidopsis*. COR mimetiza al JA-Ile y suprime las defensas activadas por SA incrementando así la capacidad de crecimiento bacteriano en el hospedador. COR tiene múltiples efectos en la planta entre los que se puede mencionar la reapertura estomática que permite el ingreso del patógeno, la inhibición de respuestas que fortifican la pared celular luego del reconocimiento de PAMPs,

la generación de clorosis y la inducción de genes de respuesta a JA (Melotto y col., 2006; Geng y col., 2014). Además, *P. syringae* libera efectores que son capaces de activar la vía de JA. Entre ellos, HopZ1 y HopX1 estimulan la degradación de proteínas JAZ y así activan la vía de JA (Jiang y col., 2013; Gimenez-Ibanez y col., 2014).



**Figura 7. Interacción negativa entre vías de SA y JA.** Los patógenos biótrofos liberan compuestos como COR o efectores como HopX1 y HopZ1 que activan la vía de JA. MPK4 tiene un efecto reduciendo el nivel de SA y estimulando la vía de JA. Ambas hormonas generan un desbalance redox, SA incrementa un estado reducido y JA oxidado. La activación de los factores de transcripción TGAs, GRX480, WRKY70/50/51 inhibe a la vía de JA. Adaptado de Pieterse y col. (2012).

Dado su efecto en la patogénesis, la regulación negativa entre SA y JA ha sido muy estudiada. Se sabe que MAPK4 (*Mitogen-activated protein kinase 4*) regula negativamente la vía de SA y positivamente la señal de JA (Pieterse y col., 2012). Sin embargo, hasta el momento, se han descrito principalmente componentes de la vía de SA que afectan a la del JA o son blanco de regulación negativa por esta hormona, pero se conoce menos de los componentes de la vía de JA involucrados en estas interacciones. Algunas evidencias indican que SA antagoniza a JA por debajo de la actividad de COI1. Posiblemente, SA interfiera en la

activación de factores de transcripción de la vía de JA, como se describió para ORA59 (Caarls y col., 2015).

En la vía de SA, NPR1 es esencial en la supresión de genes de expresión de JA (Spoel y col., 2003). Además, varios genes de las familias WRKY, TGA y GRX activados por SA participan de la supresión de la vía de JA, siendo el más destacado el efecto de TGA2/5/6. Sin embargo, estos genes son suficientes pero no imprescindibles para la generación del antagonismo (Ndamukong y col., 2007; La Camera y col., 2011; Caarls y col., 2015).

Por otra parte, estas hormonas generan variaciones redox, las cuales parecen ser un factor importante en la interacción. SA dispara ciclos de reducción y oxidación que se detectan en el aumento de los niveles de glutatión total y una mayor tasa GSH/GSSG. Dichos incrementos coinciden con la fase de bloqueo de la vía de JA por SA (Koornneef y col., 2008). Por su parte, la activación de la vía de JA tiende a reducir los niveles totales de glutatión y la tasa GSH/GSSG hacia un estado más oxidado (Spoel y Loke 2011; Caarls y col., 2015). De esta manera la inter-regulación entre las vías también podría depender de los efectos que cada una de ellas genera sobre el estado redox celular (Caarls y col., 2015).

## **Metabolismo de Pro en patogénesis**

En los últimos años, se han desarrollado estudios que destacan la relevancia de este metabolismo durante respuesta de defensa contra patógenos. Una de las primeras evidencias, fue la inducción de la expresión del gen *P5CDH (FIS1)* en plantas de lino infectadas con el hongo biótrofo *Melampsora lini*. Los autores propusieron a esta respuesta como una adaptación del patógeno para disminuir los niveles de P5C y con ello, reducir la muerte celular y la HR (Ayliffe y col., 2002). Sin embargo, los mismos autores luego describieron que la mutación en este gen no afecta la susceptibilidad a *M. lini* (Mitchell y col., 2006). Por otra parte, en infecciones con *Agrobacterium tumefaciens* la aplicación de Pro exógena incrementa el desarrollo de tumores. En este caso, no se determinó cómo el aminoácido ejerce ese efecto (Haudecoeur y col., 2009), ni se estudio al metabolismo de Pro en esta interacción.

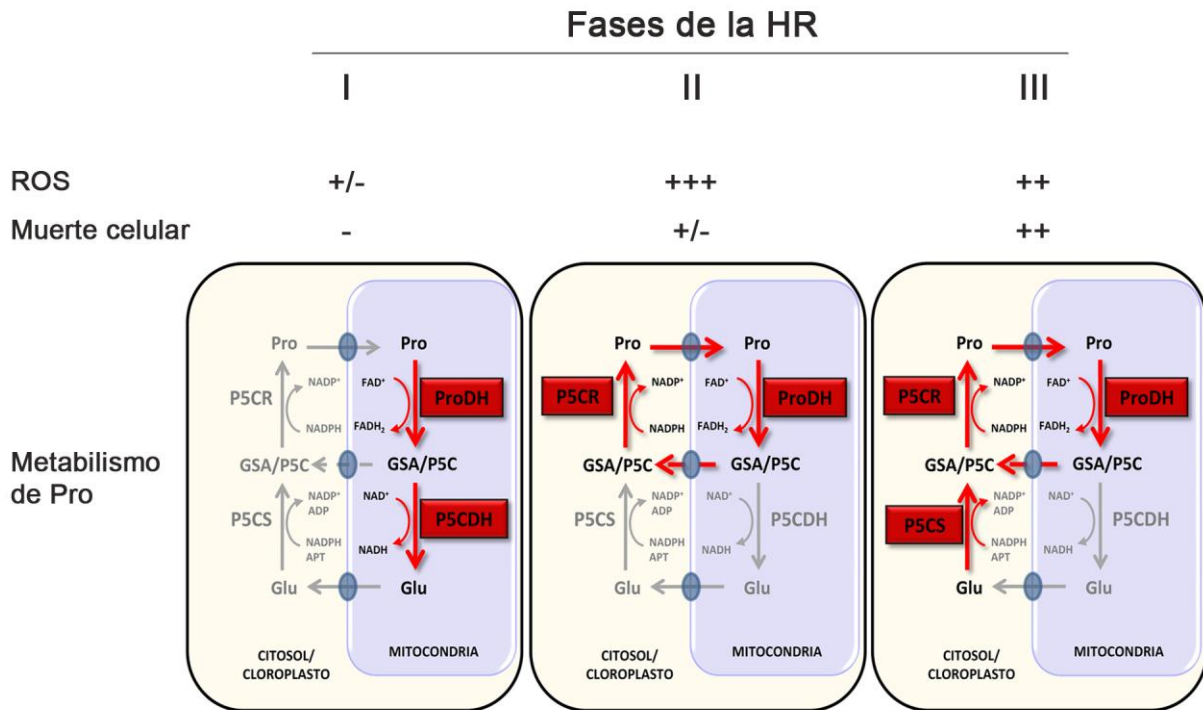
En los últimos 5 años se han descrito efectos del metabolismo de Pro sobre las respuestas de defensa contra patógenos. En *Arabidopsis* y *Nicotiana benthamiana*, el silenciamiento de *ProDH* incrementa la susceptibilidad a patógenos hemibiótrofos. En el primer caso se analizó la respuesta a cepas avirulentas de *Pst* con la planta hospedadora (Cecchini y col., 2011a) y en el segundo la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato T1* (*Pst T1*) para el cual *N. benthamiana* no es hospedante (Senthil-Kumar y Mysore, 2012). En ambos casos los tejidos infectados de esas plantas presentan menor producción de ROS, de muerte celular, una lesión más pequeña y mayor susceptibilidad. Estos estudios se desarrollaron de manera paralela a partir de preguntas distintas. En el primero el objeto fue determinar si el metabolismo de Pro cumplía un rol funcional en el desarrollo de la HR y si ProDH que se inducía de forma temprana afectaba a esta respuesta. En el segundo estudio, se realizó una búsqueda de plantas susceptibles en una colección de plantas silenciadas de *N. benthamiana* trabajando con un patógeno no huésped. Ambos enfoques experimentales resaltaron la relevancia de ProDH en el normal desarrollo de las defensas.

Monteoliva y col. (2014) estudiaron a ProDH en tres fases de la HR desencadenada por la infección de *Arabidopsis* con el patógeno huésped *Pst-AvrRpm1*. Las fases fueron determinadas en función de la generación de ROS y desarrollo de muerte celular (Figura 8). La fase I (alrededor de 6 hpi) precede a la producción masiva de ROS, la cual ocurre en la fase II (8 a 10 hpi) que coincide con el inicio de la muerte celular. Luego en la fase III (24-72hpi) disminuye la producción de ROS y se termina de establecer la muerte. El análisis de actividad ProDH mediante el uso de Pro radiactiva y la cuantificación de aminoácidos por HPLC a lo largo de la HR demostraron que la activación de ProDH ocurre desde la fase inicial hasta el desarrollo completo de la lesión. Esta actividad afecta de distinto modo el contenido de Pro, ya que este aminoácido se reduce en la fase I, pero no en la fase II y se incrementa en la fase III (Monteoliva y col., 2014). Por otra parte, los niveles de P5CDH no se alteran de modo significativo. Llamativamente, *P5CS2* recién se induce durante la última fase de la HR, planteado el interrogante acerca del origen de la Pro que sería permanentemente consumida por ProDH.

La primera alteración detectada en respuesta a estrés abiótico es la activación de P5CS. A diferencia de esto, en patogénesis inicialmente se activa ProDH. Esta enzima podría acoplarse con distintas enzimas de este metabolismo a lo largo del desarrollo de la HR (Figura 8). Durante la fase II, se ha propuesto que ProDH se desacoplaría de P5CDH y actuaría en conjunto con P5CR promoviendo un ciclo corto entre Pro/P5C (Monteoliva y col., 2014). Este ciclo requiere que Pro ingrese a la mitocondria donde ProDH la oxida a P5C, y que este producto se transporte nuevamente al citosol, donde sería reconvertido en Pro por P5CR. La ocurrencia de este ciclo fue inicialmente demostrado en animales a partir de sistemas reconstituidos (Hagedorn y Phang 1983; 1986). Entre las evidencias que sustentan su ocurrencia en la fase II de la HR podemos mencionar que: a) el contenido de Pro permanece constante aun cuando la actividad ProDH es alta, similar a la de la Fase I y III; b) P5CDH no incrementa sus niveles como lo hace ProDH; c) los genes *P5CS* no se inducen durante esta fase por lo que no contribuirían a la síntesis de Pro (Monteoliva y col., 2014). Por otra parte, la ocurrencia de este ciclo coincide con la fase de estallido oxidativo, punto determinante en el desarrollo de la HR que define el advenimiento de la muerte celular programada. Mutantes *p5cdh* que activan normalmente a ProDH durante la infección con *Pst-AvrRpm1*, presentan una resistencia incrementada en etapas tempranas, con mayor generación de ROS y muerte celular. Esto indica que el ciclo Pro/P5C aportaría al desarrollo de ambos procesos (Monteoliva y col., 2014). Sin embargo, este ciclo es cuestionado porque, hasta el momento solo se han sugerido pero no identificado, los transportadores de la membrana mitocondrial para Pro y P5C (Miller y col., 2009).

La mayoría de los estudios analizados describen alteraciones del metabolismo de Pro durante respuestas de defensa contra patógenos biótrosos, que desencadenan HR. En ese caso, la síntesis tardía de Pro es dependiente de SA (Fabro y col., 2004). Además, en infecciones con una cepa de *Pst* virulenta que logra crecer en el hospedante, no se activa *P5CS2*, *ProDH1*, ni se acumula Pro (Fabro y col., 2004; Cecchini y col., 2011a). Curiosamente, la inducción de *ProDH1* durante la infección con *Pst* avirulento también depende de la vía de SA (ICS1 y NPR1) (Cecchini y col., 2011a). Sin embargo, no se conoce si el metabolismo de Pro y particularmente ProDH, podrían participar en otras defensas. Además, se desconoce si una o ambas ProDH participan en la inmunidad contra biótrosos, ya que los datos disponibles

involucran plantas silenciadas tanto en *ProDH1* como *ProDH2*. Particularmente, es interesante evaluar la participación de *ProDH2* en este contexto ya que es de los pocos estreses que inducen fuertemente su expresión, ya que ha sido escasamente estudiada hasta el momento.



**Figura 8. El metabolismo de Pro a lo largo de distintas fases de la HR.** Fases de la HR determinadas según los niveles de ROS y muerte celular. En la fase I comienza a generarse ROS, en la fase II se produce un estallido oxidativo y comienza a desarrollarse la muerte celular que tiene su máximo en la fase III. El metabolismo de Pro varía en estas fases. En la fase I se produce un catabolismo completo de Pro. En la fase II Pro mantiene su nivel y aparentemente se activa el ciclo Pro/P5C. Durante la fase III se activa la síntesis de Pro.

Actualmente, se desconoce el mecanismo por el que ProDH contribuye a la generación de ROS durante la HR. Recientemente se detectó que tanto ProDH1 como ProDH2 potencian la producción de aROS en tratamiento con el PAMP flg22 (Fabro y col., 2016). Esto indica que la enzima mitocondrial estaría favoreciendo la actividad de la NADPH oxidasa de membrana plasmática. En principio, este efecto podría asociarse al consumo de Pro o a la acumulación de P5C (Senthil-Kumar y Mysore, 2012). Este último no parecería ser el responsable ya que la

cuantificación de los niveles de este aminoácido no mostró variaciones significativas a lo largo de la HR tanto en la planta salvaje como en la mutante *p5cdh* (Monteoliva y col., 2014).

Entonces, el efecto podría asociarse a la actividad ProDH, que puede inducir alteraciones a nivel mitocondrial o del citosol que alteren la producción de aROS. Así esta enzima podría generar mROS, ya sea directamente o a través de la mETC. Por un lado, es estructuralmente similar a la enzima monofuncional de *T. thermophilus*, que expone el FAD al solvente, y puede ceder electrones directamente al O<sub>2</sub> (White y col., 2007). Por otro lado, ProDH en animales y muy probablemente en plantas, cede electrones directamente a la cadena respiratoria a través de ubiquinona (Hancock y col., 2015; Cabassa-Hourton y col., 2016). En consecuencia, un aumento de actividad ProDH podría favorecer la sobrecarga de electrones mETC y la generación de ROS mitocondrial. Particularmente, en animales se ha detectado que la inducción de expresión de *ProDH* por el supresor de tumores p53 estimula el desarrollo de apoptosis a través de la producción de superóxido a nivel mitocondrial (Donald y col., 2001; Hu y col., 2007; Liu y col., 2005).

Por otra parte, ProDH podría potenciar la producción de aROS participando de la regulación redox del citosol/cloroplasto y mitocondria como se propuso para el estrés abiótico. Este efecto requiere de un funcionamiento en conjunto y coordinado entre la síntesis y el catabolismo en el mismo tejido infectado. Particularmente, en la fase II de la HR ProDH podría acoplarse a P5CR (Monteoliva y col., 2014). Aunque en fase III se detecta activación transcripcional de *ProDH* y del gen *P5CS2* (Fabro y col., 2004), no se ha descrito si la Pro generada por P5CS2 es sustrato de ProDH. En este caso, P5CDH es importante como determinante del destino del P5C ya que favorecería la ocurrencia de un ciclo Pro/P5C (corto) o Pro/Glu (largo). El segundo ciclo tendría un mayor efecto en la alteración del estado redox citosólico y con ello de la actividad de enzimas sensibles al contenido NADP<sup>+</sup>/NADPH residentes en este compartimiento, tales como la G6PDH y 6PGDH de la OPP, que mencionamos previamente. Estas enzimas son importantes reguladoras de los niveles de NADPH citosólico, pudiendo afectar a otras enzimas que utilicen este cofactor como las NADPH oxidasas de membrana.

## OBJETIVOS



El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar el rol del metabolismo de Pro, especialmente el efecto de ProDH, en la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana* contra patógenos.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos.

1. Evaluar la contribución de cada isoforma de ProDH a la resistencia al estrés biótico.
  - 1.1 Caracterizar la susceptibilidad de plantas simples mutantes *prodh1* y *prodh2* a patógenos con distintos estilos de vida, el hemibiótrofo *Pst* y el necrótrofo *B. cinerea*.
  - 1.2 Identificar los factores asociados a las vías de defensa inducidas por las hormonas SA y JA que regulan la expresión de *ProDH1* y de *ProDH2*.
  - 1.3 Definir si existe inter-regulación entre los genes *ProDH*.
  
2. Analizar posibles mecanismos por los cuales ProDH contribuye al desarrollo de las respuestas de defensa.
  - 2.1 Evaluar efectos de la activación de ProDH sobre las rutas de síntesis de Pro, en condiciones de estrés biótico.
    - 2.1.1 Determinar la relevancia de ProDH1, ProDH2 y P5CDH en la acumulación de Pro durante la fase III de la HR.
    - 2.1.2 Discriminar efectos asociados al transporte de Pro desde tejidos sanos o la síntesis de Pro en tejidos infectados.
    - 2.1.3 Reproducir efectos de la activación de ProDH sobre la síntesis de Pro en otro sistema experimental (estrés abiótico por Pro exógena).
  
  - 2.2 Examinar efectos derivados de la actividad ProDH que impacten sobre el funcionamiento de la enzima RBOHD que produce aROS.
    - 2.2.1 Determinar si las enzimas del metabolismo de Pro, P5CR y P5CDH estimulan la producción de aROS inducido por flg22.
    - 2.2.2 Discernir efectos de la falta o inhibición de ProDH sobre marcadores el estado redox citosólico.

## RESULTADOS

## CAPÍTULO I: CONTRIBUCIÓN DE *PROD1* Y *PROD2* A LA DEFENSA CONTRA PATÓGENOS

Como se menciona en la Introducción, en *Arabidopsis* existen dos genes que codifican isoformas diferentes de ProDH las cuales presentan actividad catalítica. Estos genes muestran expresión diferencial, ProDH1 actúa de manera preponderante bajo condiciones de estrés abiótico, y ambas isoformas parecerían cumplir funciones no redundantes (Ribarits y col., 2007; Funck y col., 2010; Fäes y col., 2014). Sin embargo, aún no se han estudiado los fenotipos asociados a la deficiencia de cada una de las isoformas bajo estrés. Más aún, para *Arabidopsis*, no se han detectado respuestas que involucren principalmente a la Isoforma 2.

El silenciamiento de ambos genes de ProDH reduce la resistencia de *Arabidopsis* (Cecchini y col., 2011a) y de *N. benthamiana* (Senthil-Kumar y Mysore, 2012) contra *Pseudomonas syringae*, impidiendo la normal generación de ROS y muerte celular programada. Hasta el momento, no se había evaluado el aporte relativo de cada isoforma a esta resistencia. Como se describió anteriormente, solo se conoce que ambas utilizarían Pro como sustrato pero no se cuenta con un análisis detallado de las características enzimáticas específicas de cada isoforma de ProDH, ya que no se ha logrado expresar cada una de manera heteróloga (Servet y col., 2012). Sin embargo, el incremento en el nivel de transcripto de los genes *ProDH* normalmente coincide con un aumento en el consumo de Pro por lo que sería informativo de la actividad ProDH (Hayashi y col., 2000; Miller y col., 2009; Cecchini y col., 2011; Servet y col., 2012; Monteoliva y col., 2014). Así, considerando que *ProDH1* es de expresión mayoritaria y es regulado por la vía del SA (Cecchini y col., 2011a), especulamos que el mismo podría contribuir a esta respuesta de manera más relevante que *ProDH2*. Este último gen tiene bajo nivel de expresión, excepto en algunas condiciones de infección con patógenos. De este modo, quisimos evaluar la posible participación de *ProDH2* en las respuestas de defensa, dado que sería el primer reporte de una función específica para este gen en *Arabidopsis*.

En este capítulo se describen estudios dirigidos a discriminar la contribución de cada gen *ProDH* a las defensas contra *Pst*, *Pst-AvrRpm1* y *B. cinerea*, mediante el uso de mutantes *prod1* y *prod2*. Además, se evalúa la expresión de los genes *ProDH1* y *ProDH2* en estas

condiciones de infección y su regulación transcripcional por las vías de SA y JA. Para ello, se emplean tratamientos con hormonas exógenas en plantas salvajes, infección de mutantes deficientes en estas rutas y sistemas que permiten determinar la interacción entre ambas vías. También indagamos sobre una posible inter-regulación entre ambos genes *ProDH*.

### **3.1 ProDH1 y ProDH2**

Las proteínas codificadas por los genes *ProDH1* y *ProDH2* son de similar tamaño (54,9 kDa y 53,1 kDa, respectivamente) y presentan un alto grado de identidad (78,78 %), principalmente en el dominio prolina deshidrogenasa. Las mayores diferencias se localizan en el extremo N terminal donde se encuentra la señal que determina la localización subcelular (mitocondrial o cloroplástica) (Figura A1 de Anexo).

#### **3.1.1 Plantas mutantes *prodh1* y *prodh2* y silenciadas *siPD***

A fin de describir la contribución de cada isoforma de ProDH a la defensa, nos propusimos utilizar plantas mutantes nulas para cada uno de estos genes. De ser posible, también quisimos caracterizar plantas nulas en ambos genes para determinar posibles sinergismos entre ellos. Para seleccionar estas herramientas caracterizamos las distintas líneas de plantas mutantes que se encuentran disponibles (Tabla I).

Además, utilizamos plantas silenciadas generadas en nuestro laboratorio (*siPD B8* y *siPD U9*), las cuales sobre-expresan 192 pb del marco de lectura abierto (ORF) de *ProDH1*, fragmento que presenta 76 % de identidad de nucleótidos con *ProDH2* por lo que en estas plantas reducen la expresión de ambos genes. Estas líneas tienen silenciamiento parcial, mientras que líneas con alto nivel de silenciamiento no pudieron ser propagadas por defectos en la producción de semillas (Cecchini y col., 2011a).

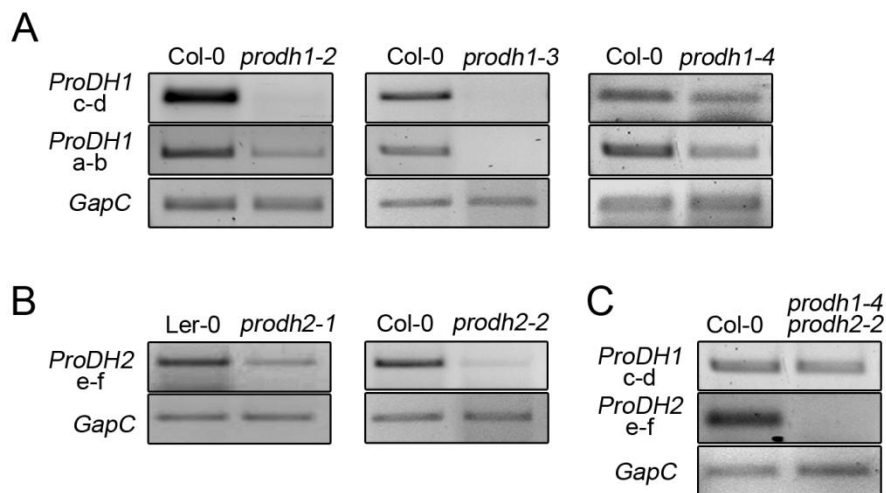
El paso inicial fue corroborar el genotipo de las simples mutantes (3 mutantes *prodh1*; 2 mutantes *prodh2*) (Figura A2 de Anexo). Para ello se utilizaron oligonucleótidos que flanquean la inserción del T-DNA (de aproximadamente 4 kb) en distintas regiones del gen. La presencia de este T-DNA evita la amplificación del alelo salvaje. Como se observa en la figura, todas las líneas son mutantes homocigotas.

Tabla I. Líneas mutantes y silenciadas en los genes *ProDH1* y *ProDH2*

Nombre	Línea	Ecotipo	Gen afectado	Sitio de inserción	Resistencia	Referencias
<i>prodh1-2</i>	Mutante SALK_081276	Col-0	<i>ProDH1</i>	Intrón	Kanamicina	Funck y col., 2010 Sharma y col., 2011
<i>prodh1-3</i>	Mutante GABI_308F08	Col-0	<i>ProDH1</i>	Exón	Sulfadiacina	Funck y col., 2010
<i>prodh1-4</i>	Mutante SALK_119334	Col-0	<i>ProDH1</i>	Intrón	Kanamicina	Funck y col., 2010
<i>prodh2-1</i>	Mutante GT1788	Ler-0	<i>ProDH2</i>	Intrón	Kanamicina	Funck y col., 2010
<i>prodh2-2</i>	Mutante GABI_328G05	Col-0	<i>ProDH2</i>	Intrón	Sulfadiacina	Funck y col., 2010
<i>siPD B8</i>	Silenciada homocigota	Col-0	<i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i>		Kanamicina	Cecchini y col., 2011a
<i>siPD U9</i>	Silenciada homocigota	Col-0	<i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i>		Kanamicina	Cecchini y col., 2011a
<i>prodh1-4</i> x <i>prodh2-2</i>	Doble mutante	Col-0	<i>ProDH1</i> y <i>ProDH2</i>	Intrón ambos	Kanamicina Sulfadiacina	Cabassa-Hourton y col., 2016

Posteriormente evaluamos la expresión génica. En las mutantes *prodh1-2* y *prodh1-3* no detectamos expresión de *ProDH1* con oligonucleótidos que flanquean el sitio de inserción del T-DNA (c-d y a-b para *prodh1-2* y *prodh1-3*, respectivamente) (Figura 9 A). Además, observamos una fuerte reducción de la amplificación del cDNA con oligonucleótidos homólogos a otras regiones del mismo (a-b y c-d para *prodh1-2* y *prodh1-3*, respectivamente). Más aún, en la mutante *prodh1-3* no detectamos transcritos con los dos pares de oligonucleótidos utilizados. Respecto a *prodh1-4*, esta mutante presenta una leve reducción en la expresión del gen, que se detecta tanto con oligonucleótidos que flanquean al T-DNA (a-b), como con aquellos que amplifican una región aguas abajo del mismo (c-d). En la mutante *prodh2-1* detectamos una expresión reducida de *ProDH2* con oligonucleótidos que flanquean la inserción del T-DNA (e-f) (Figura 9 B). Por su parte, en la mutante *prodh2-2* no se detectan transcritos de *ProDH2* con oligonucleótidos e-f (Figura 9 B). Previamente, otros autores analizaron la expresión de estos genes en estas mutantes y describieron resultados similares a los nuestros para *prodh1-2*, *prodh1-3* y *prodh1-4*; así como diferencias para *prodh2-2* donde ellos detectaron bajos niveles de transcritos de *ProDH2* (Funck y col., 2010).

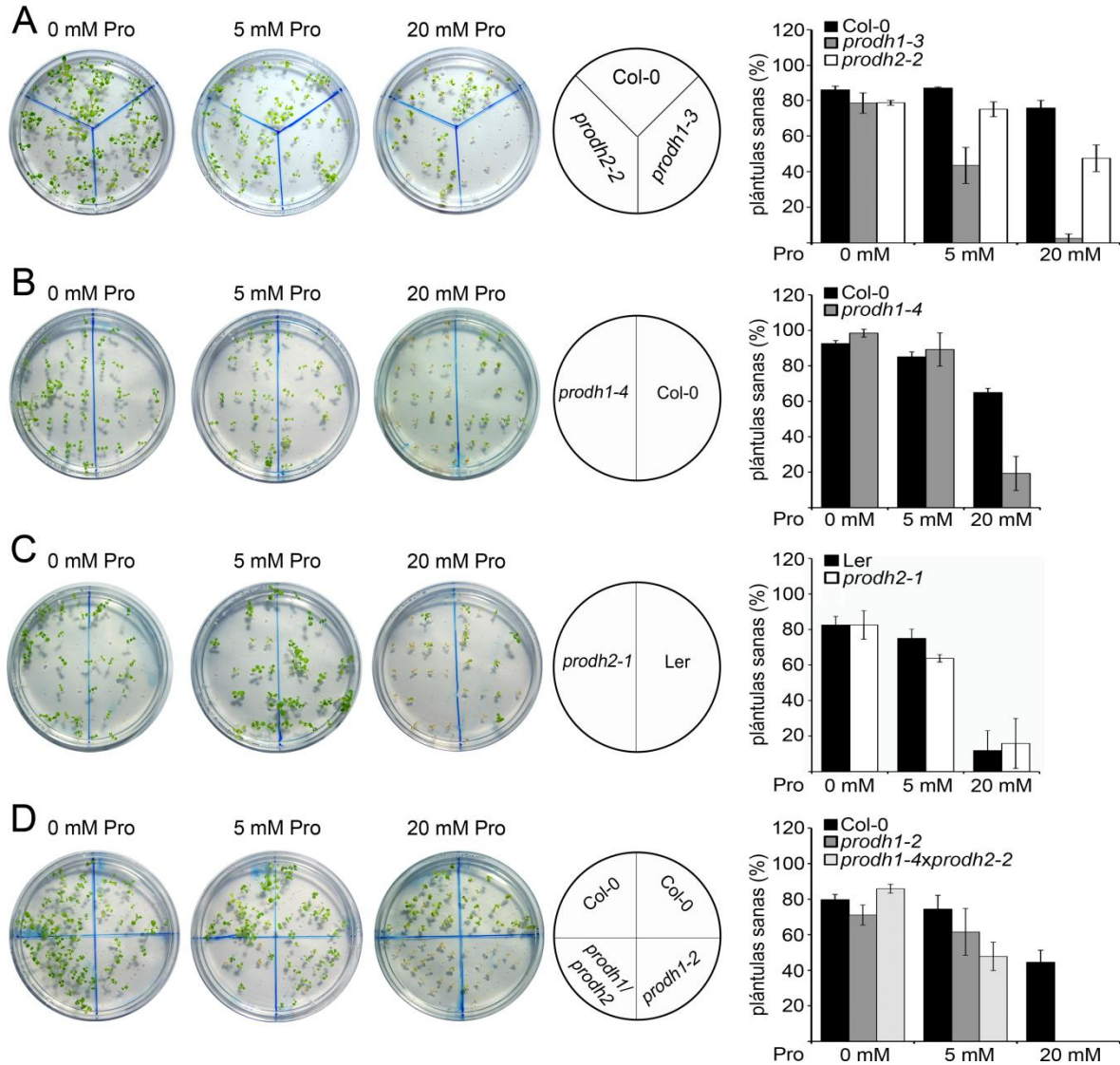
Además evaluamos los niveles transcritos de la doble mutante *prodh1-4* y *prodh2-2*. Como se ha descrito previamente, esta es la única doble mutante disponible hasta el momento. En consistencia con lo descrito para las simples mutantes, esta planta presentó niveles reducidos de *ProDH1* y nulos de *ProDH2* (Figura 9 C). Estos resultados indican que no se dispone a la fecha de mutantes o líneas silenciadas que anulen completamente la expresión de ambos genes *ProDH*. Esto refuerza la idea que la enzima tendría funciones esenciales en el desarrollo y/o producción de gametas.



**Figura 9. Expresión de *ProDH* en plantas mutantes.** Se analizan plantas *prodh1* (A) y *prodh2* (B) y *prodh1-4/prodh2-2* (C) en condición basal con los oligonucleótidos indicados en Figura A2 de Anexo por ensayos de sqPCR. *GapC* se utilizó como control de carga.

Un fenotipo característico de la deficiencia de ProDH es la hipersusceptibilidad a Pro exógena (Mani y col., 2002; Nanjo y col., 2003; Funck y col., 2010). Para caracterizar mejor a las simples mutantes y seleccionar los alelos que muestren los fenotipos más severos, evaluamos este rasgo creciendo estas líneas en dos medios alternativos: medio de cultivo Gamborg's (GM) sin agregado de Pro exógena y GM con 5 o 20 mM Pro. Tras 14 días de crecimiento en esterilidad, analizamos el porcentaje de plantas que mostraban crecimiento normal (sin daños morfológicos ni clorosis) respecto al total de semillas sembradas (Figura 10). En medio GM este porcentaje fue similar en todas las plantas (Col-0: 77-92 %; Ler: 83 %; *prodh1-2*: 71 %; *prodh1-3*: 78 %; *prodh1-4*: 98 %; *prodh2-1*: 83 %; *prodh2-2*: 79 %; *prodh1-*

4/*prodh2-2*: 85 %). A continuación, determinamos los mismos porcentajes para plantas crecidas en GM con Pro.



**Figura 10. Crecimiento de mutantes *prodh1* y *prodh2* en Pro exógena.** Semillas de mutantes *prodh1-3*, *prodh2-2* (A), *prodh1-4* (B), *prodh2-1* (C), *prodh1-2* y *prodh1-4/prodh2-2* (D), se sembraron en medio GM con 0, 5 o 20 mM Pro junto a las correspondientes plantas salvajes Col-0 y Ler. Tras 14 días de crecimiento se cuantificó el número de plantas verdes, viables. Se indica porcentaje de plantas viables respecto de la cantidad de semillas sembradas. Los valores muestran la media  $\pm$  error estándar de 2 réplicas biológicas.

La planta salvaje Col-0 presentó un crecimiento similar en medio sin Pro y con 5 mM Pro (65-86 %) pero redujo su viabilidad en 20 mM Pro (40-70 %) lo que implica alrededor de un 30 % de reducción en la viabilidad respecto al crecimiento sin Pro (Figuras 10 A, B, D). Por su

parte, la planta salvaje Ler, fue más susceptible que la planta salvaje Col-0 ya que mostró menor viabilidad en 20 mM Pro (12 %) (Figura 10 C).

Entre las mutantes *prodh1* el alelo *prodh1-3* confirió la mayor susceptibilidad. A baja concentración de Pro (5 mM) este alelo presenta solo un 43 % de viabilidad (Figura 10 A), mientras los alelos *prodh1-4* y *prodh1-2* presentaron un 89 y 65 % de viabilidad (Figuras 10 B, D) lo que representa un 90 y 86 % de su crecimiento sin Pro, respectivamente. A alta concentración (20 mM) la mutante *prodh1-4* mantiene el 19 % de viabilidad mientras que las otras dos líneas prácticamente no crecen. Cabe destacar que hasta el momento no se había caracterizado este fenotipo para la mutante *prodh1-3* ni se habían desarrollado ensayos comparativos entre las distintas líneas.

Respecto a las plantas mutantes *prodh2*, la línea *prodh2-2*, fue más susceptible que la planta Col-0 al crecer en 20 mM Pro, presentando 47 % de viabilidad en relación al crecimiento sin Pro, respectivamente (Figura 10 A). Por otra parte, no pudimos determinar correctamente la susceptibilidad de la línea *prodh2-1* ya que su ecotipo es Ler. Como mencionamos este ecotipo es muy sensible al crecimiento en Pro por lo que se dificulta detectar diferencias entre las plantas mutante y salvaje (Figura 10 C). Hasta el momento, solo se había caracterizado la mutante *prodh2-1*, mientras la línea *prodh2-2* no había sido analizada en este contexto.

La planta doble mutante *prodh1-4/prodh2-2*, mostró una susceptibilidad incrementada a Pro respecto a la *prodh1-4* con un 47 % de viabilidad en 5 mM Pro, y falta de crecimiento en 20 mM Pro (Figura 10 D). De este modo, estas plantas muestran un efecto aditivo del déficit de ambas isoformas de ProDH. Esto sumado a la mayor susceptibilidad a Pro exógena detectada en la mutante *prodh2-2* demuestran que *ProDH2* también cumple una función en esta condición. Es importante notar que estos estudios representan la primera descripción de un alelo mutante de *ProDH2* (*prodh2-2*) que muestra susceptibilidad a Pro exógena.

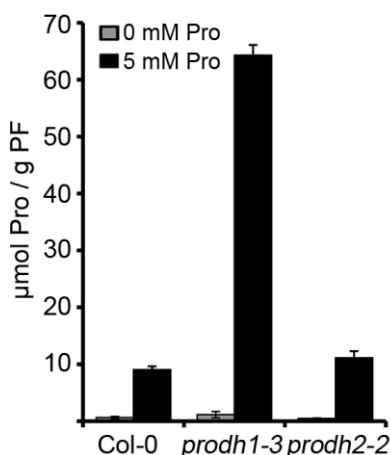
A partir de estos resultados, seleccionamos a la mutante *prodh1-3* que presenta el fenotipo más severo entre los tres alelos *prodh1*. Consecuentemente, seleccionamos a *prodh2-2* dado que tiene el mismo ecotipo (Col-0) que *prodh1-3*. Este es un factor importante en estudios comparativos ya que un contexto genético diferencial puede desencadenar respuestas no asociadas al gen mutado sino a otros polimorfismos. De hecho,



la susceptibilidad a Pro exógena es diferente en Col-0 y Ler. Además, estas dos mutantes presentan niveles muy reducidos de transcritto (Figura 9). Con las mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* realizamos la mayor parte de los siguientes experimentos.

A continuación analizamos el contenido de Pro (Bates y col., 1973) en plántulas salvajes, *prodh1-3* y *prodh2-2* crecidas por 14 días en medio GM. Observamos un contenido similar en las tres plantas aunque levemente mayor en *prodh1-3* (0,63; 1,14 y 0,46  $\mu\text{M}$  de Pro/g peso fresco en Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2*, respectivamente). Tras analizar el crecimiento de estas plantas en 5 mM Pro, la mutante *prodh1* mostró niveles de Pro 7 veces mayores que la salvaje (64 y 9  $\mu\text{mol}$  de Pro/g PF respectivamente) (Figura 11). Por su parte, los niveles de Pro en la planta *prodh2* no se diferenciaron de los de la planta Col-0 (11  $\mu\text{M}$  de Pro/g PF). Esta cuantificación no fue realizada en plántulas crecidas en 20 mM Pro por la alta mortalidad que estas presentan.

Este último resultado, concuerda con que la falta de ProDH1 otorga mayor susceptibilidad al crecimiento en Pro que la falta de ProDH2, haciéndose este fenotipo más notorio a mayor concentración de Pro (Figura 10). Esto, evidenciaría un rol preponderante de *ProDH1* en la tolerancia a Pro exógena, coincidiendo con lo sugerido en reportes previos (Funck y col., 2010).

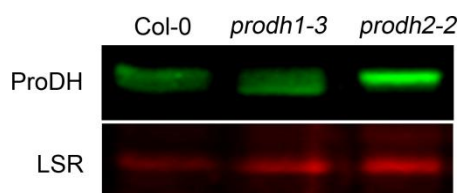


**Figura 11. Contenido de Pro en plántulas salvajes y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2*.** Las plántulas fueron crecidas por 14 días en medio GM suplementado o no con 5 mM Pro. Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 réplicas biológicas. PF: peso fresco. Los valores de Pro se describen en el texto.

### 3.1.2 Niveles de ProDH1 y ProDH2 en simples mutantes

Analizamos el contenido de ProDH1 y ProDH2 en plantas salvajes y mutantes por ensayos de Western Blot. Utilizamos dos anticuerpos policlonales generados en el

laboratorio (Monteoliva y col., 2014) que no discriminan estas isoformas dado que fueron generados contra los péptidos sintéticos TGLKGMLVYGVEHA (anticuerpo 1) y FLMEKASNGSG (anticuerpo 2) que están presentes en ambas proteínas (Figura A1 de Anexo). Por ello, intentamos diferenciar a las dos isoformas por su movilidad electroforética basándonos en su diferencia de peso molecular (2 kDa). Al analizar extractos proteicos de plantas salvajes y mutantes con el anticuerpo 1, detectamos dos bandas cuyos tamaños eran los esperados para ProDH1 (banda superior) y ProDH2 (banda inferior) (Figura 12). En la planta salvaje la banda superior es mayoritaria, mientras que en *prodh1-3* esta banda es minoritaria. A su vez, la banda inferior está ausente en la mutante *prodh2-2*. Estos resultados sugerían que la banda de mayor peso correspondía a ProDH1 y la más liviana a ProDH2, coincidiendo con los tamaños de cada isoforma.



**Figura 12. Niveles de ProDH1 y ProDH2 en planta salvaje y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2*.** Siembra de 5 µg de extracto de proteínas totales de plantas de 6 semanas en gel de poliacrilamida al 8 %. LSR; subunidad mayor de Rubisco utilizado como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas.

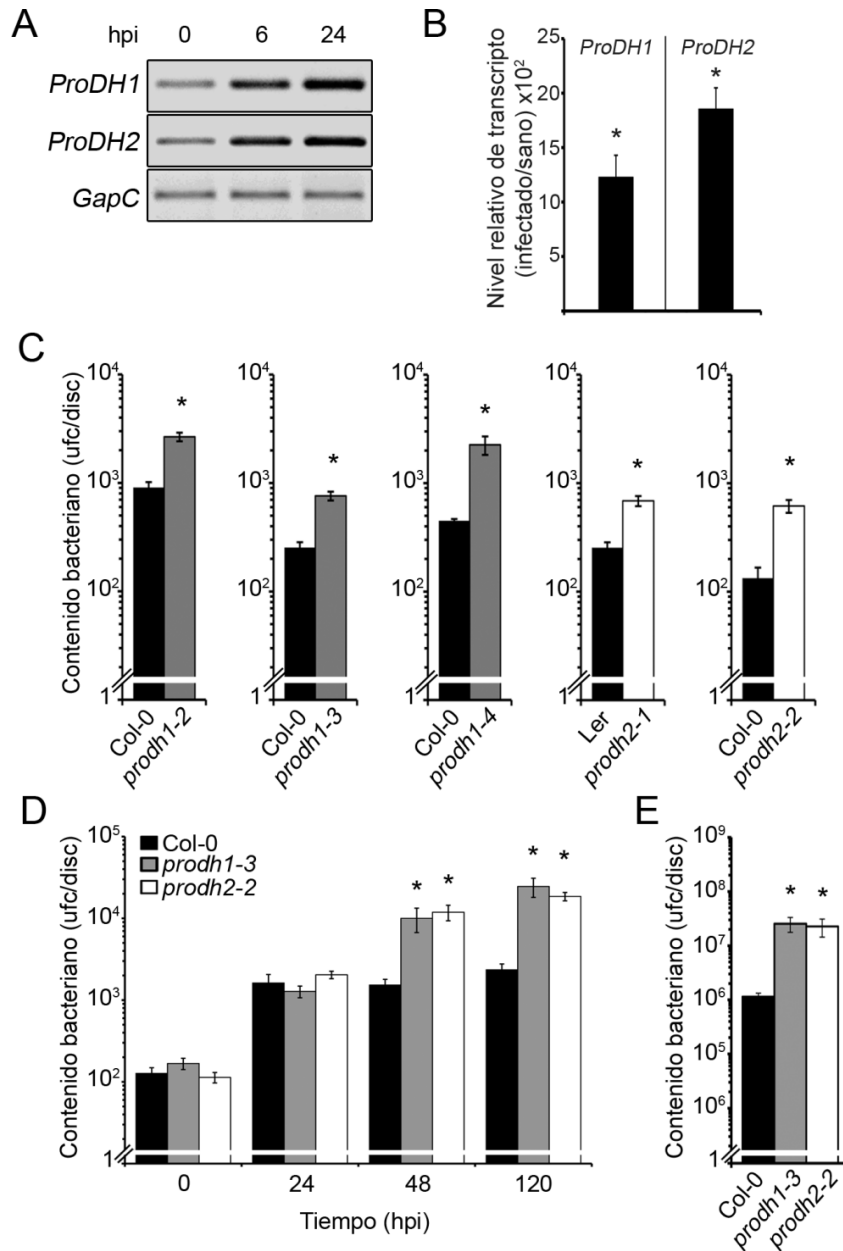
Sin embargo, el patrón observado en estas mutantes no pudo ser reproducido en otras líneas. Utilizando el anticuerpo 1, observamos que las plantas *prodh1-4* no reducían el contenido de la banda superior y asumimos que esto podía deberse a que la mutante no es nula (Figura A3 de Anexo). Sin embargo, nos llamó especialmente la atención que la banda superior aumentara en la mutante *prodh1-2*. Por su parte, la banda inferior se detectaba en la mutante *prodh2-1*. Estos resultados sugerían que el anticuerpo 1 podría estar reconociendo variantes post-traduccionales de las isoformas, las cuales no se han descrito hasta el momento. Al utilizar el anticuerpo 2, que no detecta proteínas en extractos totales pero sí en extractos mitocondriales, observamos una única banda de peso similar a ProDH pero no pudimos determinar cuál sería la isoforma dado que las mutantes no evidenciaban diferencias (Figura A3 B de Anexo). De este modo, los ensayos de Western blot con estos anticuerpos no nos permitieron discriminar entre ProDH1 y ProDH2 a partir de extractos proteicos.

Considerando que los niveles de transcritos son muy buenos indicadores de la actividad ProDH (Hayashi y col., 2000; Miller y col., 2009; Cecchini y col., 2011a; Servet y col., 2012; Monteoliva y col., 2014), utilizamos este parámetro para estudiar a las mutantes.

### **3.2 Respuesta a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato AvrRpm1***

Nuestro objetivo era analizar la participación relativa de cada isoforma de ProDH en el desarrollo de la HR contra el patógeno biótrofo *Pst-AvrRpm1*. Inicialmente evaluamos los niveles de transcritos de *ProDH1* y *ProDH2* durante la infección, para corroborar la inducción de ambos genes que había sido descrita (Cecchini y col., 2011a). Para ello, infiltramos hojas de plantas Col-0 con *Pst-AvrRpm1* y tomamos muestras a 0, 6 y 24 horas post infección (hpi). Detectamos un aumento de ambos transcritos a las 6 y 24 hpi (Figura 13 A). Incorporamos ensayos de qPCR para cuantificar los niveles de inducción a 24 hpi y observamos que el incremento de transcritos fue de 1200 (*ProDH1*) y 1800 (*ProDH2*) veces en los tejidos infectados (Figura 13 B). Aquí se hace notar que en fase de luz, y hojas adultas, la diferencia en el nivel de expresión entre ambas ProDHs se minimiza, razón por la cual el número de ciclos de amplificación de *ProDH1* y *ProDH2* fueron similares (ver número de ciclos en Tabla IV Materiales y Métodos).

Posteriormente, procedimos a analizar si alguno de los dos genes cumplía un rol principal en la resistencia al patógeno. Con este fin, infectamos con *Pst-AvrRpm1* las hojas de plantas salvajes (Col-0 y Ler) y de las mutantes previamente analizadas (*prodh1-2*, *prodh1-3*, *prodh1-4*, *prodh2-1* y *prodh2-2*) para cuantificar el contenido de bacterias a las 72 hpi. Todas las mutantes mostraron mayor susceptibilidad que la planta salvaje (entre 3 y 7 veces) y curiosamente, no detectamos diferencias en la susceptibilidad entre dos grupos de mutantes (*prodh1* y *prodh2*) (Figura 13 C). Esto sugirió que ambos genes eran necesarios para desarrollar resistencia contra esta bacteria.



**Figura 13. Susceptibilidad de mutantes *prodh1* y *prodh2* a *Pst-AvrRpm1* o *Pst DC3000*.** Expresión de *ProDH1* y *ProDH2* en tejidos infectados con *Pst-AvrRpm1* a los tiempos indicados, evaluada por sqPCR (PCR semicuantitativa) (A) o qPCR (PCR cuantitativa) (B) utilizando *GapC* o *UBQ5* como control. (C) Contenido de bacterias (unidades formadoras de colonia -ufc- ml<sup>-1</sup>) en hojas de plantas salvajes y mutantes a 72 hpi con *Pst-AvrRpm1*. (D) Curva de crecimiento de la cepa avirulenta *Pst-AvrRpm1* en plantas salvajes y mutantes de *prodh* seleccionadas. (E) Crecimiento de la cepa virulenta *Pst DC3000* en plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* a 72 hpi. En todos los casos se muestra un experimento representativo de 3 ensayos biológicos independientes incluyendo valores que representan la media ± error estándar de 3 réplicas técnicas. (\*) diferencias significativas entre plantas mutantes y salvaje p< 0,05 según *t-test*.

Aún así, los procesos infectivos pueden manifestar diferencias cinéticas en las plantas salvajes y mutantes. Para analizar este aspecto evaluamos la curva el crecimiento de *Pst-*

*AvrRpm1* en plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2*, monitoreando el contenido de bacterias a las 24, 48 y 120 hpi. A partir de 48 hpi, las dos mutantes mostraron una susceptibilidad incrementada y similar respecto a la planta Col-0 (Figura 13 D). A tiempos tardíos (120 hpi), ambas mutantes sostuvieron mayor crecimiento bacteriano que la planta salvaje, sin detectarse diferencias entre ellas. Esto sugiere que ninguna de las dos isoformas de ProDH sería cuantitativa ni temporalmente predominante sobre la otra siendo ambas necesarias para activar la resistencia contra *Pst-AvrRpm1*.

Esta cepa activa tanto la ETI (HR) como la defensa basal, entonces, nos preguntamos si una de las isoformas podría participar específicamente en la HR y la otra en la defensa basal. Por ello, analizamos sus efectos sobre el crecimiento de la cepa virulenta *Pst* DC3000 (estudio de defensa basal). Al cuantificar el crecimiento de esta bacteria en hojas de plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* a 72 hpi, observamos que ambas mutantes eran en igual medida más susceptibles al patógeno que la planta Col-0. Esto indicaba que ProDH1 y ProDH2 eran también necesarias para la defensa basal contra patógenos biótrosos (Figura 13 E). No siendo ProDH1 preponderante sobre ProDH2 en este caso.

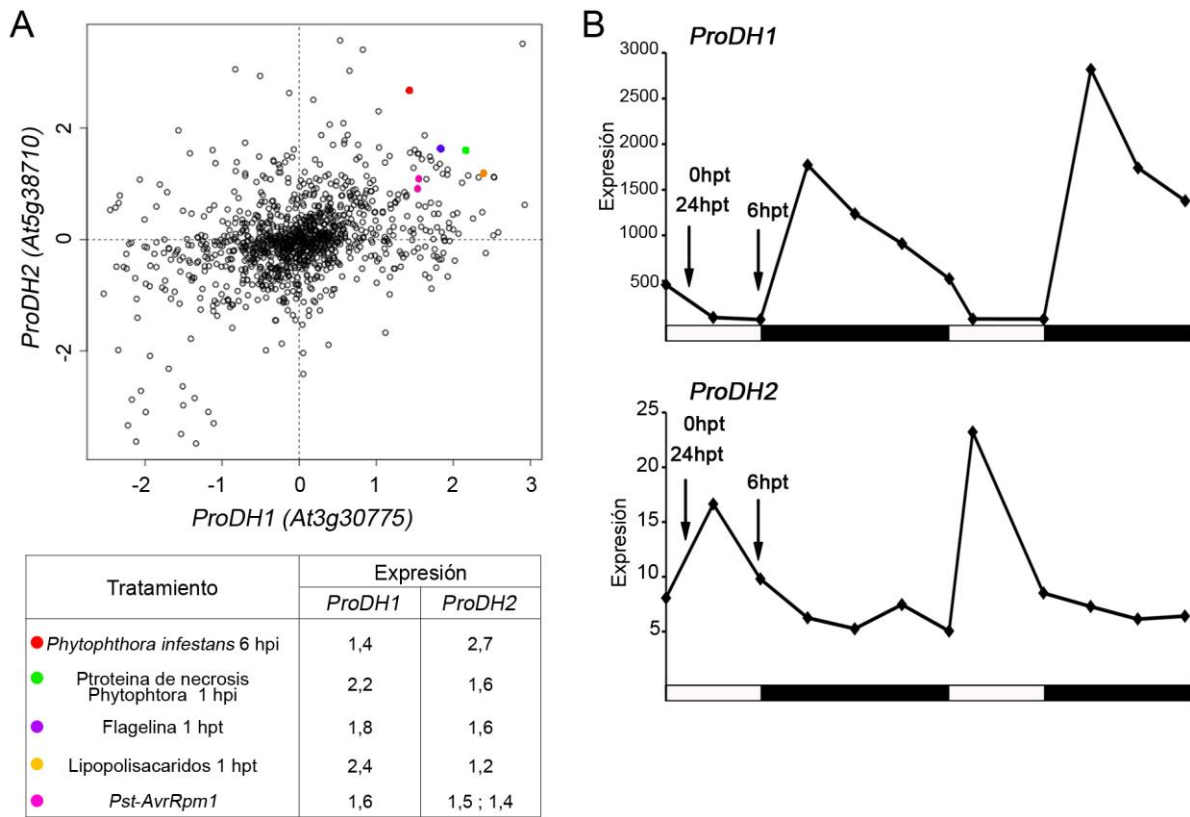
### 3.3 Regulación de la expresión de *ProDH1* y *ProDH2*

Se conocía que *ProDH1* es regulado por la vía de SA durante la infección con cepas avirulentas de *Pst* y que *ProDH2* no responde a SA exógeno (Cecchini y col., 2011a). Sin embargo, se desconocían los factores que regulan la expresión de este último gen y los que afectan a ambos en forma conjunta en los tejidos infectados.

Considerando que los genes *ProDH* no se comportan de manera similar frente a distintos estreses era previsible que durante la patogénesis respondan a distintos factores. Esta observación se desprende de un análisis *in silico* que desarrollamos para conocer el nivel de co-expresión entre *ProDH1* y *ProDH2*. El mismo indica el grado en que la expresión de ambos genes se modifica en igual sentido y magnitud ante un mismo estrés. El análisis fue realizado con el programa ATTED II (<http://atted.jp/>) que estima co-expresión génica basándose en 58 experimentos de transcriptómica que agrupan cerca de 1400 muestras.

Por un lado, detectamos que *ProDH2* no se encuentra entre los 300 genes que presentan mayor nivel de co-expresión con *ProDH1*, y viceversa (no mostrado). Por otro lado,

comparamos directamente la expresión de *ProDH1* con la de *ProDH2* en experimentos de transcriptómica que involucran condiciones de estrés. Como se observa en la Figura 14 A ambos genes presentan una baja correlación en su expresión, ya que en condiciones de activación (cuadrante superior derecho) o represión (cuadrante inferior izquierdo) los puntos no se encuentran posicionados en la diagonal. En este sentido, el programa ATTED II indica que el coeficiente de correlación entre la expresión de ambos genes es de 0,25/1,00.



**Figura 14. Análisis de expresión de *ProDH1* y *ProDH2* según estudios de transcriptomas publicados.** (A) Correlación del patrón de expresión de ambos genes de acuerdo con información analizada con el programa ATTED II (<http://atted.jp/>). Los ejes representan valores relativos de expresión génica, contra el nivel promedio de expresión de cada gen en log<sub>2</sub>. Cada círculo representa una condición diferente. Los tratamientos indicados en colores se detallan en la tabla inferior. (B) Expresión de *ProDH1* y *ProDH2* en plantas crecidas en ciclo de 8 h luz/ 16 h oscuridad (barras blancas y negras, respectivamente analizada con el programa DIRUNAL (<http://diurnal.mocklerlab.org/>)). Las flechas indican los puntos en los que se tomaron las muestras (0, 6 y 24 hpt).

Como mencionamos anteriormente, *ProDH2* responde levemente a muchos estreses lo que coincide con una distribución general de puntos cercana a 0 para este gen (Figura 14 A).

Entre las condiciones que inducen a ambos genes (co-expresión) se destacan varios tratamientos asociados a estrés biótico como por ejemplo, la infección con *Phytophthora infestans*, *Pst-AvrRpm1*, y los tratamientos con flagelina, proteína de necrosis de *Phytophthora* y lipopolisacáridos (Figura 14 A). Esto sugiere que ambos genes *ProDH* podrían ser inducidos en distintos procesos de patogénesis.

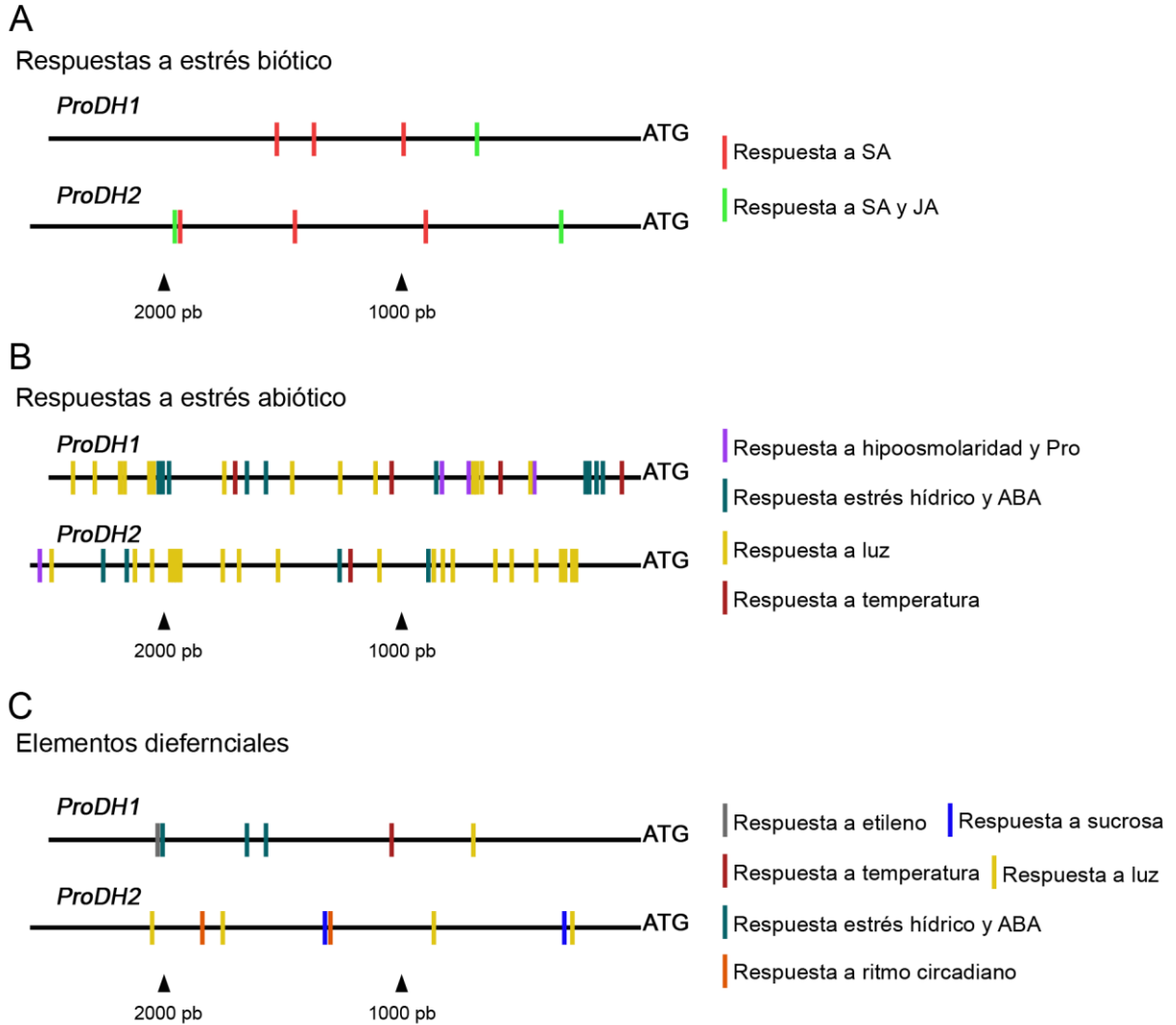
Cabe aclarar que en los análisis *in silico* detectamos que el tratamiento con luz regula diferencialmente a estos dos genes. Como se observa en la Figura 14 B, extraída del programa DIURNAL (<http://diurnal.mocklerlab.org/>), la expresión de *ProDH2* se induce por luz y la de *ProDH1* por oscuridad. Estos resultados se tuvieron en cuenta para seleccionar los horarios de recolección de muestras.

Posteriormente analizamos *in silico* a los promotores de *ProDH1* y *ProDH2* en búsqueda de elementos *cis* que podrían ser blancos de factores de transcripción asociados a defensas bióticas, dado que estos sugerirían posibles vías de regulación durante la infección. Utilizamos tres programas bioinformáticos que predicen la presencia de elementos caracterizados experimentalmente en promotores de otros genes. Estos programas son Agris (Davulury y col., 2003), Plant CARE (Lescot y col., 2002) y PLACE (Higo y col., 1999). Seleccionamos los sitios reconocidos por al menos dos de estos programas (Figura 15, Tabla AI de Anexo). El tamaño de los promotores fue definido preliminarmente por el programa Agris, como una región aguas arriba del codón ATG de inicio de transcripción de 2481 pb para *ProDH1* y de 2562 pb para *ProDH2*.

Observamos que ambos promotores responden a patógenos. *ProDH1* y *ProDH2* contienen elementos WBOXATNPR1 y CGTCA sensibles a SA o SA y JA respectivamente y estos elementos son similares en número y localización para ambos promotores (Figura 15 A y Tabla AI de Anexo). Esto sugiere que posiblemente estas vías podrían ser responsables de la inducción de *ProDH1* y *ProDH2* en patogénesis.

Además, estos genes responden a luz, temperatura, estrés hídrico y Pro exógena (Figura 15 B). El número de sitios asociados a estrés hídrico y temperatura son más numerosos en el promotor de *ProDH1*, que presenta ciertos elementos exclusivos. Ambos genes contienen numerosos sitios de regulación por luz, y el de *ProDH2* tiene elementos diferenciales de respuesta a este factor como así también a regulación circadiana. Estas observaciones son

compatibles con una expresión diferencial de los genes en estrés abiótico y la preponderancia de *ProDH1* en respuesta a estrés hídrico. Además, detectamos nuevos sitios PREATPRODHD de respuesta a Pro exógena en *ProDH1* y *ProDH2* (Tabla AI de Anexo) que pueden ser de interés para ser luego estudiados a nivel experimental.



**Figura 15. Representación gráfica de elementos de respuesta a SA y JA en promotores de *ProDH1* y *ProDH2*.** En rosa se presenta los sitios WBOXATNPR1 de respuesta a SA, y en verde el elemento CGTCA de respuesta a SA y JA. El promotor de *ProDH1* se presenta arriba y el de *ProDH2* abajo.

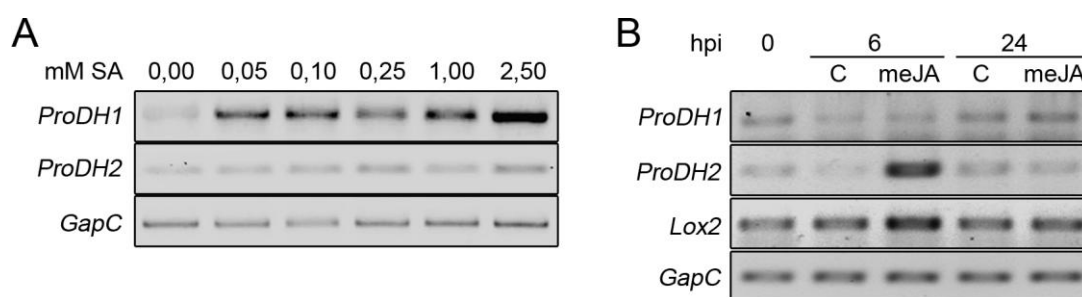
### 3.3.1 Expresión de *ProDH1* y *ProDH2* en patogénesis



### 3.3.1.1 Respuesta a hormonas exógenas

Resultó interesante detectar elementos que podrían responder a SA y JA en ambos promotores. Como hemos venido mencionando, las plantas salvajes infiltradas con SA activaban a *ProDH1*, pero no a *ProDH2* (Figura 16 A; Cecchini y col., 2011a). Considerando que las dos principales hormonas de la defensa son SA y JA, analizamos si la segunda podría regular a *ProDH2* en infección. Como aproximación inicial para evaluar esta posibilidad, cuantificamos la expresión de este gen, y de *ProDH1* en paralelo, frente al tratamiento con metil jasmonato (meJA).

La aplicación de meJA se realizó por evaporación y las muestras se evaluaron a las 0, 6 y 24 horas post tratamiento (hpt) (Figura 16 B). El nivel de transcripto de *ProDH2* se incrementó fuertemente a 6 hpt, mientras que a 24 hpt no se diferenció del observado en la condición control. Coincidiendo con esta observación, también se detectó un incremento de proteína ProDH a 12 hpt con meJA en plantas salvajes Col-0 y Ler (Figuras A3 C, D de Anexo). La expresión de *ProDH1* no varió significativamente en respuesta a meJA. Así, contrariamente a lo observado con SA, meJA regula la expresión de *ProDH2* y no la de *ProDH1*, reforzando la posibilidad de que ambos genes se regulen diferencialmente en patogénesis.



**Figura 16. Regulación de la expresión de *ProDH1* y *ProDH2* por SA y JA exógenos.** Expresión génica en tejidos de plantas salvajes infiltradas con SA (0; 0,05; 0,1; 0,25; 1 o 2,5 mM; 3 hpt; tomado de Cecchini y col., 2011a) (A) o tratadas con metil jasmonato -meJA- (0,84  $\mu$ M; 0, 6 o 24 hpt o con vehículo -control, C-) (B). La expresión de *GapC* se utilizó como control de carga y la de *Lox2* como indicador de activación de la vía de JA. La determinación se llevó a cabo por sqPCR. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

Entonces, SA exógeno regula la expresión de *ProDH1* y JA exógeno la de *ProDH2*. Las vías de señalización de estas hormonas son antagónicas y en general SA activa las defensas contra patógenos biótropos, y JA contra patógenos necrótrofos y herbívoros (Caarls y col., 2015). Por

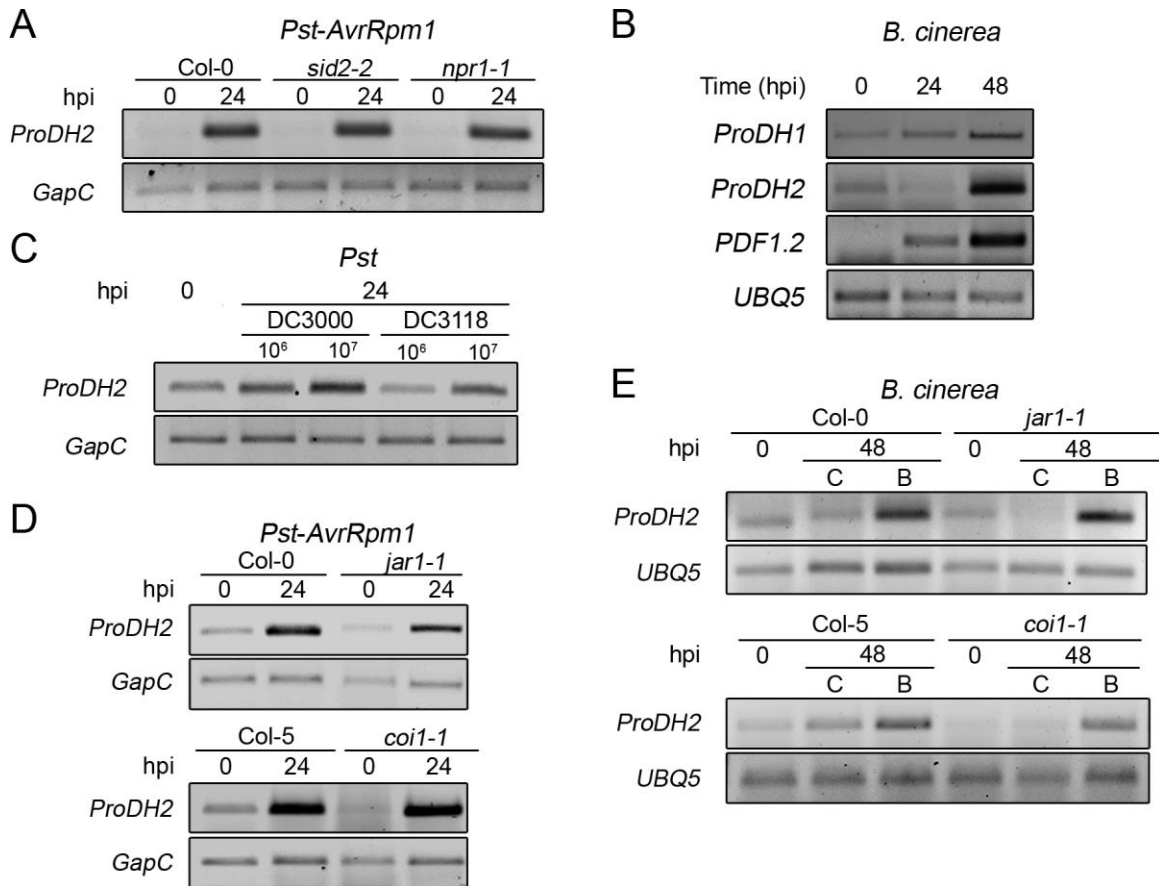
esto, fue llamativo que vías normalmente antagónicas regulen la expresión de los dos genes *ProDH*.

### 3.3.1.2 *ProDH2* en tejidos infectados

En tejidos infectados con *Pst-AvrRpm1*, la isocorismato sintetasa 1 (ICS1) codificada por el gen *SID2* (*Salicylic acid deficient 2*; Wiltdermuth y col., 2001) y el regulador NPR1 (*Nonexpresser of PR genes 1*; Wu y col., 2012) son necesarios para la inducción temprana (6 hpi) de *ProDH1* por la vía del SA (Cecchini y col., 2011a). Para corroborar que en esta condición de infección *ProDH2* no responde al SA analizamos su expresión en mutantes *sid2-2* y *npr1-1* infectadas. Las plantas salvajes y mutantes mostraron un nivel similar de transcripto de *ProDH2* a 24 hpi con este patógeno (Figura 17 A). Lo mismo se observó a 6 hpi (no mostrado). Esto indica que a pesar de presentar elementos de respuesta a SA en su promotor el gen *ProDH2* no responde a esta vía tras la inoculación con *Pst-AvrRpm1*.

Para evaluar la regulación de este gen por JA, realizamos infecciones con el patógeno necrófito *B. cinerea* que activa especialmente las defensas dependientes de esta hormona. Inoculamos las hojas con suspensiones de conidias o vehículo (ver Materiales y Métodos) y tomamos muestras a 0, 24 y 48 hpi. A las 48 hpi, detectamos una notable inducción de *ProDH2*, que coincide con la mayor inducción del gen marcador de la vía de JA, *PDF1.2* (Figura 17 B) y con la mayor acumulación de JA que ocurre en los tejidos infectados con este patógeno (Liu y col., 2015a).

JA exógeno y *B. cinerea* inducen a *ProDH2* (Figuras 16 B, 17 B). Considerando que en la interacción con *Arabidopsis* *Pst-AvrRpm1* libera coronatina (COR), un compuesto análogo a JA-Ile que reprime la vía del SA (Katsir y col., 2008), nos preguntamos si *ProDH2* podría ser regulado por COR. Para analizar este punto, infectamos plantas Col-0 con una cepa que produce COR (*Pst* DC3000) y una deficiente en su generación (*Pst* DC3118; Ma y col., 1991). La infección con *Pst* DC3000 indujo la expresión de *ProDH2* en las dos concentraciones de patógeno aplicadas. Sin embargo, la cepa deficiente en COR desencadenó una respuesta menor (Figura 17 C). Esto indica que COR es capaz de regular la expresión de *ProDH2* y podría ser al menos parcialmente responsable de su inducción durante la infección con *Pst*.

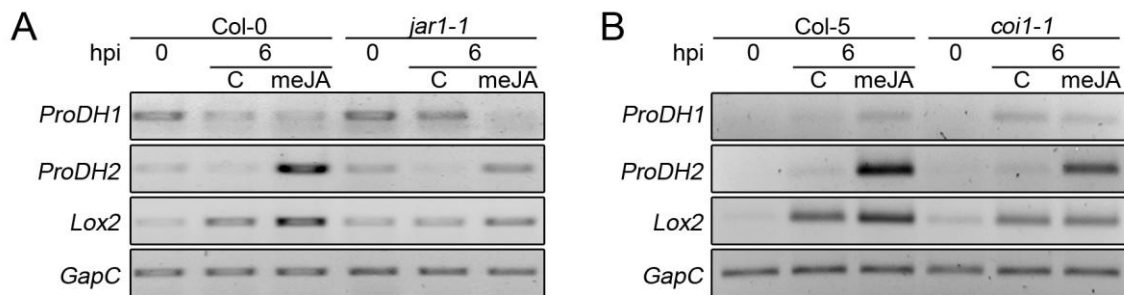


**Figura 17. Expresión de *ProDH2* en la infección con biótrofos y necrótrofos.** Se analiza esta respuesta en plantas Col-0, *sid2-2* y *npr1-1* tratadas con *Pst-AvrRpm1* ( $1 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) a 24 hpi (A); plantas salvajes infectadas con *B. cinerea* a 24 y 48 hpi (B); plantas salvajes inoculadas con *Pst* DC3000 o DC3118 ( $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) a 24 hpi (C); plantas Col-0, *jar1-1*, Col-5 y *coi1-1* expuestas a *Pst-AvrRpm1* a 24 hpi (D); y plantas Col-0, *jar1-1*, Col-5 y *coi1-1* desafiadas con *B. cinerea* a 48 hpi (E). La determinación se llevó a cabo por sqPCR. *GapC* y *UBQ5* se utilizaron como control de carga y *PDF1.2* como indicador de activación de la vía de JA. En (E) B indica infección con *B. cinerea* y C control con vehículo del tratamiento. Se muestra un experimento representativo de 2 o 3 réplicas biológicas.

Además analizamos si en las infecciones con *Pst-AvrRpm1* (hemibiótrofo) y *B. cinerea* (necrótrofo) la regulación de *ProDH2* depende de la vía canónica de JA que incluye a JAR1 (*JA responsive 1*, que genera la forma bioactiva de JA, JA-Ile) y a COI1 (*Coronatin insensitive 1* receptor de JA-Ile). Para ello, infectamos con estos patógenos a las mutantes *jar1-1* y *coi1-1* y a plantas salvajes de mismo fondo genético (Col-0 y Col-5, respectivamente). En ambos tratamientos, las dos mutantes mostraron un nivel de transcripto de *ProDH2* similar al de las plantas salvajes, por lo que descartamos que JAR1 y COI1 participen de la activación de *ProDH2* en estos contextos (Figuras 17 D, E).

La inducción de *ProDH2* por JA exógeno, COR y *B. cinerea*, y su independencia de la vía JAR-COI en tejidos infectados resultó llamativa ya que hasta el momento se conocen pocos genes que respondan a JA sin requerir de JAR o COI. Para analizar mejor este aspecto, indagamos si JAR y COI eran requeridos para inducir a *ProDH2* en respuesta a JA exógeno. El tratamiento con meJA indujo menor expresión de *ProDH2* en las mutantes *jar1-1* y *coi1-1* que en las plantas salvajes (Figuras 18 A, B) indicando que la vía canónica de señalización de JA es parcialmente utilizada para activar al gen por la hormona exógena (principalmente JAR1 y en menor medida COI1). De este modo, *ProDH2* responde a JA por vías dependientes e independientes de COI-JAR, siendo probablemente regulada por una vía no canónica en infección.

En resumen, el meJA exógeno y la COR liberada en la interacción con *Pst* DC3000 activan a *ProDH2* y en la infección con *Pst-AvrRpm1* y *B. cinerea* la vía de JA regularía a *ProDH2* de manera independiente de JAR y COI.

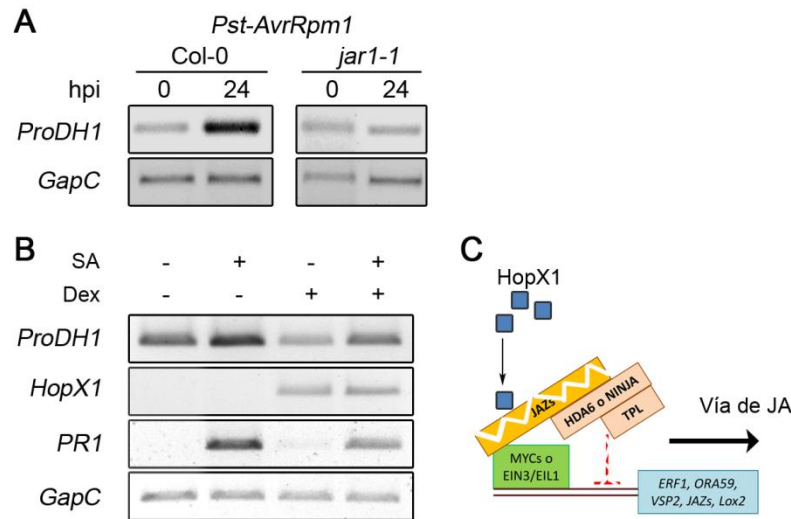


**Figura 18. Dependencia de JAR1 y COI1 en la regulación de *ProDH2* por JA exógeno.** Expresión de genes *ProDH* en tratamiento con meJA (0,84  $\mu$ M; 0 y 6 hpt) en plantas Col-0, *jar1-1* (C) o Col-5 y *coi1-1* (D). meJA, tratamiento con JA exógeno, C, control con vehículo del tratamiento. La expresión de *Lox2* se utilizó como indicador de activación de la vía de JA. La determinación se llevó a cabo por sqPCR y la expresión de *GapC* se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

### 3.3.1.3 *ProDH1* en tejidos infectados

Conocíamos que en la infección tardía con *Pst-AvrRpm1* (24 hpi) *ProDH1* mantiene cierta inducción en mutantes *sid2-2* y *npr1-1* (Cecchini y col., 2011a). Fue llamativo detectar que en la infección con *B. cinerea*, *ProDH1* también se induce (Figura 17 B). Su promotor contiene elementos de respuesta a JA y dado que esta hormona también se genera en la infección con *Pst* avirulenta (De Vos y col., 2005), especulamos que *ProDH1* podría responder a la vía de JA

en fases avanzadas de la infección con *Pst-AvrRpm1*. Para examinar este punto, comparamos los niveles de transcritos de *ProDH1* en plantas *jar1-1* y Col-0 a 24 hpi. El nivel de expresión de *ProDH1* fue claramente inferior en la mutante *jar1-1* que en la planta Col-0, avalando nuestra hipótesis (Figura 19 A).



**Figura 19. Expresión de *ProDH1* dependiente de JA y SA.** Se analiza la expresión de *ProDH1* en plantas Col-0 y *jar1-1* infectadas con *Pst-AvrRpm1* ( $1 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) a 24 hpi (A); así como en plantas transgénicas *Dex:HopX1* tratadas inicialmente con DMSO (-; vehículo) o Dex (+; 5 $\mu$ M) por 24 h y luego con H<sub>2</sub>O (-) o SA (+; 1 mM) por 24 adicionales (B). (C) Esquema de activación de vía de JA por HopX1. Este efector induce la degradación de proteínas JAZ que actúan como inhibidoras de la expresión de genes de respuesta a JA. La degradación de JAZs por HopX1 respondería a la actividad proteasa del efector. La expresión génica se analizó por sqPCR, incluyendo a *GapC* como control de carga y a *PR1* como marcador de activación de la vía de SA. Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas.

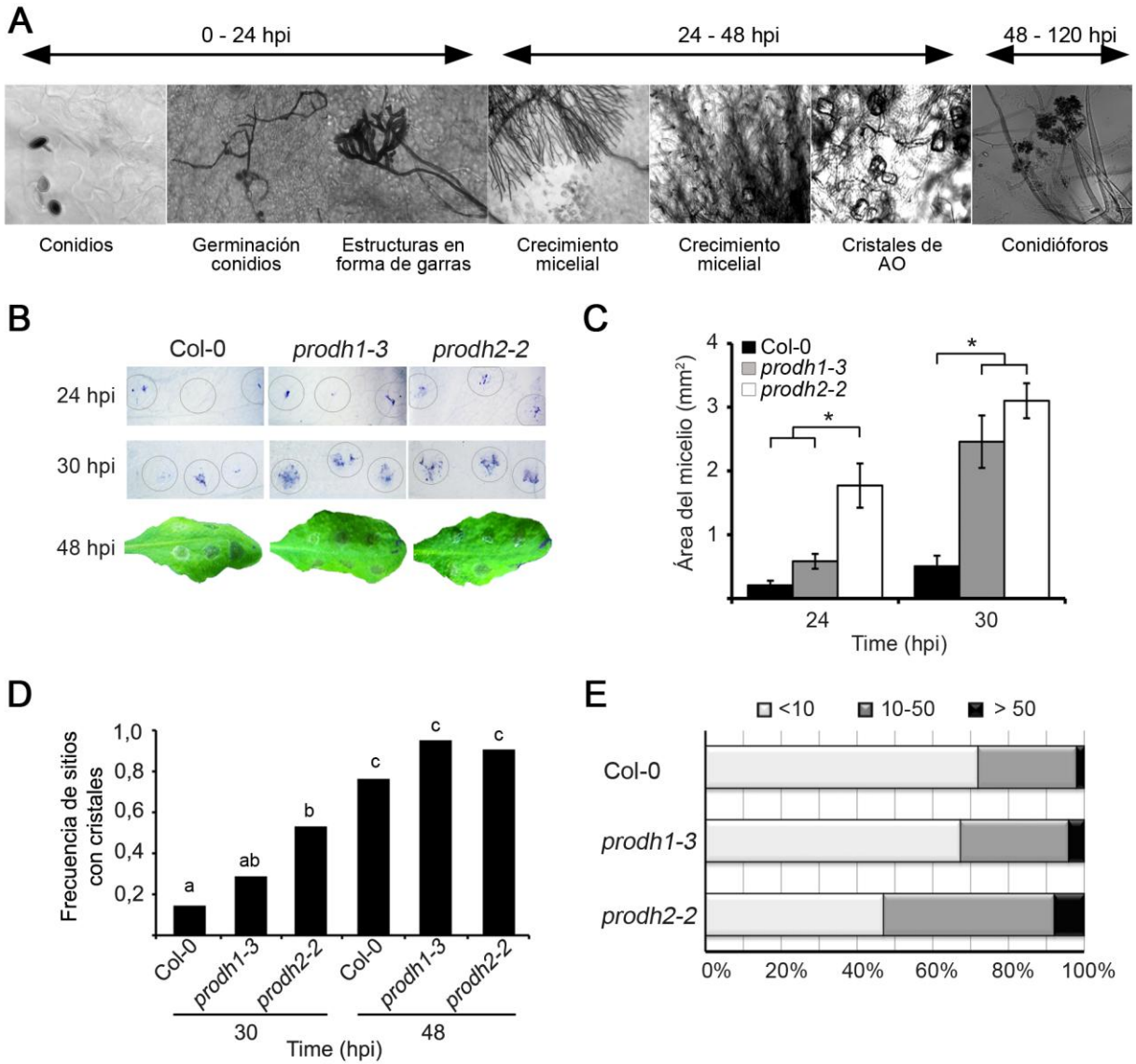
Considerando que *ProDH1* no responde al tratamiento con meJA exógeno (Figura 16 B), su activación en condiciones de infección podría depender de la intercomunicación entre las vías de SA y JA. Pusimos a prueba esta hipótesis, utilizando un sistema que nos permite estudiar la interacción de ambas vías. Para ello, trabajamos con plantas transgénicas que expresan al gen de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, *HopX1*, de manera inducible por dexametasona (Dex). HopX1 degrada proteínas inhibidoras de la vía de JA (proteínas JAZ) y así activa esta ruta (Figura 19 C; Gimenez-Ibanez y col., 2014). Consecuentemente, en respuesta a tratamiento con SA exógeno la expresión de HopX1 reduce la inducción de genes que responden esta hormona, tales como la del gen marcador *PR1* (Figura 19 B). Utilizamos este sistema para analizar el nivel de transcritos de *ProDH1*. Luego de corroborar que SA

activa a este gen (Figura 19 B) evaluamos si este efecto persiste en presencia de HopX1. Al inducir a *HopX1* por tratamiento con Dex (activación de vía de JA), se anuló el efecto positivo de SA sobre la *ProDH1*, de manera similar a lo detectado para *PR1* (Figura 19 B). Esto indica que el o los factores que activa *ProDH1* en infección con *Pst-AvrRpm1*, son dependientes de la interacción de las vías de SA y JA. Algo similar podría también manifestarse durante la exposición a *B. cinerea*, donde los niveles de SA también aumentan durante la infección. Esto sugiere que el balance SA/JA puede ser determinante de la activación de *ProDH1* en los tejidos inoculados con patógenos.

### 3.4 Respuesta a patógenos necrótrofos

Habiendo observado que ambos genes *ProDH* se inducen en la infección con *B. cinerea*, consideramos importante analizar sus contribuciones relativas a las defensas contra ese microorganismo. Para ello, examinamos la susceptibilidad de plantas simples mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* a este hongo.

El proceso de infección de Botrytis es más complejo que el bacteriano ya que involucra la diferenciación de estructuras infectivas del hongo y el establecimiento de interacciones especiales con la planta (Figura 20 A). Los conidios al alcanzar la superficie de la hoja, se hidratan, comienzan a formar el tubo germinal alrededor de 6 hpi. Posteriormente se desarrollan las hifas y los apresorios que se utilizan para penetrar la superficie foliar. En este proceso, el hongo libera factores de virulencia que favorecen su proliferación y desencadenan la muerte del vegetal estableciendo una lesión primaria, cuyo primer síntoma es el oscurecimiento por debajo del punto de infección visible alrededor de 24 hpi. Luego, el hongo se propaga produciendo la maceración de los tejidos y una lesión necrótica que se hace evidente hacia las 36 hpi (Van Kan y col., 2006; Choquer y col., 2007; Windram y col., 2012). El ácido oxálico (AO) es un factor de virulencia de Botrytis y otros hongos necrótrofos, cuya presencia en tejidos infectados se detecta por la formación cristales de morfología característica (Prins y col., 2000). Cepas de *B. cinerea* incapaces de producir OA son no patogénicas por lo que este componente es crucial para el proceso infectivo (Kunz y col., 2006). Además, el número de cristales de OA aumenta con el avance de la infección por lo que este marcador informa sobre la progresión de la enfermedad (Uloth y col., 2015).



**Figura 20. Desarrollo de *B. cinerea* en mutantes *prodh1* y *prodh2*.** (A) Etapas de infección del hongo en base a imágenes de microscopía óptica de campo claro. (B) Desarrollo micelial en hojas de Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* detectado por tinción con azul de tripano a 24 y 30 hpi. La inoculación se realizó en tres sitios con 5  $\mu$ l de  $1 \times 10^4$  conidios/ml (círculos). A 48 hpi se observa la lesión macroscópica con  $1 \times 10^3$  (arriba) o  $1 \times 10^4$  (debajo) conidios/ml. (B) Área micelial a 24 y 30 hpi cuantificada con el programa ImageJ a partir de imágenes similares a las mostradas en B para inoculación de  $1 \times 10^4$  conidios/ml. En B y C se muestra un ensayo representativo de 4 experimentos independientes, donde los valores indican la media  $\pm$  error estándar de 9 puntos de infección de 3 hojas de 3 plantas. (\*) diferencias significativas entre plantas con  $p < 0,05$  según prueba de *t*-test. (C) Frecuencia de sitios de infección que contienen al menos un cristal de OA a 30 y 48 hpi en hojas tratadas con  $1 \times 10^3$  conidios/ml. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$  según prueba de Chi-cuadrado). Se muestra un ensayo representativo de 4 experimentos independientes. (D) Número de cristales por sitio a 48 hpi con  $1 \times 10^4$  conidios/ml. (E) Intervalos con menos de 10, entre 10 y 50 o más de 50 cristales para el análisis de 4 experimentos independientes (18-21 puntos de infección de 7 hojas de al menos 3 plantas por muestra). Los valores de *prodh2-2* son significativamente distintos de las otras dos plantas con un  $p < 0,05$  según prueba de Chi-cuadrado.

En nuestros estudios utilizamos una cepa de *B. cinerea* (B05.10) que evade las defensas de *Arabidopsis* y tiene alta virulencia en esta planta. Esta cepa fue utilizada para desafiar plantas salvajes y mutantes, *prodh1-3* y *prodh2-2*. Luego de 24, 36 y 48 h recolectamos hojas infectadas para analizar el avance de la infección (Figura 20 A) y cuantificar el área de crecimiento micelial por tinción con azul de tripano y análisis de imágenes con el programa ImageJ (Figuras 20 B, C). Observamos que en fases tempranas de infección (24 hpi) la expansión del micelio fue significativamente mayor en la mutante *prodh2-2*. A las 36 hpi *prodh1-3* también mostró mayor susceptibilidad que la planta salvaje. Posteriormente (48 hpi), el área micelial fue similar en plantas mutantes y salvajes (Figura 20 B).

Al cuantificar los cristales de OA por microscopía óptica en hojas teñidas con azul de tripano, también observamos diferencias entre las mutantes y la planta salvaje. Por un lado, analizamos la cantidad de sitios que presentaban al menos un cristal, respecto del total de sitios inoculados con el patógeno. A las 36 hpi, la frecuencia de sitios con cristales fue superior en la mutante *prodh2-2* (9/17 sitios) que en la planta Col-0 (2/17 sitios). En contraste, en la mutante *prodh1-3* se detectó un valor intermedio (5/17 sitios) sin diferencias significativas con las otras dos plantas (Figura 20 D). A las 48 hpi casi la totalidad de sitios de las tres plantas presentaban cristales (19/21, 20/21 y 16/21 sitios en *prodh2-2*, *prodh1-3* y Col-0, respectivamente), algo esperado para la infección con una cepa virulenta. Sin embargo, aún en esta fase de infección, la abundancia de cristales no fue igual en todas las plantas. Cuantificamos el número total de cristales por sitio y determinamos los siguientes rangos: sitios con menos de 10, entre 10 y 50 o más de 50 cristales. Con este análisis detectamos que la mutante *prodh2-2* presentaba el 53 % de sitios de inoculación con más de 50 cristales mientras que las plantas Col-0 y *prodh1-3* presentaban solo el 28 y 32 % de sitios en ese rango, respectivamente (Figura 20 E).

Estos resultados indican que la infección fúngica progresa más rápidamente en la mutante *prodh2-2*, que en las otras dos plantas. Además, *prodh1-3* muestra una tendencia a ser más susceptible que la planta salvaje. De este modo, ProDH2 cumpliría un rol más relevante que ProDH1 en la defensa temprana contra una cepa adaptada de *B. cinerea*. Esta es la primera condición en la que se observa que esta isoforma es preponderante respecto a ProDH1. Por un lado, es llamativo que ProDH genere defensas contra un necrótrofo siendo

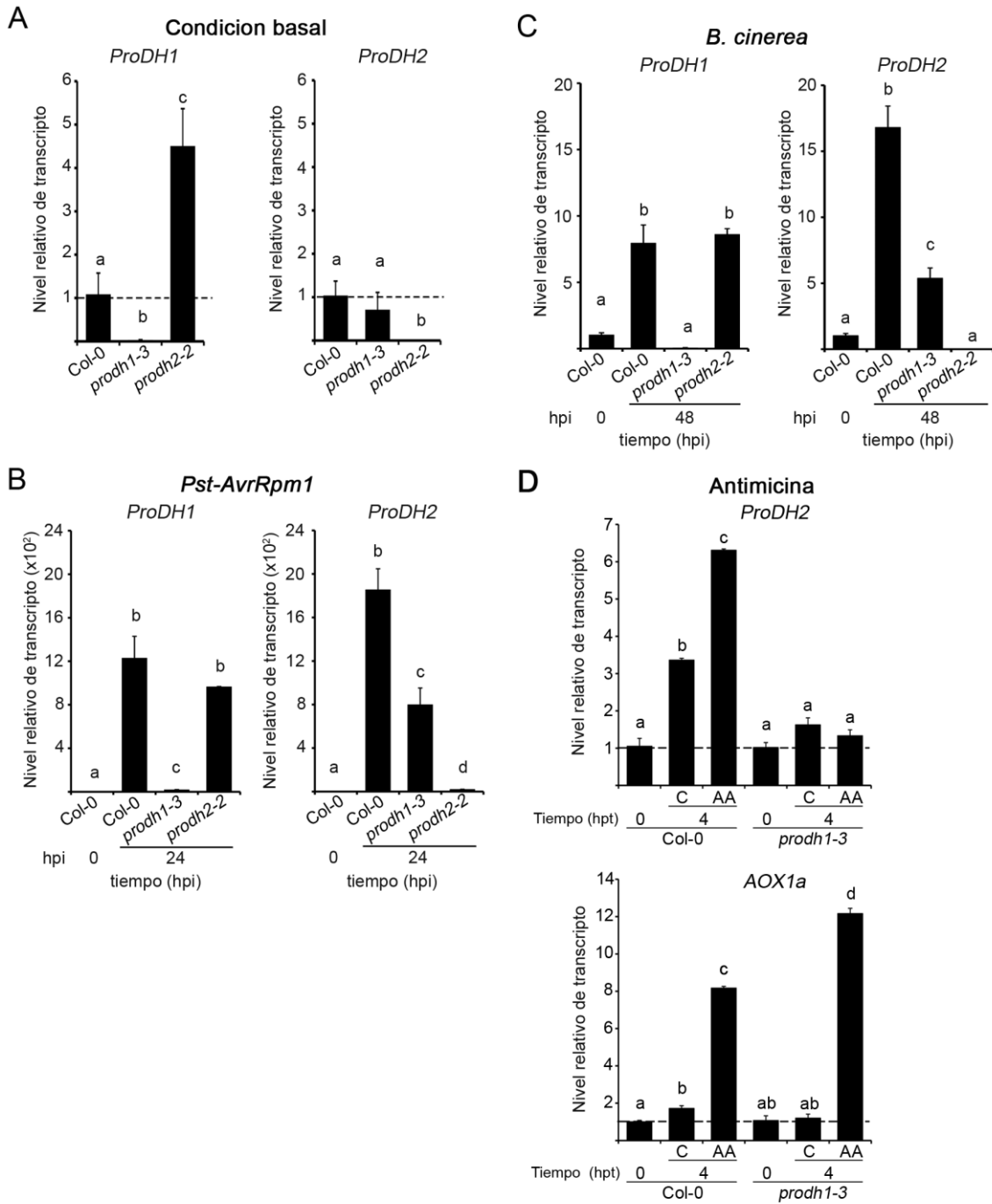


que participa en la generación de ROS y muerte celular de HR. Además, es interesante que ambas isoformas ProDH sean necesarias para las defensas contra patógenos con estilos de vida opuestos (biótrofos y necrótrofos) sugiriendo que estas isoformas cumplirían funciones variables según el patógeno al que se expone la planta.

### 3.5 Inter-regulación entre ProDH1 y ProDH2

Los resultados anteriores sugieren que en ausencia de una isoforma de ProDH la restante podría tener un efecto compensatorio. Para evaluar esta posibilidad analizamos si la expresión de *ProDH1* se altera en ausencia de *ProDH2* y *viceversa*. Comparamos la expresión de cada gen en plantas salvajes y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* por estudios de qPCR. Inicialmente, corroboramos que las mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* son nulas ya que muestran niveles indetectables de transcritos. En condición basal (sin tratamiento), *ProDH1* mostró mayor expresión en la mutante *prodh2-2* que en la planta salvaje (4,5 veces), sugiriendo que su regulación transcripcional es sensible a *ProDH2* (Figura 21 A). En contraste, la expresión de *ProDH2* fue similar en la planta *prodh1-3* y Col-0. Esto sugiere un efecto compensatorio de *ProDH1* sobre la carencia de *ProDH2*, que no se detecta en la condición recíproca.

A continuación, evaluamos la expresión de estos genes en plantas salvajes y mutantes a 24 hpi con *Pst-AvrRpm1*, expresando estos valores en forma relativa a los de la condición basal de la planta Col-0 (Figura 21 B). Observamos que la inducción de *ProDH1* en tejidos infectados era similar en la planta salvaje y la mutante *prodh2-2* (960 y 1200 veces de cambio respecto al nivel basal de Col-0, respectivamente). Por el contrario, la expresión de *ProDH2* a 24 hpi era significativamente inferior en la mutante *prodh1-3* que en la planta salvaje (800 y 1800 veces de inducción en relación al nivel basal, respectivamente). Esto indica que *ProDH2* requiere de *ProDH1* para lograr su óptima activación en respuesta a *Pst-AvrRpm1*.



**Figura 21. Expresión de *ProDH1* y *ProDH2* en mutantes *prodh1* y *prodh2*.** Transcritos de genes *ProDH1* y *ProDH2* cuantificados por qRT-PCR en plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* en condición basal (A), y en infección con *Pst-AvrRpm1* (24 hpi con  $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>) (B), o *B. cinerea* (48 hpi con  $1 \times 10^5$  conidios/ml depositados en 6 sitios de la hoja) (C). (D) Expresión de *ProDH2* y *AOX1a* en discos de hoja de plantas Col-0 y *prodh1-3* tratados con AA (10  $\mu$ M) por 4h. Los valores se determinaron con el método  $\Delta\Delta$ CT relativo al valor de Col-0 sin tratar (0 hpi) (A,B,C) o de muestras no tratadas (D). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 3 réplicas técnicas. *UBQ5* fue utilizado como control endógeno. En cada caso, se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0,05$  en A,B,C o  $p < 0,01$  en D, según *t*-test.

Realizamos el mismo análisis en plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* infectadas con *B. cinerea* (Figura 21 C). Al igual que en la infección de *Pst-AvrRpm1*, *ProDH1* se indujo en los tejidos infectados de manera similar en plantas salvajes y mutantes *prodh2-2* (7,9 y 8,6 veces relativo al nivel basal de Col-0, respectivamente). En cambio, *ProDH2* mostró menor inducción en la mutante *prodh1-3* infectada respecto a la planta salvaje infectada (5,4 y 16,8 veces de cambio, respectivamente). Entonces, en la infección con *B. cinerea* *ProDH2* también requiere de *ProDH1* para lograr su máxima expresión.

Estos resultados indican que en condición basal *ProDH1* presenta una regulación negativa por *ProDH2*, pero esto no se manifiesta en patogénesis. A su vez, *ProDH2* requiere de la presencia de *ProDH1* para alcanzar el nivel de inducción de la planta salvaje, tanto en infección con *Pst-AvrRpm1* como con *B. cinerea*.

Por último, realizamos un ensayo que contribuye a evaluar la regulación entre los genes *ProDH* en infección. El mismo analiza si un incremento de ROS mitocondrial podría inducir la expresión de *ProDH2* en forma dependiente de *ProDH1*, considerando que *ProDH* afecta la generación de ROS en tejidos vegetales infectados, y la enzima produce ROS mitocondrial en animales. Para ello, tratamos discos de hoja de plantas Col-0 y *prodh1-3* con el inhibidor de la mETC antimicina A (AA; 10  $\mu$ M) por 4 h. Como era esperado, este tratamiento produjo acumulación de ROS mitocondrial (Figura 21 D) e indujo la expresión del gen codificante de la oxidasa alternativa mitocondrial (*AOX1a*), un marcador de alteraciones redox de esta organela. Detectamos que la generación de ROS mitocondrial por AA induce a *ProDH2* en la planta salvaje, pero no en la mutante *prodh1-3*. Esto indica que la inducción de *ProDH2* por ROS mitocondrial depende de *ProDH1*. Especulamos que algo análogo podría ocurrir en infección y consideramos que este hallazgo podría resultar clave para analizar en un futuro el mecanismo por el que *ProDH1* regula transcripcionalmente a *ProDH2*.

## **CAPÍTULO II: COORDINACIÓN DEL CATABOLISMO Y SÍNTESIS DE PROLINA EN ESTRÉS**

Numerosos estreses cursan con acumulación de Pro por inducción de genes de síntesis y represión de genes del catabolismo. Además, es común que en la fase de recuperación los tejidos foliares estimulen el consumo de la Pro acumulada (Verslues y Sharma, 2010). La coordinación temporal y espacial del anabolismo y catabolismo de Pro parece cumplir un rol importante en la tolerancia a estreses abióticos. A nivel espacial Pro se sintetiza en tejidos fuente como hojas y se transporta a otros que actúan como sumidero como las raíces. Concomitantemente, transporta poder reductor y energía en ese proceso (Sharma y col., 2011).

Bajo estrés biótico se observan respuestas inversas ya que inicialmente se induce el catabolismo y luego la síntesis de Pro. En la HR generada por la infección de *Pst-AvrRpm1*, ProDH se activa en la fase inicial (Fase I; 6 hpi) participando en la generación de ROS y se mantiene activada hasta la fase III (72 hpi) en el cual se estimula el anabolismo coincidiendo con el establecimiento de la muerte celular y el aumento de Pro. A nivel espacial ProDH se induce en el centro de la lesión mientras que los genes de síntesis se inducen tanto allí como en el borde (Checchini y col., 2011a; Senthil-Kumar y Mysore, 2012). Esto sugiere una regulación espacio-temporal particular que no depende simplemente del contenido de Pro.

El catabolismo y la síntesis podrían estar coordinados en la HR de distintas maneras y así desencadenar distintos efectos. Entre ellos, el transporte de poder reductor desde tejidos sanos hacia el sitio de la infección (Sharma y col., 2011), la generación de ATP y ROS (Cecchini y col., 2011a; Senthil-Kumar y Mysore, 2012; Servet y col., 2012; Ben Rejeb y col., 2014), o el incremento de metabolitos tóxicos (P5C) (Deuschle y col., 2004). P5CDH es importante en esta regulación porque sería determinante para la acumulación de P5C (Deuschle y col., 2004), la ocurrencia del ciclo Pro/P5C (ciclo corto) sugerido como generador de ROS o del ciclo Pro/Glu (ciclo largo) que transporta poder reductor entre citosol y mitocondria. Es por esto que decidimos analizar cómo se coordina el catabolismo de Pro con su síntesis en HR. Este capítulo evalúa el efecto de ProDH sobre la síntesis de Pro en dos condiciones de estrés (infección con *Pst-AvrRpm1* y tratamiento con Pro exógena) y la participación de P5CDH en selección de las vías de síntesis (vía de Glu o vía de Orn).

## 4. 1 Síntesis de Pro en infección con *Pst-AvrRpm1*

### 4. 1.1 Acumulación de Pro en mutantes *prodh*

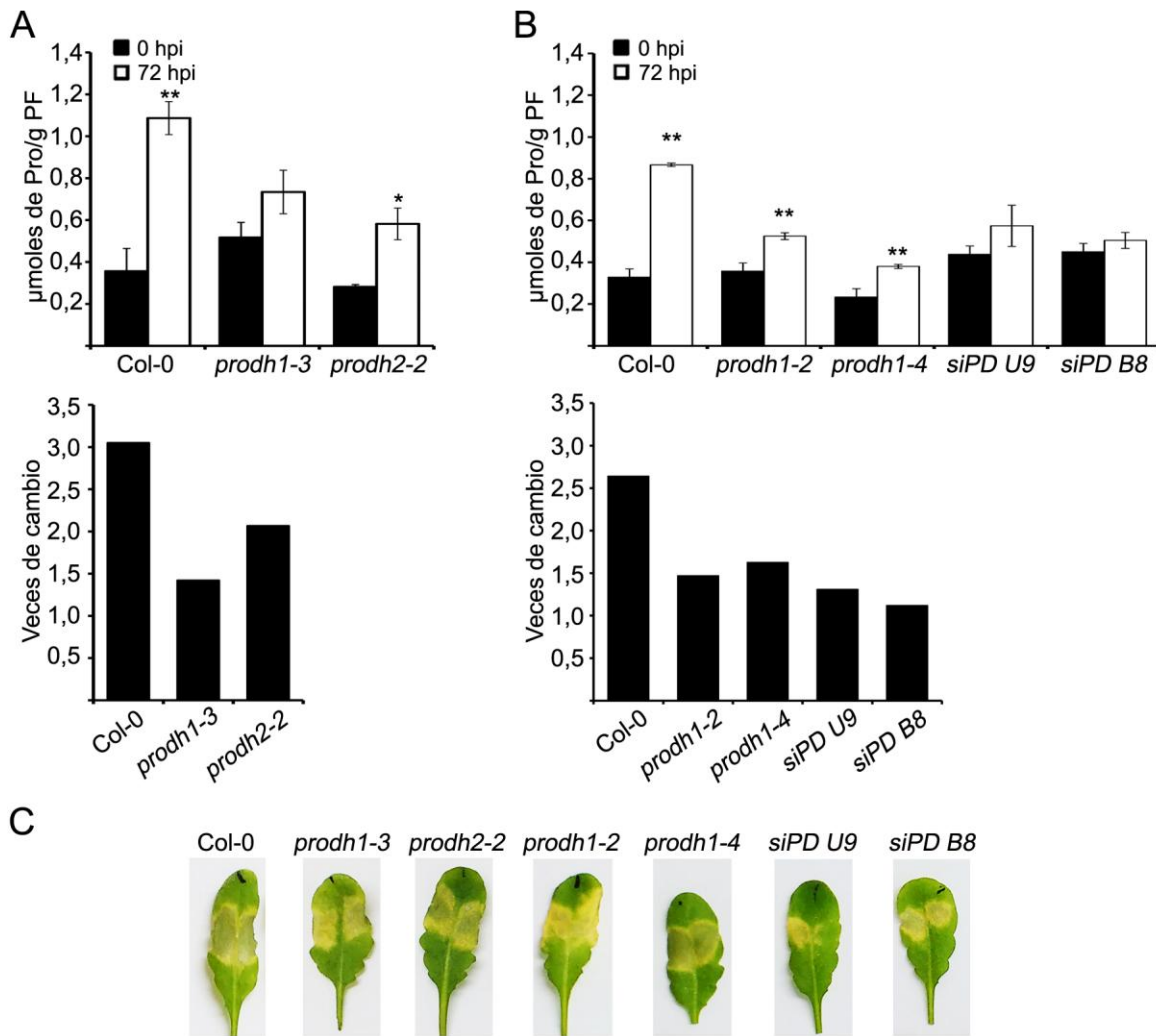
Para investigar si el catabolismo y la síntesis de Pro están coordinados en la HR, inicialmente analizamos si ProDH promueve la acumulación tardía del aminoácido. Para ello, cuantificamos su contenido en hojas de plantas salvajes, mutantes *prodh1-2*, *prodh1-3*, *prodh1-4* y *prodh2-2* y líneas silenciadas *siPD U9*, *siPD B8* a las 0 y 72 hpi con *Pst-AvrRpm1*. Si no existiera esta coordinación, los niveles de Pro en infección serían iguales o mayores en las plantas mutantes/silenciadas que en las salvajes.

A 72 hpi las plantas Col-0 aumentaron 2,6-3,0 veces el nivel de Pro respecto al nivel basal (Figuras 22 A, B). Por su parte, las simples mutantes no alcanzaron ese nivel de aumento, el cual fue de 1,47 (*prodh1-2*), 1,44 (*prodh1-3*), 1,63 (*prodh1-4*) y de 2 veces (*prodh2-2*). Las líneas silenciadas *siPD U9* y *siPD B8*, prácticamente no acumularon Pro en infección (1,3 y 1,1 veces de aumento, respectivamente) (Figura 22 B). Estos resultados indican que ambas ProDH desencadenan el incremento de Pro que ocurre en la fase III de la HR y ProDH1 sería preponderante en esta función.

Por otra parte, la necrosis de lesión de HR fue más marcada en la planta salvaje. En las mutantes esta lesión mostró bordes cloróticos más extensos, y en las plantas silenciadas tuvo un menor tamaño y desarrollo (Figura 22 C).

### 4.1.2 Acumulación de Pro en fase III de HR en plantas salvajes y *p5cdh*

Habiendo observado que ProDH afecta la acumulación tardía de Pro en HR, analizamos si este efecto requiere de P5CDH. Utilizamos una mutante nula *p5cdh* y en ella cuantificamos el contenido de Pro a 0 y 72 hpi con *Pst-AvrRpm1* mediante HPLC. En la fase tardía de la infección, las plantas mutantes y salvajes incrementaron el contenido de Pro de manera similar (Tabla II; Figura 23 A). Esto indica que la falta de P5CDH no impide la acumulación de Pro que ocurre en la fase III de la HR. Cabe notar que los niveles basales de Pro son mayores en la mutante pero esto no parece afectar el fenotipo de HR (Tabla II; Monteoliva y col., 2014).



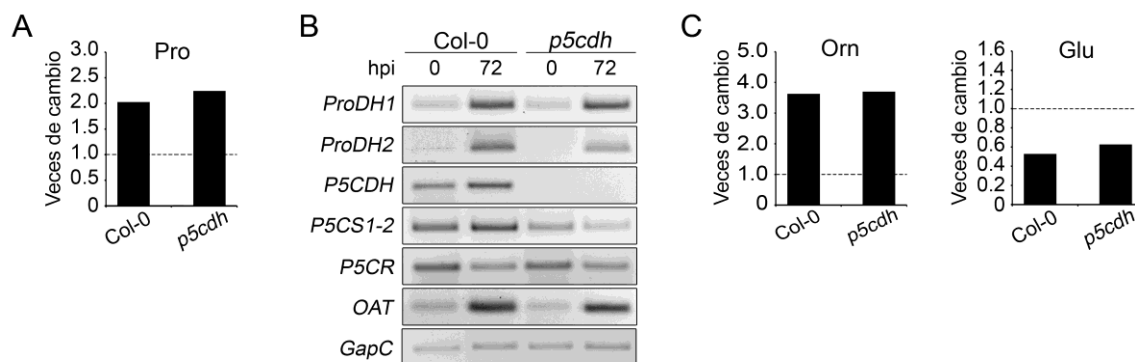
**Figura 22. Contenido de Pro en plantas salvajes y deficientes en *ProDH* infectadas con *Pst-AvrRpm1*.** Se grafican los niveles del aminoácido en cada muestra (arriba) y las veces de cambio en infección con *Pst-AvrRpm1* (72/0 hpi) (abajo) en plantas Col-0, *prodh1-3*, *prodh2-2* (A), *prodh1-2*, *prodh1-4*, silenciadas siPD U9 y siPD U8 (B). El contenido de Pro se cuantificó por colorimetría y se indica en  $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco. Se presenta un ensayo representativo de 2 experimentos biológicos; los datos representan media  $\pm$  desvío estándar de 3 hojas de 3 plantas. (\*) y (\*\*) diferencias significativas con  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$  respectivamente, según t-test, entre el contenido de Pro a 72 y 0 hpi. (C) Fotos representativas del desarrollo de la lesión de HR a 72 hpi en las distintas plantas.

Como se mencionó, *ProDH* se acopla a *P5CDH* al inicio de la HR y posteriormente se desacopla de esta enzima (Monteoliva y col., 2014). En una u otra condición, *ProDH* podría estimular distintas vías de síntesis de Pro y consecuentemente desencadenar diferentes alteraciones metabólicas. Observamos que a 72 hpi con *Pst-AvrRpm1* los genes *ProDH1* y *ProDH2* se inducen normalmente en la planta *p5cdh* (Figura 23 B). En lo que respecta a los genes de síntesis, los transcritos de *P5CS* aumentaron en la planta salvaje pero se redujeron

en *p5cdh*. Por otro lado, ambas plantas activaron la expresión de *OAT*, y reprimieron levemente la de *P5CR*. Esto indica que en el contexto de la infección P5CDH afecta la expresión de los genes *P5CS*, pero no la del gen *OAT*. Este resultado fue sorprendente dado que P5CDH no cataliza un paso limitante del catabolismo de Pro.

	Col-0		<i>p5cdh</i>	
nmol/ g PF	0 hpi	72 hpi	0 hpi	72 hpi
<b>Pro</b>	151 ± 19 <sup>a</sup>	305 ± 32 <sup>b</sup>	204 ± 20 <sup>a</sup>	457 ± 89 <sup>b</sup>
<b>Orn</b>	18 ± 3 <sup>a</sup>	64 ± 12 <sup>b</sup>	19 ± 3 <sup>a</sup>	70 ± 20 <sup>b</sup>
<b>Glu</b>	978 ± 21 <sup>a</sup>	516 ± 70 <sup>b</sup>	1087 ± 147 <sup>a</sup>	681 ± 27 <sup>b</sup>

**Tabla II. Contenido de Pro, Orn y Glu en plantas Col-0 y *p5cdh* infectadas con *Pst-AvrRpm1*.** Hojas de plantas salvajes y mutantes, sanas (0 hpi) e infectadas con *Pst-AvrRpm1* ( $1 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>) a 72 hpi, fueron utilizadas para cuantificar los aminoácidos por HPLC. a y b indican diferencias significativas entre tratamientos para cada planta ( $p < 0,05$  según *t*-test). Los valores se expresan como nmol/g de peso fresco. Los valores representan la media ± desvío estándar de 5-6 experimentos independientes. En cada muestra se utilizaron 3 hojas derivadas de 3 plantas independientes.



**Figura 23. Cambios en el metabolismo de Pro en plantas Col-0 y *p5cdh* infectadas con *Pst-AvrRpm1*.** Incremento de Pro a 72 hpi respecto a la condición basal (A) y transcritos de *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *P5CS1-2*, *P5CR* y *OAT* a 0 y 72 hpi (B). En B el gen *GapC* se utilizó como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. (C) Cambios en el contenido de Orn y Glu a 72 hpi respecto a la condición basal. La determinación de veces de cambio de A y C se realizó en base a datos de Tabla II.

Mediante ensayos de HPLC cuantificamos a los precursores de Pro (Glu y Orn) y determinamos sus alteraciones en infección. El nivel de Glu disminuyó un 40 a 50 % y el de Orn aumentó 3,6 veces en ambas plantas (Tabla II, Figura 23 C). Entonces, en infección,

P5CDH afecta a la activación transcripcional de *P5CS* sin alterar el contenido de los precursores de síntesis. De esta manera como OAT se induce en *p5cdh*, que Orn varíe de manera similar a Col-0 no llama la atención. Respecto a Glu, el contenido de este metabolito es altamente regulado por varias vías metabólicas, lo que explicaría la falta de variación en *p5cdh*.

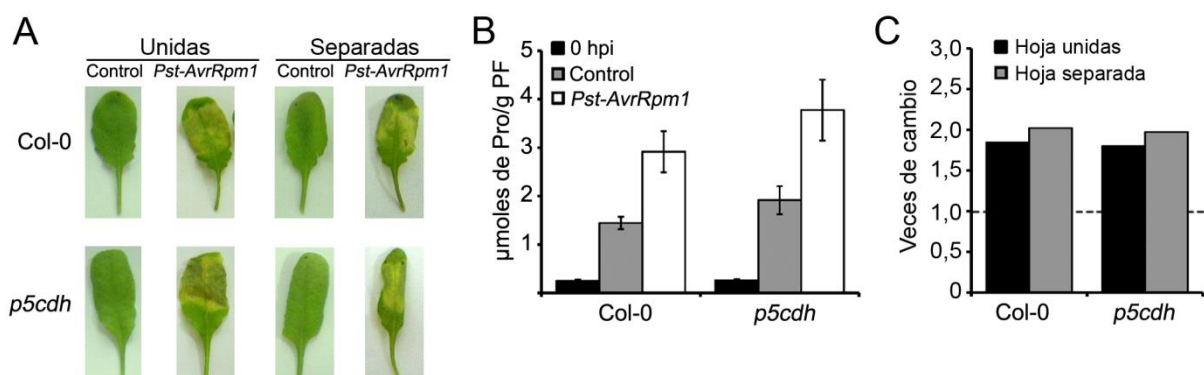
Los resultados obtenidos indican que OAT cumple un rol relevante en la síntesis de Pro durante fase tardía de la HR. Esta es una función novedosa tanto por el estadio de la planta (adulta) como por la condición (estrés biótico) en la que se presenta, ya que se la había asociado a la síntesis de Pro en plántulas bajo estrés salino.

#### 4.1.3 Síntesis y transporte

En condiciones de bajo potencial hídrico, la síntesis y catabolismo de Pro pueden llevarse a cabo en tejidos distintos, transportándose el aminoácido desde la parte aérea (tejidos fuente), hacia la raíz (sumidero) (Sharma y col., 2011). Del mismo modo la Pro que se acumula en los tejidos infectados podría derivar de tejidos sanos, especialmente en las plantas *p5cdh* que reducen la expresión de genes *P5CS1/2*. Para analizar esta hipótesis comparamos los niveles de Pro en hojas infectadas con *Pst-AvrRpm1*, que se mantuvieron ya sea unidas a la planta o cortadas. En el segundo caso incubamos los pecíolos en agua para evitar la desecación. Los estudios se realizaron en paralelo con plantas Col-0 y *p5cdh*.

La HR se desarrolló de manera similar en ambas condiciones (hojas unidas o cortadas) en ambas plantas (Col-0 y *p5cdh*) (Figura 24 A). Las hojas escindidas inoculadas con el vehículo presentaron mayor contenido de Pro respecto a la condición basal (Figura 24 B) pero esto no se manifestó en hojas mantenidas en la planta con el mismo tratamiento (no mostrado). Esta observación podría indicar cierto grado de estrés en las hojas cortadas, aunque visualmente no se observaron síntomas (Figura 24 A). Aún bajo esta condición, la acumulación de Pro tras 72 hpi con *Pst-AvrRpm1* relativa al tratamiento con el vehículo, fue similar para hojas unidas o separadas de las plantas Col-0 (1,85 y 2,02 respectivamente) y *p5cdh* (1,80 y 1,97 respectivamente; Figura 24 C). Esta observación indica que la síntesis de Pro se produce en el tejido infectado y estos tejidos generan Pro que se acumula durante la fase III de la HR sin requerir del transporte desde tejidos sanos.





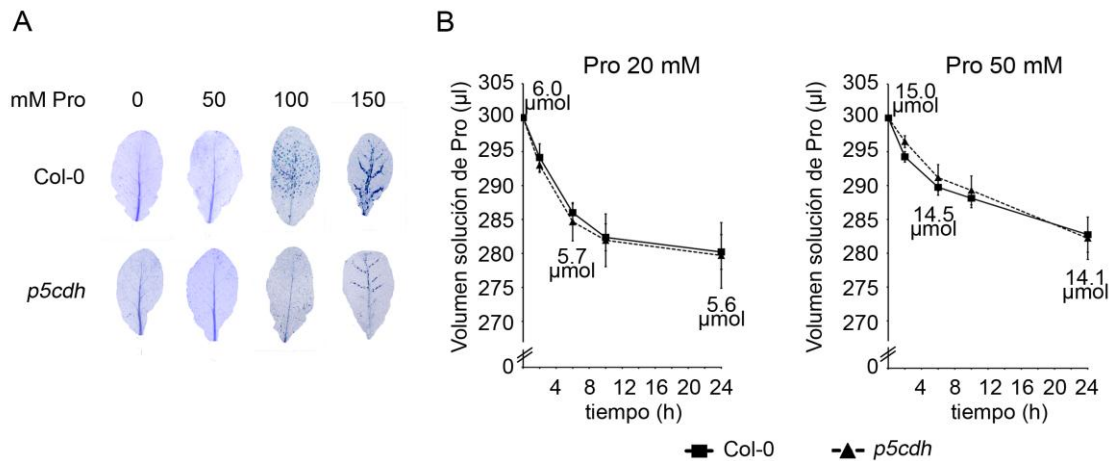
**Figura 24. Origen de la Pro acumulada en plantas Col-0 y *p5cdh* infectadas con *Pst-AvrRpm1*.** (A) Lesión de HR en hojas infiltradas con vehículo (control) o *Pst-AvrRpm1* ( $1 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) a 72 hpi, mantenidas en la planta (unidas) o cortadas (separadas). (B) Cuantificación de Pro en muestras sin tratamiento (0 hpi), o escindidas e infiltradas con vehículo (control) o con *Pst-AvrRpm1* y luego mantenidas en agua por 72 h. Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 réplicas biológicas independientes (3 hojas de 3 plantas por muestra). (C) Cambio en el contenido de Pro (infectada/control a 72 hpt) en hojas unidas o separadas de la planta en base a datos de 2 experimentos independientes.

#### 4.2 Efecto de ProDH sobre la síntesis de Pro bajo otra condición de estrés

Habiendo observado que la falta de ProDH afecta la activación de la síntesis de Pro en la fase III de la HR, procedimos a analizar si esto también ocurre bajo una condición de estrés abiótico. Para ello, aplicamos Pro exógena para inducir la expresión de *ProDH* y activar el consumo de Pro (Kiyosue y col., 1996; Nakashima y col., 1998; Satoh y col., 2002; Funck y col., 2010; Sharma y Verslues, 2010). Entonces evaluamos el comportamiento de los genes de síntesis *P5CS* y *OAT*. En estos ensayos utilizamos hojas cortadas en lugar de plántulas, para restringir el análisis a un único órgano vegetal y evitar efectos asociados al transporte del aminoácido. En este contexto, estudiamos a las plantas salvaje y *p5cdh*.

Inicialmente seleccionamos un tratamiento con Pro exógena que no fuese nocivo. Para ello, suministramos por pecíolo distintas concentraciones de Pro (0, 50, 100, 150 mM) por 24 h y analizamos muerte celular por tinción con azul de tripano (Figura 25 A). La solución de Pro 50 mM no resultó tóxica. Por el contrario, el suministro de Pro 100 y 150 mM generó muerte perivascular en hojas de plantas Col-0. Como las hojas de *p5cdh* sólo manifestaron muerte frente a la mayor concentración de Pro (150 mM), quisimos descartar que las mismas no presentaran una menor capacidad para captar al aminoácido de la solución. Para ello, incubamos las hojas en 300  $\mu\text{l}$  de 20 o 50 mM Pro y tomamos alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de estas soluciones a tiempo inicial y a 2, 6, 10 y 24 hpt para determinar en ellas la concentración de

Pro. Tras cuantificar el contenido del aminoácido por colorimetría, detectamos que Pro no varió su concentración a lo largo del tratamiento ( $20.2 \pm 0,2$  para solución 20 mM o  $49.9 \pm 1.9$  mM Pro para solución 50 mM). Por otra parte, medimos el volumen de cada tubo a los mismos tiempos para hojas Col-0 y *p5cdh* incubadas en 20 y 50 mM Pro y obtuvimos valores similares para una misma concentración y tiempo (Figura 25 B). Es decir, los genotipos no mostraron diferencias en la captación de Pro. Estimando el peso promedio de una hoja en 30 mg, detectamos que cada hoja captaría alrededor de 400 o 900 nmoles de Pro a 24 hpt con las soluciones de 20 o 50 mM, respectivamente (Figura 25 B).

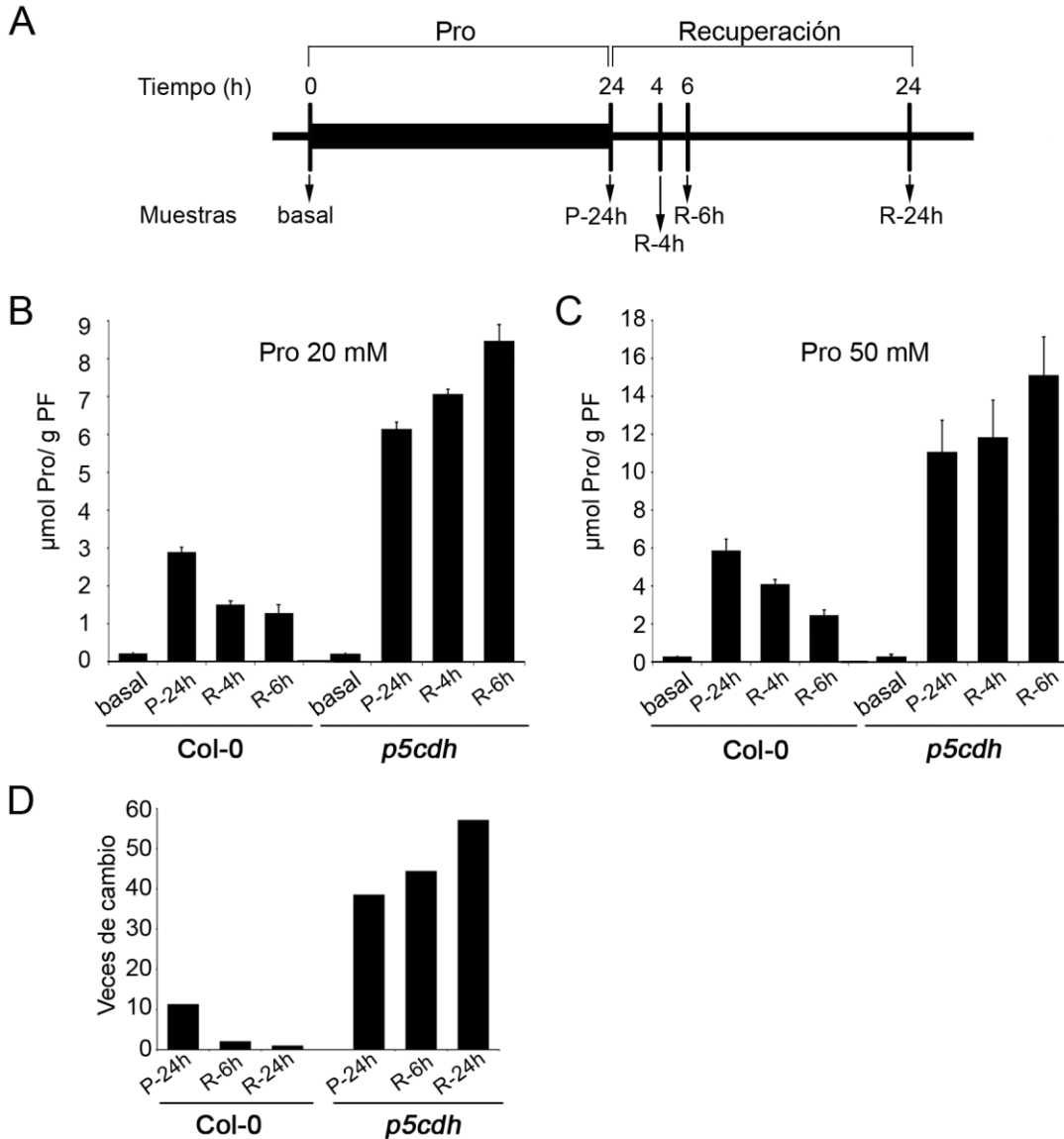


**Figura 25. Toxicidad y captación de Pro en hojas Col-0 y *p5cdh* cortadas.** (A) Muerte celular de hojas incubadas en agua o soluciones 50, 100 o 150 mM Pro por 24 h, determinada por tinción con azul de tripano. (B) Volumen de solución a tiempo inicial y a 2, 6, 10 y 24 h luego de incubación de hojas Col-0 o *p5cdh* en 300 µl de Pro 20 o 50 mM. Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 experimentos con 4 hojas cada uno. Se indica los valores totales de Pro en los tubos a 0, 6, y 24 hpt.

Una vez realizados estos controles sobre el sistema, analizamos si la inducción de ProDH por Pro exógena estimula a las vías de síntesis. El diseño experimental utilizado se describe en la Figura 26 A y consistió en colocar las hojas Col-0 y *p5cdh* en tubos con soluciones 20 o 50 mM Pro por 24 h (muestras P-24h). Luego de ese período, las hojas se retiraron y colocaron en cámara húmeda sin suministro de Pro para impedir su desecación. Durante este período (de recuperación) se tomaron muestras a distintos tiempos 4, 6 y 24 h (muestras R-4h, R-6h y R-24h, respectivamente). Se espera que en esta etapa se consuma la Pro administrada.

4.2.1 Contenido de Pro

Inicialmente analizamos el contenido de Pro en condición basal y en muestras P-24h, R-4h y R-6h por espectrofotometría. Como era de esperar detectamos mayores niveles del aminoácido en tratamientos con la solución más concentrada (50 mM Pro) (Figuras 26 B, C).



**Figura 26. Tratamientos con Pro exógena de hojas de plantas Col-0 y p5cdh.** (A) Diseño experimental que incluye la incubación de hojas en solución de Pro por 24 h (P-24h, barra gruesa) y la posterior recuperación en medio libre de Pro (barra fina) periodo en que se tomaron muestras a 4, 6 y 24 h (R-4h, R-6h y R-24h). El contenido de Pro se determinó en condición basal, P-24, R-4h y R-6h para tratamientos con solución 20 mM (B) o 50 mM (C) en hojas de plantas Col-0 y p5cdh. En B, C Pro se cuantificó por espectrofotometría. Se muestra un ensayo representativo de 3 réplicas biológicas. Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de 3 hojas de 3 plantas independientes por tiempo. En todos los casos se detectaron diferencias significativas respecto a la condición basal con  $p < 0,001$  según *t*-test. (D) Alteración del contenido de Pro a P-24h, R-6h y R-24h respecto al nivel basal, determinada por HPLC. Relaciones obtenidas de datos de Tabla III.

En hojas Col-0, detectamos un aumento de Pro a P-24h seguida de una reducción en la fase de recuperación, lo que indicó su consumo en la segunda etapa. En hojas *p5cdh*, el incremento de Pro a P-24h fue aproximadamente el doble que el de la planta salvaje y sorprendentemente, durante la recuperación el aminoácido continuó aumentando. Para confirmar estos resultados y descartar eventuales artificios de la técnica colorimétrica cuantificamos el contenido de Pro por HPLC. Muestras de hojas de Col-0 y *p5cdh* tratadas con 20 mM Pro fueron analizadas a nivel basal, P-24h, R-6h e incorporamos el análisis a R-24h. A partir de los datos obtenidos (Tabla III), determinamos las veces de cambio respecto a los niveles basales de cada planta. En Col-0, Pro aumentó 10 veces a P-24h y luego se consumió llegando a niveles basales tras 24 h de recuperación. En plantas *p5cdh* el contenido de Pro incrementó 38 veces a P-24h, y en R-24h llegó a un nivel 57 veces superior al basal (Figura 26 D y Tabla III).

El aumento de Pro detectado en *p5cdh* podía ser causado por el incremento de síntesis, o la inhibición de ProDH, entre otros. Estas dos posibilidades son analizadas a continuación.

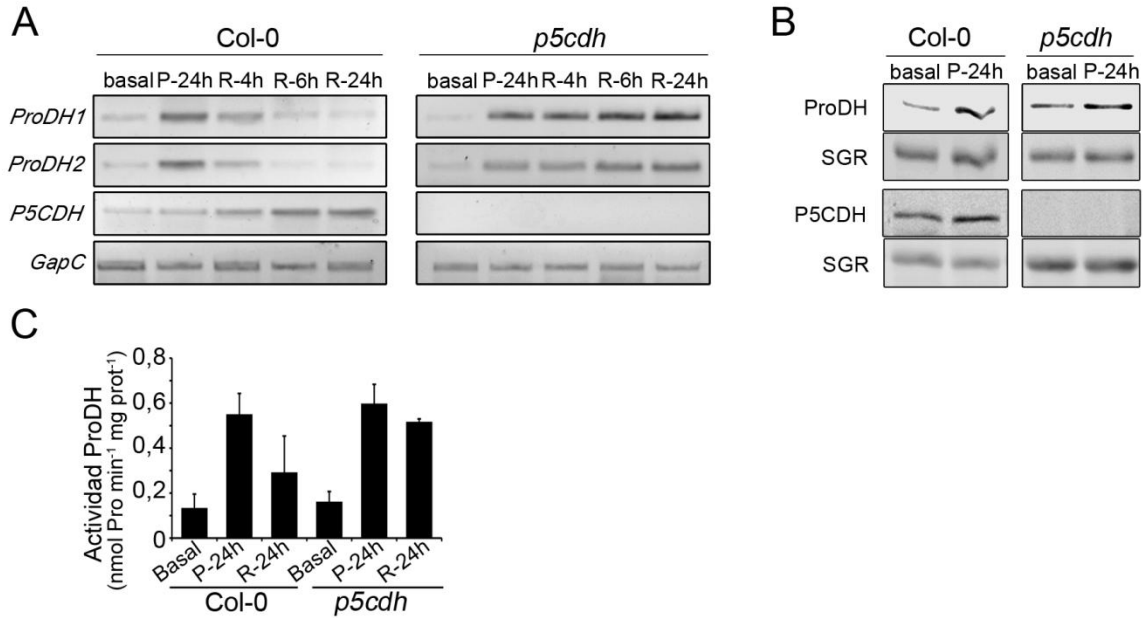
nmol/ g PF		Basal	P-24h	R-6h	R-24h
Col-0	Pro	125 ± 23 <sup>a</sup>	1400 ± 381 <sup>b</sup>	247 ± 45 <sup>a</sup>	115 ± 16 <sup>a</sup>
	Orn	13 ± 2 <sup>a</sup>	45 ± 8 <sup>b</sup>	26 ± 4 <sup>ab</sup>	31 ± 7 <sup>ab</sup>
	Glu	929 ± 177 <sup>a</sup>	1113 ± 45 <sup>a</sup>	1188 ± 36 <sup>a</sup>	1087 ± 130 <sup>a</sup>
<i>p5cdh</i>	Pro	213 ± 44 <sup>a</sup>	8172 ± 823 <sup>b</sup>	9425 ± 1088 <sup>bc</sup>	12113 ± 744 <sup>c</sup>
	Orn	26 ± 5 <sup>a</sup>	76 ± 21 <sup>ab</sup>	119 ± 29 <sup>ab</sup>	177 ± 26 <sup>b</sup>
	Glu	1096 ± 55 <sup>a</sup>	203 ± 26 <sup>b</sup>	473 ± 61 <sup>c</sup>	385 ± 83 <sup>bc</sup>

**Tabla III. Contenido de Pro, Orn y Glu en hojas de plantas salvaje y *p5cdh* tratadas con Pro exógena.** Determinación por HPLC del contenido de Pro, Orn y Glu en hojas tratadas con 20 mM Pro a P-24h, R-6h y R-24h. a, b, c indican diferencias significativas entre tratamientos para cada planta ( $p < 0,05$  por ANOVA y test de Tukey). Los valores se expresan como nmol/ g de peso fresco y representan la media ± el desvío estándar de 3-6 experimento independientes. En cada caso, se utilizaron por cada tiempo 3 hojas de 3 plantas independientes.

#### 4.2.2 Catabolismo de Pro

Para aportar más datos sobre la activación de ProDH por Pro exógena analizamos su nivel de expresión génica. En hojas Col-0, *ProDH1* y *ProDH2* se indujeron a P-24h y luego disminuyeron su expresión durante la recuperación, retomando niveles basales a R-6h. Por

otra parte, el gen *P5CDH* se activó a R-4h en este genotipo (Figura 27 A). En la mutante *p5cdh*, *ProDH1* y *ProDH2* se activaron a P-24h y a diferencia de lo observado en Col-0, mantuvieron una expresión elevada hasta R-24h. Esta activación de *ProDH* en *p5cdh* fue paralela a la acumulación Pro.



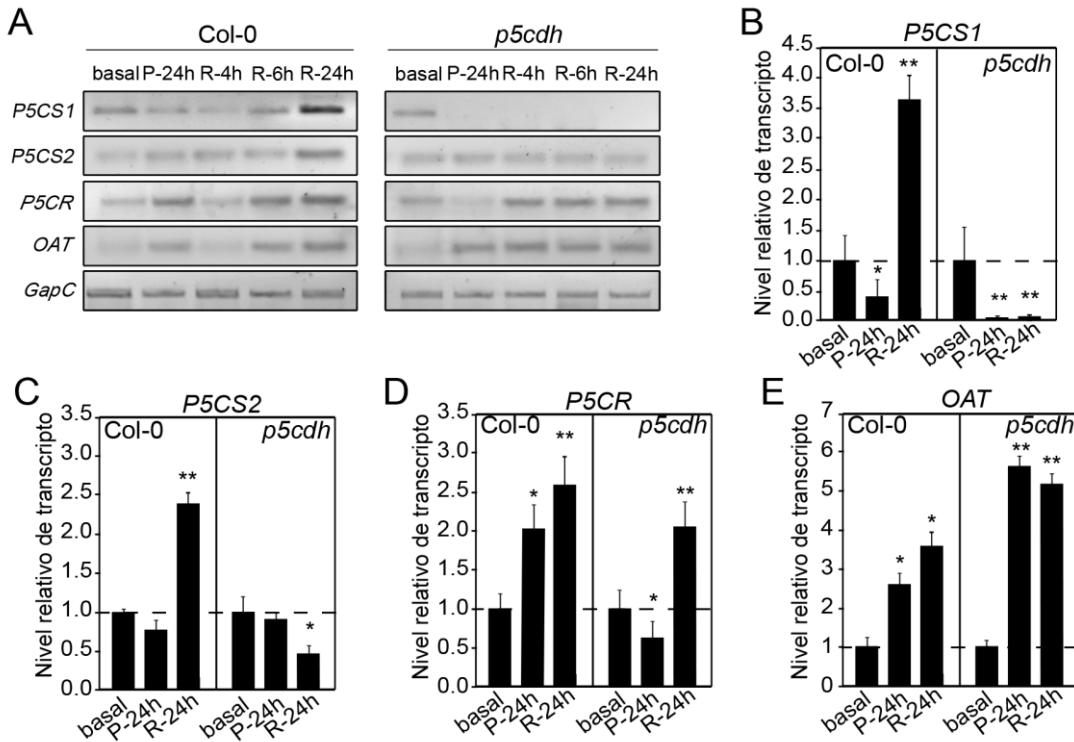
**Figura 27. Catabolismo de Pro en hojas de plantas Col-0 y *p5cdh* en tratamiento con Pro exógena (20mM).** (A) Nivel de transcritos de *ProDH1*, *ProDH2* y *P5CDH* en muestras no tratadas (basal), o analizadas a P-24h, R-4h, R-6h, y R-24h por sqPCR. *GapC* se utilizó como control endógeno de carga. (B) Nivel de proteínas ProDH y P5CDH en condición basal y P-24h analizado por Western blot. SGR subunidad mayor de Rubisco utilizada como control de carga. (C) Actividad ProDH en extractos de hojas a nivel basal, P-24h y R-24h. Los valores se expresan en nmol de Pro consumidos por min por mg de proteína total y representan la media  $\pm$  desvío estándar de 2 réplicas biológicas.

Además, a P-24h, detectamos la acumulación de la proteína ProDH en ambas plantas y la de P5CDH en Col-0 por Western blots (Figura 27 B). También analizamos la actividad ProDH durante el tratamiento. Coincidiendo con los resultados anteriores, en Col-0 esta actividad aumentó 4,1 veces a P-24h, y luego se redujo a la mitad durante la recuperación (Figura 27 C). En *p5cdh* la actividad aumentó 3,7 veces a P-24h y mantuvo un incremento similar (3,3 veces) hasta R-24h.

Este conjunto de resultados, confirma que el incremento de Pro que se produce en la mutante *p5cdh* durante la recuperación no responde a una inhibición de ProDH ya que, esta enzima se mantiene activada durante todo el tratamiento.

### 4.2.3 Síntesis de Pro

Finalmente, habiendo demostrado que el tratamiento con Pro exógena activa el catabolismo de Pro (ProDH) en plantas salvajes y mutantes *p5cdh*, analizamos su efecto sobre las rutas de síntesis. Para ello evaluamos si, tal como ocurre en patogénesis, los genes *P5CS* y *OAT* se inducen frente a este tratamiento. Observamos que en Col-0 los transcritos de *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR* y *OAT* aumentan entre R-6h y R-24h, coincidiendo con la fase donde Pro se reduce hasta niveles basales (R-24h; Figura 28 A). Estos datos fueron confirmados por qPCR para P-24h y R-24h, tal como se observa en la Figuras 28 B, C, D y E.



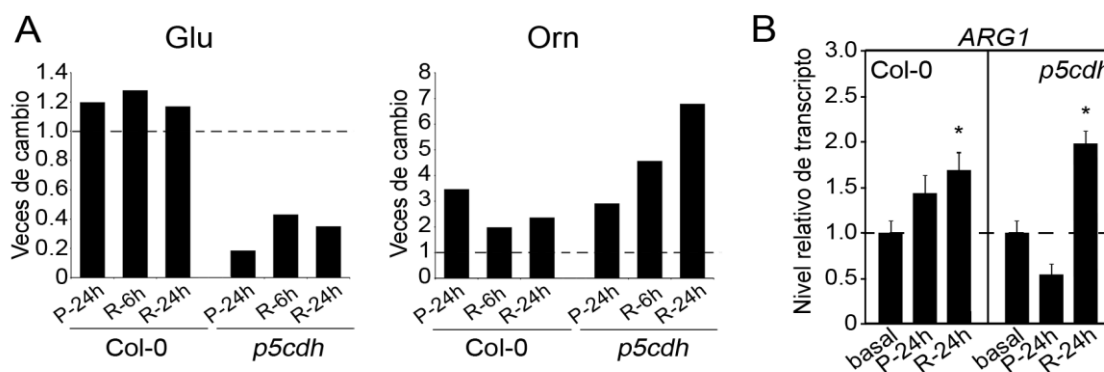
**Figura 28. Anabolismo de Pro en hojas de plantas Col-0 y *p5cdh* en tratamiento con Pro exógena (20 mM).** (A) Nivel de transcritos de genes del anabolismo de Pro (*P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR* y *OAT*) evaluados por sqPCR en muestras tomadas a los tiempos indicados. *GapC* se utilizó como control endógeno de carga. Cuantificación de transcritos de *P5CS1* (B), *P5CS2* (C), *P5CR* (D) y *OAT* (E) por qPCR a P-24h y R-24h relativa al nivel basal según Pfaffl, *UBQ5* se utilizó como gen endógeno. (\*) y (\*\*) diferencias significativas con  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$  respectivamente, según *t*-test.

En el caso de *p5cdh*, los genes *OAT* y *P5CR* mostraron una inducción sostenida desde tiempos más tempranos (P-24h y R-4h, respectivamente) y *P5CS2* mantuvo una expresión basal durante todo el tratamiento para luego reducirla hacia R-24h. Por su parte, *P5CS1* fue fuertemente reprimido a lo largo de todo el periodo. Por lo tanto, al igual que en

patogénesis, las plantas *p5cdh* alteran la expresión de los genes *P5CS* luego de la inducción de ProDH.

Hasta aquí, detectamos que tras la activación de ProDH se inducen los genes de síntesis de Pro tanto por la vía de Glu como de Orn. Por esto, cuantificamos estos aminoácidos por HPLC, para analizar si varían durante el tratamiento. Utilizamos muestras de condición basal, P-24h, R-6h y R-24h y hojas Col-0 y *p5cdh* (Tabla III) y con los datos obtenidos determinamos las veces de cambio de cada compuesto respecto a su nivel basal (Figura 29 A).

Glu no varió su nivel significativamente a lo largo del tratamiento en la planta Col-0, pero a diferencia de lo detectado en la HR, se redujo significativamente (entre 80 y 60 %) en la mutante *p5cdh*. Dado que Glu participa en numerosas vías del metabolismo de aminoácidos, esta reducción podría asociarse a falta de síntesis a partir de Pro (falta de P5CDH), su conversión en otros derivados (Arg, Asn, Ala, GABA, Gln), o la inhibición de otras vías de síntesis por la acumulación de Pro (Forde y Lea, 2007).



**Figura 29. Precursores de Pro en hojas de plantas Col-0 y *p5cdh* en tratamiento con Pro exógena (20 mM).** (A) Veces de cambio en el contenido de Glu y Orn a P-24h, R-6h y R-24h respecto al contenido basal en cada planta. Relaciones obtenidas a partir de datos de Tabla III. (B) Nivel de transcripto de *ARG1*, por qPCR, a P-24h y R-24h respecto al nivel de expresión en condición basal según Pfaffl. *UBQ5* se utilizó como gen endógeno. (\*) diferencias significativas con  $p < 0,05$  según *t*-test.

Por otra parte, el contenido de Orn aumentó a P-24h tanto en las plantas salvajes como en la mutante *p5cdh* (3,5 y 2,9 veces respectivamente). Sin embargo, durante la recuperación, su contenido disminuyó en Col-0 (30 a 40 % respecto a P-24h) y aumentó en *p5cdh* (1,5 a 2,3 veces respecto a P-24h), mostrando un comportamiento similar a Pro. Para evaluar si este aumento de Orn que se detecta en *p5cdh* podría deberse a su síntesis a partir de arginina (Arg), cuantificamos los transcriptos de *ARG1* (*Arginasa 1*) responsable de esa reacción, en esta condición. Aunque no detectamos una relación directa entre la expresión

de *ARG1* y los niveles de Orn a P-24h, observamos activación del gen a R-24h en ambas plantas, coincidiendo con la activación de la síntesis de Pro en la planta Col-0 y el aumento de Orn entre P-24h y R-24h en la planta *p5cdh* (Figuras 28 A, 29 A, B). Posiblemente la acumulación de Orn es necesaria para que este aminoácido funcione como sustrato de Pro, ya que en todos los casos aquí analizados su contenido se modifica en el mismo sentido que el de Pro (Figuras 23 A, C; 26; 29 A).

En resumen, los resultados descritos en este capítulo indican que la activación de ProDH que ocurre en los tejidos infectados con *Pst-AvrRpm1* o tratados con Pro exógena termina estimulando la síntesis de Pro a partir de Orn y de Glu. P5CDH es determinante para la activación de *P5CS*, posiblemente respondiendo a los niveles de Pro. Este patrón de regulación se conserva al menos en dos condiciones de estrés (biótico y abiótico).

La planta *p5cdh* reprime la expresión de *P5CS*. Sin embargo, esta mutante es capaz de acumular Pro tanto durante la HR como ante el tratamiento con Pro exógena. Como *OAT* se induce normalmente en esta planta, esta vía sería la principal responsable de la síntesis de Pro. Debido a que esta enzima suministra P5C en la mitocondria, la única alternativa para la síntesis es que este compuesto intermediario sea sustrato de P5CR. Al permanecer ProDH activa durante estos tratamientos, especulamos que bajo estas condiciones se mantendría activado el ciclo corto Pro/P5C.

A su vez, la regulación de *P5CS* por P5CDH aquí observada, sugiere que en la planta salvaje también se activaría el ciclo largo Pro/Glu durante la fase III de la HR, además del ciclo corto Pro/P5C ya descrito (Monteoliva y col., 2014).



### **CAPÍTULO III: POSIBLES MECANISMOS POR LOS QUE PRODH AFECTA PRODUCCIÓN DE ROS APOPLÁSTICO**

En los capítulos anteriores caracterizamos a ProDH1 y ProDH2 en tejidos infectados con patógenos de estilos de vida muy distintos y estudiamos su comportamiento principalmente en la HR (ETI) que es desencadenada por reconocimiento del efector AvrRpm1 por la proteína R RPM1. En otro estudio del laboratorio describimos que ProDH1 y ProDH2 también potencian la defensa basal (PTI) desencadenada por reconocimiento del PAMP flagelina (flg22) a través del receptor PRR FLS2. En ambas condiciones ProDH estimula la generación de aROS por la NADPH oxidasa de membrana RBOHD. En muchas interacciones con patógenos esta enzima es la principal responsable de la síntesis de aROS ( $O_2^-$ ) a expensas del consumo de NADPH citosólico (Torres y col., 2002; 2005; Nühse y col., 2007; Zhang y col., 2007).

En base a estos antecedentes, nos interesó aportar más evidencias sobre el posible mecanismo por el cual ProDH afecta la actividad de RBOHD. Considerando que ProDH se localiza en mitocondria y RBOHD en membrana plasmática, la interacción física entre ambas no tendría lugar. Así, debe existir un efecto indirecto de la actividad de ProDH que genere una respuesta o producto que potencie la actividad de RBOHD. Para estudiar este aspecto nos centramos en el modelo de PTI donde analizamos algunos efectos de ProDH sobre el receptor FLS2, RBOHD, y el estado redox a nivel citosólico, y/o mitocondrial. En este capítulo, se describen algunos sistemas que se implementaron para comenzar a estudiar el mecanismo por el cual ProDH potencia la producción de aROS.

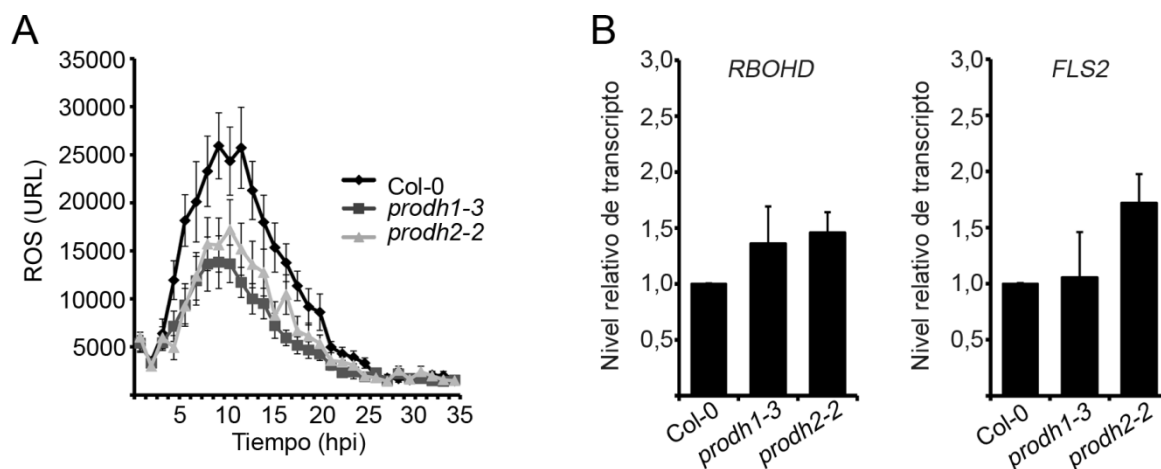
#### **5. 1. Efecto de ProDH sobre la generación de aROS de PTI**

El efecto de ProDH1 y ProDH2 sobre la generación de aROS por RBOHD se comprobó cuantificando la generación de ROS por esta enzima por el ensayo de luminol. Para ello, discos de hojas de plantas salvajes (Col-0) y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* fueron expuestos a flg22. Junto con la flg22 se incorporó luminol y peroxidasa, esta última permite la reacción del  $H_2O_2$  con el luminol generando emisión de luz. La luminiscencia es indicativa del contenido de  $O_2^-$  generado, y ya se ha establecido que RBOHD es la fuente de ROS en respuesta a flg22 (Zhang y col., 2007).

Las mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* presentan una menor producción de aROS, alrededor de un 50 y 40 % inferior al de la planta salvaje, respectivamente. Aunque *prodh1-3* presenta un nivel inferior al de *prodh2-2*, en varios ensayos realizados la diferencia entre las dos mutantes no resultó ser significativa (Figura 30 A).

## 5. 2. Efecto de ProDH sobre la expresión de *FLS2* y *RBOHD*

Como primer paso evaluamos si ProDH aumenta la expresión de los genes *FLS2* y/o de *RBOHD* y así potencia el estrés oxidativo. Esta respuesta se produce a tan solo 5 min de tratamiento con flg22, por lo que cuantificamos los niveles basales de estos transcritos en las plantas salvajes y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2*. La expresión de *RBOHD* no se diferenció significativamente de la planta salvaje con una tendencia a expresarse más en las mutantes (1,35 y 1,45 veces de cambio en *prodh1-3* y *prodh2-2* que en Col-0, respectivamente) (Figura 30 B). A su vez, la expresión de *FLS2* tampoco mostró variaciones significativas en las mutantes respecto a la planta salvaje (1,1 y 1,7 veces de aumento en *prodh1-3* y *prodh2-2*, respectivamente) (Figura 30 B). De este modo, la potenciación de la generación de aROS por ProDH no depende de una regulación transcripcional a nivel del receptor de la NADPH oxidasa.



**Figura 30. Producción de aROS y niveles de transcritos de *RBOHD* y *FLS2* en Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2*.** (A) Cinética de generación de aROS en discos de hojas tratados con flg22 (300 nM). Los valores (unidades relativas de luminiscencia, URL) corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 12 discos derivados de 12 hojas de al menos 3 plantas. Se muestra un ensayo representativo de 3 réplicas independientes. (B) Niveles de expresión de *RBOHD* y *FLS2*. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 4 réplicas biológicas cada una constituida por 3 hojas de 3 plantas distintas. En el gráfico se representa la expresión relativa a Col-0 calculada por el método Pfaffl, utilizando *UBQ5* como gen endógeno. No se detectaron diferencias significativas entre las muestras (ANOVA).

### 5. 3. Efecto de ProDH sobre el estado redox citosólico

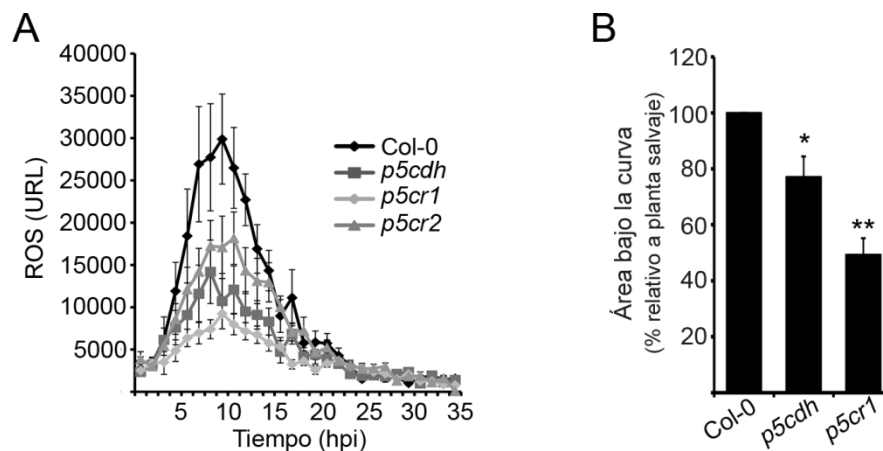
Algunos estudios han sugerido que el acoplamiento entre la síntesis y el catabolismo de Pro podría influir en el estado redox citosólico que mantendría el normal funcionamiento de la OPP (Hare y Cress, 1997). Sin embargo, esta conexión no ha sido evaluada hasta el momento. ProDH se acopla a P5CR durante el estallido oxidativo de la HR (Monteoliva, y col 2014), así como, a las vías de síntesis por Orn y Glu durante la última fase de esta respuesta (Capítulo II). De esta manera, la coordinación entre síntesis y catabolismo podría transportar de manera constante poder reductor desde el citosol a la mitocondria en los tejidos infectados que generan estrés oxidativo. Este transporte podría influir en el estado redox citosólico, y a partir de ello potenciar la actividad RBOHD. En este caso, la participación de P5CR sería necesaria para estimular la producción de aROS.

#### 5. 3. 1. Participación de P5CR y P5CDH en la generación de aROS

Analizamos si P5CR es necesaria para la generación de aROS por flg22. Con este fin, utilizamos dos mutantes insercionales de T-DNA *p5cr1* (Salk\_127043) y *p5cr2* (Salk\_098189) previamente caracterizadas a nivel genómico (Figura A4 de Anexo). Estas mutantes son hemigotas (no nulas) ya que las hijas homocigotas son inviables por ser P5CR requerida para el desarrollo embrionario (Funck y col., 2012). Aún así, observamos que las mutantes *p5cr1* como *p5cr2* acumularon menores niveles de aROS que la planta salvaje (Figura 31 A). Las diferencias entre ambas mutantes pueden asociarse a la posición del T-DNA en cada caso (en *p5cr1*: primer exón, en *p5cr2*: penúltimo intrón; Figura A4 de Anexo) La cuantificación del área bajo la curva de los histogramas mostrados en la Figura 31 A se utiliza para normalizar la producción de ROS de las mutantes relativo a la planta Col-0 y así poder comparar distintos experimentos. Así detectamos que las muestras de *p5cr1* presentan una reducción del 50 % en la producción de aROS respecto a la planta Col-0 (Figura 31 B).

Por otra parte, evaluamos el aporte de P5CDH a la generación de aROS en respuesta a flg22, utilizando el ensayo de luminol para la cuantificación. Estas mutantes redujeron los niveles de aROS alrededor de un 30 % respecto a la planta salvaje (Figura 31), indicando que la falta de P5CDH tiene menos efecto que la de P5CR sobre la producción de aROS. Sin embargo, el efecto detectado en la planta *p5cdh* sugiere que esta enzima favorece la actividad de RBOHD durante el tratamiento con flg22. Esto sería consistente con su

participación en el ciclo Pro/Glu. Así tanto los ciclos Pro/P5C y Pro/Glu podrían actuar conjuntamente durante la HR y potenciar la generación de aROS.



**Figura 31. Producción de aROS por flg22 en plantas Col-0, p5cr1, p5cr2 y p5cdh.** (A) Cinética de generación de aROS en discos de hojas tratados con flg22 (300 nM). Los valores (unidades relativas de luminiscencia, URL) corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 12 discos correspondiente a 12 hojas de al menos 3 plantas distintas. Se presenta un ensayo representativo de tres. (B) Niveles de aROS cuantificados como área bajo la curva relativizada como porcentaje del valor obtenido en Col-0. Se representa la media  $\pm$  error estándar de 3 o 9 ensayos independientes para p5cr1 y p5cdh, respectivamente. (\*) y (\*\*) diferencias significativas respecto a la planta Col-0 con  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$  respectivamente, según *t*-test.

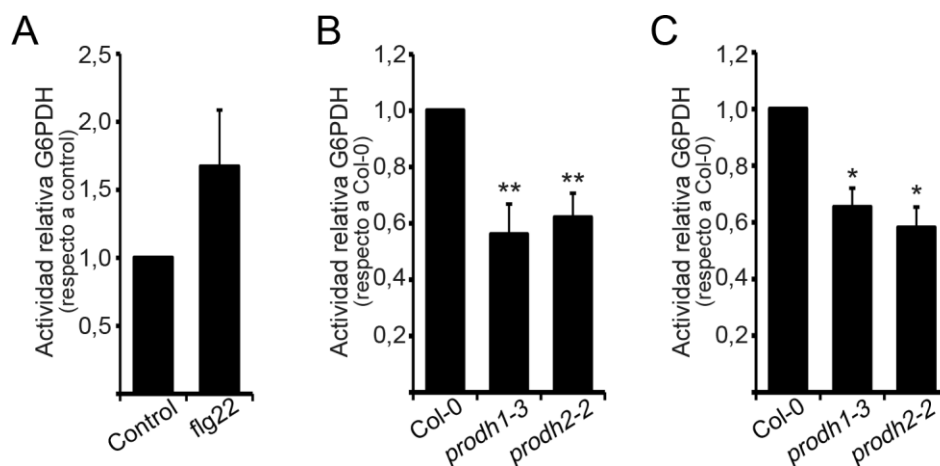
Estos resultados sugieren que ProDH podrían afectar el estado redox citosólico actuando en conjunto con las enzimas de síntesis. Como aproximación para evaluar esta posibilidad implementamos dos tipos estudios que son indicadores del estado redox citosólico: determinación de actividad G6PDH y translocación de NPR1-GFP al núcleo. Aquí describimos los resultados preliminares obtenidos con estos ensayos que deberán ser complementados por otros estudios en un futuro para definir el efecto de ProDH sobre el estado redox citosólico. Los datos presentados son indicativos de alteraciones en este compartimento celular.

### 5. 3. 2. Actividad G6PDH en mutantes *prodh1* y *prodh2*

El paso catalizado por la G6PDH es limitante en el desarrollo de la OPP. Esta enzima genera NADPH y es reprimida por producto por lo que esta finamente regulada por el balance NADPH/NADP<sup>+</sup> (Johnson y col., 1972; Lenzian y col., 1980; Williams, 1980). Existen seis isoformas de esta enzima en Arabidopsis, dos presentan localización citosólica, y cuatro

cloroplástica. Estas se expresan diferencialmente en distintos tejidos. En hojas, la actividad de la isoforma citosólica G6PDH5 es preponderante, y se ha detectado en menor medida la actividad de una isoforma cloroplástica la cual aún no ha sido identificada. Al igual que otras isoformas, G6PDH5 se inhibe por exceso de NADPH (Wakao y Benning, 2005), por lo que la medición de su actividad es un buen indicador del estado de oxidación de esta cupla redox.

Utilizamos extractos totales de hoja para cuantificar la actividad G6PDH en una mezcla de reacción que contiene  $\text{NADP}^+$  y glucosa-6-fosfato. Cuantificamos el NADPH generado por espectrofotometría y expresamos la actividad como  $\text{mmoles de NADPH por min}^{-1}$  por  $\text{g proteína total}^{-1}$ . Stampfl y col. (2016) describieron que plántulas salvajes expuestas a flg22, presentan un incremento de 1,3 veces en la actividad de esta enzima respecto al control. En nuestros ensayos con discos de hojas de planta Col-0 tratadas por 15 min con 300 nM flg22, detectamos un aumento en la actividad G6PDH de alrededor de 1,6 veces respecto al control en algunos casos (Figura 32 A), pero en otros ensayos no observamos dicha inducción.



**Figura 32. Actividad G6PDH en plantas Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2*.** Se informa la actividad enzimática de la planta Col-0 en respuesta a flg22 [15 min luego de exposición a flg22 300 nM] expresada en forma relativa al tratamiento control con  $\text{H}_2\text{O}$  (A). Actividad enzimática en plantas mutantes relativa a Col-0 en estado basal (B) o en respuesta a flg22 (C). Se muestra la media  $\pm$  error estándar de esas 3 réplicas biológicas. (\*) y (\*\*) diferencias significativas respecto a la planta Col-0 con  $p < 0,07$  o  $p < 0,01$  respectivamente, según *t*-test.

Al comparar la actividad enzimática basal de plantas salvajes y mutantes *prodh* detectamos de manera consistente importantes reducciones en las mutantes (45 y 40 % en *prodh1-3* y *prodh2-2* respecto a plantas salvajes, respectivamente), presentando la planta salvaje una actividad de alrededor de 15  $\text{mmoles de NADPH por min}^{-1}$  por  $\text{g proteína total}^{-1}$ . Estas diferencias se mantuvieron entre las mutantes y la planta salvaje tras el tratamiento

con flg22 donde la reducción fue de 35 y 42 % en *prodh1-3* y *prodh2-2* en relación a la planta control, respectivamente (Figura 32 B). Cabe destacar que en estos experimentos con flg22 la actividad G6PDH de la planta salvaje no alcanzó una inducción de 1,6 respecto a su condición basal, por lo que las diferencias con las mutantes podrían ser incluso mayores.

Estos resultados indican que la carencia de ProDH reduce la actividad G6PDH siendo consistente con que ProDH podría evitar la acumulación del NADPH citosólico, que inhibe a la enzima limitante de la OPP.

### 5.3.3 NPR1-GFP como marcador de estado redox citosólico

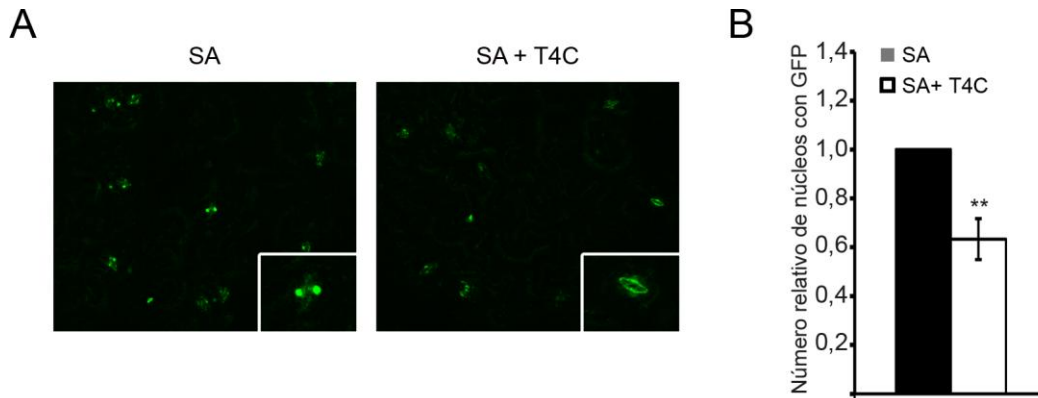
NPR1 es un regulador positivo de las vías defensas contra patógenos biótropos estimuladas por SA. En tejidos no infectados esta proteína se mantiene en estado oligomérico en el citosol. En respuesta a SA se reducen los enlaces disulfuro intermoleculares por acción de tioredoxinas (TRX-h5 y TRX-h3), y NPR1 desplaza su equilibrio al estado de monomérico relocalizándose en el núcleo. La capacidad de NPR1 de migrar al núcleo depende de la relación de GSH:GSSG (Mou y col., 2003). A mayor reducción del glutatión, mayor nivel de NPR1 en estado monomérico.

Disponemos de una planta transgénica que expresa NPR1 fusionada al gen reportero GFP. Este constructo constituye un buen marcador del estado redox citosólico, habiéndose observado que plantas tratadas con inhibidores de la OPP que reducen la relación GSH:GSSG, muestran menor migración de NPR1 al núcleo (Mou y col., 2003).

Utilizamos estas plantas NPR1-GFP para analizar si la falta de actividad ProDH altera la translocación de NPR1 al núcleo. Para esto, pre-tratamos discos de hoja con el inhibidor competitivo de ProDH thiazolidine-4-carboxylate (T4C; 4 mM por 1 h o agua como control) y luego los expusimos a SA (0,5 mM; 2 h). En concentraciones 1 a 5 mM, T4C inhibe a ProDH (Monteoliva y col., 2014) y reduce la acumulación de aROS por RBODH sin ser tóxico (Fabro y col., 2016). Como control, utilizamos discos pre-tratados con agua y luego expuestos a SA. Analizamos la localización subcelular de NPR1-GFP por microscopía confocal y cuantificamos el área, la intensidad y el número de núcleos con fluorescencia de GFP (programa Fiji-ImageJ) en células oclusivas de los estomas (Figura 33 A).

No detectamos variaciones en la intensidad ni el área de los núcleos marcados con GFP. Sin embargo, el número de núcleos fluorescentes fue inferior en los discos pre-tratados con T4C respecto a los pre-tratados únicamente con agua (Figura 33 B). Esto indica que la

monomerización de NPR1 es sensible a la actividad ProDH. Algo similar se detectó en plantas tratadas con un inhibidor de la actividad OPP, que redujo el nivel de NPR1 monomérica (Mou, y col., 2003). Esto refuerza la noción que indicaría que la actividad ProDH altera el estado redox citosólico.

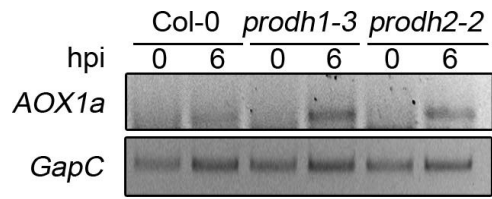


**Figura 33. Localización de NPR1-GFP en núcleo de células oclusivas de estomas.** (A) Discos de hojas de plantas transgénicas *35S:NPR1-GFP*, pre-tratadas por 1 h con 4 mM de T4C o H<sub>2</sub>O y luego con 0,5 mM SA por 2 h fueron analizados por microscopía confocal con excitación 488 nm y emisión 510 nm objetivo 20X. (B) Número de núcleos de células oclusivas de estomas en las que se detectó fluorescencia de GFP por campo, relativo al tratamiento con SA (B). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos de tres plantas distintas con tres fotos por preparado. (\*\*) diferencia significativa de tratamiento SA + T4C respecto al de SA con  $p < 0,01$ , según *t*-test.

#### 5. 4. Posible efecto de ProDH a nivel mitocondrial

Una elevada actividad ProDH podría favorecer la generación de ROS mitocondrial (mROS) y así señalar la actividad de RBOHD. Hasta el momento, no hemos indagado en esta posibilidad, no obstante hemos obtenido resultados preliminares que sugieren que las mutantes *prodh* presentarían alteración de la mETC. La inducción en la expresión de *Aox1a* es un sensor de alteraciones redox a nivel mitocondrial y hemos detectado que durante la infección con *Pst-AvrRpm1* (6 hpi; Figura 34), este gen presenta mayor nivel de expresión en hojas de plantas mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* que en Col-0, coincidiendo con lo observado en la Figura 21 D para la mutante *prodh1-3* tratada con AA.

Esto nos sugiere que ProDH podría ser requerida para el mantenimiento de la homeostasis de la mETC, estado redox mitocondrial y producción de ATP. Sin embargo, serán necesarios más ensayos para determinar la participación de ProDH en la generación de mROS y ATP.



**Figura 34. Expresión de *AOX1a* en plantas Col-0 y mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2*.** Expresión de *Aox1a* por sqPCR en hojas a 0 y 6 hpi con *Pst-AvrRpm1*. La expresión de *GapC* se utilizó como gen endógeno. Se muestra un ensayo representativo de dos réplicas biológicas.



## DISCUSIÓN

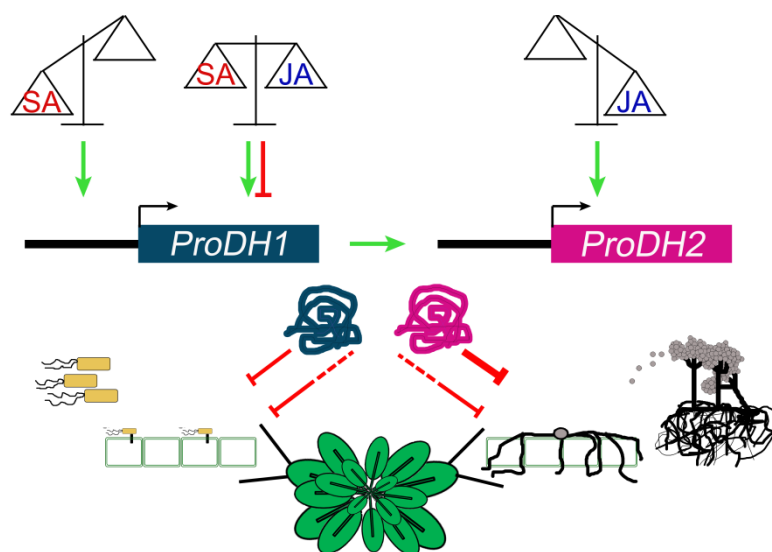
Existen dos genes que codifican para ProDH en *Arabidopsis* de los cuales uno ha sido muy poco estudiado y no se le ha descrito una función asociada (*ProDH2*). Este trabajo de tesis se centra en analizar la participación de ambos genes ProDH en las respuestas de defensa activadas durante distintas interacciones planta-patógeno, así como los factores que regulan la expresión de cada gen y los posibles mecanismos por los cuales ProDH participaría en el desarrollo de la inmunidad.

### **Defensas contra patógenos con estilos de vida diferentes**

La participación de ProDH en la resistencia contra biótrosos y necrótrofos resultó llamativa (Figuras 13; 20; 35). Proponemos que esto podría ser debido a su efecto positivo sobre el estrés oxidativo. Este comportamiento sería particular ya que muchos componentes que potencian la producción de ROS y consecuentemente la muerte celular de la HR restringen la proliferación de patógenos biótrosos, sin promover resistencia contra necrótrofos ya que un menor desarrollo de HR desfavorece la capacidad infectiva de estos organismos (Govrin y Levine, 2000; Glazebrook, 2005). No obstante, en los últimos años un grupo de investigaciones sugiere que el estallido oxidativo también puede generar muerte de las conidias de los hongos necrótrofos y estar inicialmente asociado a la resistencia. Esto se deduce de estudios con *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotinium*, que durante la infección temprana promueven condiciones reductoras que aminoran el efecto negativo de los ROS producido por el tejido infectado sobre sus hifas. A su vez, en una fase más avanzada de la infección, las hifas que sobreviven estimularían un estado oxidativo que favorece la muerte de las células de la planta y el crecimiento del micelio. El ácido oxálico (AO) liberado por el hongo regularía ambos tipos de alteraciones redox (Cessna y col., 2000; Shlezinger y col., 2011; William y col., 2011; Simon y col., 2013). En este contexto, nuestros resultados sugieren que en la infección temprana con *B. cinerea*, al igual que en la infección con *Pst-AvrRpm1*, ProDH promovería la generación de ROS que desfavorece las fases iniciales de infección. Esta hipótesis coincide con la hiper-susceptibilidad de ambas mutantes ProDH a *B. cinerea* en etapas tempranas de la infección, ya que la falta de la enzima favorece el avance inicial del hongo.

Por otra parte, es posible que ProDH cumpla funciones esenciales, por lo que su deficiencia, desfavorezca a cualquier respuesta de defensa. En este sentido, ProDH podría

afectar el metabolismo mitocondrial básico. Algunas enzimas mitocondriales que participan en la respiración son requeridas para inducir defensas contra biótrofos y necrótrofos. Entre ellas se encuentra la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Complejo II), cuyas mutantes son más susceptibles a *Pst* y a los necrótrofos *Rhizoctonia solani* y *Alternaria brassicicola* (Gleason y col., 2011). Así mismo, la mutación en la serina hidroximetiltransferasa 1 (SHMT1) mitocondrial, que participa en la fotorespiración, reduce la capacidad de producir ROS y defensas contra *Pst-AvrRpm1*, *A. brassicicola* y *B. cinerea* (Moreno y col., 2005). Más aún, ProDH podría tener funciones básicas más allá de la mitocondria. Como se discute más adelante, esta enzima podría afectar el balance redox del conjunto de piridin nucleótidos (Hare y Cress, 1997). En concordancia con esto la alteración de los niveles de NAD, y consecuentemente de NAD(P)/H, aumentan la producción de ROS y la resistencia a *Pst-Avrpt2*, *B. cinerea* y *Dickeya dadantii* (Pétriacq y col., 2016).



**Figura 35. ProDH1 y ProDH2 participan en la respuesta de defensa contra patógenos hemi/biótrofos y necrótrofos y son diferencialmente reguladas por SA y JA.** *ProDH1* es inducido por la vía de SA y es sensible a la interacción entre las vías de SA y JA. *ProDH2* es regulado por JA por una vía independiente de JAR-COI. A su vez, *ProDH1* regula positivamente la expresión de *ProDH2* en condiciones de infección. Ambas ProDHs son requeridas para la resistencia a la bacteria hemibiótrofa *Pst* como al hongo necrótrofo *B. cinerea*.

### Respuestas diferenciales de *ProDH1* y *ProDH2* en tejidos infectados

La información obtenida en relación a este aspecto, generó inicialmente un panorama confuso. Algunas evidencias sugerían que ambas ProDH podrían cumplir funciones redundantes y otras indicaban lo contrario. Entre las primeras, el tratamiento con distintos

patógenos y elicitores inducía a ambos genes (Figura 14), a diferencia de lo que ocurre en salinidad donde *ProDH1* es reprimida y *ProDH2* es inducida (Funck y col., 2010). En el mismo sentido, los promotores de ambos genes presentaban los mismos elementos de regulación por SA y JA (Figura 15 A). Además, en el material estudiado (hoja de planta adulta) y condición de luz seleccionada, las diferencias basales de expresión entre ambos genes *ProDH* eran mínimas (Figuras 2, 14 B). De hecho, en muestras infectadas *ProDH1* y *ProDH2* alcanzaron similares niveles de expresión (umbral alrededor de 25 ciclos para ambas en ensayos de qPCR; 31 y 29 ciclos, respectivamente en sq-PCR; eficiencias de amplificación similares para los oligonucleótidos; ver Tabla IV de oligonucleótidos de Materiales y Métodos. Además, a nivel fenotípico, la carencia de una u otra *ProDH* generaba similar susceptibilidad a infecciones avirulentas y virulenta de *Pst* (Figura 13). Esto sugería que *ProDH1* y *ProDH2* podrían coexistir en tejidos infectados y desarrollar funciones similares o idénticas.

Por otra parte, otras evidencias sugerían funciones no redundantes para estas isoformas. Fusiones transcripcionales de estos genes al reportero GUS revelaban distintos patrones de expresión a nivel tisular (Nakashima y col., 1998; Funck y col., 2010; Figura 2). Además, los promotores de ambos genes mostraban diferencias, en algunos elementos (respuesta a estrés hídrico, luz y otros; Figura 15 C) y los genes respondían de manera distinta al estrés abiótico presentando un bajo nivel de co-expresión (Figura 14 A). Estas diferencias en la regulación, llevaron a otros autores a proponer funciones no redundantes entre estas isoformas en *N. tabacum*, *B. napus* y en la misma *Arabidopsis* (Ribarits y col., 2007; Funck y col., 2010; Fäes y col., 2014).

Para profundizar en este aspecto, evaluamos a las mutantes *prodh1* y *prodh2* en otra interacción biótica (resistencia a *B. cinerea*) y analizamos la regulación de *ProDH1* y *ProDH2* por SA y JA en plantas salvajes. Ambos estudios mostraron diferencias significativas entre los genes indicando que no existiría redundancia de función entre ellos en patogénesis, tal como que se propuso para estrés abiótico.

Además, nuestros resultados sugieren que en tejidos infectados estas isoformas cumplirían funciones complementarias. Esto es consistente con que *prodh1-3* y *prodh2-2* sean igualmente susceptibles a *Pst-AvrRpm1* y *Pst-DC3000* y con que ambas isoformas sean necesarias para evitar la infección con *B. cinerea*. Además, la inter-regulación entre los genes en infección apunta en el mismo sentido. Así, cada isoforma podría cumplir funciones en

distintos tejidos, dada la distribución tisular previamente descrita (*ProDH2* en sistema vascular, *ProDH1* ubicuo; Nakashima y col., 1998; Funck y col., 2011; Genevestigator; Figura 2). No obstante, hasta el momento no se ha determinado la localización tisular de estas isoformas durante procesos infectivos, por lo que no podemos descartar que ambas actúen en los mismos tejidos. En ese caso resultados previos sugieren que podrían tener funciones en distintas organelas ya que, *ProDH2* podría localizarse en cloroplastos y *ProDH1* en mitocondria (Van Aken y col., 2009; Funck y col., 2010). Alternativamente, ambas enzimas podrían ser mitocondriales y cumplir funciones complementarias por ejemplo, mediante la formación de heterodímeros. Ensayos de geles 2D de mitocondrias aisladas de *Arabidopsis* detectaron a *ProDH1* en complejos de entre 70-140 kDa sugiriendo un posible estado oligomérico (Cabassa-Hourton y col., 2016). En el mismo sentido, si bien la estructura cuaternaria de las *ProDHs* de *A. thaliana* no ha sido evaluada, su homólogo de bacterias (*E. coli*, *Helicobacter spp.*, *Thermus thermophilus*), arqueas y eucariotas (*Trypanozoma cruzi*) sugiere que la enzima puede formar dímeros y/o oligómeros (Lee y col., 2003; Krishnan y col., 2006; White y col., 2007; Kawakami y col., 2011; Paes y col., 2013).

En este trabajo de tesis describimos los primeros fenotipos asociados al déficit de *ProDH2*. Particularmente, es interesante la susceptibilidad a *B. cinerea* detectada en la mutante *prodh2-2*, que representa la primera condición en que esta isoforma es más relevante que *ProDH1*. La expresión de *ProDH2* se induce fuertemente durante la infección de otros hongos necrótrofos como *A. brassicola*, *Plectosphaerella cucumerina* y *S. sclerotiorum* (Genevestigator) indicando que podría cumplir un rol más destacado en la respuesta de defensa contra este tipo de patógenos. En sentido contrario, durante la infección de *Arabidopsis* con el patógeno no huésped *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* solo la mutante *prodh1* mostró susceptibilidad y no así la planta *prodh2* (Senthil-Kumar y Mysore 2012). Sin embargo, el alelo mutante de *ProDH2* utilizado en ese caso (SAIL\_90\_G05) no es nulo, por lo que se requieren estudios adicionales con mutantes *prodh2* nulas para evaluar este aspecto. Así, estas observaciones refuerzan la idea que *ProDH1* y *ProDH2* podrían cumplir funciones específicas en el desarrollo de las defensas.

### Regulación transcripcional de *ProDH2* en infección

Un aspecto clave fue analizar las vías hormonales que regulan la expresión de estos genes en procesos de infección, particularmente de *ProDH2* el cual había sido muy poco estudiado. *ProDH2* no responde a SA exógeno (Cecchini y col., 2011a) ni depende de los componentes que regulan los niveles de SA en la planta (ICS1, mutante *sid2-2*) o su efecto en la resistencia contra biótrosfos (NPR1) (Figuras 16 A, 17 A). Por este motivo, fue llamativo que *ProDH2* fuese necesaria para la resistencia contra *Pst-AvrRpm1* y se indujera durante esta infección. Nuestros resultados sugieren que *ProDH2* sería regulada por JA en esta interacción debido a las siguientes evidencias: a) *ProDH2* se induce con meJA exógeno y esto resulta en el incremento de proteína (Figura 16 B y Figura A3 C, D de Anexo); b) en la infección con *Pst* su expresión es claramente dependiente de COR (Figura 17 C), algo que también se observó en ensayos de transcriptómica (Thilmony y col., 2006); c) en respuesta a *B. cinerea* su activación coincide con la del marcador *PDF1.2* y con la fase de acumulación de JA (Liu y col., 2015; Figura 17 B).

No obstante, tanto en la infección con *Pst-AvrRpm1* como con *B. cinerea*, la inducción de *ProDH2* es independiente de JAR y COI, siendo solo parcialmente dependiente de esta vía en el tratamiento con hormona exógena (Figuras 17 D, E; 18). Esto sugiere que *ProDH2* respondería a una vía alternativa de JA. Algunas evidencias sugieren la existencia de estas vías alternativas. Entre ellas, podemos mencionar que un 26 % de los genes que responden al tratamiento con meJA son independientes de COI1 (Devoto y col., 2005). Además, se ha observado que algunos fenotipos generados ya sea por COR exógeno o infección con la cepa *Pst* DC3000 tales como, la inhibición de deposición de calosa y la promoción del crecimiento de *Pst* se mantienen en mutantes *coi1* (Geng y col., 2014). Las vías alternativas de JA independiente de COI podrían involucrar a precursores o derivados de JA como OPDA y cis-Jasmonato (Wasternack y col., 2013), o responder a asociaciones con la vía de regulación de otra hormona como el etileno (Geng y col., 2014). Sólo como aproximación, evaluamos si existían evidencias de regulación por etileno (ACC), o específica por OPDA, JA o meJA. A partir de datos de transcriptomas detectamos que ACC no induce a *ProDH2* y que los distintos tipos de jasmonatos activan su expresión de manera similar (Genevestigator; Taki y col., 2005). Considerando que los componentes que integran la/s vía/s de JA independiente/s de COI no están claramente definidos no hemos podido utilizar mutantes en los mismos para definir cuál sería esta vía alternativa.

### Regulación transcripcional de *ProDH1* en infección

Como *ProDH1* se induce por SA vía ICS1/NPR1 en la infección temprana con *Pst-AvrRpm1*, pero solo responde parcialmente a esta vía en fases avanzadas de la infección (Cecchini y col., 2011a) sospechamos que podría ser sensible al JA que se acumula en esta fase. Existen evidencias que demuestran que el tratamiento con hormonas exógenas no necesariamente reproduce lo que ocurre durante la infección, donde la interacción entre distintas hormonas y vías de señalización definen conjuntamente la respuesta (de Vos y col., 2005; Tsuda y col., 2009). Así, la inter-regulación entre SA y JA y el balance entre ellas podrían ser determinantes de la activación de *ProDH1*. Esto se sustenta en las siguientes observaciones: a) durante la infección con *Pst-AvrRpm1*, *ProDH1* depende de JAR y de ICS1/NPR1 para activarse normalmente (Figura 19 A; Cecchini y col., 2011a) y en tejidos infectados con *Pst* avirulento (24 hpi) se acumulan SA y JA sin producirse inhibición de la vía de JA por la del SA (de Vos y col., 2005; Spoel y col., 2007); b) la inducción de HopX1 (activación de la vía JA) antagoniza la activación de *ProDH1* por SA (Figura 19 B); c) *ProDH1* se induce en infección con *B. cinerea*, donde también aumentan SA (24 hpi) y JA (48 hpi) (Liu y col., 2015); d) el JA exógeno no regularía a este gen posiblemente porque actúa a través de la vía de SA (Figura 16 B).

Nosotros detectamos tanto efectos sinérgicos como antagónicos de la interacción de SA y JA sobre la expresión de *ProDH1*. Esto ya se ha observado para otros genes, donde el contenido y balance entre estas hormonas y su cronología de activación, generan sinergismo o antagonismo sobre la expresión de genes marcadores clásicos como *PR1* (SA) y *PDF1.2* (JA) (Mur y col., 2006; Koornneeff y col., 2008). En el mismo sentido, en plantas mutantes *cpr6* que activan de manera constitutiva tanto las defensas de la vía de SA como las de JA, se ha observado inducción de *PR1* dependiente de *NPR1* y *JAR1* (Clarke y col., 2000).

Es interesante que dos genes que codifican para una misma función enzimática sean diferencialmente regulados por SA y JA ya que normalmente estas moléculas generan efectos opuestos en infección. Ensayos de transcriptómica identificaron genes que son regulados por ambas vías demostrando que 1 de cada 4 genes inducido por SA exógeno también es inducido por JA y viceversa, repitiéndose este resultado entre los genes reprimidos (Schenk y col., 2000). Sin embargo, no se han dirigido estudios a la detección de genes que codifiquen para una misma proteína, y sean activados ya sea por SA o por JA. Estas observaciones

sugieren que no solo los niveles sino también la proporción de las isoformas podrían variar en distintas respuestas de defensa en función al balance entre estas hormonas y tener distintos efectos. Por ejemplo, para señalar defensas sistémicas podría resultar esencial expresar la supuesta isoforma vascular (*ProDH2*). Además, eventualmente, la regulación por SA y JA permitiría formar homo u heterodímeros entre *ProDH1* y *ProDH2* con efectos o actividades diferentes.

### **Inter-regulación entre *ProDH1* y *ProDH2***

Las isoformas de *ProDH* muestran inter-regulación a nivel transcripcional. A nivel basal, la expresión de *ProDH1* está incrementada en la mutante *prodh2-2*. Esto podría explicar la falta de susceptibilidad y la baja acumulación de Pro que se detectan en plantas *prodh2-2* expuestas a Pro exógena, donde *ProDH1* podría tener un efecto compensatorio (Figuras 10, 11). Sin embargo, esta compensación no sería completa, ya que la falta de *ProDH2* también afecta la tolerancia a Pro exógena, aunque en menor medida que la de *ProDH1*. Nuestro estudio describe a *prodh2-2* como el primer alelo mutante de este gen que manifiesta este fenotipo. Esta mutación fue generada en el ecotipo Col-0 que, a diferencia del ecotipo Ler, no es en sí mismo susceptible a Pro exógena (Funck y col., 2010). En consistencia con esto, Cabassa Hourton y col. (2016) recientemente describieron que la doble mutante *prodh1-4/prodh2-2* tratada con Pro exógena tiene menor actividad *ProDH* que la simple mutante *prodh1-4*. Posiblemente, el sitio PRE detectado en el promotor de *ProDH2* podría mediar la inducción de este gen por Pro (Figuras 15; 27 A).

En condiciones de infección los dos genes *ProDH* se activan pero la falta de *ProDH2* no lleva a una mayor inducción de *ProDH1*. Esto se observa tanto en la infección con el patógeno biótrofo como con el necrótrofo. Sin embargo, a diferencia de lo observado a nivel basal, *ProDH2* no alcanza su inducción máxima en ausencia de *ProDH1*. Estos hallazgos indican que la inter-regulación de estos genes varía según la condición en estudio y que en patogénesis podría generarse un sinergismo entre los dos. A su vez, esto podría explicar el mayor grado de co-expresión detectado en estreses bióticos (Figura 14 A).

Desconocemos los factores que determinan la inter-regulación entre *ProDH1* y *ProDH2*. Una posibilidad es que *ProDH1* o algún derivado de su actividad determine la inducción de *ProDH2*. En animales la activación de *ProDH* lleva a incrementar los niveles del anión superóxido en la mitocondria (Donald y col., 2001; Liu y col., 2005; Hu y col., 2007) y lo



mismo podría ocurrir en los tejidos infectados de plantas. En *Arabidopsis* los estudios de transcriptomas sugieren que *ProDH2* es sensible a tratamientos que producen mROS, mientras que *ProDH1* no responde del mismo modo (Genevestigator). Realizando aplicaciones de AA (inhibidor del complejo III de la mETC) en hojas, provocamos acumulación de mROS y en esa condición detectamos inducción de *ProDH2* (Figura 21 D). Curiosamente, esta respuesta fue dependiente de *ProDH1*, por lo que aún si *ProDH1* incrementara el mROS, esto no sería suficiente para activar a *ProDH2*. Eventualmente, diferencias en los ROS generados por AA o *ProDH1*, u otras alteraciones asociadas a la actividad de esta enzima podrían ser responsables de las diferencias observadas. Por otra parte, la inducción de *ProDH1* por SA exógeno no induce a *ProDH2* (Figura 16 A), lo que indica que la expresión del primer gen no determina necesariamente la activación de segundo, confirmando que en patogénesis otros factores, incluso sensibles a las vías de SA-JA, podrían participar en esta regulación.

#### **ProDH estimula la síntesis tardía de Pro**

La constante estimulación de ProDH en los tejidos infectados plantea el interrogante de cómo se regenera el sustrato en esos tejidos. La Pro que es consumida por la enzima podría derivar de órganos sanos, o ser sintetizada en el mismo sitio.

Para evaluar la primera posibilidad utilizamos hojas cortadas e infectadas. Estas hojas generaron una acumulación de Pro y HR similares a aquellas infectadas y mantenidas en la planta, indicando que el transporte desde tejidos sanos no es relevante en estos procesos. Esto contrasta con lo que ocurre en condiciones de bajo potencial hídrico, donde Pro se moviliza desde las hojas hacia las raíces (Sharma y col., 2011). Consistentemente, en HR se activan los genes de síntesis de Pro a partir de Orn y Glu, sustentando la noción que la Pro consumida por ProDH deriva de los tejidos infectados. Más aún, la acumulación de Pro en una hoja depende de la activación de *ProDH* en la misma hoja, respuesta que fue observada tanto en mutantes *prodh* durante la HR, como en la inducción de ProDH en plantas salvaje tratada con Pro exógena. La inducción del catabolismo y la síntesis en el mismo tejido sugiere una coordinación entre estos eventos. Por el contrario, en otro estrés donde estos procesos se activan en distintos órganos, la síntesis puede mantenerse activa en ausencia de ProDH1 (Sharma y col., 2011).

La regulación de la síntesis por ProDH es novedosa, este evento podría ser importante en definir los bordes de la lesión. Posiblemente la Pro generada en el centro y bordes actúe como sustrato de ProDH favoreciendo la generación de ROS asociada a esta enzima. A su vez la acumulación de Pro en los bordes podría ser importante para delimitar la lesión (Fabro y col., 2004; Senthil-Kumar y Mysore, 2012). En este estudio observamos que las mutantes *prodh* presentan una HR con bordes más cloróticos y anchos que la plata salvaje, y en las plantas silenciadas estos rasgos son más notorios y la lesión está reducida, lo que indica que la activación de ProDH y posiblemente su coordinación con la síntesis son importantes para determinar la normal topología de la HR. Particularmente, ProDH1 parece cumplir un rol más relevante en la estimulación de la síntesis de Pro que ProDH2, y podría funcionar de manera sinérgica con la segunda isoforma ya que las plantas silenciadas acumulan menos Pro que las simples mutantes. Es importante aclarar es que los resultados aquí descritos descartan la hipótesis que las mutantes y silenciadas en ProDH generen una lesión reducida de HR por excesiva acumulación de Pro que actuaría como antioxidante (Qamar y col., 2015). Como hemos mostrado, estas plantas acumulan menos Pro que las plantas salvajes.

La señal que determina la regulación entre ProDH y las rutas anabólicas no parecería ser la reducción de Pro, ya que en plantas *p5cdh* donde ProDH se activa normalmente Pro no se reduce, la acumulación es normal o aun mayor. Curiosamente, en esta condición la presencia de P5CDH sería determinante para la activación de la síntesis vía Glu.

A su vez la regulación de los genes *P5CS* por P5CDH sugiere que en la fase III de la HR, además del ciclo Pro/P5C (Monteoliva y col., 2014), también tendría lugar el ciclo Pro/Glu. Una posible explicación para la ocurrencia de ambos, es que el primero se active inicialmente y termine generando una reducción de Pro por pérdidas en el ciclado. Al detectarse dicha disminución, los tejidos podrían reponer Pro utilizando el ciclo largo. Así la síntesis de P5C por Orn y Glu permitiría compensar reducciones en el nivel de metabolitos durante el ciclo Pro/P5C, ya que normalmente los ciclos no son totalmente eficientes. Asimismo, como la mutante *p5cdh* desarrolla la HR normalmente (Monteoliva y col., 2014), la ocurrencia del ciclo largo no sería limitante en el desarrollo de esta respuesta, ya que su aporte podría ser complementado por la vía de Orn.

### **Ornitina aportaría a la síntesis de prolina en infección**

Fue inesperado el descubrimiento de que OAT puede aportar a la síntesis de Pro durante el desarrollo de la HR ya que la contribución de esta enzima a este proceso es discutida, particularmente en *Arabidopsis*. Por un lado, plantas mutantes *oat* acumulan normalmente Pro bajo condiciones de estrés salino, por lo que su aporte sería secundario respecto al de P5CS, al menos en algunas condiciones (Funck y col., 2008). Por otro lado, hay discrepancias respecto a si el P5C generado por esta enzima es sustrato de P5CR o de P5CDH dada la localización subcelular de estas enzimas (citoplasmática y mitocondrial, respectivamente) (Funck y col., 2008).

Respecto al primer punto, los resultados que sugieren que OAT participa de la síntesis de Pro, fueron obtenidos en las mutantes *p5cdh*. En esa planta OAT se induce, P5CS es fuertemente reprimido y Pro se acumula tanto en infección con *Pst-AvrRpm1* como en tratamiento con Pro exógena. En este último caso, descartamos que la gran acumulación de Pro fuese asociada a un aumento generalizado de aminoácidos libres provenientes de la degradación de proteínas. Por un lado, las concentraciones de Pro exógena utilizadas no son tóxicas y las hojas *p5cdh* son más resistentes a este tratamiento que las hojas Col-0 (Figura 25 A). Además, en los perfiles de aminoácidos de HPLC no detectamos un aumento generalizado de aminoácidos. Por el contrario algunos de ellos (ej. Glu) reducen su contenido en estas muestras (Figura 29 A; Tabla III).

Otros antecedentes también refuerzan la participación de OAT en la síntesis de Pro en los tratamientos aquí estudiados. La OAT de *Vigna aconitifolia* no es inhibida por Pro (Delauney y col., 1993) y permitiría la acumulación de elevados niveles del aminoácido. Cabe preguntarse si en patogénesis y tratamiento con Pro exógena, la OAT de *Arabidopsis* puede mostrar este tipo de comportamiento y promover la síntesis y acumulación de Pro.

Respecto al segundo punto, los resultados que obtuvimos con la mutante *p5cdh* sugieren una coordinación entre OAT y P5CR que concuerda con el ciclado entre Pro/P5C que ocurre en la fase II de la HR (Monteoliva y col., 2014). Nuevamente, la existencia de este ciclo es discutida porque hasta el momento no se conoce el transportador de P5C de la mitocondria. Estudios de marcado metabólico en mutantes *p5cdh* ayudarían a evaluar el destino del P5C generado a partir de Orn.

Recientemente, se propuso que la inducción de OAT en HR podría derivar en la acumulación de P5C (Senthil-Kumar y Mysore, 2012). Sin embargo, la cuantificación de P5C

por HPLC en distintos estadios de HR indican que este intermediario no aumenta (Monteoliva y col., 2014), por lo que es previsible que el P5C generado por OAT alimente la síntesis de Pro en HR. Llamativamente, el sustrato de OAT (Orn) en vez de reducirse, incrementa frente al tratamiento con Pro exógena o la infección (Figuras 23 C; 29 A; Tablas II y III). El gen *Arg1* que codifica para la enzima que sintetiza Orn se induce tanto en infección con *P. syringae* (Jones y col., 2006), como en la recuperación del tratamiento con Pro exógena (Figura 29 B). Este incremento podría asociarse a un ajuste que permita un aumento constante de Orn para la producción de P5C. Un comportamiento similar en el contenido de este aminoácido se detectó en ensayos de estrés salino en plantas de castaña donde tanto Pro como Orn aumentaron en paralelo durante el tratamiento (da Rocha y col., 2012).

#### **Efectos de ProDH sobre la generación de ROS apoplástico**

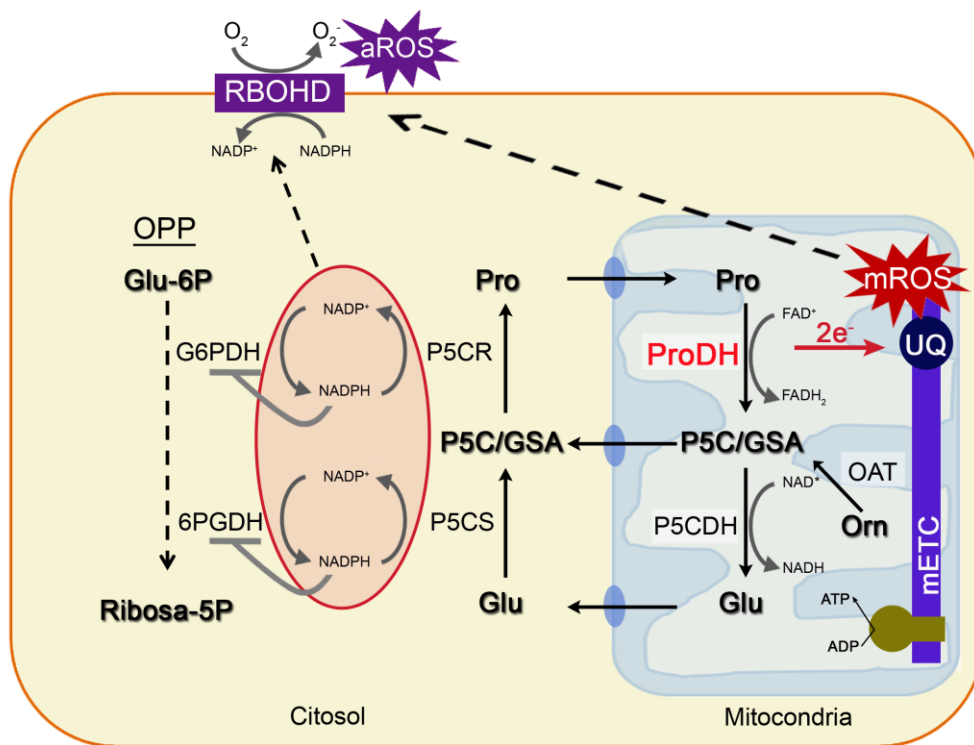
En nuestro grupo se ha determinado que durante el desarrollo de la HR y la respuesta a flg22, ProDH potencia la generación de ROS por la NADPH oxidasa de membrana (Cecchini y col., 2011a; Fabro y col., 2016; Figura 30 A). En ambos casos, la NADPH oxidasa RBOHD es la principal fuente de ROS (Torres y col., 2001; 2005; Nühse y col., 2007; Zhang y col., 2007). El efecto de ProDH se encuentra asociado a su actividad, ya que su inhibición por T4C y THFA (inhibidores competitivos) genera un efecto similar al detectado en las simples mutantes (Fabro y col., 2016). La disposición de ProDH y la NADPH oxidasa en distintos compartimentos celulares indican que la asociación entre ellas no debe ser directa. Con estos antecedentes, nos propusimos evaluar cómo podrían relacionarse ambas actividades (Figura 36).

Por un lado, la activación simultánea de ProDH y las enzimas de síntesis de Pro puede afectar el balance del NADPH/NADP<sup>+</sup> citosólico y en consecuencia la función NADPH oxidasa. Por otro lado, ProDH puede ceder electrones a la mETC, por lo que un exceso de su actividad podría favorecer la generación de mROS, pudiendo esto constituir una señal de activación para RBOHD.

#### **Efectos de ProDH sobre el estado redox citosólico**

El funcionamiento conjunto de síntesis y el catabolismo de Pro pueden colaborar a mantener la homeostasis redox del citosol al transportar poder reductor hacia la mitocondria (Hare y Cress 1997). Los resultados aquí descriptos sugieren que ProDH participaría de esta

regulación. Por un lado, las mutantes *prodh1-3* y *prodh2-2* presentan una actividad reducida de G6PDH tanto a nivel basal como luego del tratamiento con flg22 (Figuras 32 B, C). Esta enzima es inhibida por un estado reducido del citosol, particularmente por exceso de NADPH. A su vez, la inhibición de la actividad ProDH por T4C aparentemente reduce la migración de NPR1 al núcleo (Figura 33). Esta respuesta fue utilizada como segundo sensor del estado redox citosólico.



**Figura 36. Posibles efectos de la actividad ProDH sobre la generación de aROS.** La activación simultánea de ProDH y las enzimas de síntesis de Pro consumiría NADPH en el citosol manteniendo activa a la OPP, principal fuente de NADPH citosólico sensible al exceso de producto. Además, la activación de ProDH podría sobrecargar a la mETC, aumentando el nivel de mROS que actúe como señal para activar la producción de aROS. Además, a nivel mitocondrial ProDH podría incrementar la producción de ATP en tejidos que afrontan un estrés. En ambas condiciones ProDH podría coordinarse directamente con P5CR en el ciclo Pro/P5C o con P5CDH en un ciclo Pro/Glu.

Considerando que P5CR es requerida para la normal producción de aROS en respuesta a flg22, y que ProDH se coordina con enzimas de síntesis afectando el balance de NADPH entre el citosol y la mitocondria, es previsible que la participación de ProDH en el ciclo Pro/P5C altere la homeostasis redox del citosol. En concordancia con esto, mutantes *prodh1* tienen una relación NADP<sup>+</sup>/NADPH significativamente menor a la de la planta salvaje (Sharma y col.,

2011). Estos cambios pueden impactar en diversos procesos metabólicos, modulando actividades de enzimas sensibles a estado redox (Noctor y Foyer, 2016), incluida la RBOHD. Además, estos cambios podrían ser determinantes para la generación de modificaciones post-traduccionales necesarias para la activación de esta oxidasa, como es su fosforilación (Dubiella y col., 2013; Kadota y col., 2014; Li y col., 2014).

Por otro lado, indirectamente, el balance de pirimidin nucleótidos podría afectar a otras enzimas que regulen la actividad de RBOHD. G6PDH es una de las principales productoras de NADPH en el citosol siendo este cofactor el sustrato de las NADPH oxidasas de membrana. Existen antecedentes que demuestran que la actividad de la G6PDH favorece la producción de aROS. En tabaco, durante la HR desarrollada contra *Phytophthora nicotianae* la actividad y nivel de proteína de la G6PDH citosólica aumenta, mientras que la expresión constitutiva de una isoforma plastídica en citosol exacerba la producción de ROS y muerte celular de la HR. En el mismo sentido, la aplicación de un inhibidor competitivo de esta enzima reduce la producción de ROS por las NADPH oxidasa de membrana y la generación de la lesión de HR (Scharte y col., 2009). En Arabidopsis, el tratamiento con flg22 tanto de discos de hojas (Figura 32 A), como de plántulas, incrementa la actividad G6PDH, mientras que plántulas mutantes o tratadas con inhibidores de esta enzima presentan reducida la generación de ROS en respuesta a este y otros PAMPs, observándose lo inverso en plantas sobre-expresantes de esta enzima (Stampfl y col., 2016). Así ProDH podría potenciar la actividad de RBOHD al impedir la inhibición de la G6PDH por una elevada concentración de NADPH.

Como mencionamos, ProDH afectaría el estado redox citosólico acoplándose a las vías de síntesis participando ya sea en un ciclo largo (Pro/Glu) o corto (Pro/P5C). El primero consumiría dos moléculas de NADPH en el citosol por molécula de Pro transportada a la mitocondria por lo que tendría un mayor efecto. Sin embargo, nuestros resultados indican que ambos vías podrían ocurrir en este proceso ya que en la mutante *p5cr* se reduce en mayor medida la generación de aROS que la mutante *p5cdh*. Por un lado, esto sugiere que el ciclo corto participaría en la estimulación de producción de aROS, mientras que por otro, no podemos descartar que ciclo largo también contribuya a esta respuesta, dado el fenotipo detectado en plantas *p5cdh*. Estas observaciones concuerdan con la sugerencia de que el ciclo corto Pro/P5C potenciaría el estallido oxidativo (actividad RBOHD) durante la fase II de la HR (Monteoliva y col., 2014).

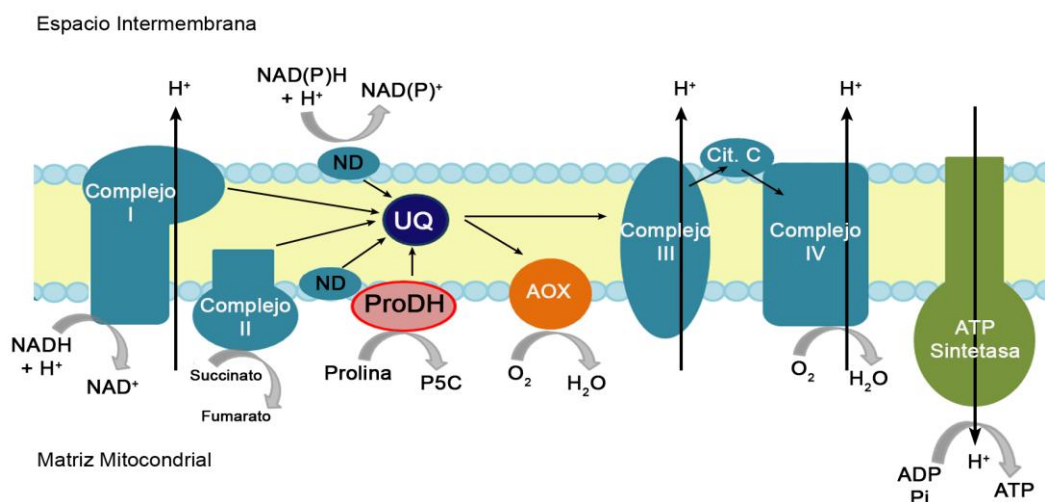
Es importante aclarar que la reducción en la monomerización de NPR1 producida por la inhibición de la actividad ProDH podría también asociarse a una reducción en la actividad G6PDH ya que la inhibición de la OPP reduce la monomerización de NPR1 (Mou y col., 2003). Pero esto no coincidiría con el estado redox reducido del citosol detectado en plantas mutantes *prodh1* (Sharma y col., 2011), ya que este favorecería la monomerización de NPR1 por tioredoxinas 3 y 5 (Mou y col., 2003). Estas aparentes discrepancias indican que estos resultados deben ser analizados con mayor cuidado.

### **Efectos de ProDH sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

ProDH también podría potenciar la producción de aROS a nivel mitocondrial (Figuras 36, 37). En animales la enzima cede los electrones resultantes de la oxidación de Pro directamente a la coenzima Q y probablemente compite por este aceptor con el Complejo II de la mETC. Así un incremento en la actividad ProDH reduce la capacidad respiratoria, con mayor generación de  $O_2^-$  mitocondrial y disminución del nivel de proteína de los otros componentes de la mETC (Hancock y col., 2015). En plantas recientemente se ha demostrado que ProDH1, y no así ProDH2, sería responsable de transportar los electrones de la oxidación de Pro a la mETC, en condiciones de tratamiento con Pro exógena (Cabassa-Hourton y col., 2016). Entonces en plantas, ProDH podría participar en la generación de ROS por sobrecarga de electrones en la mETC (Figura 37). La hiperactivación de ProDH dentro del ciclo Pro/P5C estimularía la producción mROS en raíces tratadas con Pro (Miller y col., 2009).

Los niveles de mROS podrían señalar cambios que afecten la actividad de la RBOHD. Nuestro grupo ha demostrado que tanto el bloqueo de la mETC (tratamientos con AA o rotenona) como la falla del sistema antioxidante de esta organela (silenciamiento de la Mn-superóxido dismutasa, MnSOD) reducen la capacidad de esta oxidasa de membrana de producir ROS (Fabro y col., 2016). En el mismo sentido, se ha propuesto que existe una fina regulación entre RBOHD, RBOHF y señales intracelulares derivadas de ROS y SA que determinan la inducción y mantenimiento de las respuestas de defensa (Chaouch y col., 2012). Por esto, sería importante en un futuro cuantificar la generación de ROS a nivel mitocondrial derivada de ProDH. Las mutantes *prodh* aumentan la expresión de *AOX1a* a nivel basal y en condiciones de infección (Figuras 21 D; 34) y tienen actividad AOX incrementada respecto a la planta salvaje (Cabassa-Hourton y col., 2016). En estas plantas el aporte de electrones a la mETC sería menor por deficiencia en ProDH. A su vez una mayor

actividad AOX indica que estas plantas podrían generar un menor transporte de protones en la mETC, lo que en conjunto determinarían una menor producción de ATP. Este también puede ser uno de los factores que afecta la actividad de RBOHD en las mutantes *prodh*.



**Figura 37. ProDH en la cadena de transporte de electrones mitocondrial vegetal.** Esquema de la mETC mostrando el Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (ubiquinol-citocromo C reductasa), Complejo IV (citocromo C oxidasa), UQ (ubiquinona) AOX (oxidasa alternativa), ND (NAD(P)H deshidrogenasas tipo II), ATP sintetasa. Se observa que los complejos I, III y IV transportan protones en la membrana. Los Complejos I, II y ND ceden electrones al UQ, esta puede cederlos a Complejo III permitiendo aumentar el potencial de membrana o a la AOX que cede electrones a  $O_2$ , evitando un exceso en el transporte de electrones. ProDH cedería los electrones directamente a UQ a partir de su cofactor  $FADH_2$ .

Nuestros resultados sugieren que ProDH afecta el estado redox citosólico pero aún desconocemos si la enzima también afecta la homeostasis redox de la mitocondria. Especulamos que la potenciación de RBOHD por ProDH deriva de uno u ambos efectos. En este sentido, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que aumentan la producción de NAD y modifica los niveles de NAD(P)/H, son más resistentes tanto a patógenos hemibiótrofos como necrótrofos (Petriacq y col., 2016). Plantas mutantes en una ascorbato oxidasa cloroplástica que participa en la síntesis de NAD, o enzima NADP-Málica citosólica (NADP-ME2) que produce NADPH presentan reducción en los niveles de ROS generados por RBOHD frente al tratamiento con flg22, y otros PAMPs como elf18 y quitina (Macho y col., 2012; Voll y col., 2012).



**Conclusión final**

En este trabajo, por primera vez demuestra que ProDH1 y ProDH2 participan en el mantenimiento del funcionamiento de la OPP, probablemente al coordinarse con la síntesis de Pro. Esto fue analizado tanto en HR como en tratamiento con Pro exógena. Este efecto de ProDH sobre la actividad G6PDH puede ser el responsable de la potenciación de RBOHD y de la producción de aROS. Estos efectos sobre el citosol y la RBOHD pueden ser uno de los factores que determinan que ProDH1 y ProDH2 participen de la inmunidad de la planta frente a distintos tipos de patógenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 1- Condiciones de crecimiento de plantas

Semillas de *Arabidopsis* fueron inicialmente esterilizadas con una mezcla 3:1 agua:NaClO y 1 % Tween 20, luego lavadas con agua estéril y mantenidas a 4 °C por 4 días. Entonces, se sembraron en placas conteniendo medio de cultivo Gamborg's, GM (1X sales de Murashige y Skoog, 1X vitaminas Gamborg, sacarosa 2 %, agar 1.6 %, agua destilada) con antibióticos. Tras 10 días de germinación y crecimiento, las plántulas fueron trasplantadas a suelo (tierra:vermiculita, 1:1), donde crecieron por 6-8 semanas. Tanto en placa como en suelo, fueron mantenidas en condiciones de temperatura constante de alrededor de 22 °C y ciclos de 8 h luz/ 16 h oscuridad.

Se utilizaron las siguientes plantas de ecotipo Col-0, plantas *siPD U9* y *siPD B8* generadas en nuestro grupo, las líneas *prodh1-2* (SALK\_081276), *prodh1-3* (GABI\_308F08), *p5cr1* (SALK\_127043) y *p5cr2* (SALK\_098189) que fueron cedidas por el Dr. Dietmar Funck (Funck y col., 2010; 2012) las líneas *prodh1-4* (SALK\_119334), *prodh2-2* (GABI\_328G05) y la doble mutante *ProDH prodh1-4xprodh2-2* que fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Arnould Savouré (Cabassa-Hourton y col., 2016) las mutantes *p5cdh* (SALK\_021026) *sid2-2*, *npr1-1* y *jar1-1* que se obtuvieron del *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) y las plantas transgénicas *35S:NPR1-GFP* que fueron obtenidas del laboratorio de la Dra. Xinnian Dong (Mou y col., 2003).

Las plantas *prodh2-1* (GT1788) ecotipo Ler fue obtenida del laboratorio del Dr. Dietmar Funck. Las mutantes *coi1-1* (Katsir y col., 2008) y las líneas transgénicas *Dex:HopX1* (Gimenez-Ibanez y col., 2014) ecotipos Col-5 y Aa-0, respectivamente, fueron cedidas por el Dr. Roberto Solano.

### 1.1 - Crecimiento en Pro exógena.

En los ensayos de crecimiento con Pro (Sigma-Aldrich), ésta se incorporó al medio GM en concentraciones 0, 5 y 20 mM y se permitió el crecimiento de las plántulas por 14 días en las condiciones de luz y temperaturas previamente descritas. En ese momento, se cuantificó el número de plántulas verdes como marcador de viabilidad, con este número respecto al total de semillas sembradas se determinó el porcentaje de viabilidad.

## 2- Tratamientos con patógenos

### 2.1- Condiciones de crecimiento e infección de patógenos bacterianos

Los patógenos bacterianos utilizados incluyeron la cepa virulenta *Pst* DC3000 (Whalen y col., 1991), la cepa avirulenta *Pst-AvrRpm1* que lleva el gen de avirulencia *AvrRpm1* (Ritter y Dangl, 1996) y la mutante deficiente en producción de coronatina *Pst* DC3118 (COR<sup>-</sup>; Thilmony y col., 2008). Estas cepas fueron crecidas en medio de cultivo King's B (KB; proteasa peptona 2 % p/v, glicerol 1 % v/v, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15 % p/v, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.15 % p/v, agar 1.5 % p/v, agua destilada) suplementado con antibióticos rifampicina (Rf) y kanamicina (Km) para *Pst* DC3000 y *Pst-AvrRpm1* y Rf para *Pst* DC3118. Para realizar las infecciones la bacterias se cultivaron en medio líquido con agitación (120-200 rpm) por 16 h a 28 °C, y 1 ml de ese cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 3 min y lavado una vez en 10 mM MgCl<sub>2</sub> pH=7. Se cuantificó el contenido bacteriano por absorbancia a  $\lambda = 600$  nm. Las bacterias fueron diluidas a  $5 \times 10^5$  ufc/ml para las curvas de crecimiento y  $10^6$  o  $10^7$  ufc/ml para análisis de expresión génica (Pavet y col., 2005). En los ensayos de infección la suspensión bacteriana se infiltró con una jeringa de 1 ml sin aguja en la parte abaxial de hojas de plantas de *Arabidopsis* de 6-8 semanas (Alvarez y col., 1998). Para ensayos de RT-PCR se infectó la hoja completa y para cuantificaciones de Pro y curvas de crecimiento se realizaron infecciones dejando un borde de hoja sin infectar.

### 2.1.1- Curvas de crecimiento de *Pst*

Estas se desarrollaron según Pavet y col. (2005) cortando discos de 4 mm en la zona infiltrada de 6 hojas de al menos 3 plantas, luego se maceró el tejido vegetal en 10 mM MgCl<sub>2</sub>, y se realizaron diluciones seriadas (1/10) que fueron sembradas en placas de KB (Rf 50 µg/ml y Km 100 µg/ml) por duplicado para cuantificar el número de unidades formadoras de colonia (ufc) tras 24-48 h a 28 °C, valor que se expresó como ufc/disco.

### 2.2- Condiciones de crecimiento e infección fúngica

La cepa *Botrytis cinerea* B05.10 fue provista por el Dr. Pietkenstain. Este hongo fue repicado cada 15-20 días bajo condiciones de esterilidad en medio de crecimiento sólido agar papa dextrosa (APD). Cada dos repiques se realizó uno en medio que contenía hojas de tomate triturado para mantener la virulencia del hongo. Los procedimientos de infección se llevaron a cabo siguiendo lo propuesto por Benito y col. (1998). A los 10 días post-repique, se los expuso por 2 días a luz negra para promover la producción de conidios. A los 15-16 días post-repique, se colectaron conidios y se lavaron con 0,1 % Tween 20, centrifugando a 6000 rpm

por 15 min. Luego, se realizaron dos lavados con agua y centrifugado por 5 min a 12000 rpm. Las conidias fueron resuspendidas en buffer de infección (10 mM  $K_3PO_4$  y 10 mM sacarosa) por 2 h. Luego de cuantificarlas, utilizando una cámara de Neubauer en microscopio óptico, se diluyó en buffer de infección hasta concentraciones  $1 \times 10^5$  o  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  conidios/ml para ser utilizados en ensayos de RT-PCR o ensayos de crecimiento respectivamente. Para analizar crecimiento, de un lado de la hoja se depositaron 3 gotas de 5  $\mu$ l de  $1 \times 10^4$  conidios/ml, y en la otra de  $1 \times 10^3$  conidios/ml. Las muestras se recolectaron a 24, 36 y a 48 hpi.

#### 2.2.1- Tinción de *B. cinerea* con azul de tripano

Para análisis de estructuras fúngicas, las muestras de hojas infectadas con *B. cinerea* se colocaron en solución fría de azul de tripano (solución A:etanol, 1:1) por 16 h. La solución A compuesta de agua:ácido láctico:glicerol (1:1:1) conteniendo 0,025 % de azul de tripano. Posteriormente, las hojas se destiñeron con hidrato de cloral 70 %, luego con etanol 90 % y progresivas diluciones de etanol (70, 50, 30 y 0 %). Finalmente, se resuspendieron en glicerol 30 % y se montaron con porta y cubreobjetos. Se realizaron fotografías bajo lupa, usando una escala incorporada a cada foto para cuantificar el área de crecimiento del hongo (programa ImageJ). Por microscopía óptica se analizaron estructuras fúngicas y los cristales de AO.

### **3- Tratamiento con ácido jasmónico exógeno**

Plantas jóvenes de 3-4 semanas conteniendo alrededor de 8 hojas expandidas fueron colocadas en recipientes cerrados de 7,74 L. El tratamiento con meJA se realizó por evaporación según Fabro y col. (2008). Para ello, se incorporaron bolitas de algodón en las cuales se distribuyó una solución de 1,54  $\mu$ l de meJA (Sigma) en 160  $\mu$ l de etanol o etanol solo como control, obteniendo una concentración final 0,84  $\mu$ M de meJA en el volumen del recipiente.

### **4- Inducción HopX1 y tratamiento con ácido salicílico**

El tratamiento se realizó según Gimenez-Ibanez y col. (2014). Plántulas transgénicas *HopX1* crecidas en medio GM sobre un papel de filtro por 10 días fueron colocadas en medio GM líquido con Dexametasona (Dex) 5  $\mu$ M o el control (DMSO) por 24 h. Entonces, se incorporó 1 mM de SA o agua (control) por otras 24 h.

### 5- Tratamiento con antimicina A (AA)

Se utilizó el protocolo previamente descrito por Fabro y col. (2016). Basicamente, se cortaron discos de 4 mm de hojas de plantas de 6 semanas y se dejaron flotando en agua por 16 h. Luego se realizó el tratamiento con AA (Sigma-Aldrich, A8674) 10  $\mu$ M, o etanol (control) durante 4 h (12 discos por muestra).

### 6- Generación de aROS por tratamiento con flg22

Este tratamiento se realizó según Gomez-Gomez y col. (1999) y Fabro y col. (2016). El péptido flg22 (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA) fue sintetizado en el Instituto de Biología Integrativa (CNR, Paris, Francia) y disuelto en agua a una concentración inicial 1mM. Discos de hojas de 0,38 cm<sup>2</sup> fueron colocados en placas de 96 pocillos y mantenidos por 16 h en agua previo a la realización del ensayo. Luego se incorporó la solución de flg22 (300nM), peroxidasa (34  $\mu$ g/ml) y luminol (20 $\mu$ g/ml), para inmediatamente cuantificar la luminiscencia en el equipo lector de multiplacas, Synergy HT, Biotek, USA, con lecturas cada 40 segundos durante 40 min.

### 6- Extracción de ácidos nucleicos

#### 6.1- Pulverización de muestras

Las muestras de hojas o plántulas fueron colocadas en tubos eppendorf de 2 ml con 6 bolitas de acero de 3 mm y congeladas en nitrógeno líquido para ser grilladas en 2 ciclos de 1 min 20 seg a 1500 rpm en disruptor TMD 1500 (Tombo).

#### 6.2- Extracción de DNA genómico

Se utilizó el método de Delledonne y col. (1983), según el cual se realiza la extracción con buffer fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 de muestras pulverizadas de 5-6 hojas. Esta extracción se realizó para determinar la presencia del T-DNA en las plantas mutantes *prodh* por PCR. Para ello, se utilizó una dilución 1/100 como templado para la PCR.

#### 6.3- Extracción de RNA

Se realizó por el método de fenol:cloroformo adaptada de Verwoerd y col. (1989). Muestras de plántulas (6-10), hojas (3-4) o discos (12) pulverizados fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de la solución precalentada (80°C) de 1:1 buffer de extracción (100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH

8; 10 mM EDTA, 1 % SDS) y fenol ácido (pH 5, Sigma-Aldrich), a esta mezcla se le incorporó 250 µl de cloroformo. Luego, se realizó un lavado del sobrenadante con 1 vol de cloroformo para eliminar restos de fenol. La precipitación se realizó agregando de 0,625 volúmenes de LiCl 8 M a la fase acuosa, se mantuvo a 4 °C por 16 h y se centrifugó. El pellet obtenido se lavó con etanol 80 % y finalmente se resuspendió en agua previamente tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). Las muestras fueron conservadas a -80 °C.

#### 6.4- Ensayos de RT-PCR

Para realizar las reacciones de retro-transcripción (RT) se utilizaron 2 µg de RNA, que inicialmente fueron tratados con DNasa (RQ1 de Promega), utilizando buffer de reacción 10X de Invitrogen (200 mM Tris-HCl pH8.4; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl) a 37 °C por 30 min. Luego, se incorporaron oligonucleótidos de 6 bases con secuencias al azar (hexámeros 5'NNNNNN 3'). La mezcla se mantuvo a 70 °C por 5 min y rápidamente se colocó en hielo para permitir el apareamiento con el ARN. Entonces, se incorporó la enzima retro-transcriptasa M-MLV (Promega) siguiendo los protocolos del fabricante en un volumen final de 20 µl. La retro-transcripción se realizó con los siguientes pasos de temperatura: 15 min a 25 °C, 60 min a 37 °C y 15 min a 70 °C. Los cDNA se conservaron a -20°C.

#### 6.5- PCR y PCR semicuantitativa (sqPCR).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl con 0,5 a 1 µl de templado (DNA o cDNA), 16 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 0,1 µl de Taq polimerasa (Promega), buffer de PCR 10X, 0,4 mM dNTPs en un volumen de 20 µl. Los ciclos de PCR incluyeron una fase de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido por ciclos de 35 seg a 95 °C, fase de apareamiento de oligonucleótidos a temperaturas particulares por 35 seg, y extensión por 45 seg a 72 °C. El número de ciclos fue variable dependiendo de los oligonucleótidos y la cantidad de templado utilizados, garantizando que la reacción se encuentre en fase exponencial. Los productos de PCR fueron separados y analizados mediante electroforesis en geles de agarosa entre 1-2 %.

#### 6.6- PCR cuantitativa (qPCR)

Esta reacción se llevó a cabo con Mezcla Real 2X (Byodinamycs), en un volumen final de 15 µl con 1 µl de cDNA. Las concentraciones y condiciones de reacción para cada par de

oligonucleótidos se establecieron luego de determinar los valores de eficiencia (con series de diluciones 1/3 de templado). De este modo, se estableció el uso de concentraciones 180 nM para *UBQ5*, 200 nM para *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *OAT*, *Arg1*, *Aox1a*, *ProDH1* *RBOHD*, *FLS2* y *ProDH2F* y 300 nM para *ProDH2R*. Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas. Los ensayos se realizaron los termocicladores Rotor-Gene Q (Quiagen) y ABI 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las veces de cambio se determinaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  o Pfaffl, según la eficiencia de los pares de oligonucleótidos utilizados.

**Tabla IV. Oligonucleótidos cebadores y condiciones usadas en reacciones de PCR**

Gen AGI number	Oligonucleótidos	Ta# (°C)	Ciclos*	Eficiencia RT-qPCR
<i>AtProDH1</i> ( <i>At3g30775</i> ) (a-b)	Fw: 5'-TCTCCTCTATCCCAACCTCTG-3'	64	30	
	Rv: 5'-GATCGCTCACTCGTTTCAGAAG-3'			
<i>AtProDH1</i> ( <i>At3g30775</i> ) (c-d)	Fw: 5'-TGATGGAGAAAGCATCAAACGG-3'	60	31	93
	Rv: 5'-TCTCCTCTTAAGTTCCATCCTC-3'			
<i>AtProDH2</i> ( <i>At5g38710</i> ) (e-f)	Fw: 5'-CGTCGAAGCTGCTAAAACCT-3'	62	29	92
	Rv: 5'-CGTTCGATTCTTGACATCTAAG-3'			
<i>GapC</i> ( <i>At3g04120</i> )	Fw: 5'-CACTTGAAGGGTGGTGCCAAG-3'	60	24	
	Rv: 5'-CCTGTTGTCGCCAACGAAGTC-3'			
<i>AtUBQ5</i> ( <i>At3g62250</i> )	Fw: 5'-GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA-3'	60	25	102
	Rv: 5'-TCAAGCTTCAACTCCTTCTTT-3'			
<i>AtLox2</i> ( <i>At3g45140</i> )	Fw: 5'-TACTTGCCTTCCCAAACACC-3'	60	25	
	Rv: 5'-AGTGCCCTTGGCTGTAGAGA-3'			
<i>AtPDF1.2</i> ( <i>At5g44420</i> )	Fw 5'-TAAGTTTGCTTCCATCATCACCC-3'	60	27	
	Rv 5'-GTGCTGGGAAGACATAGTGCAT-3'			
<i>AtPR1</i> ( <i>At2g14610</i> )	Fw: 5'-GTAGGTGCTCTTGTTCTTCCC-3'	60	26	
	Rv: 5'-CACATAATCCCACGAGGATC-3'			
<i>HopX1</i>	Fw: 5'-TAGCAAGCTTCGCTTACG-3'	60	30	
	Rv: 5'-GTTTCACGCGTAACCTTG-3'			
<i>AOX1a</i>	Fw: 5'-GGAGGCTTCTGCTGATGCGACA-3	62	26	98



(At3g22370)	Rv: 5'-AGCTGGAGCTTCCTTTAGTTCACGACC-3'			
<i>P5CDH</i> (At5g62530)	Fw: 5'-GCGGTTCTGGCACGGTCTT-3'	60	26	
	Rv: 5'-AGTCCACATCTTCAGCGGGTAAAC-3'			
<i>P5CS1</i> (At2g39800)	Fw: 5'-GTCGGGGTCAAGGATTACT-3'	60	26	
	Rv: 5'-CATCGTACTTATGAGCAAGAC-3'			
<i>P5CS2</i> (At3g55610)	Fw: 5'-CCAATATTCTCCACGTCCGCTTCTTC-3'	60	26	97
	Rv: 5'-GATCTCCGTCATAGTTTGTGTCTATC-3'			
<i>P5CS1-2</i>	Fw 5'-CGATCAAATGCTATCTTACACAAGG-3'	60	25	
	Rv 5'-ACAAGAAGGGTTCCATCGCAT-3'			
<i>P5CR</i> (At5g14800)	Fw: 5'-CACAGACCGTTCTTGGAGCTG-3'	62	26	
	<b>(b)</b> Rv: 5'-GTGTTGCCCGAAAGAGCCTTT-3'			
<i>OAT</i> (At5g46180)	Fw: 5'-TAACCGAGTGTGATCGCTGTGGAA-3'	52	28	
	Rv: 5'-ACCGGTGCTGTGCTCTATGGAAAT-3'			
<i>ARG1</i> (At4g08900)	Fw: 5'-TTGCGTCCGTTGGTCTTA -3'	60		
	Rv: 5'-TTGTTCCCGTCCTTCTCG -3'			
<i>RBOHD</i> (At5g47910)	Fw: 5'-CTGGACACGTAAGCTCAGGA -3'	58		82
	Rv: 5'-GCCGAGACCTACGAGGAGTA -3'			
<i>FLS2</i> (At5g46330)	Fw: 5'-ACTCTCTCCAGGGGCTAAGGAT -3'	60		72
	Rv: 5'-AGCTAACAGCTCTCCAGGGATGG-3'			
<i>P5CR (a)</i>	Fw: 5'-GGCGGAGAGTTTCAAGGTAGG-3'	62	35	
<i>P5CR (c)</i>	Fw: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'	65	35	

### 7- Análisis *in silico* de promotores

Las secuencias de los promotores de genes *ProDH1* y *ProDH2* fueron analizadas con los programas PLACE (Higo y col., 1999), Agris (Davulury y col., 2003), y Plant CARE (Lescot y col., 2002). Las regiones promotoras de cada gen fueron determinadas con el programa Agris, (2481 y 2562 bp para *ProDH1* y *ProDH2*, respectivamente). Los elementos reconocidos por al menos dos programas fueron seleccionados.

## 8- Extracción de proteínas y Western blot

Muestras de tejido de plántulas u hojas pulverizados fueron resuspendidas en dos volúmenes de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glicerol, 2 % SDS, 0.5 % 2-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, agua miliQ, PMSF 2 mM, Cocktail Inhibidor de Proteasa Sigma-Aldrich 1/200), hervidas por 5 min y centrifugadas a máxima velocidad por 10 min, recuperando el sobrenadante. Estas muestras fueron conservadas a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry, realizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) y midiendo absorbancia a  $\lambda = 750$  nm. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida (5 % *upper* y 10 % *lower*). Sembrando 5-10  $\mu\text{g}$  de proteínas totales por carril. Estos geles fueron teñidos con Coomassie Blue o transferidos a una membrana Hybon ECL de Amersham (GE Halthcare). La inmunomarcación se realizó con anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio, anti-ProDH anticuerpo 1 1:10000; anticuerpo 2 1:1000, o anti-P5CDH 1:300 (cabe aclarar que para este anticuerpo se debe sembrar más de 30  $\mu\text{g}$  proteína para poder detectarlo). La incubación de cada uno fue realizada en PBS 1X, leche 1 % y Tween 20 0,1 % por 16 h a 4 °C. Luego se realizaron 5 lavados con PBS 1X, el primero con Tween 20 0,1 %. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario IRDye 800CW cabra anti-conejo IgG (LI-COR, Biosciences) dilución 1:20000 en PBS 1X con leche 1 % y Tween 20 0,1 %, incubando 1 h a 22 °C con agitación. Posteriormente, se repitieron lavados similares a post-anticuerpo primario. Las membranas fueron escaneadas en Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Biosciences). La subunidad mayor de Rubisco se analizó en el canal 700 y se utilizó como control de carga.

## 9- Cuantificación de aminoácidos

### 9.1 Cuantificación de Pro por colorimetría

Para esta cuantificación se siguió el método de Bates (1973). Muestras de únicas hojas pulverizadas fueron resuspendidas en 5  $\mu\text{l}$  de ácido sulfosalicílico (SSA) 3 % por mg de peso fresco de la muestra. Luego de centrifugar a 12000 rpm por 10 min y por cada 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante se agregó 100  $\mu\text{l}$  de SSA 3 %, 200  $\mu\text{l}$  de ninhidrina ácida (2.5 % ninhidrina, ácido o-fosfórico 2.4 % y ácido acético 58 % v/v) y 200  $\mu\text{l}$  ácido acético 96 %. Las muestras fueron incubadas por 1 h a 100 °C. Luego se agregó un volumen de tolueno para extraer el producto coloreado y se cuantificó absorbancia a  $\lambda = 520$ . A la par se realizó una curva de calibración con Pro (Sigma-Aldrich) para estimar la concentración en  $\mu\text{moles}$  de Pro en función de los g

de peso fresco de la muestra. Por cada punto de medición se evaluaron independientemente tres hojas de distintas plantas.

### 9.2 Cuantificación de Pro, Glu y Orn por HPLC

La cuantificación de estos aminoácidos se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Monteoliva y col. (2014). Cada muestra constó de tres hojas que fueron pulverizadas, resuspendidas en etanol 80 %, mantenidas por 1 h a 80 °C, y luego centrifugadas (8 minutos a 13000 rpm). El sobrenadante se evaporó hasta secar y el residuo se resuspendió en 50 µl de agua miliQ. Las muestras fueron derivatizadas con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccimidilcarbamato (ACQ), que reacciona con aminoácidos primarios y secundarios generando complejos que fluorescen a 400 nm. La separación de los mismos se llevó a cabo en columna Zorbax C18 Plus (100 × 4.6mm, 3.5µm) en un sistema de HPLC cuaternario (Hewlett Packard series 1100, CEMECO) con (A) buffer acetato de sodio 140 mM pH 5.8 y trietilamina 7 mM; (B) acetonitrilo; (C) agua miliQ filtrada. Las corridas se desarrollaron con el siguiente gradiente 0,01 min 100 % A; 0,50 min 99 % A + 1 % B; 27,5 min 91 % A + 9 % B; 28,50 min 89 % A + 11 % B; 44,50 min 82 % A + 18 % B; 47,5 min 60 % B + 40 % C; 50,5 min 100 % A. El equipo se encontraba acoplado a un detector fluorescente (excitación 300 nm y emisión a 400 nm). Los tiempos de retención específicos se determinaron usando estándares externos de distintos aminoácidos (Pro, Orn, Glu, P5C, Asn, Thr, Ala, Arg, GABA y Phe) y la cuantificación con curvas de concentraciones de Pro, Orn y Glu. Los valores se expresaron en nmol en relación a gramos de peso fresco de la muestra. Estos experimentos se realizaron en el Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba.

## **10- Actividades enzimáticas**

### 10.1- Actividad ProDH *in vitro*

Se utilizó el protocolo descrito por Monteoliva y col. (2014) con algunas modificaciones. Muestras de 4 hojas fueron pulverizados en nitrógeno líquido y homogenizados en buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 7 mM; KCl 600 mM; EDTA 3 mM; ditioneitol, DTT, 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, 1 mM; polivinilpirrolidona, PVP, 5 %). Estas muestras se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para realizar el ensayo de actividad y cuantificar contenido de proteínas totales por Lowry. La actividad fue ensayada en buffer de reacción

( $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ - HCl 150 mM pH 7.5,  $\text{NAD}^+$  1 mM y Pro 25 mM) conteniendo  $^{14}\text{C}$ -Pro (NEC Perkin Elmer; 266 mCi/mmol) como sustrato. Se realizaron dos ensayos por muestra, incluyendo en una de ellas el inhibidor de ProDH ácido L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C) para descontar variaciones no asociadas a la actividad ProDH. Se tomaron alícuotas a 0, 40, 80 y 120 min frenando en cada caso la reacción con la mezcla metanol:cloroformo:agua (en proporciones 12:5:3 v/v). El sobrenadante fue evaporado y resuspendido en 50  $\mu\text{l}$  agua y separado por TLC con fase móvil etanol 80 % v/v según Boggess y col. (1978). Los aminoácidos se tiñeron por pulverización de ninhidrina 0,2 % p/v en etanol 95 % v/v. Las TLC fueron expuestas y luego escaneadas en Storm 840 Phosphor Imager para determinar la posición de  $^{14}\text{C}$ -Pro. La banda correspondiente a Pro fue levantada de la placa y resuspendida en líquido de centelleo Optiphase, Hisafe 2 (Perkin Elmer) y cuantificada en contador de centelleo. Los valores de radiactividad se utilizaron para calcular actividad como nmoles de Pro consumidos por minuto y mg de proteína total.

### 10.2 Actividad G6PDH *in vitro*

La actividad G6PDH se analizó según Sindelar y col. 2002, con algunas modificaciones. Muestras de hojas (20 discos; 30 mg), se pulverizaron en nitrógeno líquido y homogenizaron en 2 volúmenes de buffer de extracción (Tris-HCl 20 mM;  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM; EDTA 1 mM; ditioneitol, DTT, 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, 1 mM pH 7). Estas muestras se centrifugaron 15 min a 12000 rpm para rescatar el sobrenadante. Por muestra se realizaron diluciones 1, 2/5, 1/5. Por cada concentración se realizaron 3 réplicas técnicas. La actividad se determinó como producción de NADPH detectado por incremento de absorbancia a  $\lambda = 340$  nm. En paralelo, se realizó una curva de concentración de NADPH con concentraciones 100, 50, 25, 10, 5 y 2  $\mu\text{M}$ . Las incubaciones se realizaron en placas de 96 pocillos con buffer de reacción (Tris-HCl 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM; G6P 0,2 mM;  $\text{NADP}^+$  0,1 mM; pH 8) en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  con 10  $\mu\text{l}$  de extracto. La reacción se inició con el agregado de G6P y  $\text{NADP}^+$ . Las mediciones de absorbancia se realizaron cada 1 min por 1 h en espectrofotómetro para microplacas (Epoch, Biotek). Como control cada extracto se evaluó en las mismas condiciones pero sin el agregado de G6P, para descontar la generación de NADPH por otras vías. La cuantificación de proteína se realizó para cada pocillo a través del método de Lowry.

**11- Detección de muerte celular por azul de tripano**

La tinción con azul de tripano se realizó siguiendo el método de Koch y Slusarenko (1990). Las hojas se colocaron en tubos con una solución 1:1:1:1 fenol:glicerol:ácido láctico:agua destilada y 0,025 % de azul de tripano y se incubaron a 98 °C por 2-4 min. Luego se descartó la solución de tinción destiñó con lavados con hidrato de cloral 70 % p/v, y mantuvieron a 80 °C por 15 min. Luego, se lavaron con etanol 90 % y progresivas diluciones de etanol (70, 50, 30 y 0 %). Luego se resuspendieron en glicerol 30 % y montaron con porta y cubreobjetos.

**ANEXO**

```

PRODH1  MATRLLRNFIRRSYRLPAFSPVGPPTVTASTAVVPEILSFGQQAPEPPLHHPKPTEQSH 60
PRODH2  MANRFLRPNLIHR--FSTVSPVGGP-----TTIIEILSFDQPKPE----- 39
      **.*:**.*:**.* :.:.***** *:.:*****.* **

PRODH1  DGLDLSAQARLFSSIPTSDLLRSTAVLHAAAIGPMVDLGTWVMSSKLMASVTRGMVLGL 120
PRODH2  VDLDLSAQARLFASVPISTLLRSTAILHATSIGPMVDLGSWLMSSKLMDDTTVTRDLVLR 99
      .*****:**.* * *****:***:*****:**:*****:***.:** :

PRODH1  VKSTFYDHFCAGEDADAAAERVRSVYEATGLKGMVLVYGVVEHADDAVSCDDNMQQPTITIE 180
PRODH2  VKGTFYDHFCAGEDAAAAARRVSSVYESTGLKGMVLVYGVVEHAEDGGACDENIQKFIETVE 159
      **.****** **.* ** *:*:*****:*. :**:*:**.*:**

PRODH1  AAKSLPTSHFSSVVKITAICPISLLKRVSDLLRWYKSNFKLSWKLSFPVFSSESP 240
PRODH2  AAKTLPSSHLSSVVKITAICPMNVLKRVSDLLRWQYKSNFKLPWKLNSFPVFSGLSPL 219
      ***:**:**:*****: :.*****:**.* *****.***:*:***** **

PRODH1  YHTNSEPEPLTAEERELEAAHGRIQELCRKQESNVPELLIDAEDTILQPAIDYMASSA 300
PRODH2  YHTTSEPEPLTVEERELEKAHERIKSVCLRCQESNVPELLIDAEDTILQPAIDYMAW 279
      ***.******.****** ** *:.:* :***** **

PRODH1  IMFNADKDRPIVYNTIQAYLRDAGERLHLAVQNAEKENVPMGFKLVRGAYMSSEASLADS 360
PRODH2  IMFNSDKDRPIVYNTIQAYLRDAGERLHLALRESEKMNVPPIGFKLVRGAYMSSEAKLADS 339
      ****:*****:*****: ::** **:*:*****.*****

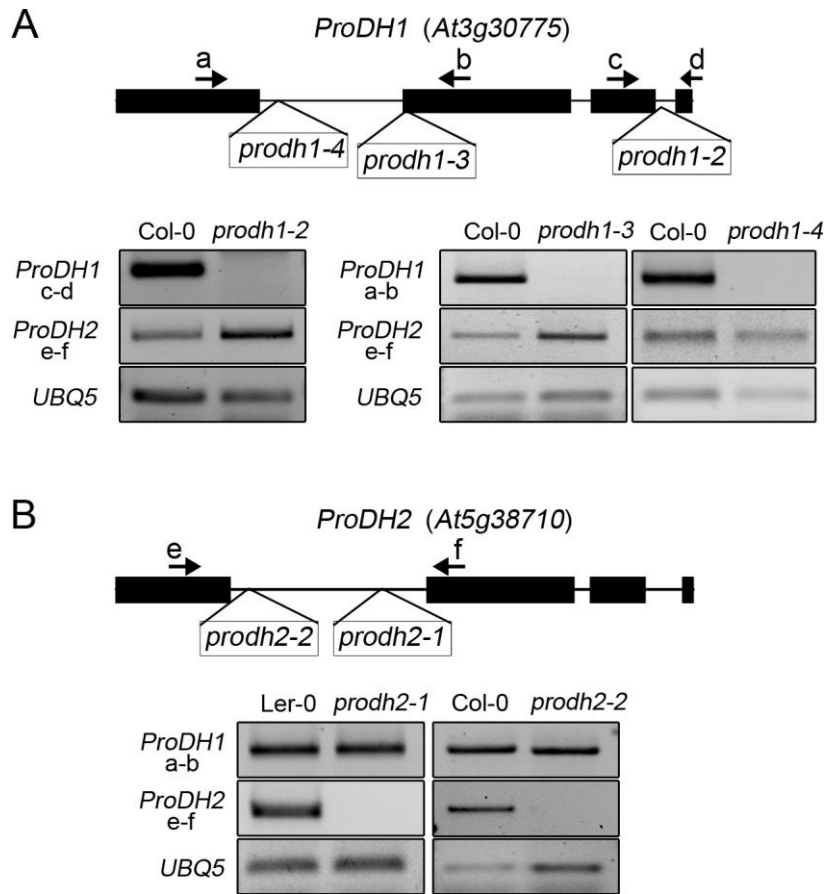
PRODH1  LGCKSPVHDTIQDTHSCYNDCEMFLMEKASNGSGFGVVLATHNADSGRLASPKASDLGID 420
PRODH2  LGYKSPVHDTIQNTHDCYNDCEMFLMEKASNGSGIAVILATHNTDSGKLGARKASELGIN 399
      ** *****:**.* *****:*****: .*:*****:***:*.:*****:***:

PRODH1  KQNGKIEFAQLYGMSDALSFGKLRAGFNVSKYMPFGPVATAIPIYLIRRAYENRGMSTGA 480
PRODH2  KENGKIEFAQLYGMSDALSFGKLRAGFNVSKYMPYGPVDTAIPYILIRRAYENRGMSTGA 459
      *:*****:*** *****:*****:***

PRODH1  HDRQLMRMELKRRLIAGIA 499
PRODH2  LDRQLMRKELKRRVMAW-- 476
      ***** *****:.*

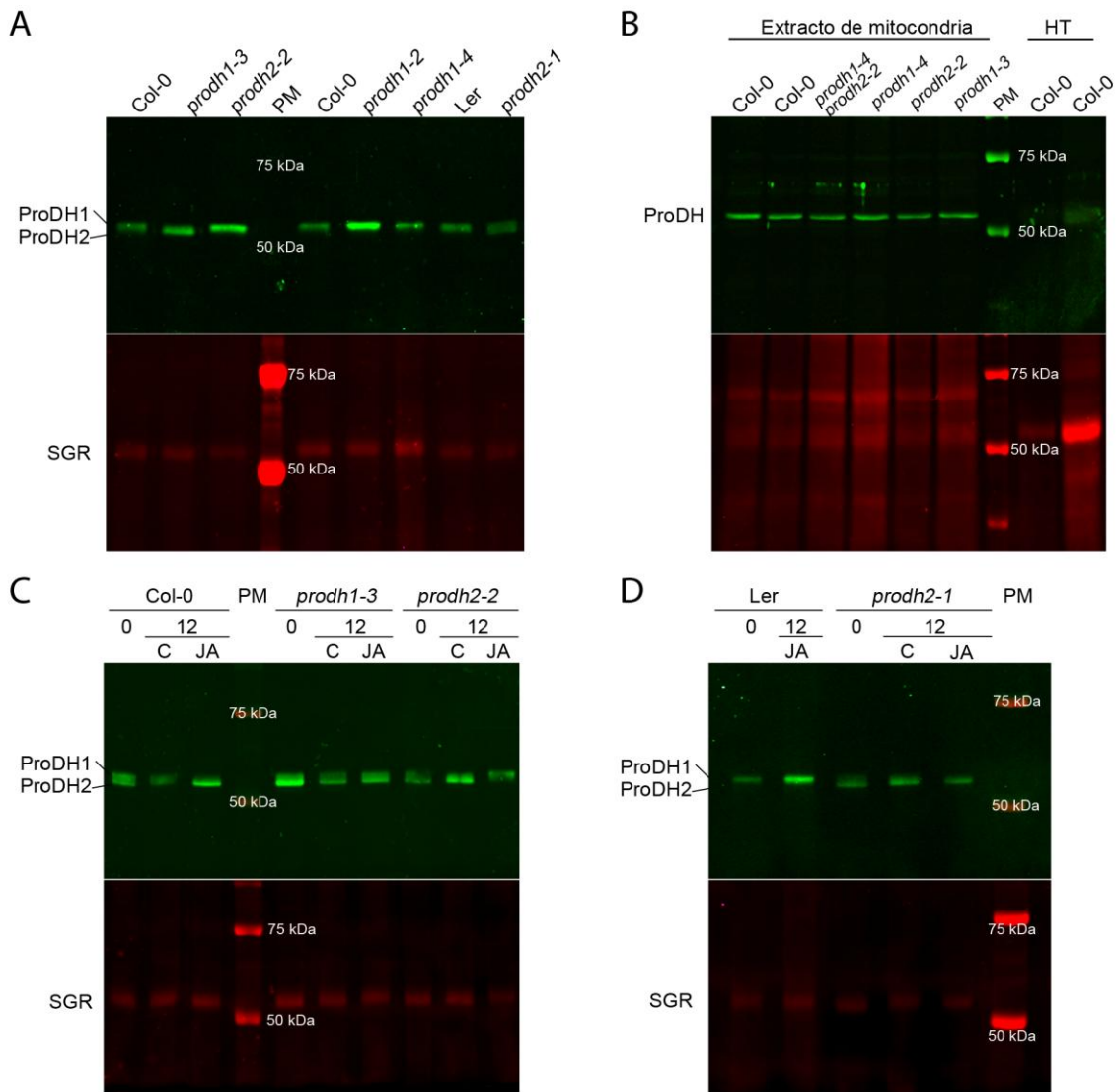
```

**Figura A1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de ProDH1 y ProDH2.** El programa ClustalW2 se utilizó para realizar el alineamiento de ambas secuencias. Se indican aminoácidos apolares (rojo); ácidos (azul); básicos (magenta); polares no cargados (verde), diferenciando residuos idénticos (asterisco), residuos con alta similitud (dos puntos; score > 0.5 en matriz Gonnet PAM 250); y con baja similitud (punto; score ≤ 0.5 en matriz Gonnet PAM 250). El dominio prolina deshidrogenasa se resalta en verde y el péptido de tránsito mitocondrial se marca en amarillo (Func y col., 2010). En negro se resalta la Tyr que determina la especificidad por Pro (Y464 en ProDH; Y443 en ProDH2). En gris se muestran los péptidos sintéticos utilizados para generar los anticuerpos 1 (TGLKGMVLVYGVVEHA, gris claro) y 2 (FLMEKASNGSG; gris oscuro).



**Figura A2. Genotipificación de líneas mutantes de *ProDH1* y *ProDH2*.** Se indica la posición de T-DNA en plantas mutantes *prodh1* (A) o *prodh2* (B) y los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del DNA genómico por PCR (a-b; c-d; e-f). *UBQ5* se utilizó como control de carga.





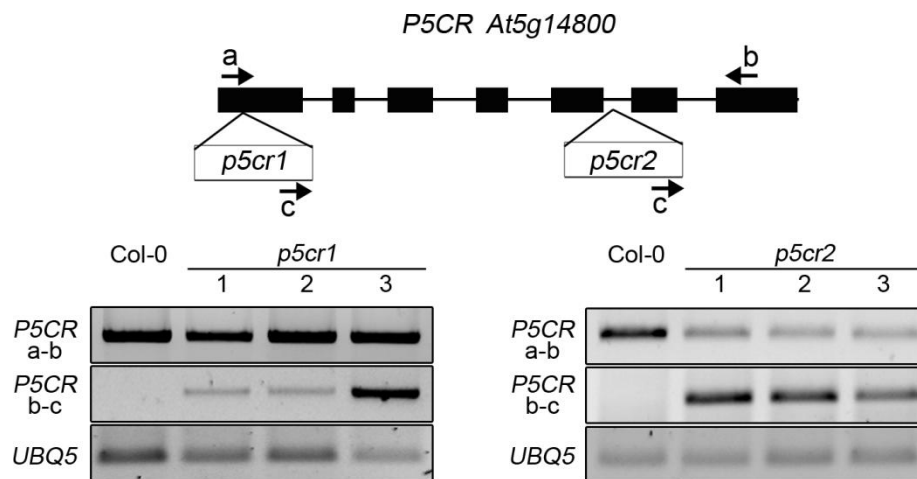
**Figura A3. Ensayos de Western blot dirigidos a diferenciar ProDH1 de ProDH2 en extractos de proteínas.** (A) Extractos totales (5  $\mu$ g/carril) de plántulas de 14 días Col-0, *prodh1-3*, *prodh2-2*, *prodh1-2*, *prodh1-4*, Ler y *prodh2-1*. (B) Extractos totales (15  $\mu$ g/carril; HT) o mitocondriales (15  $\mu$ g/carril) de hojas de plantas Col-0, *prodh1/prodh2*, *prodh1-4*, *prodh2-2* y *prodh1-3* de 6 semanas de edad. (C y D) Extractos totales de plantas de 8 hojas de Col-0, *prodh1-3* y *prodh2-2* (izquierda) o Ler y *prodh2-1* (derecha) a nivel basal o tras 12 h de tratamientos con meJA (0,80  $\mu$ M; JA) o vehículo (etanol; C). En verde anticuerpos anti-ProDH denominados 1 (A, C, D) o 2 (E) (ver Figura 1 del Anexo). En rojo subunidad mayor de Rubisco SGR utilizada como control de carga. PM: marcador de peso molecular. A la izquierda se indican los pesos estimados de ProDH1 y ProDH2.

Tabla AI. Elementos regulatorios en *cis* en los promotores de los genes *ProDH1* y *ProDH2*.

Nombre del elemento	Secuencia	Respuesta a	<i>ProDH1</i>	<i>ProDH2</i>	
			Posición	Posición	
WBOXATNPR1	TTGACT	WRKY/SA	-1525	-1940	
			-1376		
	AGTCAA		-893	-896	
				-1447	
CGTCA/WBOXATNPR1 /ASF1MOTIFCAMV	TGACG	meJA/WRKY/ luz/SA	-679		
	CGTCA			-1948	
ARFAT	TGTCTC	Auxinas		-328	
				-684	-2121
				-647	-1471
				-1267	
ERE	TTTGAAT	Etileno	-2007		
PREATPRODH	ACTCAT	Hiposmolaridad /Pro	-837	-2536	
			-709		
	ATGAGT		-450		
DPBF-1 and 2 binding site	CACATG	bZIP/ABA	-223		
	ACACAGG			-1285	
MYCATERD1	CACATG	Estrés hídrico	-863		
			-223		
	CATGTG			-2284	
				-2196	
MYB2CONSENSUSAT	AACTG	Estrés hídrico/ABA	-2002		
	CAACTGG		-1671		
	CAACTG		-1603		
ABRELATERD1	ACGTG	Estrés hídrico/ABA	-2016	-879	
				-1926	
				-191	
				-165	
TATCCAT/C	TATCCAT	Sacarosa		-1330	
				-336	
LTRE	CCGAAAC	Temperatura		-1228	
	CCGAAA		-81		
	ACCGACA		-602		
HSEs binding site	AGAATTTTCT	Temperatura	-1720		
CCA1 binding site	AACAATCT	Luz	-1071		
	AGATTTTT			-441	
T-box	ACTTTG	Luz	-458	-532	
3-AF1 binding site	AAATATCCCTT	Luz		-2080	
GATABOX	AGATAG	Luz	-1774	-1978	
	TGATAA			-1701	
	GATAA			-273	
				-2169	
	ATGATATGA			-1970	
	TGATAG			-2496	
	GTTATCA			-2415	
	AGATAAG			-850	
	GGTTAA			-2324	
	TTATCTAT			-803	
	ATAGATA			-2223	
	AGATAG			-2205	
				-2084	
	TTATCA			-2045	

	TGATAA		-1477	
	TTATC		-667	
	TGATAG			-598
I BOX	GATAAG	Luz	-1290	
	CTTATC			-1959
				-1114
	CCTTATCTTT			-366
			-1537	
SORLIP2AT	GGGCC	Luz	-692	
SORLREP4AT	CTCCTAATT	Luz		-281
SORLIP1AT	GCCAC	Luz		-882
SORLREP3AT	TGTATATAT	Luz		-1775
CIACADIANLELHC	CAAAGTTATC	Ritmo circadiano		-1840
	CAATGACATC			-1302

Las secuencias de los genes *ProDH1* y *ProDH2* fueron analizadas con los programas Agris, PlantCare y PLACE. Se seleccionaron los elementos detectados por al menos dos de estos programas. Las posiciones se definen de manera relativa al codón de inicio ATG.



**Figura A4. Genotipificación de mutantes *p5cr1* y *p5cr2*.** Esquema de las inserciones de T-DNA en plantas mutantes y posición de los oligonucleótidos utilizados para su caracterización (a-b; b-c). Los oligonucleótidos a y b son complementarios a *P5CR*, y el cebador c es complementario al T-DNA. La inserción del T-DNA genera productos de 1700 pb (alelo *p5cr1*) o 902 pb (alelo *p5cr2*) con los oligonucleótidos b-c. Ambas mutaciones se mantienen en hemicigosis tal como lo revela la presencia del alelo salvaje y del alelo mutado por inserción del T-DNA. *UBQ5* se utilizó como control de carga.

## REFERENCIAS

- Alia, Mohanty, P. y Matysik, J. (2001) Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, **21**, 195-200.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. y Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- Amirsadeghi, S., McDonald, A. E. y Vanlerberghe, G. C. (2007) A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco. *Planta*, **226**, 453-463.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-De March, G. y Savoure, A. (2004) Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental y environmental specific features. *Physiol Plant*, **120**, 442-450.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., y col. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977-983.
- Ayliffe, M. A., Mitchell, H. J., Deuschle, K. y Pryor, A. J. (2005) Comparative analysis in cereals of a key proline catabolism gene. *Mol Genet Genomics*, **274**, 494-505.
- Ayliffe, M. A., Roberts, J. K., Mitchell, H. J., Zhang, R., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., y col. (2002) A plant gene up-regulated at rust infection sites. *Plant Physiol*, **129**, 169-180.
- Barker, R. J. y Lehner, Y. (1972) Free amino acids in the thoraces of flown honey bees, *Apis mellifera* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **43**, 163-9.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. y Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant y Soil*, **39**, 205-207.
- Benito, E. P., Ten Have, A., van't Klooster, J. W., & van Kan, J. A. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 207-220.
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C. y Savoure, A. (2014) How reactive oxygen species y proline face stress together. *Plant Physiol Biochem*, **80**, 278-284.
- Bestwick, C. S., Bennett, M. H. y Mansfield, J. W. (1995) Hrp Mutant of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola Induces Cell Wall Alterations but Not Membrane Damage Leading to the Hypersensitive Reaction in Lettuce. *Plant Physiol*, **108**, 503-516.
- Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T. E. y Alfano, J. R. (2010) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development y suppresses plant innate immunity. *Cell Microbiol*, **12**, 318-330.
- Boggess, S. F. y Koeppel, D. E. (1978) Oxidation of proline by plant mitochondria. *Plant Physiol*, **62**, 22-25.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., y col. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, **53**, 1367-1376.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, **123**, 1279-1291.
- Caarls, L., Pieterse, C. M. y Van Wees, S. C. (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci*, **6**, 170.
- Cabassa-Hourton, C., Schertl, P., Bordenave-Jacquemin, M., Saadallah, K., Guivarc'h, A., Lebreton, S., y col. (2016) Proteomic y functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, **473**, 2623-2634.
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I. y Alvarez, M. E. (2011a) Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **155**, 1947-1959.
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I. y Alvarez, M. E. (2011b) Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms. *Plant Signal Behav*, **6**, 1195-1197.
- Cerrudo, I., Keller, M. M., Cargnel, M. D., Demkura, P. V., de Wit, M., Patitucci, M. S., y col. (2012) Low red/far-red ratios reduce *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea* y jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiol*, **158**, 2042-2052.

- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B. y Low, P. S. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, **12**, 2191-2200.
- Clarke, J. D., Volko, S. M., Ledford, H., Ausubel, F. M. y Dong, X. (2000) Roles of salicylic acid, jasmonic acid, y ethylene in cpr-induced resistance in arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 2175-2190.
- Cook, D. E., Mesarich, C. H. y Thomma, B. P. (2015) Understying plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu Rev Phytopathol*, **53**, 541-563.
- Crabtree, B. y Newsholme, E. A. (1970) The activities of proline dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, aspartate-oxoglutarate aminotransferase y alanine-oxoglutarate aminotransferase in some insect flight muscles. *Biochem J*, **117**, 1019-1021.
- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G. C. (2012) Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Environ*, **35**, 1121-1136.
- Chaouch, S., Queval, G. y Noctor, G. (2012) AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism y a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress y pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J*, **69**, 613-627.
- Chinchilla, D., Boller, T. y Robatzek, S. (2007) Flagellin signalling in plant immunity. *Adv Exp Med Biol*, **598**, 358-371.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernyez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., y col. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666-671.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., y col. (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic y polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, **277**, 1-10.
- da Rocha, I. M., Vitorello, V. A., Silva, J. S., Ferreira-Silva, S. L., Viegas, R. A., Silva, E. N., y col. (2012) Exogenous ornithine is an effective precursor y the delta-ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *J Plant Physiol*, **169**, 41-49.
- Davuluri, R. V., Sun, H., Palaniswamy, S. K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., y col. (2003) AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements y transcription factors. *BMC bioinformatics*, **4**, 25.
- de Torres Zabala, M., Zhai, B., Jayaraman, S., Eleftheriadou, G., Winsbury, R., Yang, R., y col. (2015) Novel JAZ cooperativity y unexpected JA dynamics underpin Arabidopsis defence responses to *Pseudomonas syringae* infection. *New Phytol*, **209**, 1120-1134.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., y col. (2005) Signal signature y transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen y insect attack. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 923-937.
- Delauney, A. J., Hu, C. A., Kishor, P. B. y Verma, D. P. (1993) Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* y regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem*, **268**, 18673-18678.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. y Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., y Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 13454-13459.
- Dempsey, D. A. y Klessig, D. F. (2012) SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci*, **17**, 538-545.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., y col. (2004) The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell*, **16**, 3413-3425.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Daschner, K., Binder, S. y Frommer, W. B. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase y its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J*, **27**, 345-356.

- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H. S., Chilcott, C., Zhu, T., y col. (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- y methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, y hormone interactions. *Plant Mol Biol*, **58**, 497-513.
- Di Martino, C., Pizzuto, R., Pallotta, M. L., De Santis, A. y Passarella, S. (2006) Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*, **223**, 1123-1133.
- Dietrich, R. A., Delaney, T. P., Uknes, S. J., Ward, E. R., Ryals, J. A. y Dangl, J. L. (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*, **77**, 565-577.
- Donald, S. P., Sun, X. Y., Hu, C. A., Yu, J., Mei, J. M., Valle, D., y col. (2001) Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res*, **61**, 1810-1815.
- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 547-552.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komyer, E., Lassig, R., Witte, C. P., y col. (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 8744-8749.
- Durner, J., Wendehenne, D. y Klessig, D. F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, y cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10328-10333.
- Elthon, T. E. y Stewart, C. R. (1981) Submitochondrial location y electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol*, **67**, 780-784.
- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L. y Alvarez, M. E. (2004) Proline accumulation y AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 343-350.
- Fabro, G., Di Rienzo, J.A., Voigt, C.A., Savchenko, T., Dehesh, K., Somerville, S. y Alvarez, M.E. (2008) Genome-wide expression profiling of Arabidopsis at the stage of *Golovinomyces cichoracearum* haustorium formation. *Plant Physiol* **146**, 1421-1439.
- Fabro, G., Rizzi, Y. S. y Alvarez, M. E. (2016) Arabidopsis Proline Dehydrogenase Contributes to Flagellin-Mediated PAMP-Triggered Immunity by Affecting RBOHD. *Mol Plant Microbe Interact*, **29**, 620-628.
- Fäes, P., Deleu, C., Ainouche, A., Le Caherec, F., Montes, E., Clouet, V., y col. (2014) Molecular evolution y transcriptional regulation of the oilseed rape proline dehydrogenase genes suggest distinct roles of proline catabolism during development. *Planta*, **241**, 403-419.
- Faris, J. D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S., y col. (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 13544-13549.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., y col. (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol*, **5**, 344-350.
- Forde, B. G. y Lea, P. J. (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, y signalling. *J Exp Bot*, **58**, 2339-2358.
- Forlani, G., Scainelli, D. y Nielsen, E. (1997) [ $\delta$ ]1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase from Cultured Cells of Potato (Purification y Properties). *Plant Physiol*, **113**, 1413-1418.
- Fu, Z. Q. y Dong, X. (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol*, **64**, 839-863.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., y col. (2012) NPR3 y NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, **486**, 228-232.
- Funck, D., Eckard, S. y Muller, G. (2010) Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. *BMC Plant Biol*, **10**, 70.
- Funck, D., Stadelhofer, B. y Koch, W. (2008) Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol*, **8**, 40.



- Funk, D., Winter, G., Baumgarten, L. y Forlani, G. (2012) Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biol*, **12**, 191.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., y col. (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against Botrytis cinerea. *Plant Physiol*, **148**, 1695-1706.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G. y Mackey, D. (2014) The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of Pseudomonas syringae. *Planta*, **240**, 1149-1165.
- Genoud, T., Buchala, A. J., Chua, N. H. y Metraux, J. P. (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *Plant J*, **31**, 87-95.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R. y Farmer, E. E. (2010) Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal*, **3**, cm3.
- Giberti, S., Funk, D. y Forlani, G. (2014) Delta1-Pyrroline-5-carboxylate reductase from Arabidopsis thaliana: stimulation or inhibition by chloride ions y feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol*, **202**, 911-919.
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Fernyez-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J. P. y Solano, R. (2014) The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling y promote infection in Arabidopsis. *PLoS Biol*, **12**, e1001792.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic y necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 205-227.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. C., Yerson, C. R., Carroll, A. J., y col. (2011) Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation y defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 10768-10773.
- Göhre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., y col. (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol*, **18**, 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. y Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **18**, 277-284.
- Govrin, E. M. y Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. *Curr Biol*, **10**, 751-757.
- Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gummy, C., Suter-Grottemeyer, M., Neuhaus, J. M., y col. (2005) The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiol*, **137**, 117-126.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F. y Ausubel, F. M. (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, **77**, 551-563.
- Hagedorn, C. H. y Phang, J. M. (1983) Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline y delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys*, **225**, 95-101.
- Hagedorn, C. H. y Phang, J. M. (1986) Catalytic transfer of hydride ions from NADPH to oxygen by the interconversions of proline y delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys*, **248**, 166-174.
- Hamilton, E. W., 3rd y Heckathorn, S. A. (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants y small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline y betaine. *Plant Physiol*, **126**, 1266-1274.
- Hancock, C. N., Liu, W., Alvord, W. G. y Phang, J. M. (2015) Co-regulation of mitochondrial respiration by proline dehydrogenase/oxidase y succinate. *Amino Acids*, **48**, 859-872.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M. M. y Smeekens, S. (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 y PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J*, **53**, 935-949.
- Hare, P. D., y Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, **21**, 79-102.

- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannieres, M., Shelp, B. J., Morera, S., y col. (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 14587-14592.
- Hayano-Kanashiro, C., Calderon-Vazquez, C., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L. y Simpson, J. (2009) Analysis of gene expression y physiological responses in three Mexican maize lyraces under drought stress y recovery irrigation. *PLoS One*, **4**, e7531.
- Hayashi, F., Ichino, T., Osanai, M. y Wada, K. (2000) Oscillation y regulation of proline content by P5CS y ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol*, **41**, 1096-1101.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. y Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav*, **7**, 1456-1466.
- Hervieu, F., Le Dily, F., Huault, C. y Billard, J. P. (1995) Contribution of ornithine aminotransferase to proline accumulation in NaCl-treated radish cotyledons. *Plant, Cell & Environment*, **18**, 205-210.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, **27**, 297-300.
- Hoque, M. A., Banu, M. N., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. y Murata, Y. (2008) Proline y glycinebetaine enhance antioxidant defense y methylglyoxal detoxification systems y reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol*, **165**, 813-824.
- Hoyos, M. E., Palmieri, L., Wertin, T., Arrigoni, R., Polacco, J. C. y Palmieri, F. (2003) Identification of a mitochondrial transporter for basic amino acids in *Arabidopsis thaliana* by functional reconstitution into liposomes y complementation in yeast. *Plant J*, **33**, 1027-1035.
- Hu, C. A., Delauney, A. J. y Verma, D. P. (1992) A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9354-9358.
- Hu, C. A., Donald, S. P., Yu, J., Lin, W. W., Liu, Z., Steel, G., y col. (2007) Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent y mitochondria-mediated apoptosis. *Mol Cell Biochem*, **295**, 85-92.
- Hua, X. J., van de Cotte, B., Van Montagu, M. y Verbruggen, N. (1997) Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **114**, 1215-1224.
- Hua, X. J., Van de Cotte, B., Van Montagu, M. y Verbruggen, N. (2001) The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional y post-transcriptional regulation. *Plant J*, **26**, 157-169.
- Huang, Y., Chen, X., Liu, Y., Roth, C., Copely, C., McFarlane, H. E., y col. (2013) Mitochondrial AtPAM16 is required for plant survival y the negative regulation of plant immunity. *Nat Commun*, **4**, 2558.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W. y Zimmermann P. (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 420747.
- Islam, M. M., Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., y col. (2009a) Exogenous proline y glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities y confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol*, **166**, 1587-1597.
- Islam, M. M., Hoque, M. A., Okuma, E., Jannat, R., Banu, M. N., Jahan, M. S., y col. (2009b) Proline y glycinebetaine confer cadmium tolerance on tobacco bright yellow-2 cells by increasing ascorbate-glutathione cycle enzyme activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 2320-2323.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B. A., Wright, C. M., Brodsky, J. L. y Greenberg, J. T. (2007) A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts y suppresses defenses. *Curr Biol*, **17**, 499-508.
- Jiang, S., Yao, J., Ma, K. W., Zhou, H., Song, J., He, S. Y., y col. (2013) Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog*, **9**, e1003715.
- Johnson, H. S. (1972) Dithiothreitol: An inhibitor of glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity in leaf extracts y isolated chloroplasts. *Planta*, **106**, 273-277.

- Jones, A. M., Thomas, V., Bennett, M. H., Mansfield, J. y Grant, M. (2006) Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol*, **142**, 1603-1620.
- Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Kadota, Y., Shirasu, K. y Zipfel, C. (2015) Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol*, **56**, 1472-1480.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., y col. (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell*, **54**, 43-55.
- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y. y Howe, G. A. (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate y the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7100-7105.
- Kawakami, R., Satomura, T., Sakuraba, H. y Ohshima, T. (2011) L-proline dehydrogenases in hyperthermophilic archaea: distribution, function, structure, y application. *Appl Microbiol Biotechnol*, **93**, 83-93.
- Kazan, K. y Manners, J. M. (2011) JAZ repressors y the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci*, **17**, 22-31.
- Kelley, W. L. (1998) The J-domain family y the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci*, **23**, 222-227.
- Kim, H. S., Thammarat, P., Lommel, S. A., Hogan, C. S. y Charkowski, A. O. (2011) *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, **24**, 773-786.
- Kishor, K., Polavarapu, B., y Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant, cell & environment*, **37**, 300-311.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *Plant Cell*, **8**, 1323-1335.
- Koch, E. y Slusarenko, A. (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, **2**, 437-445.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C., y col. (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol*, **147**, 1358-1368.
- Krause, M. y Durner, J. (2004) Harpin inactivates mitochondria in Arabidopsis suspension cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 131-139.
- Krishnan, N. y Becker, D. F. (2006) Oxygen reactivity of PutA from *Helicobacter* species y proline-linked oxidative stress. *J Bacteriol*, **188**, 1227-1235.
- Kunz, C., Vyelle, E., Rolly, S. p., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A. s., y col. (2006) Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New phytologist*, **170**, 537-550.
- Kuzniak, E. y Sklodowska, M. (2004) The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *J Exp Bot*, **55**, 605-612.
- La Camera, S., L'Haridon, F., Astier, J., Zyer, M., Abou-Mansour, E., Page, G., y col. (2011) The glutaredoxin ATGRXS13 is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of Arabidopsis thaliana plants. *Plant J*, **68**, 507-519.
- Lam, E., Kato, N. y Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria y the plant hypersensitive response. *Nature*, **411**, 848-853.
- Lee, Y. H., Nadarai, S., Gu, D., Becker, D. F. y Tanner, J. J. (2003) Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. *Nat Struct Biol*, **10**, 109-114.

- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. y Rentsch, D. (2010a) Proline metabolism y transport in plant development. *Amino Acids*, **39**, 949-962.
- Lehmann, S., Gummy, C., Blatter, E., Boeffel, S., Fricke, W. y Rentsch, D. (2010b) In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J Exp Bot*, **62**, 787-796.
- Lenzian, K. J. (1980) Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP(+) y dithiothreitol at variable NADPH/NADP (+) ratios in an illuminated reconstituted Spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta*, **148**, 1-6.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C., y col. (2010) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, **232**, 1423-1432.
- Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., y col. (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements y a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, **30**, 325-327.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., y col. (2014) The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe*, **15**, 329-338.
- Liu, S., Kracher, B., Ziegler, J., Birkenbihl, R. P. y Somssich, I. E. (2015) Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *Elife*, **4**, e07295.
- Liu, Y., Borchert, G.L., Donald, S.P., Surazynski, A., Hum C.A., Weydert, C.J., Oberley, L.W., Phang, J.M. (2005) MnSOD inhibits proline oxidase-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, **26**, 1335-1342.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R. y Collmer, A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible y incompatible plant interactions. *Mol Microbiol*, **54**, 353-365.
- Ma, S. W., Morris, V. L. y Cuppels, D. A. (1991) Characterization of a DNA region required for production of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **4**, 69-74.
- Macho, A. P., Boutrot, F., Rathjen, J. P. y Zipfel, C. (2012) Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiol*, **159**, 1845-1856.
- Mani, S., Van De Cotte, B., Van Montagu, M. y Verbruggen, N. (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline y its analogs in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **128**, 73-83.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. y He, S. Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**, 969-980.
- Memelink, J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, **70**, 1560-1570.
- Mersmann, S., Bourdais, G., Rietz, S. y Robatzek, S. (2010) Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor y is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol*, **154**, 391-400.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R. y Zilberstein, A. (2009) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J Biol Chem*, **284**, 26482-26492.
- Mishra, S. y Dubey, R. S. (2006) Inhibition of ribonuclease y protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *J Plant Physiol*, **163**, 927-936.
- Mitchell, H. J., Ayliffe, M. A., Rashid, K. Y. y Pryor, A. J. (2006) A rust-inducible gene from flax (*fis1*) is involved in proline catabolism. *Planta*, **223**, 213-222.
- Mittler, R., Vyerauwers, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, **9**, 490-498.
- Mock, H. P. y Grimm, B. (1997) Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis y Leads to Light-Dependent Necrosis. *Plant Physiol*, **113**, 1101-1112.

- Mock, H. P., Heller, W., Molina, A., Neubohn, B., Syermann, H., Jr. y Grimm, B. (1999) Expression of uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase antisense RNA in tobacco induces pathogen defense responses conferring increased resistance to tobacco mosaic virus. *J Biol Chem*, **274**, 4231-4238.
- Moller, I. M. (2001) PLANT MITOCHONDRIA Y OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, y Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**, 561-591.
- Monteoliva, M. I., Rizzi, Y. S., Cecchini, N. M., Hajirezaei, M. R. y Alvarez, M. E. (2014) Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of Arabidopsis. *BMC Plant Biol*, **14**, 21.
- Moore, J. W., Loake, G. J. y Spoel, S. H. (2011) Transcription dynamics in plant immunity. *Plant Cell*, **23**, 2809-2820.
- Moreno, J. I., Martin, R. y Castresana, C. (2005) Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic y abiotic stress. *Plant J*, **41**, 451-463.
- Mou, Z., Fan, W. y Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.
- Mur, L. A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. y Wasternack, C. (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate y jasmonate signaling include synergy, antagonism, y oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*, **140**, 249-262.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. y Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, **59**, 501-520.
- Murahama, M., Yoshida, T., Hayashi, F., Ichino, T., Sanada, Y. y Wada, K. (2001) Purification y characterization of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate reductase isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol*, **42**, 742-750.
- Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline y hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. *Plant Physiol*, **118**, 1233-1241.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1999) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **461**, 205-210
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S. y Shinozaki, K. (2003) Toxicity of free proline revealed in an arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, **44**, 541-548.
- Naton, B., Hahlbrock, K. y Schmelzer, E. (1996) Correlation of Rapid Cell Death with Metabolic Changes in Fungus-Infected, Cultured Parsley Cells. *Plant Physiol*, **112**, 433-444.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y. y Voinnet, O. (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, **321**, 964-967.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N. y Metraux, J. P. (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell*, **14**, 275-286.
- Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zyer, M., Weigel, R., y col. (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors y suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J*, **50**, 128-139.
- Noctor, G. y Foyer, C. H. (2016) Intracellular Redox Compartmentation y ROS-Related Communication in Regulation y Signaling. *Plant Physiol*, **171**, 1581-1592.
- Nomura, M. y Takagi, H. (2004) Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12616-12621.
- Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M. y Day, D. A. (2004) Salicylic acid is an uncoupler y inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol*, **134**, 492-501.

- Nuhse, T. S., Bottrill, A. R., Jones, A. M. y Peck, S. C. (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J*, **51**, 931-940.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V. S., Whitelegge, J. P., Souda, P., y col. (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol*, **158**, 2013-2027.
- Ostrovsky, P. C. y Maloy, S. (1995) Protein phosphorylation on serine, threonine, y tyrosine residues modulates membrane-protein interactions y transcriptional regulation in Salmonella typhimurium. *Genes Dev*, **9**, 2034-2041.
- Paes, L. S., Suarez Mantilla, B., Zimbres, F. M., Pral, E. M., Diogo de Melo, P., Tahara, E. B., y col. (2013) Proline dehydrogenase regulates redox state y respiratory metabolism in Trypanosoma cruzi. *PLoS One*, **8**, e69419.
- Palmieri, L., Todd, C. D., Arrigoni, R., Hoyos, M. E., Santoro, A., Polacco, J. C., y col. (2006) Arabidopsis mitochondria have two basic amino acid transporters with partially overlapping specificities y differential expression in seedling development. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1277-1283.
- Pandey, S. P., y Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology*, **150**, 1648-1655.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A. C., y col. (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, **464**, 788-791.
- Pauwels, L. y Goossens, A. (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell*, **23**, 3089-3100.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., y col. (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death y disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **139**, 1291-1303.
- Peng, Z., Lu, Q. y Verma, D. P. (1996) Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase y proline dehydrogenase genes controls proline levels during y after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet*, **253**, 334-341.
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., y col. (2015a) Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cell Microbiol*, **18**, 453-465.
- Petre, B., Saunders, D. G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., y col. (2015b) Cydate Effector Proteins of the Rust Pathogen Melampsora larici-populina Target Diverse Plant Cell Compartments. *Mol Plant Microbe Interact*, **28**, 689-700.
- Petriacq, P., Ton, J., Patrit, O., Tcherkez, G. y Gakiere, B. (2016) NAD Acts as an Integral Regulator of Multiple Defense Layers. *Plant Physiol*, **172**, 1465-1479.
- Phang, J. M., Liu, W. y Zabirnyk, O. (2010) Proline metabolism y microenvironmental stress. *Annu Rev Nutr*, **30**, 441-463.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. y Van Wees, S. C. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **28**, 489-521.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M. E., y col. (2000) Infection strategies of Botrytis cinerea y related necrotrophic pathogens. In: *Fungal pathology*. (ed. ^eds.). Springer, pp. 33-64.
- Qamar, A., Mysore, K. S. y Senthil-Kumar, M. (2015) Role of proline y pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front Plant Sci*, **6**, 503.
- Rajendrakumar, C. S., Reddy, B. V. y Reddy, A. R. (1994) Proline-protein interactions: protection of structural y functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, **201**, 957-963.
- Rayapati, P. J., Stewart, C. R. y Hack, E. (1989) Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Is in Pea (Pisum sativum L.) Leaf Chloroplasts. *Plant Physiol*, **91**, 581-586.

- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E. y Frommer, W. B. (1996) Salt stress-induced proline transporters y salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*, **8**, 1437-1446.
- Rentsch, D., Schmidt, S. y Tegeder, M. (2007) Transporters for uptake y allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett*, **581**, 2281-2289.
- Ribarits, A., Abdullaev, A., Tashpulatov, A., Richter, A., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2007) Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated y play a role in early plant development. *Planta*, **225**, 1313-1324.
- Ritter, C. y Dangl, J. L. (1996) Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes. *Plant Cell*, **8**, 251-257.
- Rodriguez-Herva, J. J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., y col. (2012) A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell Microbiol*, **14**, 669-681.
- Roosens, N. H., Thu, T. T., Iskyar, H. M. y Jacobs, M. (1998) Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA y effect of salt stress on its expression in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, **117**, 263-271.
- Roosens, N., Bitar, F., Loenders, K., Angenon, G., y Jacobs, M. (2002) Overexpression of ornithine-d-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding*, **9**, 73-80.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **45**, 309-317.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- y hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **130**, 709-719.
- Savoure, A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M. y Verbruggen, N. (1995) Isolation, characterization, y chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*, **372**, 13-19.
- Scharte, J., Schon, H., Tjaden, Z., Weis, E. y von Schaewen, A. (2009) Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8061-8066.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Yerson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., y col. (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11655-11660.
- Senthil-Kumar, M. y Mysore, K. S. (2012) Ornithine-delta-aminotransferase y proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant Cell Environ*, **35**, 1329-1343.
- Servet, C., Ghelis, T., Richard, L., Zilberstein, A. y Savoure, A. (2012) Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci (Lyman Ed)*, **17**, 607-620.
- Sharma, P. y Dubey, R. S. (2005) Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity y water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol*, **162**, 854-864.
- Sharma, S., Shinde, S. y Verslues, P. E. (2013) Functional characterization of an ornithine cyclodeaminase-like protein of Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol*, **13**, 182.
- Sharma, S. y Verslues, P. E. (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential y stress recovery. *Plant Cell Environ*, **33**, 1838-1851.
- Sharma, S., Villamor, J. G. y Verslues, P. E. (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis y catabolism in growth y redox balance at low water potential. *Plant Physiol*, **157**, 292-304.

- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., y col. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, **468**, 400-405.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y. F., Talbot, N. J., y col. (2011) Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathog*, **7**, e1002185.
- Signorelli, S., Arellano, J. B., Melo, T. B., Borsani, O. y Monza, J. (2013) Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants. *Plant Physiol Biochem*, **64**, 80-83.
- Signorelli, S., Coitino, E. L., Borsani, O. y Monza, J. (2014) Molecular mechanisms for the reaction between ( )OH radicals y proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *J Phys Chem B*, **118**, 37-47.
- Simon, U. K., Polanschutz, L. M., Koffler, B. E. y Zechmann, B. (2013) High resolution imaging of temporal y spatial changes of subcellular ascorbate, glutathione y H(2)O(2) distribution during *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis*. *PLoS One*, **8**, e65811.
- Sindelar, L. y Sindelarova, M. (2002) Correlation of viral RNA biosynthesis with glucose-6-phosphate dehydrogenase activity y host resistance. *Planta*, **215**, 862-869.
- Smirnoff, N., y Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057-1060.
- Spoel, S. H. y Dong, X. (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*, **12**, 89-100.
- Spoel, S. H., Johnson, J. S. y Dong, X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18842-18847.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., y col. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- y jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, **15**, 760-770.
- Spoel, S. H. y Loake, G. J. (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Curr Opin Plant Biol*, **14**, 358-364.
- Stampfl, H., Fritz, M., Dal Santo, S. y Jonak, C. (2016) The GSK3/Shaggy-Like Kinase ASKalpha Contributes to Pattern-Triggered Immunity. *Plant Physiol*, **171**, 1366-1377.
- Staswick, P. E. y Tiryaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2117-2127.
- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., y col. (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA y is regulated by ABA1, ABI1 y AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J*, **12**, 557-569.
- Szabados, L. y Savoure, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, **15**, 89-97.
- Székely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., y col. (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation y developmental control of proline biosynthesis. *Plant J*, **53**, 11-28.
- Szoke, A., Miao, G. H., Hong, Z. y Verma, D. P. (1992) Subcellular location of delta-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule y leaf of soybean. *Plant Physiol*, **99**, 1642-1649.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., y col. (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes y plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **139**, 1268-1283.
- Tanner, J. J. (2008) Structural biology of proline catabolism. *Amino Acids*, **35**, 719-730.
- Thilmony, R., Underwood, W. y He, S. Y. (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J*, **46**, 34-53.



- Toka, I., Planchais, S., Cabassa, C., Justin, A. M., De Vos, D., Richard, L., y col. (2010) Mutations in the hyperosmotic stress-responsive mitochondrial BASIC AMINO ACID CARRIER2 enhance proline accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **152**, 1851-1862.
- Torres, M. A. (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant*, **138**, 414-429.
- Torres, M. A. y Dangl, J. L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress y development. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 397-403.
- Torres, M. A., Dangl, J. L. y Jones, J. D. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD y AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 517-522.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. y Katagiri, F. (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet*, **5**, e1000772.
- Tsuge, H., Kawakami, R., Sakuraba, H., Ago, H., Miyano, M., Aki, K., y col. (2005) Crystal structure of a novel FAD-, FMN-, y ATP-containing L-proline dehydrogenase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem*, **280**, 31045-31049.
- Uloth, M. B., Clode, P. L., You, M. P. y Barbetti, M. J. (2015) Calcium oxalate crystals: an integral component of the *Sclerotinia sclerotiorum*/Brassica carinata pathosystem. *PLoS One*, **10**, e0122362.
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., y col. (2009) Defining the mitochondrial stress response in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, **2**, 1310-1324.
- van Kan, J. A. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*, **11**, 247-253.
- van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, **44**, 135-162.
- Verbruggen, N. y Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, **35**, 753-759.
- Verbruggen, N., Hua, X. J., May, M. y Van Montagu, M. (1996) Environmental y developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8787-8791.
- Verbruggen, N., Villarroel, R. y Van Montagu, M. (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, **103**, 771-781.
- Verslues, P. E., Kim, Y. S. y Zhu, J. K. (2007) Altered ABA, proline y hydrogen peroxide in an Arabidopsis glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Mol Biol*, **64**, 205-217.
- Verslues, P. E. y Sharma, S. (2010) Proline metabolism y its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book*, **8**, e0140.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. y Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2362.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A. y Klessig, D. F. (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, **47**, 177-206.
- Voll, L. M., Zell, M. B., Engelsdorf, T., Saur, A., Wheeler, M. G., Drincovich, M. F., y col. (2012) Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in Arabidopsis thaliana is associated with enhanced susceptibility to Colletotrichum higginsianum. *New Phytol*, **195**, 189-202.
- Wakao, S. y Benning, C. (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant J*, **41**, 243-256.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction y action in plant stress response, growth y development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann Bot*, **111**, 1021-1058.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C. S., Dietrich, K., Wang, X., Schutze, K., y col. (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J*, **25**, 3133-3143.

- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F. y Staskawicz, B. J. (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* y a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* y soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-59.
- White, T. A., Krishnan, N., Becker, D. F. y Tanner, J. J. (2007) Structure y kinetics of monofunctional proline dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*, **282**, 14316-14327.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. y Ausubel, F. M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Williams, B., Kabbage, M., Kim, H. J., Britt, R. y Dickman, M. B. (2011) Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog*, **7**, e1002107.
- Williams, J.F. (1980) A critical examination of the evidence for the reactions of the pentose pathway in animal tissues. *Trends in Biochemical Science* **5**, 315–320.
- Windram, O., Madhou, P., McHattie, S., Hill, C., Hickman, R., Cooke, E., y col. (2012) *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology y regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell*, **24**, 3530-3557.
- Wu, L., Fan, Z., Guo, L., Li, Y., Zhang, W., Qu, L. J., y Chen, Z. (2003). Over-expression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Science Bulletin*, **48**, 2594-2600.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., y col. (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep*, **1**, 639-647.
- Xie, Z. y Chen, Z. (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport y oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol*, **120**, 217-226.
- Xie, Z. y Chen, Z. (2000) Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 183-190.
- Xue, X., Liu, A. y Hua, X. (2009) Proline accumulation y transcriptional regulation of proline biosynthesis y degradation in *Brassica napus*. *BMB Rep*, **42**, 28-34.
- Yang, J., Kloepper, J. W. y Ryu, C. M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci*, **14**, 1-4.
- Yao, N., Eisfelder, B. J., Marvin, J. y Greenberg, J. T. (2004) The mitochondrion--an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **40**, 596-610.
- Yao, N. y Greenberg, J. T. (2006) *Arabidopsis* ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death. *Plant Cell*, **18**, 397-411.
- Yao, N., Tada, Y., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa, Y., y col. (2002) Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J*, **30**, 567-579.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., y col. (1995) Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase y the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J*, **7**, 751-760.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol*, **38**, 1095-1102.
- You, J., Hu, H. y Xiong, L. (2012) An ornithine delta-aminotransferase gene OsOAT confers drought y oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci*, **197**, 59-69.
- Yu, C., Claybrook, D. L. y Huang, A. H. (1983) Transport of glycine, serine, y proline into spinach leaf mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **227**, 180-187.
- Zhang, B., Van Aken, O., Thatcher, L., De Clercq, I., Duncan, O., Law, S. R., y col. (2014) The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death y pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **80**, 709-727.

- Zhang, C. S., Lu, Q. y Verma, D. P. (1995) Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, **270**, 20491-20496.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., y col. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, **1**, 175-185.
- Zhang, L. y Xing, D. (2008) Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species y alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction y subsequent cell death. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1092-1111.
- Zurbriggen, M. D., Carrillo, N., Tognetti, V. B., Melzer, M., Peisker, M., Hause, B., y col. (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant J*, **60**, 962-973.