

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estrés y muerte celular programada en  
leguminosas: efectos de la expresión  
de supresores de muerte celular**

por

**Biólogo Germán Robert**

**Director: Dr. Ramiro Lascano  
Co-Director: Dra. Mariana Melchiorre**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV)  
dependiente del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP-INTA)**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2012**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Este documento se encuentra disponible en el Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<https://rdu.unc.edu.ar/>

## **COMISIÓN ASESORA**

Nombre y Apellido: Ramiro Lascano.

Lugar de Trabajo: IFRGV, FCEFyN Cátedra de Fisiología Vegetal.

Nombre y Apellido: Claudio González.

Lugar de Trabajo: FCEFyN Cátedra de Fisiología Vegetal.

Nombre y Apellido: Virginia Luna

Lugar de Trabajo: Universidad Nacional de Rio IV.

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Lugar y Fecha:

Calificación:

## **TRIBUNAL**

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

A mis viejos...

## **Producción científica derivada de esta Tesis**

**XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal.** Mar del Plata, Argentina 17 – 20 de septiembre de 2012. “Procesos de tráfico de endomembranas/autofagia tienen un rol clave en el crecimiento y desarrollo radical y en la interacción simbiótica *Glycine max-Bradyrhizobium japonicum*”. Germán Robert, Nacira Muñoz, Marianela Rodríguez, Georgina Estrada-Navarrete, Mariana Melchiorre, Federico Sánchez y Ramiro Lascano.

**XXV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (XXIV RELAR).** Piriápolis, Uruguay. 4 – 9 septiembre 2011. “Muerte de pelos radicales de soja (*Glycine max*): efectos de la inoculación con *B. japonicum* y el estrés abiótico”. Germán Robert, Nacira Muñoz, Mariana Melchiorre y Ramiro Lascano.

**XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal.** 26 al 29 de septiembre de 2010, La Plata, Buenos Aires, Argentina. “Participación de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) y procesos de vesiculización en las respuestas tempranas de la interacción *Glycine max* l-*Bradyrhizobium japonicum*”. Germán Robert, Nacira Muñoz, Mariana Melchiorre y Ramiro Lascano.

**XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (XXIV RELAR) y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Microorganismo-Planta-Ambiente (I IBEMPA).** 5 al 8 de mayo de 2009. San José de las Lajas, La Habana, Cuba. “Participación de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) sobre condiciones generadoras de muerte en etapas tempranas de la interacción *Glycine max* l-*Bradyrhizobium japonicum*”. Germán Robert, Nacira Muñoz, Mariana Melchiorre, Federico Sanchez y Ramiro Lascano.

**I Congreso de la Red Argentina de Salinidad (RAS).** 11 al 13 de marzo de 2009. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina. “Supresores de muerte y producción de especies reactivas de oxígeno en pelos radicales durante la interacción *Glycine Max* L.-*Bradyrhizobium Japonicum* bajo condiciones de estrés salino y osmótico” Robert G., Muñoz N., Alvarado-Affantranger X., Melchiorre M., Racca R., Sanchez F., Lascano R.

**VIII Congreso Nacional de Fijación Biológica de Nitrógeno.** 29 al 31 de octubre de 2008. Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). “Expresión del supresor de muerte celular Ced-9 en raíces aéreas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*). Efectos bajo condiciones de estrés”. Germán Robert, Nacira Muñoz, Margarita Rodríguez-Kessler, Xochitl Alvarado-Affantranger,

Georgina Estrada-Navarrete, Roberto Racca, Mariana Melchiorre, Federico Sanchez y Ramiro Lascano.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron durante este tiempo, no solo a los que colaboraron en la construcción de esta Tesis, sino también a los compañeros de vida, ya que son parte importante de como uno se va construyendo como persona.

A mi familia, a mis viejos y mis hermanos, porque son el apoyo y compañía constante en la vida y la principal influencia por la que hoy he llegado a ser la persona que soy (osea, icualquier queja dirigirse a ellos! Jui jui jui). A Pao, mi compañera, mi amor, iporque es ella quien ahora tiene que aguantar esa persona que he llegado a ser!, gracias monito por tu compañía, dulzura y paciencia.

Mi inserción en este grupo de trabajo fue gracias a Victorio Trippi. Recuerdo esa primera conversación que tuvimos, sobre muerte celular, en ese momento sentí que había encontrado el lugar para realizar mi tesina de grado. Gracias Victorio por compartir toda su experiencia con afecto y total humildad. También fue Victorio quien me presentó a Ramiro Lascano para que me dirigiera en la Tesina de grado, para posteriormente embarcarnos en el Doctorado en Ciencias Biológicas junto a la codirección de Mariana Melchiorre. Mi agradecimiento a Ramiro y Mariana por esto años de acompañamiento, permitiendo la identidad y rumbo de trabajo que uno fue descubriendo en este transitar y apoyando las iniciativas que pudieran ir surgiendo. Gracias porque siempre se favoreció la expresión libre, promoviendo la discusión por sobre la certeza. ¡Gracias porque se ha disfrutado el *quehacer* diario! Quiero hacer una mención especial a Ramiro, con quién también he compartido mucho tiempo fuera del laboratorio, ¡incluso viviendo con toda su familia! (habría que preguntarles a ellos si también le agradecerían esto a Ramiro... Jo jo jo). Gracias por toda tu generosidad y amistad.

A Luis Conci, quien me recibió por primera vez en el INTA hace mucho tiempo, y por quién comenzaron los contactos en el Instituto. ¿Actualmente?, porque siento que puedo contar con él a pesar de la “traición” de cruzarme de pasillo hacia la Fisiología Vegetal, porque siempre está dispuesto a escuchar y aconsejar. A Roberto, porque nos abrió las puertas del INTA a todo el grupo de Trippi, y posteriormente en particular a mí. Porque en su afán de que el grupo crezca promovió vinculaciones con importantes investigadores. Así es que conocimos a Federico Sánchez, de México, con quién hemos trabajado posteriormente en colaboración y quién me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias Fede y Carmen por brindarme toda su hospitalidad, gracias porque allí conocí grandes amigos que compartieron y me enseñaron muchas cosas, gracias Yisus, Lilianita, Margarita, Juan, Geo, Xochitl, Aaron, Jonathan, Roxana, Alejandra, Oddete, Eve, Jaz, Berta, y seguro que me olvido de alguien...

A mis compañeros de trabajo y amigos, porque sé que están cuando uno los necesita: Naci (la pequeña) por toda tu colaboración en esta Tesis, por todo tu cariño; Marianela, por tu disposición a escucharme (y retarme... iesto es compartido con la pequeña!); Rodri (el oso), gracias porque siempre estás para colaborar y ayudar (iy lavar los platos los viernes!); loli, ¡gracias por encargarte de mi educación! Cuantos años loli..., de fierro; pablongo (del hongo, también conocido como *El Prócer*), gracias por toda tu ayuda y concejos; Mariana (pumix), otra de fierro; Paolita, gracias por la ayuda brindada; Dani Lopez, por tu colaboración (a pesar que nos abandonaste); Dani (Tira), porque siempre es alegría! y no puedo anotar a todos, ¡así que los menos susceptibles quedaron afuera! Jui jui jui.

Gracias al INTA por financiar mi formación junto al MINCyT y ofrecerme el lugar de trabajo. Gracias a la Comisión Asesora y miembros del Tribunal por el tiempo dedicado y las valiosas sugerencias realizadas. Por último, quiero agradecer a toda la gente del Doctorado por su trabajo realizado.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1. Muerte celular programada.....	6
1.1. Reguladores y efectores de la muerte celular programada en animales.....	7
1.2. Muerte celular programada Tipo I o Apoptosis: el modelo de muerte celular programada en animales.....	8
1.3. Muerte celular programada tipo II o Autofágica.....	10
1.4. Origen y evolución de la muerte celular programada.....	13
1.4.1. Control de la muerte en organismos unicelulares.....	14
Procariotas.....	14
Eucariotas.....	15
1.5. Muerte celular programada en plantas.....	17
1.5.1. Participación de las organelas en la muerte celular programada en plantas.....	20
Mitocondrias.....	20
Cloroplastos.....	22
Retículo endoplasmático.....	21
2. Homeostasis redox. Producción y remoción de especies activas del oxígeno.....	23
3. Senescencia y muerte celular programada.....	25
4. Las leguminosas.....	27
4.1. Establecimiento de la simbiosis. Reconocimiento, formación de nódulos y fijación biológica del nitrógeno.....	28
4.2. Efectos del estrés sobre la producción de granos.....	29
4.3. Senescencia nodular en leguminosas.....	30
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32

CAPÍTULO 1: Obtención de plantas transgénicas con expresión de Ced-9 y sus efectos bajo condiciones de estrés.....	33
INTRODUCCIÓN.....	34
1. Reguladores de apoptosis: miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en animales.....	34
1.1. Mecanismos de acción de las proteínas de la familia Bcl-2.....	36
1.2. Proteínas de la familia Bc-2 y la regulación de autofagia.....	37
1.3. Expresión de proteínas animales de la familia Bcl-2 en plantas.....	39
2. Muerte celular en la interacción soja- <i>B. japonicum</i> .....	40
3. Transformación de soja.....	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
RESULTADOS.....	43
Obtención de plantas de soja con expresión de Ced-9.....	43
Sistema alternativo para la introducción de Ced-9 en plantas de soja. Obtención de raíces en cabellera mediante el uso de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	44
Expresión de Ced-9 en raíces de soja. Evaluación de la nodulación.....	46
Caracterización de los eventos de muerte de pelos radicales de raíces sometidas a 150 mM NaCl y durante etapas tempranas de la interacción soja- <i>B. japonicum</i> bajo condiciones de 50 mM NaCl.....	46
Evaluación de estructura nuclear de pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte.....	48
Peroxidación de lípidos y niveles de glutatión en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte.....	49
Niveles de ATP en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte.....	50
Efectos de la expresión del supresor de muerte celular Ced-9 en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés.....	51
Evaluación de la estructura nuclear.....	51
Peroxidación de lípidos en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés.....	52
Niveles de ATP en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés.....	53
Contenido de iones sodio, potasio y calcio en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés.....	54

¿Conservación de los mecanismos de acción de Ced-9 en las plantas? Búsqueda de dominio putativo BH3 en la proteína ATG6/BEC-1 de <i>Glycine max</i> .....	56
Evaluación de la estructura secundaria de GmATG6.....	59
Estructura terciaria. Búsqueda de homólogos por estructura de proteínas.....	61
DISCUSIÓN.....	63
CAPÍTULO 2: Participación del tráfico de endomembranas/autofagia en los procesos de muerte celular y en la interacción rizobio-leguminosa.....	68
INTRODUCCIÓN.....	69
1. Expresión de Ced-9 en raíces en cabellera. Efectos negativos sobre la nodulación.....	69
2. Metabolismo de lípidos y tráfico de vesículas. Participación de Fosfatidil-inositol 3-kinasa.....	71
3. Tráfico de endomembranas. Participación en las respuestas a condiciones de estrés.....	73
Vesiculización.....	74
Autofagia.....	75
3.1. Autofagia: ¿promoción o inhibición de la muerte celular programada?.....	76
4. Interacción rizobio-leguminosa.....	78
4.1. Participación de las especies activas del oxígeno en la interacción rizobio-leguminosa.....	79
4.2. Participación del tráfico de vesículas en la interacción rizobio-leguminosa....	81
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	83
RESULTADOS.....	84
Evaluación del proceso de autofagia en raíces en cabellera pBE-Ced-9.....	84
Análisis de expresión de genes implicados en autofagia .....	84
Evaluación del contenido de proteína ATG8 en raíces en cabellera pBE-Ced-9 bajo condiciones de estrés.....	85
Participación del tráfico de endomembranas en la muerte celular de raíces y pelos radicales bajo condiciones de estrés.....	86
Análisis de la expresión de genes implicados en autofagia.....	86
Inhibición farmacológica de PI3K.....	89

Silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K.....	90
Determinación de los niveles de expresión de GmVps34/PI3K en raíces transgénicas PI3Ki.....	92
Evaluación del fenotipo de las raíces en cabellera PI3Ki. Morfología.....	93
Evaluación del fenotipo de las raíces en cabellera PI3Ki.	
Producción intracelular de especies activas del oxígeno.....	95
Efectos del silenciamiento de GmVps34/PI3K en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés.....	96
Peroxidación de lípidos en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés.....	97
Evaluación del contenido de proteína ATG8 en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés.....	98
Contenido de iones sodio y potasio en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés.....	99
Participación del tráfico de endomembranas en la interacción rizobio-leguminosa. ....	100
Efectos del silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K sobre la nodulación.....	100
Expresión de genes implicados en autofagia en raíces PI3Ki.....	101
Evaluación de la colonización nodular por el microsimbionte en raíces en cabellera PI3Ki.....	102
Participación de PI3K en etapas tempranas de la interacción soja- <i>B. japonicum</i> . Generación de especies activas del oxígeno.....	102
Participación del complejo NADPH oxidasa en etapas tempranas de la interacción soja- <i>B. japonicum</i> .....	105
Respuestas tempranas moduladas por PI3K en la interacción soja- <i>B. japonicum</i> . Efectos sobre la nodulación.....	106
Respuestas tempranas moduladas por el complejo NADPH oxidasa en la interacción soja- <i>B. japonicum</i> . Efectos sobre la nodulación.....	107
Silenciamiento post-transcripcional de GmAtg6/Bec-1.....	108
Evaluación de la nodulación en raíces en cabellera ATG6i.....	109
DISCUSIÓN.....	111
CONCLUSIONES FINALES.....	116

MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
1. Material vegetal.....	133
1.1. Transformación de meristemas cotiledonares de plantas de soja.....	120
1.2. Generación de raíces en cabellera en plántulas de soja mediante el uso de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa K599.....	120
1.3. Germinación de semillas de soja y obtención de pelos radicales.....	120
1.4. Condiciones de estrés y muerte celular de pelos radicales. y raíces en cabellera.....	121
1.5. Cultivo bacteriano e inoculación de tratamientos.....	121
2. Extracción de pelos radicales para determinaciones bioquímicas.....	121
3. Extracción de ARN.....	121
3.1. Transcriptasa reversa.....	122
3.2. PCR en tiempo real	
2.2.1. Mezcla de reacción y condiciones de PCR.....	122
2.2.2. Cálculo de eficiencia de oligonucleótidos.....	122
4. Electroforesis de proteínas en geles de poli(acrilamida).....	122
5. Proteínas totales.....	123
6. Determinación histoquímica de radical superóxido apoplástico.....	123
7. Determinación de especies activas del oxígeno intracelulares por microscopía de epifluorescencia y confocal.....	123
8. Evaluación de muerte de pelos radicales y de raíces sometidas a los tratamientos de estrés	
8.1. Viabilidad por tinciones con Azul de Evans y Azul de trifano.....	123
8.2. Evaluación de la degradación nuclear por microscopía confocal.....	124
8.3. Evaluación de la degradación nuclear por electroforesis en gel de agarosa.....	124
9. Extracción ácida para la determinación de Glutación, MDA y ATP.....	124
9.1. Determinación de antioxidantes no enzimáticos: glutación.....	124
9.2. Determinación de malondialdehído (MDA).....	125
9.3. Determinación por luminiscencia de los niveles de ATP.....	125
10. Efectos tempranos sobre etapas tardías de la interacción simbiótica.....	125
11. Actividad Nitrogenasa.....	125
12. Construcción de plásmidos.....	126
13. Preparación de plásmidos (Miniprep).....	126
14. Cuantificación de iones en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés.....	127
15. Análisis y cuantificación de imágenes.....	127
16. Análisis estadístico.....	127
BIBLIORAFÍA.....	128

# ABREVIATURAS

**ABA** ácido absícico  
**ADN** ácido desoxiribonucleico  
**AG** ácido giberélico  
**Ams1**  $\alpha$ -manosidasa  
**ApeI** aminopeptidasa I  
**APX** ascorbato peroxidasa.  
**ARN** ácido ribonucleic  
**Atg** genes de autofagia  
**ATP** adenosin trifosfato  
**Bec-1** beclina  
**BH** dominio homólogo a Bcl-2  
**BP** band pass.  
**BrEt** bromuro de etidio  
**CAT** catalasa.  
**Cit-c** citocromo c  
**DHAR** dihidro ascorbato reductasa.  
**DMSO** di-metil-sulfóxido.  
**dNTP:** dinucleótidos trifosfatos  
**DO** densidad óptica.  
**DPI** ioduro de difenilo.  
**DTNB** 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico).  
**DTT** ditioneitol.  
**EAO** especies activas de oxígeno.  
**EDTA** acido etilenediaminotetraacetico.  
**EGTA** ácido etilenglicol-bis (-aminoetileter)-N,N,N,N-tetraacetico.  
**ET** etileno  
**FBN** fijación biológica de nitrógeno.  
**FHB** fusariosis de la espiga  
**FN** factores nod.  
**GFP** proteína verde fluorescente  
**GR** glutatión reductasa.  
**GSH** glutatión reducido.  
**GSSG** glutatión oxidado.  
**HPLC** cromatografía líquida de alta presión.  
**JA** ácido jasmónico

**Km** kanamicina.  
**LP** long pass.  
**MCP** muerte celular programada.  
**MDHAR** mono dehidro ascorbato reductasa.  
**MPB** membrana peri-bacteroidal.  
**NA** naranja de acridina  
**PCR** reacción en cadena de la polimerasa.  
**PI3K** fosfatidil inositol 3-kinasa  
**PI3P** fosfatidil inositol 3-fosfato  
**PMPT** poro mitocondrial de permeabilidad transitoria  
**PVPP** poli-vinil-poli-pirrolidona.  
**RE** retículo endoplasmático  
**RH** respuesta hipersensible.  
**SOD** superóxido dismutasa.  
**TBA** ácido tiobarbitúrico.  
**TCA** ácido tricloro acético.  
**Tdt** protein roja del tomate  
**UV** ultra violeta.  
**VDAC** canal aniónico dependiente de voltage  
**VPE** proteína de procesado vacuolar

## RESUMEN

En leguminosas, condiciones de estrés aceleran el proceso de senescencia e inducen muerte celular, comprometiendo la asimilación del carbono, la fijación biológica del nitrógeno y en consecuencia el crecimiento y la productividad. La hipótesis inicialmente planteada fue que la expresión de supresores de muerte de origen animal retardan los procesos de senescencia y muerte del sistema planta-simbionte bajo condiciones de estrés. Debido a que no se logró obtener plantas enteras transformadas, se optimizó la generación de plantas compuestas con raíces en cabellera transgénicas. Curiosamente, las raíces de soja transgénicas con expresión de Ced-9, proteína anti-apoptótica de *Caenorhabditis elegans* que no presenta homólogos identificados en el reino vegetal, tuvieron disminuida su capacidad de nodulación; resultado que nos condujo a replantear nuestros objetivos iniciales.

La proteína CED-9 conservó sus funciones en plantas de soja sometidas a condiciones de estrés, inhibiendo procesos de muerte celular, lo que sugiere un nivel de funcionalidad similar entre los componentes que forman parte de los mecanismos de muerte celular programada en plantas y animales. No obstante, aún no se han determinado los mecanismos por los que estas proteínas ejercen sus efectos en las plantas. En este sentido, hemos observado la capacidad de CED-9 de controlar la homeostasis iónica y de regular el proceso de autofagia, explicando, al menos en parte, la función conservada de los anti-apoptóticos de animales en plantas de soja y sus efectos sobre la nodulación y procesos de muerte celular. Asimismo, con el objetivo de evaluar la participación de autofagia en los procesos mencionados, se utilizaron herramientas farmacológicas y de genómica funcional. Estas aproximaciones demostraron la implicancia de autofagia en los mecanismos de sobrevivencia y en la simbiosis soja-*Bradyrhizobium japonicum*. Finalmente, se propone que la capacidad de CED-9 de regular autofagia en soja se debe a su potencial interacción con el dominio putativo BH3 de la proteína GmATG6/BEC-1, regulador maestro de dicho proceso. Estudios futuros serán realizados para comprobar esta hipótesis.



## SUMMARY

In legumes, stress conditions accelerate the senescence process and induce cell death, compromising the carbon assimilation, biological nitrogen fixation, and consequently growth and productivity. The initial hypothesis was that the expression of anti-apoptotic proteins from animals, which have no homologues identified in plants, delays senescence and death processes of the plant-symbiont system in legumes under stress conditions. The generation of composite plants with transgenic hairy roots was optimized due to it was not possible to obtain whole plants transformed. Interestingly, transgenic soybean roots expressing the anti-apoptotic protein CED-9 from *Caenorhabditis elegans* had diminished nodulation capacity. This result led us to reconsider our initial objectives.

CED-9 protein retained its functions in soybean plants under stress conditions, inhibiting cell death processes, suggesting similar functionality level between the components of the mechanisms of programmed cell death in plants and animals. However, the mechanisms by which these proteins exert their effects on plants are not yet determined. In this sense, we have observed the ability of CED-9 to control ionic homeostasis and regulate the process of autophagy, explaining, at least in part, the conserved function of the anti-apoptotic in soybean plants and its effect on nodulation and cell death processes. Furthermore, pharmacological tools and functional genomics were used in order to evaluate the involvement of autophagy in the above processes. These approaches demonstrated the implication of autophagy in survival mechanisms and in the soybean-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. Finally, it is proposed that CED-9 regulates autophagy in soybean due to its potential interaction with the putative BH3 domain in GmATG6/BEC-1 protein, master regulator of this process. Future studies will be conducted to test this hypothesis.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1. Muerte celular programada

Los organismos eucariotas, tales como las plantas, animales y levaduras, poseen diferentes formas de “suicidio celular” como una estrategia importante de respuesta a varios estímulos internos y externos, necesarias para que puedan desarrollarse adecuadamente y sobrevivir. En 1991, Ellis y colaboradores definieron a la muerte celular programada (MCP) como un proceso de muerte fisiológica involucrado en la eliminación selectiva de células no deseadas. En organismos pluricelulares la destrucción organizada de las células es importante para la formación de estructuras corporales, la forma específica de órganos y para la remoción de células no deseadas, dañadas o infectadas (Wyllie *et al.*, 1980; Jacobson *et al.*, 1997; Pennell y Lamb C, 1997; Vaux y Korsmeyer, 1999; Beers y McDowell, 2001). Dada la vital importancia de los eventos de muerte durante el desarrollo normal y en diferentes respuestas de adaptación, los mecanismos implicados en el control y ejecución de la muerte se encuentran bajo un estricto control, dando lugar a lo que se ha llamado *programa de muerte*.

Los primeros trabajos que describieron el proceso de MCP fueron realizados por Carl Vogt en 1842, basados en sus estudios sobre el desarrollo de peces y anfibios. En 1885, Walther Flemming realizó una descripción más precisa del proceso de MCP. Sin embargo, no fue hasta 1965 que el tópico fue retomado en los estudios realizados por John Foxton Ross Kerr en tejidos epiteliales utilizando microscopía electrónica (Kerr, 1965). Posteriormente, en 1972, Kerr, Wyllie y Currie introducen por primera vez el término Apoptosis para describir un tipo de muerte celular distinto a la Necrosis (Kerr *et al.*, 1972). Inicialmente, Kerr había utilizado el término *necrosis celular programada*, pero en el artículo, llamaron apoptosis al proceso natural de eliminación controlada de células, con características morfológicas que sugerían un fenómeno activo, inherentemente programado y que podía ser iniciado o inhibido por una variedad de estímulos ambientales, tanto fisiológicos como patogénicos (Kerr *et al.*, 1972).

El estudio de la MCP ha sido un campo importante de investigación en los diferentes sistemas de modelos animales, no sólo porque es un proceso esencial para entender el desarrollo, sino también porque la desregulación de la MCP causa alteraciones en la homeostasis celular que tienen implicaciones importantes asociadas con infecciones y diversas enfermedades, incluyendo cáncer o procesos neurodegenerativos. Estos estudios han llevado a la clasificación de la muerte celular en tres tipos en base a características morfológicas, tales como la formación de cuerpos apoptóticos, fagocitosis, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (Apoptosis o Muerte Celular Programada Tipo I), incremento del número de autofagosomas y vesículas líticas (Autofagia o Muerte Celular Programada Tipo II) y por último, la ausencia de los criterios anteriores, la ruptura de la membrana plasmática, el hinchamiento celular y de organelas

(Necrosis) (Kroemer *et al.* 2009). Asimismo, sólo las dos primeras fueron consideradas procesos de MCP. Sin embargo, recientemente, la necrosis ha surgido como una forma alternativa de MCP, cuya activación puede tener importantes consecuencias biológicas.

Resulta importante destacar que, la caracterización detallada de los procesos y mecanismos de MCP fueron realizados en sistemas animales, utilizando la apoptosis como modelo de estudio. La principal característica de los procesos de MCP es la participación activa de la célula para el control y ejecución de la muerte. Esta participación activa requiere de una transducción de señales específica, la expresión de genes y la síntesis de proteínas claves, como así también modificaciones post-traduccionales. Así, el proceso tiene lugar bajo un estricto control que lo lleva a cabo de una manera *ordenada*. La diferencia más importante entre los procesos de muerte celular *ordenados* con respecto a los de tipo necróticos o *no ordenados*, es el requerimiento de energía para el correcto metabolismo y, en algunos casos, la movilización de los productos de la actividad catalítica.

### **1.1. Reguladores y efectores de la muerte celular programada en animales**

Estudios realizados con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* caracterizaron un número de genes implicados en la regulación de la apoptosis. Algunos de estos fueron denominados *anti-apoptóticos* o *supresores de MCP* para los genes que participan en suprimir el desarrollo de la MCP (por ejemplo Ced-9) y *pro-apoptóticos*, para los que inducen la ocurrencia de este proceso (Ced-4, EGL-1, entre otros). De esta manera, surge la primera evidencia de que la muerte celular es un proceso activo bajo control genético (Sulston y Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983; Ellis y Horvitz, 1986; Hengartner *et al.*, 1992). Muchos de estos genes tienen homólogos en mamíferos, que al igual que en los gusanos, inhiben la apoptosis (Bcl-2, Bcl-xL, entre otros) o la inducen (Bax, Bad, Bid, entre otros) (Vaux *et al.*, 1988 y 1992; Hockenbery *et al.*, 1990). Dados estos descubrimientos, y en pleno apogeo de la *era genómica*, la MCP fue caracterizada como la activación de una maquinaria suicida, controlada genéticamente que determinaba a las células a *vivir o morir*.

En última instancia, las proteínas reguladoras conducen a la activación o inhibición de proteínas efectoras de la apoptosis, cisteín-proteasas específicas denominadas caspasas. Las caspasas están reguladas a nivel postraduccionales, asegurando así que puedan ser activadas rápidamente. Además de clasificarse por su filogenia y función general, las caspasas se pueden clasificar en dos tipos según su función en las diversas cascadas de señalización intracelular en las que median: caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras como las caspasas-8 y -9

procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras como las caspasas-3 y -7, activándolas. Las caspasas efectoras una vez activadas procesan a su vez otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas vías de apoptosis.

## **1.2. Muerte celular programada Tipo I o Apoptosis: el modelo de muerte celular programada en animales**

Los cambios que distinguen al proceso de apoptosis de otros procesos de MCP, son bioquímicos y principalmente morfológicos. Las células apoptóticas presentan condensación o contracción del citoplasma, reorganización del núcleo, “ampollamiento” de la membrana plasmática, formación de cuerpos apoptóticos, los cuales serán fagocitados por otras células (Kerr *et al.*, 1972) y condensación de la cromatina (Earnshaw, 1995; O’Brien *et al.*, 1998). Finalmente, ocurre la activación de endonucleasas específicas que conducen a la fragmentación de la cromatina en unidades nucleosomales múltiples de 180 pb, un proceso denominado como ADN “escalera” debido al patrón que presenta el ADN en una corrida electroforética (Earnshaw, 1995; Fath *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996b; Wyllie, 1980). Cabe destacar que muchas de estas características, pero no todas, son comúnmente observadas en un amplio rango de organismos eucariotas.

La regulación de la auto-destrucción puede ocurrir como respuesta a señales originadas por fuera del ambiente celular, como así también desde el interior celular, donde cada célula individual es considerada una entidad compleja y la mezcla heterogénea de organelas y componentes funcionan como una unidad. En este sentido, el proceso de apoptosis puede llevarse a cabo por señales *extrínsecas* o *intrínsecas*, que en última instancia, y a través de los reguladores, conducirán a la activación de aspartil-proteasas específicas de apoptosis denominadas *caspasas* (Green, 2000; Strasser *et al.*, 1995) (Fig. 1). La vía *intrínseca* de inducción de la apoptosis es particularmente dependiente del estado fisiológico celular, el cual, sumado a la relación de señales de vida/muerte, determinará el “destino” de la célula. Esta activación es iniciada en la célula por la pérdida de integridad de la membrana externa de la mitocondria, lo que permite la redistribución del citocromo c (cit-c) y otras proteínas regulatorias de apoptosis en el citoplasma (Fig. 1) (Green, 2000). Subsecuentemente, una vez en el citoplasma, el cit-c interacciona directamente con Apaf-1 (del inglés, *Apoptosis-Activating-Factor-1*) el cual actúa como adaptador en la formación, dependiente de ATP, del complejo macromolecular conocido como *apoptosoma* (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996). Este complejo recluta y activa *caspasa-9* (Fig. 1). La activación de estas proteasas conduce a la activación de moléculas adicionales de caspasa-9, como así también otras caspasas específicas de apoptosis (caspasa-3 y caspasa-7), dando como resultado las características morfológicas típicas de

la apoptosis (Fig. 1). Estas proteasas son las implicadas en ejecutar el *programa de muerte celular*. Sin embargo, si no se encuentra ATP disponible para la formación del apoptosoma, puede ocurrir una forma de muerte celular de tipo necrótica (Formigli *et al.*, 2000).

La vía *extrínseca* de activación de la apoptosis comienza cuando un ligando inductor de muerte interactúa con receptores de membrana plasmática de la familia TNFR (del inglés, *Tumour Necrosis Factor Receptor*) o CD95 (Fig. 1), también denominados receptores de muerte. Esto inicia la formación de un complejo de iniciación de muerte que recluta y activa caspasa-8 (Nagata, 1997). En esta vía, una activación fuerte de caspasa-8 puede activar caspasa-3, resultando en apoptosis. Sin embargo, en algunos tipos celulares, la activación de caspasa-8 no es suficiente para activar caspasa-3. En estas células, la activación de caspasa-8 es amplificada a través de la mitocondria (Peter y Krammer, 1998). Este proceso ocurre cuando caspasa-8 hidroliza a Bid, un factor *pro-apoptótico*, que se transloca a mitocondria induciendo la pérdida de integridad de membrana externa, liberación de cit-c y activación de caspasa-9 y caspasa-3, tal como ocurre en la vía intrínseca (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998) (Fig. 1).

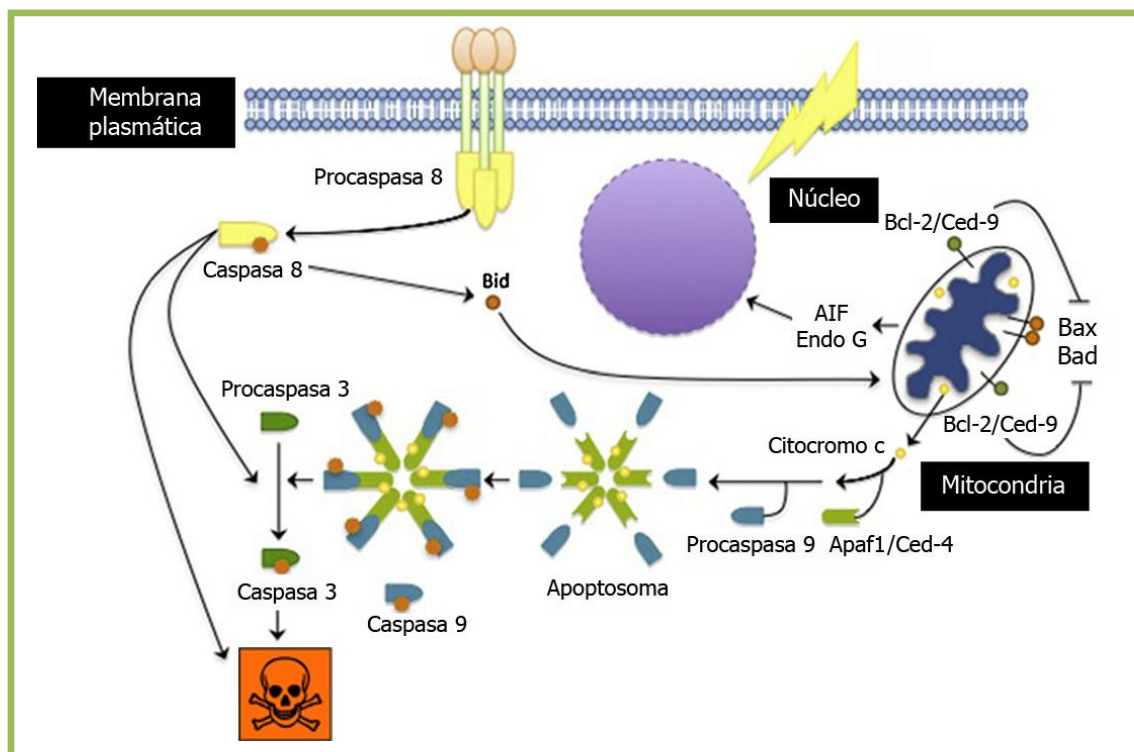


Fig. 1: Activación intrínseca y extrínseca de la apoptosis en animales. AIF, factor inductor de apoptosis; Endo G, endonucleasa G; Apaf1, factor-1 activador de apoptosis.

En resumen, la asociación entre el “destino” de cada célula (estado fisiológico celular, sumado a la relación de señales de vida/muerte) y la naturaleza de las interacciones que pueden establecer con otras células y su ambiente externo, definirán la vida o muerte celular. Dichos procesos regulan rigurosamente el número de células, su localización y el constante ajuste de los diferentes tipos celulares para constituir los órganos y tejidos. Esta interdependencia entre las células es una de las bases de la perennidad y plasticidad de los organismos, permitiendo la constante reconstrucción de tejidos/órganos y la adaptación a los cambios ambientales.

### **1.3. Muerte celular programada tipo II o autofágica**

Otro proceso muy importante componente de la MCP y del mantenimiento de la homeostasis celular es la *autofagia*. El término autofagia deriva de las raíces griegas *auto* -uno mismo y *phagos* –comer. Este es un proceso altamente conservado que permite a las células eucariotas el secuestro, traslado y degradación de componentes celulares superfluos o dañados, siendo el mecanismo regulado más importante por el cual se degradan proteínas de vida larga y la única vía descrita hasta el momento para la degradación de organelas (Klionsky y Emr, 2000; Levine y Klionsky, 2004).

Desde las primeras observaciones a mediados de 1950 (Clark, 1957), las vías autofágicas han sido estudiadas intensivamente en levaduras y sistemas animales, y más recientemente en plantas (Scott *et al.*, 2004; Bassham *et al.*, 2006). Existen tres tipos distintos de autofagia (Fig. 2), los cuales difieren en mecanismos, funciones fisiológicas y especificidad cargo, 1) *autofagia mediada por chaperonas*, las cuales reconocen una secuencia específica de aminoácidos y llevan a cabo la translocación directa de proteínas a través de la membrana de la vacuola/lisosoma vía un receptor (Massey *et al.*, 2004), 2) *microautofagia*, el proceso menos caracterizado, donde ocurre el secuestro de citoplasma por invaginación y/o septación de la membrana de la vacuola/lisosoma (Wang y Klionsky, 2004) y por último, la forma más frecuente, 3) *macroautofagia*, que involucra el secuestro de constituyentes citoplásmicos, incluyendo mitocondrias, retículo endoplásmico y ribosomas, mediante la fusión e invaginación de formas de membranas aisladas, surgidas presumiblemente de estructuras denominadas *preautofagosomas* o *sitio de ensamblado del fagoforo* (PAS), dando lugar a estructuras vesiculares de doble o multimembranas con un diámetro de 500 – 1000 nm, conocidas como *autofagosomas*. La membrana externa del autofagosoma puede fusionarse con endosomas o pequeños lisosomas dando lugar a los *autolisosomas* (Bassham, 2007). Por último, los autofagosomas o autolisosomas se fusionan a la membrana de la vacuola para liberar la vesícula interna (cuerpo autofágico) al lumen del compartimento (Klionsky y Ohsumi, 1999). Este tipo de autofagia provee de energía durante condiciones de estrés metabólico y participa en el recambio de proteínas



de vida larga y organelas (Levine y Klionsky, 2004). De ahora en adelante, vamos a referirnos con el término *autofagia* a este último proceso. En términos generales, autofagia es un mecanismo de sobrevivencia que genera nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos libres, manteniendo una reserva de “ladrillos macromoleculares” y la generación de ATP, bajo condiciones limitantes en nutrientes (Lum *et al.*, 2005) y en respuesta a bajos niveles de energía (ATP) (Alers *et al.*, 2012).

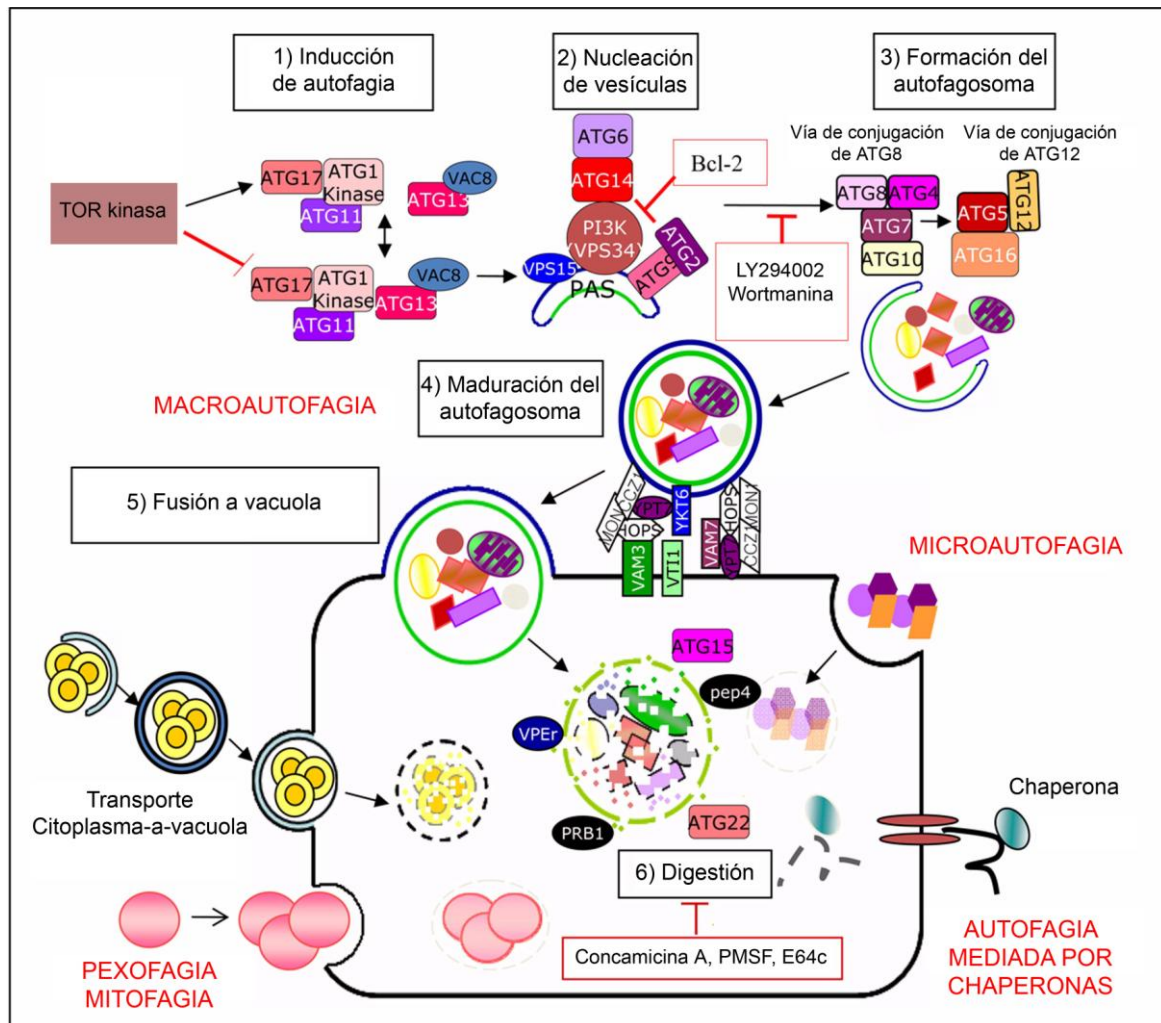


Fig. 2: Resumen esquemático del proceso de autofagia y componentes asociados a vías autofágicas. Microautofagia, pexofagia y mitofagia incluyen procesos de invaginación del tonoplasto para envolver materiales citosólicos, peroxisomas y mitocondrias, respectivamente. Macroautofagia secuestra constituyentes citoplasmáticos en vesículas con membrana doble denominadas autofagosomas que se fusionan con el tonoplasto para degradar su contenido en el lumen de la vacuola. El transporte citoplasma-a-vacuola ha sido descrito hasta el momento solo en levaduras. Autofagia mediada por chaperonas dirige el traslado de proteínas sin plegar a través del tonoplasto vía chaperonas y receptores de membrana. En animales, Bcl-2 interacciona con Beclina-1/ATG6 inhibiendo autofagia (Modificado de Kwon y Park, 2008).



En contraste, la vía citoplasma-a-vacuola, hasta el momento presente solo en levaduras, es un mecanismo biosintético por el cual se transportan las hidrolasas residentes de vacuola aminopeptidasa I (ApeI) y  $\alpha$ -manosidasa (Ams1) (Fig. 2). Esta vía utiliza muchos de los componentes necesarios para los mecanismos de degradación autofágica (Scott *et al.*, 1996).

Estudios de mutagénesis en levaduras han identificado varios genes de autofagia (ATG) requeridos para la formación del autofagosoma y para una actividad autofágica adecuada (Levine y Klionsky, 2004; Klionsky, 2005), los cuales se encuentran conservados desde levaduras a plantas y animales (Klionsky, 2005; Kourtis y Tavernarakis, 2009). Dichos genes, denominados Atg, se pueden agrupar en grupos funcionales (Fig. 2): 1) cascada kinasa para la inducción del proceso, donde TOR quinasa hiperfosforila ATG1 y ATG13, manteniendo la disociación del complejo que contiene componentes accesorios tales como ATG11, ATG17, y Vac8. Bajo condiciones deficientes en nutrientes, ATG1 y ATG13 son desfosforilados, lo que conlleva a la re-asociación y activación del complejo; 2) cascada de señalización de lípidos para la nucleación junto a proteínas que van a constituir el autofagosoma, sometido a procesamiento con PI3K, ATG6, ATG9 y otros. Este paso es reprimido por inhibidores de PI3K. 3) y 4) La formación y maduración del autofagosoma implica vías de conjugación de proteínas. 5) El autofagosoma es transportado hacia la vacuola con la ayuda de proteínas implicadas en el tráfico vesicular, mientras que 6) el reciclaje y desensamblaje de complejos ATG y del contenido citoplasmático implica actividad de hidrolasas y lipasas (Fig. 2). En las plantas se ha identificado una gran expansión en muchos de estos genes.

En animales, se ha demostrado que niveles elevados de activación de las vías autofágicas pueden conducir a una MCP tipo II (Baehrecke, 2003; Edinger y Thompson, 2004; Gozuacik y Kimchi, 2004). La relación funcional entre apoptosis y autofagia es compleja, en el sentido de que bajo ciertas circunstancias, autofagia constituye una adaptación a condiciones de estrés que evita la muerte celular (y suprime apoptosis), mientras que bajo otra “configuración” o “destino celular” (estado fisiológico celular, sumado a la relación de señales de vida/muerte), el proceso de autofagia constituiría un camino alternativo de muerte celular. Otro aspecto interesante es que, autofagia y apoptosis pueden ser inducidas por señales comunes, resultando muchas veces en una combinación de ambas. Esto indicaría que, a nivel molecular, las maquinarias de respuesta de estos procesos comparten vías comunes, pudiendo vincular o polarizar las respuestas celulares.

Este tipo de muerte celular ha sido históricamente definida mediante criterios morfológicos, sin embargo la mera presencia de autofagosomas en las células muriendo es insuficiente para distinguir entre la “muerte celular con autofagia” de la “muerte celular

por autofagia”. Mediante distintos mutantes de genes *Atg* se ha definido la participación de la autofagia en la ejecución de la muerte celular en diferentes entornos y situaciones. Yu y colaboradores (2006) mostraron el primer ejemplo de cómo la degradación selectiva de una proteína vital a través del proceso de autofagia desencadena la muerte celular. En este trabajo, los investigadores observaron que catalasa, una enzima clave del sistema antioxidante, era selectivamente eliminada durante la muerte celular autofágica. Asimismo, la muerte celular fue prevenida mediante la inhibición del proceso de autofagia como así también mediante tratamientos con antioxidantes.

#### **1.4. Origen y evolución de la muerte celular programada**

Diversos trabajos se han focalizado en el estudio de la participación de las proteínas pro- y anti-apoptóticas en el control de la homeostasis celular general. Estos estudios demostraron que los reguladores de la MCP pueden modular funciones mitocondriales y celulares afectando el transporte de nucleótidos de adenina, de  $Ca^{2+}$  y otros metabolitos como así también alterar la homeostasis de glucosa (Murphy *et al.*, 2005; Danial *et al.*, 2003). De esta manera, en el control de la auto-destrucción subyacen mecanismos de control de la homeostasis que pueden formar parte de la maquinaria de MCP. Es posible que dicha maquinaria haya estado presente siempre en las células, pero que ha sido finamente regulada en organismos multicelulares para el control del número de células en el desarrollo, homeostasis e integridad del organismo. Sin embargo, la idea que la MCP pueda haber ocurrido primero en organismos unicelulares parece paradójica ya que el “suicidio” hubiera sido seleccionado en contra.

No obstante, existen diversas razones teóricas que podrían permitir la especulación de que una forma de MCP podría haber surgido en los organismos unicelulares. Una de ellas se refiere al hecho de que los organismos unicelulares pueden formar colonias. Es la supervivencia de la colonia, más que la supervivencia de cada uno de sus miembros, lo que garantiza la perennidad del organismo unicelular. Por lo tanto, se puede imaginar que la colonia, como un todo, puede beneficiarse por el deceso de parte de sus células. Paradójicamente, en este contexto, la falta de un mecanismo molecular que permita la MCP puede resultar en la selección en contra de la colonia. Como mencionamos anteriormente, la función central que se ha atribuido a la MCP en los organismos multicelulares, es el control estricto de la diferenciación celular, la coincidencia del número de células a su entorno, y la defensa contra el daño genético y las infecciones, lo que lleva a la eliminación de células anormales o infectadas. La diferenciación celular, la regulación del número de células y la defensa contra la infección, no son características exclusivas de los organismos multicelulares, sino que también se producen en los organismos unicelulares y pueden, por lo tanto, ser optimizados por una forma de MCP a

nivel de colonias en organismos unicelulares. Una última razón teórica está basada en los antecedentes expuestos de que no habría un *programa de muerte* necesario y suficiente para inducir la autodestrucción y cuya única función posible sea la ejecución de la muerte celular; sino más bien, como veremos a continuación, la naturaleza del programa de muerte y su maquinaria efectora (Ameisen *et al.*, 1995; Ameisen 1996, 1998 y 2002).

#### **1.4.1. Control de la muerte en organismos unicelulares**

*Procariotas*- En la naturaleza, las bacterias se encuentran en comunidades complejas denominadas *biopelículas*. Estas estructuras se forman por la excreción de una matriz extracelular con características funcionales y estructurales complejas, y se ha postulado que, en términos de selección Darwiniana, las biopelículas pueden ser la unidad de selección (Caldwell y Costerton, 1996). En estas comunidades, células individuales mueren aparentemente como una forma de asegurar la supervivencia de otros miembros. Para adaptarse a la biopelícula las bacterias hacen cambios importantes en su estructura y metabolismo (Allison, 2000). Estos cambios pueden conducir a la diferenciación terminal del organismo, lo que implica en algunas ocasiones un proceso de muerte celular *organizado*.

El fenómeno de esporulación en la bacteria *Bacillus subtilis* en respuesta a condiciones ambientales adversas ha sido citado como modelo en la exploración de los orígenes de la MCP (Ameisen 2002). En condiciones favorables, *B. subtilis* tiene crecimiento vegetativo a través de división celular simétrica pero bajo condiciones adversas, la bacteria inicia una respuesta general al estrés, que involucra cerca de 150 proteínas y la esporulación, la cual es iniciada mediante la fosforilación del factor de transcripción SpoOA (Hecker y Volker, 2001). La diferenciación de la spora es un programa de desarrollo complejo que comienza con un proceso de división celular asimétrico. El septum se posiciona cerca de uno de los polos de la célula en desarrollo, sin embargo, la división celular no se completa. De esta manera, el septum polar separa dos territorios diferentes y las futuras células asimétricas permanecen unidas. La parte más grande de la célula, denominada célula madre, se diferencia terminalmente y provee de metabolitos a la parte más pequeña de la célula, llamada pre-espora, necesarios para que se diferencie en una spora no proliferativa de larga vida. Subsecuentemente, la célula madre experimenta una forma de MCP mediada por autolisinas que hidrolizan la pared celular y que se encuentran reguladas transcripcionalmente (Smith *et al.*, 2000). Un aspecto esencial en la regulación genética de la diferenciación celular que lleva a la esporulación y MCP en *B. subtilis*, es la compleja regulación intercelular de la expresión y la activación de al menos cuatro factores de transcripción,  $\sigma^E$  a  $\sigma^K$  (Losick y Stragier, 1992). Otro aspecto fabuloso de *B. subtilis* es que el proceso de división celular asimétrico

le permite, a nivel de cada célula, someterse a un programa de desarrollo que conduce a la emergencia de la forma más simple de un organismo multicelular transitorio: conformado por dos células que se han diferenciado en el equivalente de una célula somática (la célula madre) y en el equivalente de una célula germinal (la espora).

Otro caso de estudio de muerte celular en procariotas es en la bacteria *Myxococcus xanthus*, donde miles de células individuales forman agregados bajo condiciones deficientes en nutrientes, para luego dar lugar a una estructura en forma de domo, en cuyo centro algunas células móviles se diferencian en esporas esféricas y no-móviles. Las células basales no forman esporas y mueren sosteniendo la diferenciación de células apicales. La señalización entre las células ocurre vía factores de *quorum-sensing*, permitiendo la esporulación en el interior, mientras las células restantes sufren una muerte masiva, asegurando de esta manera el futuro de la colonia (Kaiser, 2001).

Es interesante destacar que existe un diverso e intrincado programa de muerte celular, cuyos mecanismos están finamente regulados previo a la multicelularidad eucariota, y que han sido descritos bajo circunstancias que incluyen la diferenciación terminal, el control poblacional y la competencia entre colonias de bacterias de diferente especie. La existencia de componentes celulares que son regulados para dar lugar a los eventos de muerte celular en procariotas, sugiere que estos procesos pueden haber sido reclutados para funcionar con el mismo propósito en las primeras células eucariotas. En este sentido, se han encontrado homólogos de dominios proteicos apoptóticos en bacterias con desarrollo complejo, tales como actinomicetes, cianobacterias y alfa-proteobacterias, estas últimas son propuestas como progenitoras de las mitocondrias (Koonin y Aravind, 2002).

*Eucariotas*- Se han descrito eventos similares a MCP en al menos nueve especies de eucariotas unicelulares. Estas vías de señalización de muerte están siendo examinadas con la intención de identificar paralelismos con la MCP en organismos superiores. En este sentido, los Kinetoplastidos, grupo que pertenece a una rama antigua del árbol filogenético de los eucariotas y que representan a uno de los primeros eucariotas con mitocondria, muestran características morfológicas similares a la apoptosis. Un ejemplo bien estudiado es el caso de *Trypanosoma cruzi* en estado epimastigota, donde la sobrevivencia depende de la densidad de células. La dilución de estas células resulta en una muerte masiva, sugiriendo que “señales de vida” desde otras células son requeridas para reprimir una vía de muerte *por defecto*. Aquellas células epimastigotas que no se diferencian a tripomastigota se vuelven esféricas, exhiben “ampollamiento” de membrana plasmática, condensación de cromatina y fragmentación de ADN, vacuolización de citoplasma y formación de cuerpos apoptóticos (Ameisen *et al.*, 1995). Igualmente, *Leishmania major* presenta las mismas características que *T. cruzi* bajo

condiciones inductoras de muerte, la cual puede ser inhibida utilizando inhibidores de caspasas. Asimismo, estudios realizados a mitocondrias aisladas de estas células mostraron liberación de cit-c cuando se incuban con la proteína Bax de humano.

Mecanismos conservados de muerte celular también fueron observados en *Dictyostelium discoideum*, organismo unicelular ameboide con características de protozoo y hongo que se alimenta de bacterias. Bajo condiciones de inanición, libera AMPc que actúa como quimio-atractivo para otras amebas las cuales se agregan formando una estructura que migra como una unidad hacia la luz. Cuando las condiciones ambientales son apropiadas, la migración cesa y comienza la diferenciación en forma de tallo, cuyas células están rodeadas por un tubo rígido de celulosa, mientras que en el ápice se forman esporas. Las células del tallo están “programadas para morir” (Ameisen 2002). Esta muerte celular involucra una señalización por  $Ca^{2+}$ , no se ve afectada por inhibidores de caspasas, está acompañada por pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la translocación al núcleo de un homólogo del factor de inducción de apoptosis (AIF) de mamíferos, conduciendo a la condensación de la cromatina y activación de endonucleasas. Asimismo, ocurre exposición de fosfatidil-serinas y degradación de las células muertas por células vecinas (Arnoult *et al.*, 2001).

En 1997, cuando se completó la secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, no se encontraron homólogos de moléculas tales como Bcl-2 o Apaf-1, que son consideradas centrales para el proceso de muerte celular programada en animales. La idea de que la apoptosis era única en los metazoos fue contradicha por el descubrimiento de la mutación *Cdc48*<sup>S565G</sup> en levaduras, la cual exhibía características de apoptosis, incluyendo exposición de fosfatidil-serinas, marginación de la cromatina y fragmentación celular (Madeo *et al.*, 1997). El gen *Cdc48* codifica una proteína involucrada en la fusión vesicular, y de la misma manera, una mutación en su homólogo en humanos, *VCP/p97*, también induce apoptosis en células B (Shirogane *et al.*, 1999). Otros genes de levadura han sido implicados en apoptosis. *Yca1* (Yeast caspasa-1) codifica para una proteína con homología estructural y procesamiento similar a las caspasas de mamíferos. La delección del gen *Yca1* confiere resistencia a la muerte celular inducida por estrés oxidativo y parece tener la función fisiológica de causar la muerte de células envejecidas (Madeo *et al.*, 2002). La muerte de células viejas está sujeta a la generación de EAO en la mitocondria y se ha hipotetizado que estas células están programadas para morir con el fin de limitar la formación de ADN genéticamente dañado (Madeo *et al.*, 2002). La existencia de una vía de MCP dependiente de las mitocondrias en *S. cerevisiae* sugiere que dicha organela contiene elementos de un camino ancestral que fue reclutado para la MCP en metazoos. No obstante, en el año 2002, Chose y colaboradores describieron en el protista *Trichomonas vaginalis*, el cual no posee mitocondrias, un proceso parecido a la apoptosis.

Tratamientos con drogas pro-apoptóticas promovieron la muerte celular, la cual fue moderadamente inhibida por la adición de inhibidores de caspasas. También observaron fragmentación nuclear y exposición de fosfatidil-serinas.

Lo expuesto hasta aquí sugiere que la MCP no ha evolucionado primero como una consecuencia de la multicelularidad en los organismos superiores, sino que dichos mecanismos han sido finamente regulados y complejizados, alcanzando un punto extremo e irreversible de esta característica ancestral de control social de las poblaciones de células. Asimismo, los reguladores claves de la apoptosis en los organismos superiores pueden haber aparecido durante el transcurso de la evolución para regular más finamente una vía de MCP ancestral. En este sentido, la expresión de genes pro-apoptóticos de origen animal, como *Apaf-1/Ced4* y *Bax*, en levaduras, conduce a una muerte celular de naturaleza apoptótica (Ligr *et al.*, 1998). Por otro lado, la expresión heteróloga de genes anti-apoptóticos de origen animal (*Bcl-2* y *Ced9*) y de plantas (*Bax Inhibitor-1*) en levaduras, disminuyen la muerte celular (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2007). Es conveniente señalar que levaduras transgénicas con características apoptóticas han sido una gran herramienta para la identificación de genes candidatos relacionados a la muerte celular en plantas (ver Greenwood y Ludovico, 2010). Levine *et al.* (2001) transformaron levaduras que expresaban *Bax* con una librería de ADNc de *Arabidopsis* con el fin de identificar genes supresores de muerte celular. De esta manera pudieron determinar que el gen *AtVamp7*, que codifica para una proteína asociada a membrana de vesículas, bloquea la muerte celular. Asimismo, una proteína de unión que responde a etileno, AtEBP, proteínas que detoxifican radicales libres de oxígeno y proteínas de remoción de moléculas alteradas por daño oxidativo, fueron identificadas como supresoras de muerte celular mediante bibliotecas de ADNc (Pan *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2002; Chen, *et al.*, 2004). Estas aproximaciones y sus resultados alientan el estudio de los mecanismos de MCP en plantas y dan un marco más amplio al planteo de hipótesis.

### **1.5. Muerte celular programada en plantas**

En las plantas se encuentran una variedad de formas y mecanismos de MCP, formando parte integral del desarrollo y en los mecanismos de defensa de las plantas y que ocurren en todos los estadios del ciclo de vida, desde la fertilización del óvulo hasta la muerte de todo el organismo. Además pueden ocurrir a escala local, por ejemplo la depleción de las células del suspensor, o a gran escala, como es el caso de la senescencia foliar (Fig. 3) (Barlow, 1982). Un aspecto muy importante de la MCP y que resulta crucial para el desarrollo óptimo de este proceso, es el control de los límites y cinética de los eventos de muerte celular. Por ejemplo, bajo ciertas interacciones planta-patógeno, sucede la muerte rápida de las células que rodean el sitio de infección, proceso denominado

respuesta hipersensible (RH). La RH es un proceso activo de MCP que ocurre rápidamente, pero en una zona restringida donde se contiene al patógeno en su sitio de entrada, mientras que un reciclado eficiente de las células muertas sería secundario. En contraste, en la senescencia, proceso que ocurre en un período relativamente largo y vinculado con el reciclado del nitrógeno, la MCP termina afectando a todo el órgano.

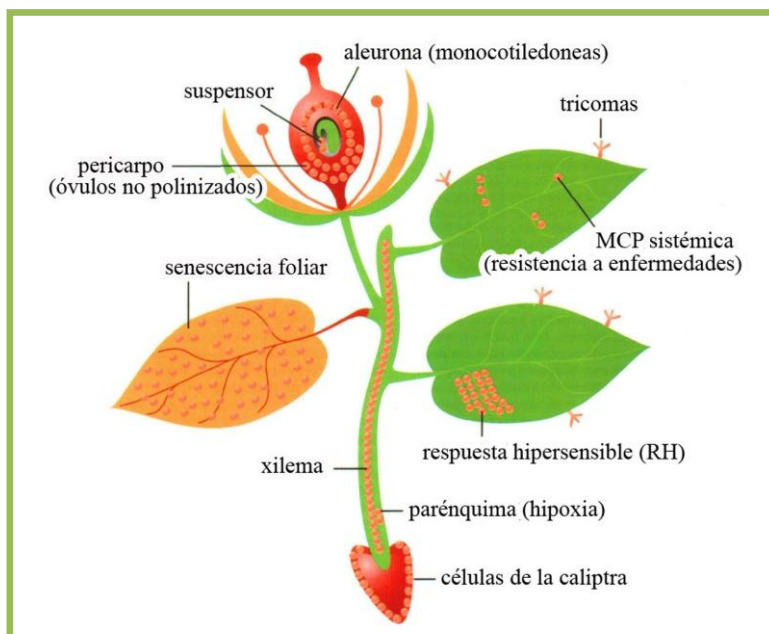


Fig. 3: Ejemplos de MCP en plantas durante el desarrollo y en respuestas adaptativas. (Modificado de Pennell y Lamb, 1997). La muerte celular causa la depleción del suspensor y de las células de la aleurona, los cuales tienen funciones temporales durante el desarrollo (Yeung y Meinke, 1993). Además es esencial para la especialización de ciertas clases de tricomas y de los elementos del xilema (Mittler y Lam, 1995; Greenberg, 1996; Fukuda, 1997). La muerte celular también puede ocurrir a gran escala, por ejemplo durante la senescencia (Nooden, 1988; Bleecker y Patterson, 1997).

Al igual que en animales, los procesos de MCP en plantas tienen una vital relevancia durante el desarrollo, en los mecanismos de autoincompatibilidad de polen y en las respuestas frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, formando parte de los mecanismos adaptativos de adquisición de resistencia y tolerancia. Durante la diferenciación de los elementos del xilema en el sistema modelo de *Zinnia elegans*, se producen brasinosteroides para dar inicio a la etapa final que involucra la MCP autolítica (Fukuda, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001). Este tipo de muerte regido por la vacuola ha sido documentado también durante otros procesos del desarrollo de las plantas, tales como la senescencia, la muerte de las células del suspensor y en la formación de aerénquima en las raíces (Jones, 2001; van Doorn *et al.*, 2011; van Doorn, 2011). Asimismo, tratamientos con

actinomicina D o cicloheximida inhiben la muerte celular, sugiriendo el requerimiento de la síntesis de proteínas. Además, se ha determinado la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la activación de las nucleasas responsables de la fragmentación del ADN (Mittler y Lam, 1995; H. Wang *et al.*, 1996)

Durante el desarrollo del endosperma de monocotiledoneas, dos hormonas tienen efectos opuestos sobre la MCP de las células de la capa de aleurona. El ácido giberélico (AG) promueve la muerte celular mientras que el ácido absísico (ABA) contrarresta los efectos promotores de muerte del AG (Jones y Jacobsen, 1991). El efecto de estas hormonas podría estar relacionado a sus efectos opuestos sobre la expresión de enzimas del sistema antioxidante (Fath *et al.*, 2002). Las vías de transducción de señales que controlan la secreción y muerte celular “rio abajo” de las hormonas involucran  $\text{Ca}^{2+}$  y actividad de fosfatasa (Gilroy y Jones, 1992; Kuo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Como resultado de la activación de estos mecanismos específicos de señalización, se observa un encogimiento celular y procesado en “escalera” del ADN de las células de la aleurona.

En esta variedad de “formas” de MCP en plantas, las distintas hormonas pueden jugar roles diferenciales. Por ejemplo, el ácido jasmónico (JA) regula negativamente la muerte celular en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés oxidativo generado por tratamientos con ozono (Rao y Davis, 2001), pero puede participar en promover la muerte celular inducida por la toxina fúngica fumonisina B1 (Asai *et al.*, 2000). Otra hormona implicada en la regulación de la MCP es el etileno (ET). Esta hormona está involucrada en la promoción de la senescencia (Orzaez y Granell, 1997) como así también en otras formas de MCP durante el desarrollo, tales como la formación de aerénquima en raíces bajo condiciones de anegamiento e hipoxia (Jackson *et al.*, 1985) y en la MCP del endosperma en los cereales (Young y Gallie, 2000).

Las células de las plantas tienen características peculiares, en particular la presencia de la pared celular y vacuolas, que sugieren que el proceso de MCP se lleva a cabo con características morfológicas diferentes a las observadas en animales. No obstante, las células que sufren MCP pueden mostrar características tanto de apoptosis (condensación de cromatina y fragmentación del núcleo) como de autofagia (vacuolización, vesículas multimembranales) (Mur *et al.*, 2008). Sin embargo, en etapas finales del proceso, se ha observado con frecuencia la separación de la membrana plasmática de la pared celular, colapso de la membrana plasmática y vacuolar y pérdida del contenido celular remanente hacia el apoplasto. Esto es más característico de la necrosis animal que de la muerte autofágica o apoptótica (van Doorn y Woltering, 2005). De esta manera, aunque la morfología de algunos eventos de MCP en plantas han sido caracterizados y los mecanismos moleculares que los controlan han comenzado a identificarse, hasta el momento no hay un criterio definido para su clasificación en plantas



(van Doorn *et al.*, 2011; van Doorn, 2011; van Doorn y Woltering, 2005; Thomas *et al.*, 2003; Reape *et al.*, 2008; Love *et al.*, 2008; Nishimura y Hatsugai, 2011).

A pesar del interés difundido en el estudio de los mecanismos de MCP en plantas, este se ha visto obstaculizado por la falta de *reguladores claros* que funcionen en la integración de señales de muerte. En los metazoos, desde humanos a *C. elegans*, se encuentran bien caracterizados y conservados los reguladores centrales de la apoptosis: BCL-2/CED-9, APAF-1/CED-4 y la familia de proteínas ejecutoras, caspasas/CED-3 (Jacobson *et al.*, 1997; Ameisen, 2002). La ausencia, hasta el momento, de ortólogos estructurales de estas proteínas en los genomas de las plantas y levaduras, sugiere la evolución de reguladores alternativos y estructuralmente distintos para el control de la activación de la MCP en plantas y hongos. No obstante, mediante el uso de transgénicos, se reportaron los efectos de las proteínas animales pro-apoptosis y anti-apoptosis en plantas (Mitsuhara *et al.*, 1999; Qiao *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Dickman *et al.*, 2001; Shabala *et al.*, 2007; Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Lacomme y Santa Cruz, 1999), indicando que a pesar de las diferencias morfológicas, habría estrategias similares con moléculas funcionalmente relacionadas y conservadas entre animales y plantas, controlando la MCP.

Es importante en destacar que, en trigo se han introducido mediante ingeniería genética genes de resistencia a hongos (lactoferricina y péptido sintético D4E1) y genes anti-apoptóticos de origen animal (Bcl-XL, Op-IAP, SF-PIA y Ced9) a fin de mejorar su resistencia a la *fusariosis de la espiga* (FHB). Se supone que estos genes no sólo aumentarían la tolerancia a FHB, sino que también inhibirían la infección por patógenos necrotróficos en general. La expresión de los inhibidores de MCP resulta en otros rasgos agrónomicamente beneficiosos, tales como mejor tolerancia a altos niveles de salinidad y estrés por frío, mostrando niveles reducidos de fragmentación del ADN (Baenziger *et al.*, 2004).

### **1.5.1. Participación de las organelas en la muerte celular programada en plantas**

Una característica particular de los eventos ordenados de MCP es la participación activa de la célula con requerimiento de energía para el correcto control y ejecución del proceso. Entonces, es lógico pensar que las mitocondrias y cloroplastos serían elementos importantes para la regulación de la muerte celular.

*Mitocondrias*- El metabolismo redox mitocondrial está implicado en la integración del estado energético celular y las funciones redox que controlan la biología celular en las plantas (Noctor *et al.*, 2007). En el metabolismo de las células de las hojas existe una interacción metabólica y un intercambio redox muy estrecho entre mitocondrias y cloroplastos (Hoefnagel *et al.*, 1998; Raghavendra y Padmasree, 2003). En este sentido,

análisis de mutantes han demostrado la influencia que ejerce el rendimiento de las mitocondrias sobre la actividad de cloroplastos y núcleo (Dutilleul *et al.*, 2003; Pesaresi *et al.*, 2003; Nunes-Nesi *et al.*, 2005). Sumado a sus funciones homeostáticas y energéticas y de ser sitios principales de generación de EAO, habría otras vías de señalización de muerte celular dependientes de componentes de estas organelas.

La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias es de especial interés debido a su participación en la modulación de numerosas respuestas fisiológicas y en la muerte celular en animales (Giacomello *et al.*, 2007) y plantas (Arpagaus *et al.* 2002; Fortes *et al.* 2001; Virolainen *et al.* 2002). Al igual que en animales, se ha identificado un canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP en la membrana interna de mitocondrias de trigo (Pastore, *et al.*, 1999) y arveja (Petruzza *et al.*, 2001), el cual participa en la amplitud de la permeabilidad transitoria de la membrana e incremento del volumen de la mitocondria (Petruzza *et al.* 2004), dando lugar a la liberación del cit-c mediante un mecanismo que es estimulado por óxido nítrico (NO) e inhibido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chiandussi *et al.* 2002). Como mencionamos anteriormente, el cit-c, el Factor Inductor de Apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés) y endonucleasa G, son algunas proteínas que salen de las mitocondrias para promover MCP en animales y que podrían tener homólogos en plantas. Hay evidencias que indican que la ruptura en la permeabilidad de membrana de mitocondrias correlaciona con la inducción de la MCP durante el desarrollo y en respuesta al ambiente (Yu *et al.*, 2002; Curtis y Wolper, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Arpagaus *et al.*, 2002; Diamond y McCabe, 2007; Scott y Logan, 2007 y 2008; Yao *et al.*, 2004). La liberación de cit-c desde las mitocondrias ha sido demostrada en una gran variedad de sistemas de plantas, incluyendo tomate (Arpagaus *et al.*, 2002), pepino (Balk *et al.*, 1999), girasol (Balk y Leaver, 2001), avena (Curtis y Wolper, 2002), células BY2 de tabaco (Vacca *et al.*, 2006) y Arabidopsis (Balk *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2004). Sin embargo, no se han esclarecido los mecanismos de acción por los que el cit-c estimularía la MCP o si sólo es producto de la ruptura de la permeabilidad de membrana mitocondrial. Por otro lado, se ha identificado una nucleasa dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  en el espacio intermembrana de mitocondrias que participaría en la condensación y fragmentación del ADN y sería bioquímicamente similar a la endonucleasa G descrita en mitocondrias de animales (Balk *et al.*, 2003).

En tejidos animales, se ha propuesto que incrementos en el complejo I de mitocondrias ocurren para compensar el déficit de energía (Pich *et al.*, 2004). Sin embargo, en contraste con los tejidos jóvenes, la reducción de los niveles de ATP en tejidos envejeciendo no se debe a un aumento de su demanda, sino al deterioro de los componentes de la cadena respiratoria, tales como el cit-c oxidasa. Por lo tanto, el aumento del complejo I en los tejidos envejecidos no sólo no restaura las altas tasas de producción de ATP, sino lo que es peor, aumenta el nivel de reducción de los

transportadores y la producción de EAO, alimentando un "círculo vicioso" que conduce a la muerte de la célula.

*Cloroplastos*- Con respecto a la participación de los cloroplastos en los eventos de MCP, las enzimas del metabolismo de porfirinas, importantes para la biosíntesis de clorofilas, están implicadas en procesos de MCP (Lorrain *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 1998; Yao y Greenberg, 2006; Vanhee *et al.*, 2011). Aunque es probable que el daño fotooxidativo mediado por la acumulación de intermediarios tóxicos sea una causa común de la muerte celular observada en plantas mutantes de las enzimas del metabolismo de porfirinas, los mecanismos que subyacen a sus efectos no se encuentran bien definidos.

En los cloroplastos, el complejo Ndh, homólogo al complejo I de mitocondrias, proporciona electrones para regular el estado redox de los transportadores del flujo cíclico de electrones con el fin de optimizar la producción de ATP (Casano *et al.*, 2000). De manera similar a lo observado en el complejo I de las mitocondrias en animales, el aumento de la actividad de los complejos Ndh, que proporcionan electrones en tejidos envejecidos, no se compensa porque la actividad del ciclo de Calvin es baja y, como no hay un aumento en la actividad SOD cloroplástica (Casano *et al.*, 1994), la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es insuficiente para eliminar los electrones. Por lo tanto, el cloroplasto entra en un ciclo autocatalítico de producción adicional de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, daño oxidativo y reducción en la producción de ATP (Zapata *et al.*, 2005). Según esta hipótesis, el complejo I y el complejo Ndh desempeñan papeles cruciales y similares en la MCP en animales y en hojas, respectivamente, donde el desacople en las reacciones que favorecen el equilibrio redox conduce a la generación autocatalítica de EAO.

En animales, se ha demostrado una conexión entre mitocondrias y Nox1, subunidad catalítica del complejo NADPH oxidasa, que resulta crucial para la acumulación sostenida de EAO y la muerte celular inducida por deficiencia de suero (Lee *et al.*, 2006). En las plantas, se ha sugerido la relación entre los cloroplastos y el complejo NADPH oxidasa en las respuestas de defensa de las plantas (Yaeno *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2009) y la participación de la generación de EAO en el apoplasto en la regulación génica bajo condiciones de estrés fotooxidativo (Davletova *et al.*, 2005). El complejo NADPH oxidasa es un modulador altamente regulado, sensible y versátil de señales del desarrollo y del ambiente (Miller *et al.*, 2009). En este sentido, trabajos de nuestro grupo han demostrado la coordinación entre los cloroplastos y la generación de EAO en el apoplasto, como así también los efectos de la producción de EAO a través del complejo NADPH oxidasa sobre la modulación de la respuesta del sistema antioxidante bajo condiciones de estrés fotooxidativo (Robert *et al.*, 2009). Kim y colaboradores (2012) demostraron recientemente, la participación del oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) en la señalización de la muerte celular disparada por cloroplastos. El inicio de la producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es

seguido rápidamente por una pérdida de la integridad del cloroplasto que precede a la ruptura de la vacuola central y el colapso final de la célula. La ruptura de los cloroplastos no es debida directamente al  $^1\text{O}_2$ , sino que es dependiente de la señalización de dos proteínas plastídicas, EXECUTER 1 y 2. Lógicamente, este tipo de MCP ocurre sólo en células que tienen los cloroplastos completamente desarrollados (Kim *et al.*, 2012).

Resultados muy recientes han demostrado un vínculo entre la generación de EAO en el cloroplasto, el daño fotooxidativo y la activación de autofagia en *Chlamydomonas*. Además, un dato muy importante en destacar, es que tratamientos con DPI, inhibidor suicida del complejo NADPH oxidasa, suprimieron parcialmente la activación del proceso de autofagia bajo condiciones de estrés fotooxidativo (Perez-Perez *et al.*, 2012).

*Retículo endoplasmático (RE)*- La acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el RE es una señal de estrés que induce la expresión de chaperonas y proteínas requeridas para el restablecimiento de la homeostasis (Ron y Walter, 2007). En respuesta al estrés originado en el RE, las proteínas mal plegadas se translocan al citosol y son degradadas vía proteosoma y por vía autofágica (Liu *et al.*, 2012). En plantas se ha demostrado la inducción de eventos de MCP (Zuppini *et al.*, 2004; Watanabe y Lam, 2008) y senescencia (Costa *et al.*, 2008) generada por estrés a nivel del RE. Además, el estrés del RE es un inductor de autofagia y esta señal se encuentra conservada en levaduras y animales (Yorimitsu *et al.*, 2006). Perez-Perez y colaboradores (2010) demostraron la inducción de autofagia por estrés a nivel del RE en *Chlamydomonas*, pudiendo especularse un vínculo similar en plantas superiores.

## 2. Homeostasis redox. Producción y remoción de las especies activas del oxígeno

Modificaciones en el balance oxidativo ocurren como parte de las respuestas de las plantas en interacción con el ambiente, por ejemplo bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Muñoz *et al.* 2008; Robert *et al.* 2009; Melchiorre *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.* 2010). Las EAO son formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno. La configuración electrónica del mismo (dos electrones desapareados en el último orbital) lo hacen altamente sensible a la reducción mono electrónica, dando lugar a la formación de formas parcialmente reducidas o activadas, las especies activas del oxígeno (EAO) (Boveris, 1984). La fina regulación entre generación de EAO y su remoción es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y funcionalidad celular.

Existe una gran cantidad de fuentes potenciales de EAO en plantas, muchas de ellas son productos del metabolismo normal, por ejemplo, las cadenas transportadoras de electrones de la fotosíntesis y la respiración incrementan la posibilidad de que algunos de los electrones transportados sean transferidos al oxígeno (Asada y Takahashi 1987). Otras

fuentes de generación de EAO se intensifican o toman mayor relevancia en condiciones de estrés biótico y abiótico; por ejemplo, el complejo NADPH oxidasa de membrana plasmática.

El complejo NADPH oxidasa es una proteína de membrana plasmática que reduce el oxígeno molecular a ion superóxido hacia el apoplasto (Torres *et al.* 1998; Sagi y Fluhr 2001). El sistema de transferencia de electrones en este complejo está compuesto por una región C-terminal citoplásmica (homóloga a ferredoxina reductasa de procariotas y organelas) con sitios de unión a FAD y NADPH y un N-terminal también citoplásmico con dos sitios de unión a calcio. Contiene también 6 dominios trans-membrana con dos grupos hemo de estructura similar al citocromo *b* en el complejo *bc1* de mitocondrias. Las EAO producidas vía NADPH oxidasa participan en eventos de señalización y desarrollo en plantas que incluyen, respuestas de defensa, muerte celular, estrés abiótico, cierre de estomas, crecimiento polar de pelos radicales y durante la percepción de rizobios por las leguminosas (Baxter-Burrell *et al.* 2002; Foreman *et al.* 2003; Kwak *et al.* 2003; Yoshioka *et al.* 2003; Vandenabeele *et al.* 2003; Jones *et al.* 2007; Cárdenas *et al.* 2008). Mutaciones en dos genes de *A. thaliana*, *rbohD* y *rbohF*, que codifican para el ortólogo de la subunidad catalítica *gp91phox* del complejo NADPH oxidasa de mamíferos, han proporcionado las primeras evidencias genéticas de la regulación de la generación de EAO por el complejo NADPH oxidasa en plantas y sus roles en las respuestas de muerte celular durante la respuesta hipersensible.

Las plantas poseen también un complejo sistema de remoción de EAO. Las principales enzimas que remueven EAO son superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidada (APX) y catalasa (CAT). La actividad de estas tres enzimas es crucial en el mantenimiento de los niveles de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), a través de SOD, y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por APX y CAT. El control de estas EAO, es también clave para evitar la formación de radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) que se forma mediante la reacción de Haber-Weiss o de tipo Fenton en presencia de metales y es una de las EAO más reactivas. Asimismo, las células cuentan con antioxidantes no enzimáticos, tales como el ácido ascórbico (ASC) y glutatión (GSH), los cuales se encuentran en altas concentraciones en cloroplastos y otros compartimentos subcelulares y son cruciales en la remoción de EAO. Para la protección real se requieren altos niveles de ácido ascórbico y glutatión reducido. En este sentido, las enzimas glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y dihidroascorbato reductasa (DHAR) mantienen el estado de reducción del glutatión y del ácido ascórbico, utilizando NADPH como poder reductor

Más allá de la importante función de remoción de EAO de estas enzimas y de los antioxidantes no enzimáticos, el estado de reducción/oxidación de los antioxidantes y/o de los diferentes compartimentos celulares, son en sí mismos moduladores de los

mecanismos de remoción, expresión de genes y de otras vías de señalización (Karpinski *et al.* 1997; Robert *et al.* 2009). Con base en esta complejidad del control en la producción de EAO, es que se ha puesto a estas moléculas, como reales encargadas de regular vías de señalización (Lascano *et al.* 2003; Foyer y Noctor 2005). La fina regulación entre producción y degradación de EAO participa en las señales oxidativas que determinan respuestas fisiológicas. La señalización oxidativa es central en el censado de condiciones ambientales y endógenas, como en el desarrollo de ajustes a nivel de expresión génica, metabolismo y fisiología de las plantas (Foyer y Noctor 2005).

### 3. Senescencia y muerte celular programada

La senescencia, tanto a nivel celular, tisular o de todo el organismo, está básicamente relacionada a la fisiología celular y al ambiente (tanto interno, por ejemplo la interacción con otras células; como externo, tales como las condiciones ambientales) que tienden a convertirse en menos apropiados para la vida y la persistencia celular durante el desarrollo (Trippi *et al.*, 2009). Este proceso ha sido caracterizado como una etapa natural y finamente controlada del ciclo de vida de las plantas, que se encuentra regulada por bases genéticas internas, hormonales y metabólicas y que puede ser inducido por factores exógenos y condiciones de estrés. Parte de los síntomas de las plantas expuestas a situaciones de estrés, son provocados por daños oxidativos a nivel celular que están mediados por las EAO, que en consecuencia generan síntomas propios de senescencia (Trippi *et al.*, 1985, 1989, 2009). Si bien la generación de EAO es parte del metabolismo aeróbico normal, las situaciones de estrés promueven su incremento debido, principalmente, a la sobre-reducción de los transportadores de electrones cloroplásticos y mitocondriales, donde el oxígeno actúa como aceptor alternativo de electrones aumentando la producción de EAO (Gilmore, 1997). Las EAO tienen un rol dual, ya que por un lado inducen daños oxidativos, senescencia, y muerte celular, y por otro actúan como moléculas señales en procesos de crecimiento y desarrollo, respuestas de defensa e interacción con microorganismos patógenos y benéficos (Mittler *et al.*, 2004). La capacidad de las plantas de controlar los niveles de EAO depende de la actividad de su sistema antioxidante, compuesto por enzimas y componentes no enzimáticos (Scandalios, 1993). La relación entre generación y degradación de EAOs son determinantes principales del estado redox intracelular, el cual tiene una función crítica en la percepción y aclimatación a condiciones ambientales y en la interacción con microorganismos simbiotes o patógenos (Foyer y Noctor, 2005 a, b, Alscher, 1989, Lascano *et al.* 2003).

La senescencia está caracterizada por procesos degradativos y el reciclaje de macromoléculas a través de la coordinación de al menos tres vías de degradación intracelular: ubiquitin/proteosoma, degradación vacuolar y autofagia. Las proteínas son

degradadas a aminoácidos, el ácido ribonucleico (ARN) se descompone en compuestos de bajo peso molecular y los lípidos de membranas son metabolizados a azúcares (Buchanan-Wollaston, 1997). Esto permite el transporte de nutrientes vitales en sentido fuente/destino desde las hojas senescentes, raíz u órganos florales hacia tejidos en desarrollo en órganos jóvenes, hacia estructuras reproductivas y semillas o para la generación de reservas (Liu, 2008). Para que este transporte ocurra, el sistema vascular debe ser mantenido hasta etapas tardías de la senescencia (Gan y Amasino, 1997). De la misma manera, la degradación del núcleo es un evento relativamente tardío, debido a que la degradación de otras organelas está bajo su control. Por lo tanto, el contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) se mantiene en gran parte constante y su degradación puede ser observada solo en las etapas finales del proceso (Orzáez y Granell, 1997). Asimismo, tratamientos con inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas bloquean el proceso de senescencia, de tal manera que la expresión génica es necesaria hasta que el proceso se completa (Noodén, 1988).

Los procesos líticos que ocurren durante la senescencia pueden ser reversibles en cierto punto, pudiendo conducir a un reverdecimiento de las hojas senescentes (Thomas *et al.*, 2003; Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). Esta plasticidad en la senescencia es de vital importancia, ya que permite la aclimatación de las plantas a diversas condiciones ambientales. Por ejemplo, el comienzo temprano de dicho proceso podría ser favorable cuando la disponibilidad de fotoasimilados es alta o cuando el suministro de nutrientes inorgánicos, principalmente de nitrógeno, es bajo. Por otro lado, una senescencia foliar demasiado temprana podría reducir la capacidad total de asimilar el CO<sub>2</sub>, mientras que una senescencia tardía podría interferir con la removilización de nutrientes, comprometiendo la actividad fotosintética en las hojas jóvenes y en el éxito reproductivo.

Esta característica de reversibilidad ha llevado a la confusión en lo que concierne a la definición de senescencia relacionada a procesos de muerte celular programada (MCP). Por un lado, y debido a que con frecuencia uno conduce al otro, muchos investigadores consideran la senescencia como sinónimo de MCP (van Doorn y Woltering, 2004). En este sentido, algunos mecanismos de MCP involucran procesos relacionados a la senescencia, tales como la degradación de organelas y el reciclado de componentes intracelulares (Coupe *et al.*, 2004). Una visión alternativa, es considerar al deterioro de un organismo/órgano entero como senescencia y a los procesos degradativos a nivel celular como MCP (Noodén, *et al.*, 1997). Por último, se considera a la senescencia y a la MCP como procesos mutuamente excluyentes, donde la finalización del primero conduce al inicio del último (van Doorn y Woltering, 2005). En otras palabras, dos procesos separados deben estar ocurriendo, uno que es reversible, considerado como senescencia, y otro que está comprometido, considerado como MCP (Thomas *et al.*, 2003). No obstante,

durante la senescencia de pétalos de *Ipomoea nil*, se ha determinado la expresión diferencial de homólogos de genes asociados a MCP en células animales, tales como Inhibidor de Bax-1 (BI-1), genes relacionados a autofagia y Proteínas de Procesado Vacuolar (VPE), entre otros (Yamada *et al.*, 2009). Además, existen evidencias que muestran cierto entrecruzamiento entre las vías de MCP durante la *respuesta hipersensible* que ocurre frente a interacciones planta-patógeno específicas y durante la senescencia. Sin embargo la activación espacial y temporal de estos marcadores durante estos procesos es distinta, indicando una relativa especificidad para cada programa de muerte (Pontier *et al.*, 1999).

#### 4. Las leguminosas

Las leguminosas constituyen la segunda familia de plantas en importancia agronómica para el hombre. Aproximadamente un 15 % del total de tierra cultivable en el planeta se destina al cultivo de leguminosas (Graham 2003), las cuales tienen altos requerimientos en nutrición nitrogenada, siendo el nitrógeno y el agua, las principales limitantes de la producción agrícola. Asimismo, Argentina es el primer exportador mundial de productos procesados: Aceites y harinas proteicas y el tercer exportador de grano, luego de Estados Unidos y Brasil.

La característica distintiva de un sistema natural respecto de un sistema productivo intensivo y extensivo como el cultivo de soja, radica en que para alcanzar los rendimientos en grano actuales, los requerimientos de nitrógeno asimilable exceden al contenido natural del suelo. Debemos aclarar que en la actualidad la fertilización nitrogenada es altamente costosa, ya que si bien la atmosfera posee un 78% de N<sub>2</sub> gaseoso, la reducción industrial de este hacia formas asimilables (rotura del triple enlace de la molécula de N<sub>2</sub>) requiere de alta temperatura y presión (reacción de Haber-Bosch), lo que encarece su producción afectando la posibilidad de aplicación masiva en un cultivo. Otro aspecto de particular interés, es el efecto negativo sobre el medio ambiente que trae aparejada la aplicación continua y muchas veces excesiva de fertilizantes nitrogenados inorgánicos.

El nitrógeno puede ser absorbido y utilizado por las plantas en formas químicas tales como: amonio, nitrato o nitrito. El ciclo del nitrógeno en la naturaleza es complejo y existe una inter conversión constante de estas formas que cuando se encuentran en el suelo son aprovechadas por las plantas. Una parte importante del ciclo natural del nitrógeno incluye lo que se denomina fijación biológica del nitrógeno (FBN). Esta es llevada a cabo por microorganismos que en vida libre o en asociación simbiótica con plantas del grupo de las leguminosas, pueden reducir el nitrógeno gaseoso mediante la actividad de la enzima nitrogenasa a temperatura y presión normales, utilizando solo

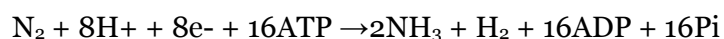


energía metabólica en forma de ATP. En gran medida, estas interacciones simbióticas constituyen un punto importante dentro del contexto económico de la agricultura mundial, puesto que son consideradas piezas claves en la función y mantenimiento de muchos ecosistemas (Abbott y Murphy 2003). Los microorganismos que poseen la capacidad de fijar nitrógeno dentro de estructuras especializadas, denominadas nódulos, pertenecen al grupo de los rizobios. La FBN se ha desarrollado en este grupo de bacterias en estrecha co-evolución con algunos grupos de angiospermas estableciendo las bases de una relación mutualista. Para el caso de la soja (*Glycine max*), en esta Tesis nos interesa la asociación mutualista que establece con *Bradyrhizobium japonicum*.

#### **4.1. Establecimiento de la simbiosis. Reconocimiento, formación de nódulos y fijación biológica del nitrógeno**

La síntesis y secreción de flavonoides hacia la rizósfera por parte de la planta dispara la inducción de los denominados genes de nodulación (genes Nod) en el rizobio, iniciándose así el reconocimiento que podrá dar lugar al establecimiento de la interacción simbiótica y por consiguiente, a la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Gage 2004). Una vez sintetizados y secretados a la rizósfera, los factores Nod de *B. japonicum*, pueden ser percibidos por receptores específicos para la simbiosis, ubicados en los pelos radicales de soja, iniciándose el proceso de infección. Luego de la adhesión de las bacterias a los pelos radicales en activo crecimiento, se induce el crecimiento curvado de los pelos radicales como respuesta de percepción por parte de la planta. A continuación, se puede observar el inicio de la infección en el pelo radical y posteriormente entre los espacios intercelulares de células en división en la raíz, llegando al cortex radicular, donde las bacterias ingresan a dichas células por un proceso endocítico. Finalmente, una progresiva división celular dará lugar a la formación del nódulo radical.

Las bacterias que han penetrado hasta el córtex de la raíz, se liberan y quedan envueltas en una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidal (MPB), la cual facilita la división y diferenciación de estas bacterias en unas nuevas estructuras denominadas bacteroides. Este nuevo orgánulo formado por la MPB y el propio bacteroide es conocido como simbiosoma (Roth *et al.* 1988), y se trata de la unidad básica fijadora del nitrógeno en el nódulo. Las MPB y bacteroidal serán las encargadas de controlar el tráfico de nutrientes entre la planta y el bacteroide, como por ejemplo, el flujo de carbono reducido en forma de ácidos dicarboxílicos de la planta al bacteroide y de nitrógeno fijado en sentido contrario, el cual será transportado posteriormente a otras partes de la planta en forma de amidas o ureidos (Udvardi y Day, 1997). Los bacteroides reducen el N<sub>2</sub> a amonio producto de la acción de la enzima nitrogenasa mediante una reacción química, altamente dependiente de energía que fue propuesta por Werner (1992):



El complejo enzimático nitrogenasa está formado por dos proteínas, y su síntesis y actividad requieren un preciso mecanismo de control de la disponibilidad de oxígeno, de modo que éste llega a los bacteroides transportado por leghemoglobina (una metaloproteína), que representa el componente principal del citoplasma bacteroidal (Halbleib y Ludden, 2000; Burris 2001; Brewin 2002). La razón por la cual existe este complejo e interesante mecanismo de control del tenor de oxígeno dentro de los nódulos, radica en que la enzima nitrogenasa es inhibida irreversiblemente por oxígeno.

#### **4.2. Efectos del estrés sobre la producción de granos**

Las leguminosas han sido en general consideradas muy sensibles a condiciones salinas, aunque existen muchas excepciones. Particularmente en soja, existe un rango de susceptibilidad al estrés salino que está dado por el cultivar (Shao *et al.* 1986; Murat *et al.* 2008). En nuestro país existen aproximadamente 276.000.000 has cultivables, dentro de las cuales cerca del 75% se encuentra afectado por condiciones de aridez o semiaridez; y al menos 34.000.000 has están sometidas a salinidad y anegamiento. Bajo condiciones de estrés, las plantas emplean diferentes mecanismos fisiológicos para modular la economía de agua, carbono y nitrógeno; esta última en leguminosas se encuentra a su vez fuertemente condicionada por el microsimbionte que la nodula (Smirnov, 1995, Foyer y Harbison, 1997).

La soja y con ella el proceso de infección y nodulación por *B. japonicum*, son severamente afectados bajo salinidad. Se ha citado por ejemplo, una reducción en un 50% del número y peso de nódulos en plantas salinizadas, con concentraciones de 26,6 mM de NaCl (Singleton y Bohlool 1984; Delgado *et al.* 1994; Elsheikh y Wood 1995). Esta disminución en el número de nódulos, podría darse porque la sal atenúa la respiración aeróbica de las bacterias dentro del nódulo, generando una caída del contenido de leghemoglobina, agotándose la fuente de energía que es requerida para la FBN. Si bien se ha establecido claramente que la productividad vegetal está determinada multifactorialmente, en términos generales, el rendimiento está condicionado por la actividad fotosintética, las magnitudes del área foliar, y la partición de fotoasimilados entre órganos, por lo que el mantenimiento de una alta tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y nitrógeno son fundamentales para sustentar el crecimiento y la productividad en condiciones limitantes.

La temperatura y el fotoperíodo son los principales factores que regulan la duración y transición de las fases de desarrollo de la soja, desde etapas vegetativas a reproductivas y senescencia (Kantolic *et al.*, 2004). No obstante, la longitud del día es el principal inductor de la floración en el desarrollo (Hicks, 1983), regulando la mayor parte

de los eventos reproductivos, condicionando el inicio y final de las diferentes fases (Kantolic *et al.*, 2004). La inducción floral conduce a la transformación de los meristemas vegetativos en meristemas reproductivos y la edad de la planta en que se produce esta transformación determinará el tamaño final de la misma y por lo tanto, su potencial rendimiento (Baigorri, 1997). Asimismo, tal como ocurre en las plantas monocarpicas, luego de la fase reproductiva ocurre la inducción de la senescencia.

El número final de granos que el cultivo puede establecer en relación al número potencial, se asocia principalmente con la capacidad de crecimiento de las plantas durante el período crítico de fijación de vainas y semillas (Vega y Andrade, 2000). Por otra parte, el peso de las semillas se define en el período de llenado de granos, el cual es afectado por la capacidad fotosintética del cultivo y por la disponibilidad de asimilados (Andrade *et al.*, 2000). Por otro lado, la rápida fijación de N<sub>2</sub> durante el llenado de granos mejora la eficiencia de la fotosíntesis de la soja y por este motivo se espera mayor acumulación de materia seca con esta fuente de nitrógeno. Asimismo, la evolución de la FBN está relacionada con la tasa de acumulación de carbono, por lo tanto, las limitaciones nutricionales que afecten el crecimiento del cultivo afectarán la tasa de acumulación de nitrógeno (García, 2000). En este sentido, bajo condiciones ambientales estresantes que promueven un florecimiento temprano, las plantas no desarrollan altura ni área foliar normales e inducen la senescencia temprana, provocando la reducción de la asimilación de carbono y nitrógeno, acortando el período de llenado del grano y por lo tanto afectando negativamente el rendimiento (Hicks, 1983; Gregerson *et al.*, 2008). De esta manera, surgió el interés por controlar la senescencia en los cultivos de grano, donde es razonable pensar que una senescencia foliar y nodular retrasada, y por lo tanto la prolongación de la actividad fotosintética y la FBN, podrían favorecer a aumentar el rendimiento de algunas especies.

### **4.3. Senescencia nodular en leguminosas**

En leguminosas, a nivel radicular, tanto condiciones de estrés (Matamoros *et al.*, 1999) como deficiencias en el reconocimiento planta/microorganismo (Banba *et al.*, 2001), inducen características de senescencia prematura en los nódulos, que al igual que el envejecimiento natural, conlleva a la pérdida de la capacidad de fijar N<sub>2</sub> atmosférico, inducción de actividades líticas y a la formación de pigmentos verdes como leghemoglobina (Lb) (Roponen, 1970; Sarath *et al.*, 1986). La senescencia nodular ha sido asociada a incrementos en la generación de EAO y/o a la disminución de la defensa antioxidante (Escuredo *et al.*, 1996; Vanacker *et al.*, 2006; Puppo *et al.*, 2005). Sin embargo, las EAO no sólo están implicadas en la senescencia nodular, sino también que participan en el desarrollo (Pauly *et al.*, 2006; Lee MY *et al.*, 2005) y funcionalidad de los

nódulos (Marino *et al.*, 2011). En el interior de los nódulos las EAO se generan como consecuencia de las altas tasas respiratorias, las condiciones fuertemente reductoras esenciales para la reducción de  $N_2$ , la tendencia de la leghemoglobina a auto-oxidarse y la potencial capacidad propia de la nitrogenasa de reducir directamente al  $O_2$  (Dalton, 1995). Las alteraciones en la disponibilidad de oxígeno y en la capacidad respiratoria de los bacteroides, sumado al daño oxidativo de componentes celulares, llevarían a una limitación en la capacidad metabólica de los bacteroides. Estos factores contribuyen a la inhibición de la actividad nitrogenasa favoreciendo la senescencia nodular (Naya *et al.*, 2007).

Todos los organismos fijadores de  $N_2$  desarrollan sus actividades metabólicas bajo un dilema crítico: por un lado, la enzima nitrogenasa que cataliza la conversión de  $N_2$  en  $NH_3$  es rápida e irreversiblemente inhibida por  $O_2$ , sin embargo el proceso de fijación biológica de  $N_2$  (FBN) es extremadamente demandante desde el punto de vista energético, con un consumo de al menos 16 moléculas de ATP por cada  $N_2$  fijado (Ljones y Burris, 1972). Por lo tanto, sostener altas tasas respiratorias en orden de suministrar esa energía, pone en riesgo a la nitrogenasa de ser inactivada por  $O_2$  (Dalton *et al.*, 1998). En los nódulos de raíces de leguminosas, el problema del  $O_2$  es resuelto por tres mecanismos: a) Abundante cantidad de  $O_2$  ligado a la leghemoglobina para facilitar su flujo al nódulo, manteniendo extremadamente bajos los niveles de  $O_2$  libre, b) alta tasa respiratoria y consumo de  $O_2$ , c) la presencia de una barrera de difusión variable que restringe el ingreso del  $O_2$  a la región central del nódulo que se encuentra infectada, (Appleby, 1984; Witty *et al.*, 1986; Hunt *et al.*, 1987; Denison, 1992). La manera en que esta barrera opera no está del todo esclarecida, pero ella es responsable del control fisiológico del tamaño, distribución y contenido de los espacios intercelulares que regulan la difusión del  $O_2$  dentro del nódulo (Dalton *et al.*, 1998). Asimismo, existen variedades de soja (*Glycine max*) con una senescencia nodular retardada y un período de fijación de  $N_2$  mayor (Espinosa-Victoria *et al.*, 2000), lo que destaca al control genético como base molecular para modificar la sincronización y/o el progreso de la senescencia nodular.

Los principales blancos para la degradación y el reciclaje de nutrientes son los cloroplastos en las hojas y los simbiosomas en los nódulos. Cabe destacar que el transcriptoma de nódulos senescentes tiene un alto grado de superposición con el de hojas senescentes. Más aún, las hormonas etileno y ácido jasmónico participan en ambos programas de senescencia (Van de Velde *et al.*, 2006). Los nódulos senescentes presentan la inducción de genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de una variedad de moléculas, como proteínas con cassette de unión a ATP y transportadores específicos de fosfato y aminoácidos (Van de Velde *et al.*, 2006). Entre los genes inducidos pertenecientes a familias de proteasas, se encontró a VPE, cistein-proteasa implicada en la

senescencia foliar y muerte celular programada (Rojo *et al.*, 2004). También se observaron incrementos de componentes de la vía de degradación ubiquitin/26S proteosoma, el cual ejerce una importante función en la degradación de proteínas regulatorias (Smalle y Vierstra, 2004). Además de la maquinaria de degradación de proteínas, se vieron inducidas vías para la degradación de ácidos nucleicos, lípidos derivados de membranas y azúcares (Van de Velve *et al.*, 2006). No obstante, no hay evidencias claras de la participación del proceso de autofagia en la senescencia nodular. En este sentido, Vauclar y colaboradores (2010) han sugerido que la inducción de senescencia en plantas de soja sometidas a oscuridad estimularía autofagia a nivel de simbiosomas, lo que podría implicar eventos de muerte MCP. Sin embargo, este trabajo carece de evaluaciones de marcadores morfológicos, genéticos y bioquímicos que apoyen esta conclusión.

Estas observaciones reflejan una secuencia similar de eventos durante los programas de senescencia foliar y nodular, a través de los cuales una primera etapa inicia la señalización que marca el cambio de estado de destino-a-fuente, luego en la etapa de reorganización se reciclan los nutrientes catabolizados, conduciendo finalmente a la degeneración y muerte del órgano.

Hipótesis: La expresión de supresores de muerte celular en plantas de leguminosas incrementa la capacidad del sistema planta-simbionte para tolerar condiciones de estrés y mantener la actividad fijadora de carbono y nitrógeno, sosteniendo la productividad a través de la atenuación de los síntomas de senescencia.

Objetivo general: Estudiar la incidencia de la expresión de supresores de muerte celular de origen animal en plantas leguminosas sometidas a condiciones de estrés.

# Capítulo 1

Obtención de plantas transgénicas con  
expresión de Ced-9 y sus efectos bajo  
condiciones de estrés

# INTRODUCCIÓN

## 1. Reguladores de apoptosis: miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en animales

“Al día siguiente no murió nadie”

José Saramago- *Las intermitencias de la muerte.*

Luego de los descubrimientos de los reguladores de MCP en *C. elegans*, los estudios en mamíferos tuvieron un notable crecimiento debido a la gran relevancia del proceso de apoptosis en la patogenia de varias enfermedades. Bcl-2 es “miembro fundador” de la familia Bcl-2 de proteínas regulatorias de la apoptosis y ha sido la más estudiada y caracterizada. Bcl-2 fue originalmente descrita en células B de linfomas (su nombre por las siglas en inglés, *B-cell lymphomas*) donde se encontraba sobre-expresada como resultado de una translocación cromosomal, lo que resultó en una inhibición de la apoptosis. En 1990 surgió una pista sobre su mecanismo anti-apoptótico y dio lugar a una de los primeros indicios del rol de la mitocondria en la apoptosis (Hockenbery *et al.*, 1990). En dicho trabajo, Hockenbery y colaboradores, demostraron que Bcl-2 era una proteína de membrana de mitocondrias cuya sobre-expresión bloqueaba el proceso de apoptosis.

La familia Bcl-2 comprende proteínas tanto *anti-apoptóticas* como *pro-apoptóticas* y se subdivide en tres subfamilias clasificadas en base a dominios de homología Bcl-2, denominados *dominios BH* (del inglés, *Bcl-2 Homology*) (Fig. 1.1). Estos dominios tienen estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice y tienen vital relevancia para la interacción entre estas proteínas. La *subfamilia Bcl-2* incluye a los anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1 entre otros, y comparten homología en tres o cuatro dominios BH (Fig. 1.1A). Bax y Bak son algunos de los miembros que componen la *subfamilia Bax*. Ellos muestran homología con la subfamilia Bcl-2 en las regiones BH1, BH2 y BH3, pero no con BH4 (Fig. 1.1B) y participan en la activación de la apoptosis facilitando la salida de cit-c y otras proteínas inter-membrana de la mitocondria. Por último, la *subfamilia solo-BH3* que incluye un gran número de proteínas que contienen solo el dominio BH3, tales como Bid, Bim y el recientemente incorporado Beclina-1/Atg6 (Fig. 1.1C). Tras la recepción de un estímulo apoptótico, estas proteínas se “activan” y reprimen a miembros de la familia Bcl-2, lo que conduce a la activación de proteínas apoptóticas, por ejemplo Bax. Estos efectos ocurren vía la interacción directa proteína-proteína (Labi *et al.*, 2006).

Se ha postulado que variaciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial podrían ser el principal mecanismo de acción de estas proteínas en el proceso de

apoptosis. Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 incrementan la permeabilidad de la membrana de la mitocondria a través de la formación de canales por homodimerización o formando heterodímeros con otras proteínas mitocondriales, como las de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, por las siglas en inglés) y las que forman el *poro mitocondrial de permeabilidad transitoria* (PMPT) (Baines *et al.* 2005, Halestrap *et al.* 2002, Nakagawa *et al.* 2005). Estos canales de gran conductancia mediarían la salida de los factores pro-apoptóticos mencionados anteriormente (Fig. 1). Además, la apertura de estos canales de transporte no selectivo lleva a una caída del potencial de membrana de mitocondria, con el consecuente desacople entre el potencial de protones y la síntesis de ATP.

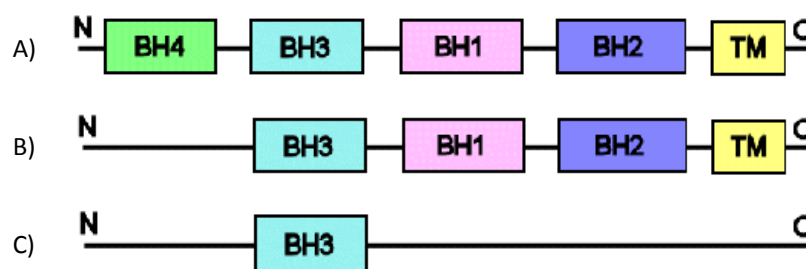


Fig. 1.1: Esquema de conservación de dominios BH en la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras de la apoptosis. A) subfamilia Bcl-2; B) subfamilia Bax; C) subfamilia solo-BH3.

Los reguladores y las vías de señalización implicadas en las respuestas de vida/muerte se encuentran conservados en los animales. Similarmente, los principales ejecutores de MCP, como las caspasas, están conservados en el reino animal. En *C. elegans* los genes Ced-3, Ced-4 y Ced-9, están directamente involucrados en el control de la ejecución de la apoptosis durante el desarrollo. Genes pro-apoptóticos como Ced-3 y Ced-4 son requeridos para la muerte de la célula, mientras que Ced-9 pertenece al grupo de los anti-apoptóticos. Ced-3 codifica para una proteasa homóloga a la familia de caspasas de mamíferos (Yuan *et al.*, 1993), mientras que CED-9 tiene homología estructural y funcional a Bcl-2 y Bcl-xL y regula negativamente la actividad de CED-3 (Hengartner y Horvitz, 1994). Esta homología tanto en secuencia como en función entre las proteínas reguladoras de MCP, indicaría un origen evolutivo antiguo de la apoptosis. Por otro lado, resulta importante destacar que en las plantas, a nivel de secuencia primaria, no se han encontrado ortólogos de ninguna proteína perteneciente a la familia Bcl-2. No obstante, resulta muy interesante el hecho de que ciertos virus han adquirido la capacidad de manipular a sus hospedadores mediante la expresión de proteínas



estructural y funcionalmente semejantes a las proteínas celulares, siendo algunas homólogas a Bcl-2, las cuales presentan mucha divergencia en la secuencia, pero comparten alta similitud en estructura tridimensional (Cuconati y White, 2002; Benedict *et al.*, 2002; Polster *et al.*, 2004; Loh *et al.*, 2005).

### **1.1. Mecanismos de acción de las proteínas de la familia Bcl-2**

En los sistemas animales, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre las proteínas anti-apoptóticas, no se han esclarecido del todo sus mecanismos de acción. Las proteínas BCL-2 parecen tener efectos mayores en las células, sin embargo, a pesar que sus efectos pueden ser observables simplemente porque las células no se mueren, el supuesto general es que estas proteínas poseen actividades bioquímicas aún no descubiertas, desafiando los postulados actuales sobre la apoptosis clásica. Incluso, actualmente, las localizaciones sub-mitocondriales están siendo controvertidas. En este sentido, la regulación del PMPT por parte de las proteínas de la familia Bcl-2 ha sido considerada, hasta no hace mucho tiempo, el principal mecanismo por el cual estas proteínas regulan los eventos de muerte celular. Sin embargo, estudios realizados con una construcción de CED-9 que carece del dominio transmembrana, demostraron que la acumulación en mitocondrias no es esencial para que CED-9 retenga sus actividades anti-apoptóticas en *C. elegans* (Tan *et al.*, 2007). Estos datos son consistentes con un carácter de acción multimodal de CED-9, donde la capacidad de regular la apoptosis a través de las interacciones en el citosol, coexisten con el rol adicional conservado evolutivamente en la membrana.

Diversos trabajos se han focalizado en el estudio de la participación de las proteínas anti-apoptóticas en el control de la homeostasis celular general, participando en la regulación o generación de EAO (Korsmeyer *et al.* 1995, Kowaltowski *et al.* 2004), alterando el volumen o estructura de la matriz mitocondrial (Kowaltowski *et al.* 2002, Scorrano *et al.* 2002), modulando el consumo o la permeabilidad al ATP (Imahashi *et al.* 2004), alterando la permeabilidad de los canales VDAC (Tsujimoto y Shimizu, 2000; Tsujimoto y Shimizu, 2002; Vander Heiden *et al.* 2000) y afectando la sensibilidad del PMPT a las concentraciones de  $Ca^{2+}$  (Murphy *et al.* 1996). Estos trabajos demostraron que los miembros de la familia Bcl-2 pueden regular funciones mitocondriales y celulares a través de la regulación de la permeabilidad de los canales VDAC, afectando el transporte de nucleótidos de adenina, de  $Ca^{2+}$  y otros metabolitos. Por otra parte, BAD, miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, es requerido para la interacción de una glucoquinasa a un complejo mitocondrial, alterando la homeostasis de glucosa (Murphy *et al.*, 2005; Danial *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas pueden asociarse y de esta manera modular la respuesta de muerte (Yang *et al.*, 1995; Conradt y Horvitz, 1998). Dicha interacción tiene lugar, al menos con algunas proteínas, por la capacidad de unir dominios BH3. Las proteínas anti-apoptóticas de la subfamilia Bcl-2 poseen un surco hidrofóbico formado por los dominios BH mediante el cual interactúan con la  $\alpha$ -hélice del dominio BH3. Los dominios BH3 presentan una alta tasa de conservación de aminoácidos mediante los cuales forman puentes de hidrógeno con los aminoácidos del surco hidrofóbico presente en las proteínas anti-apoptóticas (Fig. 1.2) (Oberstein *et al.*, 2007). Típicamente, el dominio BH3 se encuentra definido como una  $\alpha$ -hélice anfipática de cuatro vueltas con la siguiente secuencia motivo: Hf-X-X-X-Hf-K/R-X-X-Pq-D/E-X-Hf, donde “Hf” son residuos hidrofóbicos y “Pq” representan residuos pequeños, comúnmente glicina.

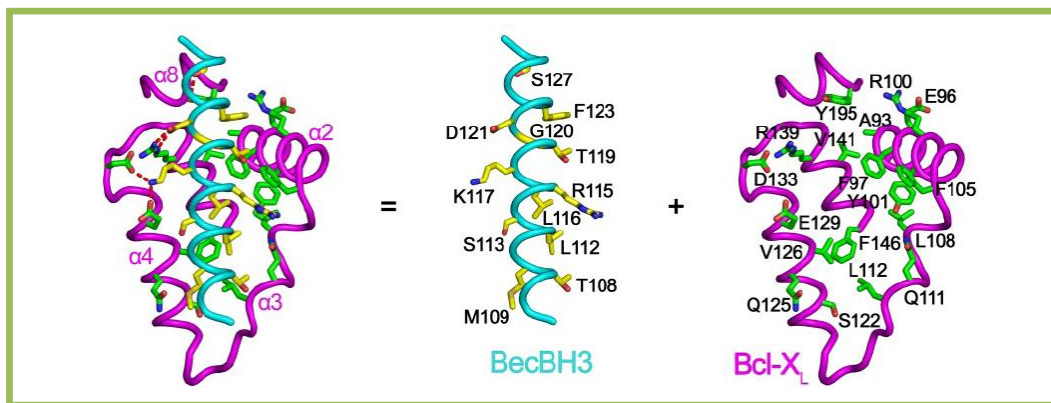


Fig. 1.2: Detalle de la superficie de interacción entre el dominio BH3 de Beclina-1/ATG6 y Bcl-xL. Los residuos del dominio BH3 están en amarillo y los de Bcl-xL en verde. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno. (Extraído de Oberstein *et al.*, 2007)

## 1.2. Proteínas de la familia Bcl-2 y la regulación de autofagia

Las proteínas anti-apoptóticas presentan en su superficie un surco hidrofóbico central delineado por cuatro dominios BH: BH4, BH3, BH1 y BH2 (Muchmore *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002 y 2003; Cory *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2001 y 2004; Danial y Korsmeyer, 2004; Loh *et al.*, 2005), por el cual unen al dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas (Sattler *et al.*, 1997; Petros *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002 y 2003; Liu *et al.*, 2003; Loh *et al.*, 2005). Originalmente, los dominios BH3 fueron descritos en el contexto de la interacción entre anti- y pro-apoptóticos. Sin embargo, estudios recientes indican que los dominios BH3 no participan únicamente en la regulación de la apoptosis, sino que también en la autofagia.

En el año 1998, Liang y colaboradores identificaron a beclina-1 (BEC-1) de mamíferos, ortólogo de Atg6/Vps30 de levaduras que forma parte del complejo fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) regulador de autofagia, como una proteína de interacción con Bcl-2. Posteriormente, diversos trabajos demostraron que otros miembros de la familia Bcl-2, tales como Bcl-xL y Ced-9, el ortólogo de Bcl-2 en *C. elegans*; como así también homólogos virales codificados por  $\gamma$ -herpesvirus oncogénicos, interaccionan con el dominio BH3 de Beclina-1 (Pattingre *et al.*, 2005; Takacs-Vellai *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2007).

Diversos trabajos han identificado los residuos de aminoácidos en el dominio BH3 de beclina-1 que son requeridos para la unión con los homólogos pertenecientes a la subfamilia Bcl-2, como así también los residuos del surco hidrofóbico presente en los anti-apoptóticos mediante el cual interaccionan con los dominios BH3 (Maiuri *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2007; Oberstein *et al.*, 2007). En este sentido, análisis de mutación puntual sobre los residuos conservados del dominio BH3 de beclina-1 demostraron la importancia de éstos aminoácidos para la unión con Bcl-2 en sistemas animales. La sustitución selectiva de los residuos claves de beclina-1, tales como L112A, L116A, L116E, L116Q, G120E, D121A y F123A redujo o anuló la interacción entre beclina-1 y Bcl-2 o Bcl-xL (Fig. 1.3) (Maiuri *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2007; Oberstein *et al.*, 2007). De esta manera, la combinación de análisis mutacionales, estructurales y bioquímicos demuestran que beclina-1 contiene un dominio BH3 que es suficiente y esencial para la interacción con los homólogos de Bcl-2.

Beclin1	(105-130)	DGGTMENLSRRLKVTGDLFDIMSGQT
mBim	(83-108)	DLRPEIRIAQELRRIGDEFNETYTRR
Bim	(81-106)	DMRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYARR
PUMA	(130-155)	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYERR
Mbmf	(128-151)	HRAEVQIARKLQCIADQFHLHTQ
BAD	(103-128)	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKG
BIK	(51-75)	MEGSDALALRLACIGDEMDSLVRAP
HRK	(26-51)	RSSAAQLTAARLKAIGDELHQRTMWR
BID	(81-104)	DIIRNIARHLAQVGDSDMR SIPPG
NOXA	(18-43)	PAELEVECATQLRRFGDKLNFQKLL

Fig. 1.3: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios BH3 de beclina-1 y miembros de la subfamilia solo-BH3, implicados en la interacción con miembros de la subfamilia Bcl-2. Las flechas indican los residuos L112, L116, G120, D121 y F123 del dominio BH3 que participan en la interacción con Bcl-2. Gris oscuro indica conservación completa mientras que gris claro indica sustituciones conservativas. *Modificado de Erlich et al.*, (2007)

Llamativamente, se ha demostrado que la interacción de Bcl-2 con Bec-1/Atg6 inhibe el proceso de autofagia. Estos trabajos sugieren otra forma de control de la homeostasis celular mediada por los supresores de muerte celular donde la actividad diferencial de Beclina-1 regularía el destino entre apoptosis, necrosis y autofagia (Patingre *et al.*, 2005; Takacs-Vellai *et al.*, 2005; Kourtis y Tavernarakis 2009). Básicamente, lo que se postula es que Bcl-2/Ced-9 participaría en la modulación de los niveles de autofagia que promoverían la sobrevivencia celular. Otro ejemplo de regulación de autofagia por proteínas de la familia Bcl-2 fue observado en *C. elegans*, donde la proteína EGL-1, homólogo de las proteínas solo-BH3 de mamíferos, que participa en la inducción de la MCP durante el desarrollo, es también requerida para la inducción no-letal del proceso de autofagia bajo condiciones de *hambre* (Maiuri *et al.*, 2007). Resulta muy significativo destacar que la participación de autofagia en la muerte celular ha sido registrada solo en animales. En las plantas aún no se ha esclarecido la participación de dicho proceso en la muerte celular, de hecho, los estudios realizados sugieren un rol *pro-vida* para las vías autofágicas (van Doorn, 2011; Patel *et al.*, 2006).

### **1.3. Expresión de proteínas animales de la familia Bcl-2 en plantas**

Un aspecto a destacar es que si bien se ha evaluado la participación de los supresores de origen animal sobre los eventos de muerte/vida en las plantas, no se han esclarecido los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos. Mediante estudios de localización subcelular, se pudo determinar la presencia de Bcl-xL principalmente en mitocondria y núcleo, mientras que en la fracción soluble, microsomal y en plástidos hubo menor contenido. Además, se ha observado que bajo condiciones de estrés salino, las células que expresaron Bcl-xL mantuvieron el potencial de membrana de mitocondria y estructura de la membrana de vacuola durante un período de tiempo mayor (Qiao *et al.*, 2002). Por su parte, Chen y Dickman (2004) también determinaron la localización en mitocondrias y cloroplastos de los supresores expresados en tabaco, y evaluaron la participación del cloroplasto en la señalización de la MCP inducida por herbicidas. De acuerdo a la localización de las proteínas heterólogas en las organelas de las células vegetales, se ha propuesto que, similarmente a lo que ocurre en animales, los supresores de muerte contribuirían en el mantenimiento de la homeostasis de las organelas, previniendo la generación/liberación de señales de muerte. Además, Xu y colaboradores (2004) comprobaron que la senescencia foliar inducida por estrés térmico estuvo retardada en plantas transgénicas con expresión de Bcl-xL y Ced-9, las cuales manifestaron altos niveles de antocianinas acumuladas, posiblemente limitando el estrés oxidativo.

Por su lado, Shabala y colaboradores (2007) demostraron que la expresión de Ced-9 retarda la aparición de síntomas de senescencia foliar bajo condiciones de estrés salino y oxidativo alterando los patrones de flujo de  $K^+$  y  $H^+$  a través de la membrana plasmática. De esta manera, se previene el eflujo de  $K^+$  desde las células del mesófilo manteniendo la homeostasis intracelular de  $K^+$ , y sugieren la habilidad de Ced-9 de controlar dos tipos de canales de permeabilidad a  $K^+$ ; canales de  $K^+$  rectificadores hacia afuera activados por despolarización (KOR) y canales catiónicos no-selectivos (NSCC). De esta manera vincularon a los flujos iónicos y los mecanismos involucrados en la regulación de MCP.

También fueron evaluados los efectos de la expresión de los supresores de muerte celular de origen animal frente a condiciones de estrés biótico, determinándose incrementos en la resistencia frente a diversos patógenos necrotróficos. Las plantas transgénicas mostraron incrementos en la expresión de ciertos genes relacionados a la defensa, tales como PR1, PR3 y PR4 (Dickman *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios realizados en sistemas de interacción planta/patógeno incompatible (respuesta hipersensible) mostraron las perturbaciones que ejerce la expresión de estos supresores, permitiendo la propagación del patógeno (Mitsuhara *et al.*, 1999). Como mencionamos anteriormente, a pesar de no haber homólogos a los genes animales relacionados a la muerte celular, se ha encontrado cierto nivel de identidad entre los dominios NB-ARC de las proteínas promotoras de muerte celular Ced-4/Apaf-1 y algunos genes de resistencia involucrados en la respuesta hipersensible de plantas (van der Biezen y Jones, 1998). En animales, Ced-9/Bcl-2 se une a Ced-4/Apaf-1e interfiere en la muerte celular (Miura y Yuan, 1997), sin embargo, en los sistemas vegetales no se ha establecido si los supresores de muerte celular de origen animal ejercen sus funciones a través de la interacción con proteínas de las plantas.

## 2. Muerte celular en la interacción soja-*B. japonicum*

En general, las leguminosas han sido consideradas muy sensibles a condiciones salinas, aunque existen muchas excepciones. Particularmente en soja, existe un rango de susceptibilidad al estrés salino que está dado por el cultivar (Shao *et al.* 1986; Murat *et al.* 2008). Lo cierto es que la soja y con ella el proceso de infección y nodulación por *B. japonicum*, son severamente afectados bajo salinidad. Se ha citado por ejemplo, una reducción en un 50% del número y peso de nódulos en plantas salinizadas, con concentraciones de 26,6 mM de NaCl (Singleton y Bohlool 1984; Delgado *et al.* 1994; Elsheikh y Wood 1995). Esta disminución en el número de nódulos, podría darse porque la sal atenúa la respiración aeróbica de las bacterias dentro del nódulo, genera una caída del contenido del leghemoglobina, agotándose la fuente de energía que es requerida para la FBN. Un aspecto interesante a tener en cuenta es que, cuando se analiza la tolerancia a la

sal de diferentes cultivares de soja, la respuesta es altamente dependiente del estadio de desarrollo (Shao *et al.* 1986; Shao *et al.* 1993). Es así que, conjuntamente con el desarrollo de la planta de soja, ocurre el proceso de infección y nodulación, y es poco conocido como se van afectando conjuntamente cada una de las etapas de la interacción simbiótica en presencia de estrés salino. Específicamente en etapas tempranas de la interacción simbiótica, se ha citado que ocurre una disminución en el número de pelos deformes en presencia de *B. japonicum*, aunque se desconocen las causas de esta disminución (Duzan *et al.* 2004).

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado cómo se afectan etapas tempranas de la interacción simbiótica bajo condiciones de estrés salino y osmótico observándose que la generación apoplástica e intracelular de EAO y la deformación de pelos radicales es similar al control en condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, estos procesos se afectan severamente en condiciones de estrés salino, donde los pelos radicales no presentan la deformación típica de la percepción del rizobio y sufren muerte celular cuando se combina estrés salino y el microsimbionte (Muñoz *et al.*, 2012). Llamativamente, la producción intracelular de EAO en las etapas tempranas de la interacción con el simbiote bajo condiciones de estrés salino subletal, muestra un patrón similar al observado en las respuestas a elicitores patogénicos (Muñoz *et al.*, 2012), los cuales no exhiben la caída posterior al pico de generación de EAO, observándose un incremento sostenido en el tiempo de los niveles de EAO intracelulares (Cárdenas *et al.*, 2008). En este contexto de trabajo se identificaron dos condiciones promotoras de la muerte de pelos radicales: tratamientos de estrés salino subletal (50 mM NaCl) combinados con el rizobio y estrés salino severo (150 mM NaCl) (Muñoz *et al.*, 2012), las cuales serán objetivo de estudio en esta Tesis.

### 3. Transformación de soja

Las leguminosas, inclusive la soja, han sido consideradas durante muchos años extremadamente recalcitrantes a la transformación genética (Trick, 1997). Esta naturaleza renuente a la transformación ha hecho imprácticas la aplicación de diversas técnicas moleculares y genéticas utilizadas comúnmente en otros cultivos y actualmente, si bien existen protocolos ajustados que permiten la obtención de transgénicos, los porcentajes de éxito siguen siendo muy bajos. Una metodología utilizada convencionalmente para la obtención de plantas transgénicas es la transformación de meristemas a través de la infección con *Agrobacterium tumefaciens* o por bombardeo de partículas. En este sentido, un sistema de cultivo *in vitro* eficaz, que resulte en la diferenciación y regeneración eficiente de la planta entera, es un requisito esencial para la transformación genética o mutagénesis (Svetleva *et al.*, 2003). Aunque varios protocolos se han descrito en la

bibliografía para la regeneración de leguminosas, el desarrollo de un óptimo sistema de cultivo *in vitro* sigue siendo un reto importante (Veltcheva *et al.*, 2005).

### Objetivos específicos

- 1- Obtener plantas leguminosas transgénicas para los supresores de muerte celular de origen animal.
- 2- Estudiar los eventos de muerte celular en plantas leguminosas y los efectos de la expresión de supresores de muerte celular de origen animal bajo condiciones de estrés.
- 3- Identificar mecanismos de acción de los supresores de muerte celular de origen animal en las plantas.

## RESULTADOS

### Obtención de plantas de soja con expresión de Ced-9

Con el objetivo de obtener plantas con expresión de Ced-9 a partir de células meristemáticas y evitar la fase de cultivo de tejidos de callos *in vitro*, hemos trabajado en la obtención de brotes transgénicos a partir de la transformación de las yemas cotiledonares con *Agrobacterium tumefaciens* en condiciones que no implican asepsia. Para tal fin, semillas de soja previamente desinfectadas se germinaron durante 2 días en cámara húmeda, posteriormente se sembraron en vermiculita y se mantuvieron en invernadero. Luego de 5-7 días se realizó la ablación del epicótilo con el objetivo de interferir la dominancia apical en favor de la regeneración de las yemas cotiledonares. Posteriormente, se procedió a la ablación sobre las yemas cotiledonares (Fig. 1.4A) y la axila del cotiledón se infectó con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido pBE2113-Ced-9 (Mitsuhara *et al.*, 1996 y 1999) (Fig. 1.4B). Las plantas se mantuvieron en cámara húmeda en invernadero y luego de 10 días aproximadamente, el 90% de las plantas regeneró una de las yemas infectadas, mientras que un porcentaje menor regeneró ambas yemas. De esta manera, se esperaba que un porcentaje de las semillas obtenidas a partir de estas ramas presentara el gen Ced-9.



Fig. 1.4: Esquema de trabajo realizado para la obtención de tallos transgénicos a partir de la transformación de los meristemas cotiledonares. A) Ablación del epicótilo y regeneración de las yemas cotiledonares; B) infección de las yemas cotiledonares con *Agrobacterium tumefaciens*/pBE2113-Ced-9, luego de realizado el corte en los tallos regenerados.



Se tomaron hojas de los tallos obtenidos (eventos primarios) para evaluar la transformación, determinando la expresión del gen y presencia de la proteína Ced-9. Se observaron resultados positivos en algunos eventos primarios, tanto por el análisis de expresión del gen, evaluada mediante transcripción reversa y PCR (TR-PCR) como por *Western-blot* (Fig. 1.5). Estas plantas fueron seleccionadas y crecidas en invernadero para la obtención de semillas y el posterior análisis de eventos transgénicos en la primera generación (F1). Lamentablemente, los análisis de *Southern-blot*, de expresión del transgen y *Western-blot* realizados en las F1, no arrojaron resultados positivos.

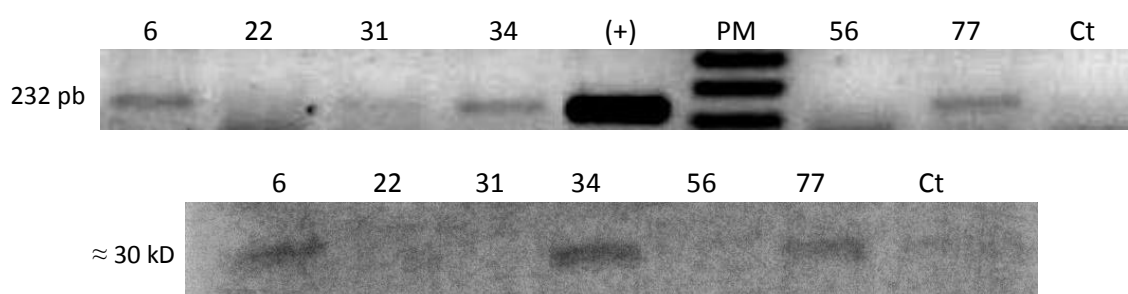


Fig. 1.5: Evaluación de transformación de los eventos primarios. Imagen superior, expresión del gen de resistencia de kanamicina evaluada mediante TR-PCR. Tamaño esperado del amplificado 232 pb. (+), Control positivo; PM, marcador de peso molecular; Ct, planta control no transformada. Imagen inferior, *Western blot* de la proteína CED-9. Tamaño esperado ≈30 kD

### Sistema alternativo para la introducción del gen ced-9 en plantas de soja. Obtención de raíces en cabellera mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes*

Las semillas de soja fueron desinfectadas, germinadas 2 días en cámara húmeda y cultivadas en un sistema de hidroponía y cámara húmeda con doble tubo (Fig. 1.6A). Los tubos de cultivo de tejidos fueron cerrados con film transparente (Fig. 1.6A y B), ya que las condiciones de humedad son muy importantes para el progreso de los callos y el posterior desarrollo de las *raíces en cabellera*. Luego de 3 días se realizó la infección con *A. rhizogenes* cepa K599/pBE-Ced-9 mediante micro-inyecciones en la base de los cotiledones. Alrededor del día 12 post-infección, cuando las raíces en cabellera tenían aproximadamente 2 cm de largo (Fig. 1.6B), se eliminó el tallo y la raíz por debajo de las mismas y se transfirió a las plantas a hidroponía donde, luego de 3 días, se realizó la inoculación con *B. japonicum* USDA138 (Fig. 1.6C). Finalmente, se evaluó la cantidad de nódulos a los 21 días post-inoculación con el simbionte (Fig 1.6D).

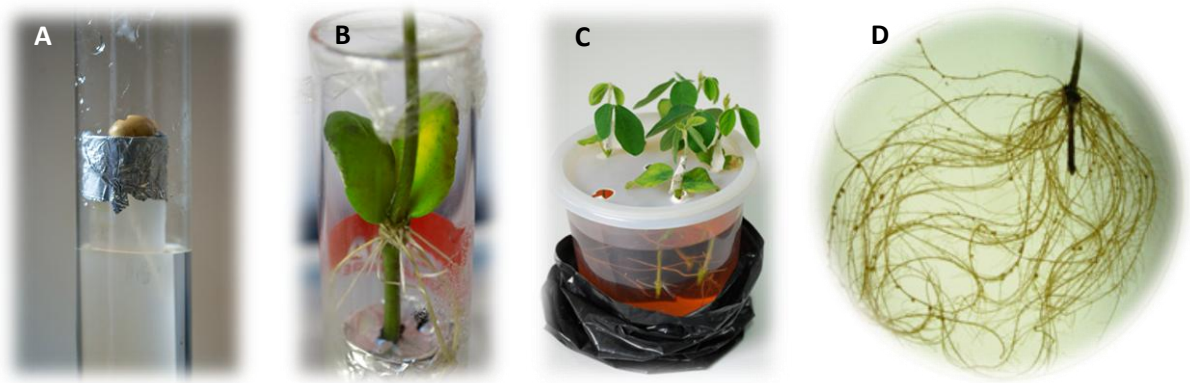


Fig. 1.6: Sistema de obtención de raíces en cabellera. A) Sistema de hidroponía en doble tubo para la infección y desarrollo de las raíces en cabellera; B) raíces generadas luego de 12 días post-infección con *A. rhizogenes*; C) sistema de hidroponía para la inoculación con *B. japonicum* USDA138 y desarrollo de nódulos; D) Imagen de raíces en cabellera noduladas.

Se evaluaron los niveles de expresión de Ced-9 en las raíces en cabellera mediante PCR-TR. En la figura 1.7 se observa la cuantificación de los niveles de expresión de Ced-9 relativo a raíces control obtenidas a partir de la infección con *A. rhizogenes* sin transformar (K599-vacía).

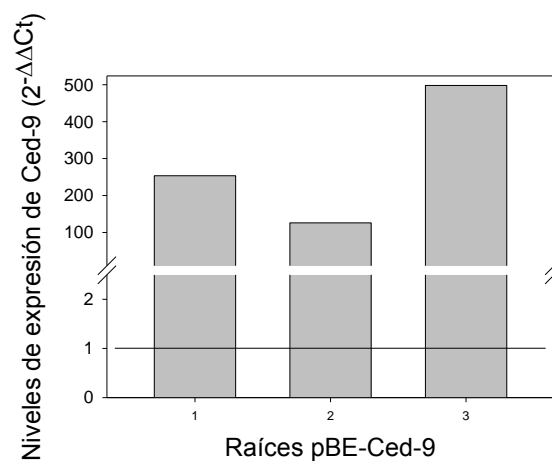


Fig. 1.7: Evaluación de expresión de Ced-9 en raíces en cabellera. Cuantificación de los niveles de expresión de Ced-9 relativo a raíces control no transformadas K599-vacía (valor 1).

## Expresión de Ced-9 en raíces de soja. Evaluación de la nodulación

Las raíces pBE-Ced-9 mostraron una reducción del 60 % en el número de nódulos en relación a las raíces K599-vacía, obtenidas a partir de la infección con *A. rhizogenes* no transformada (Fig. 1.8A). Asimismo, se pudo determinar que las raíces pBE-Ced-9 mostraron diferencias significativas en el largo, siendo más cortas que las raíces control (Fig. 1.8B).

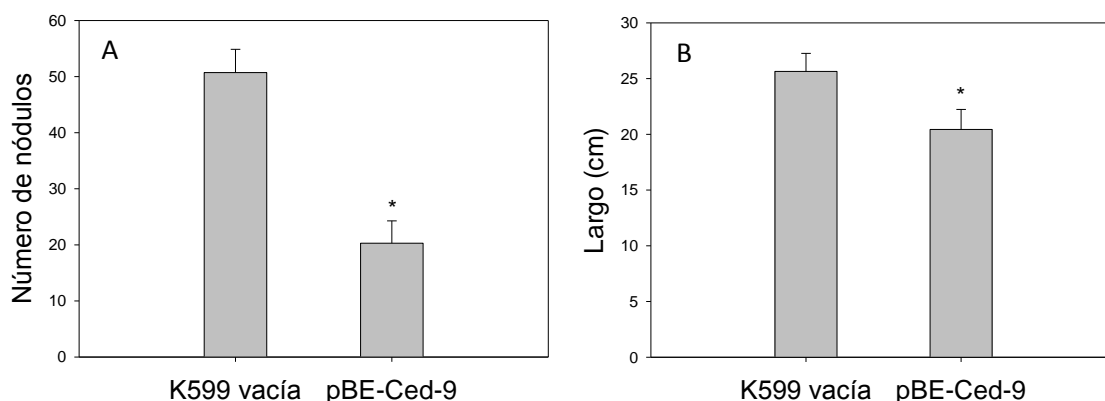


Fig. 1.8: A) Número de nódulos por raíz en plantas de soja compuestas con raíces en cabellera no transformadas (K599-vacía) y transgénicas pBE-Ced-9; B) Longitud de raíces K599-vacía y pBE-Ced-9. Los resultados son los promedios de diez experimentos independientes, asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## Caracterización de los eventos de muerte de pelos radicales de raíces sometidas a 150 mM NaCl y durante etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum* bajo condiciones de 50 mM NaCl

Debido a la falta de un sistema experimental apropiado para la evaluación de los efectos de la expresión de Ced-9 sobre los eventos de senescencia foliar y nodular, en adición a los resultados obtenidos en nuestro grupo en pelos radicales bajo tratamientos de estrés salino subletal (50 mM NaCl) combinados con el rizobio y estrés salino severo (150 mM NaCl) (Muñoz *et al.*, 2012), realizamos la caracterización de la muerte celular y se evaluó los efectos de la expresión de Ced-9 en dichas condiciones.

Para la obtención de raíces con pelos radicales en activo crecimiento se germinaron semillas, previamente desinfectadas, durante 48 h en cámara húmeda. Las primeras 24 h las semillas germinaron a 28 °C donde ocurrió la imbibición de las semillas y la aparición de los primeros milímetros de la radícula. Durante las segundas 24 h las semillas fueron

transferidas a 37 °C, condición que estimula la elongación de la radícula, alcanzando unos 3 cm de longitud y ocurre un incremento en la humedad de la cámara que estimula la aparición de pelos radicales (Muñoz *et al.*, 2012).

Las condiciones inductores de muerte de pelos radicales jóvenes fueron los descritas en trabajos previos de nuestro grupo y consisten en tratamientos de 30 min a raíces inoculadas en presencia de 50 mM NaCl (condición salina subletal) y tratamientos de 30 min a raíces no inoculadas en presencia de 150 mM NaCl. Asimismo, estas condiciones de estrés durante las etapas tempranas de la interacción repercutieron sobre el establecimiento de los nódulos (Muñoz *et al.*, 2012). Por último, los controles osmóticos realizados con concentraciones de sorbitol que ejercen presiones iso-osmóticas a los tratamientos salinos (100 y 300 mM, respectivamente) no promovieron la muerte celular (Muñoz *et al.*, 2012). Las evaluaciones de muerte celular se realizaron mediante la tinción con Azul de Evans (Fig 1.9), un colorante utilizado en la determinación de viabilidad celular (Qiao *et al.*, 2002) debido a su incapacidad de permear membranas celulares intactas. Cuando se pierde el potencial de membrana, el colorante difunde y se lo visualiza dentro de la célula mediante microscopía convencional. Se pudo confirmar que bajo ambas condiciones generadoras de muerte sólo los pelos radicales presentaron marcación positiva, mientras que en la raíz no se observó tinción con Azul de Evans (Fig. 1.9A y B). Esto permitió realizar la cuantificación de la muerte de los pelos radicales a través del análisis de imagen de la raíz.

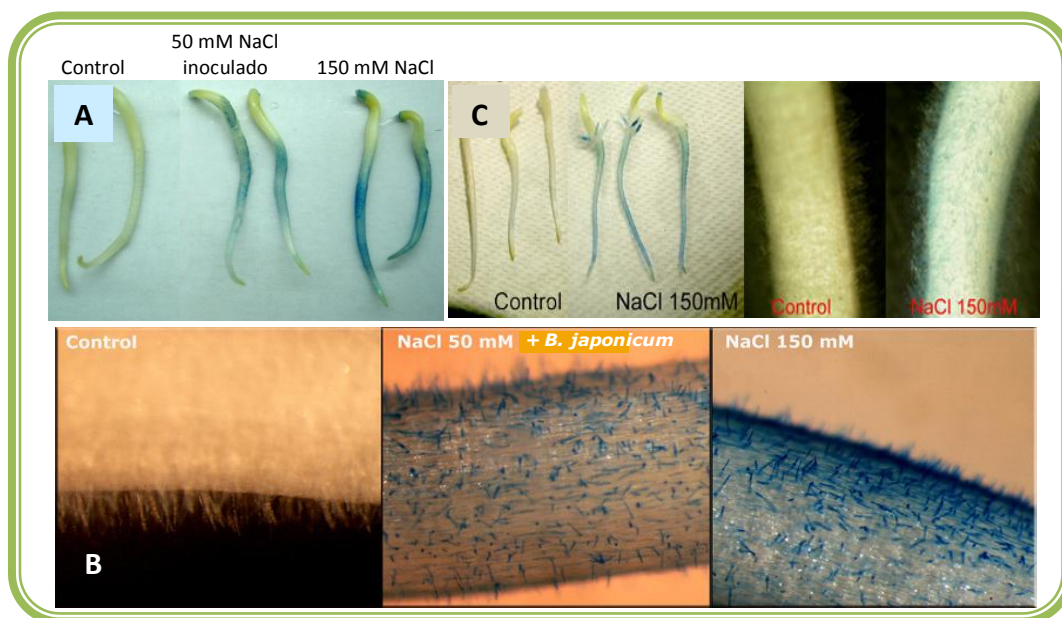


Fig. 1.9: Evaluación de muerte celular mediante la tinción con el colorante Azul de Evans en raíces sometidas a condiciones control y de estrés. A) Raíces de soja, B) imagen de pelos radicales de raíces de soja tomada con lupa y C) raíces de poroto.

Este resultado se repitió en raíces de poroto (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a dichos tratamientos, reemplazando *B. japonicum* por su simbionte *Rhizobium tropici* CIAT 899, estimando la muerte celular con Azul de trifano, otro compuesto ampliamente usado para las determinaciones de muerte celular (Fig. 1.9C). Curiosamente, se observó un gradiente en la tinción con Azul de Evans en los pelos radicales de raíces sometidas a distintas condiciones de estrés (Fig. 1.9B).

### **Evaluación de estructura nuclear de pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte**

Asimismo, otro parámetro de muerte celular utilizado fue la evaluación de la estructura nuclear *in situ* mediante microscopía confocal y tinciones con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt), y la degradación de la cromatina mediante electroforesis en gel de agarosa. En la figura 3.2 se puede observar un pelo radical joven en tratamiento control, donde el núcleo mantiene su integridad. Contrariamente, en los tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl, no se observa un núcleo definido, los pelos radicales presentan una marcación difusa y fragmentada propia de la degradación nuclear (Fig. 1.10B y C).

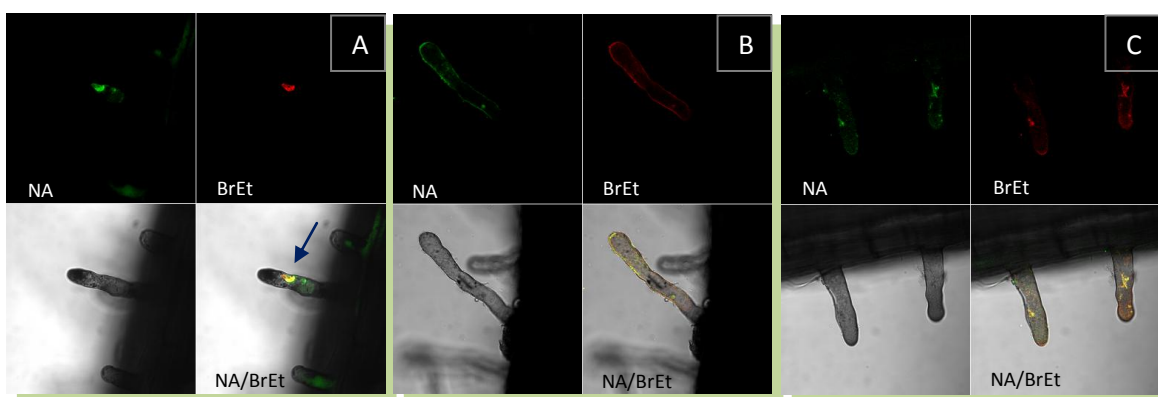


Fig. 1.10: Evaluación de estructura nuclear en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones de estrés, mediante tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (NA/BrEt). A) tratamiento control, la flecha marca el núcleo; B) 50 mM NaCl + *B. japonicum* y, C) 150 mM NaCl. NA: canal Naranja de Acridina, BrEt: canal Bromuro de Etidio, NA/BrEt: superposición de imágenes NA y BrEt. Imágenes tomadas con microscopio confocal Zeiss. La excitación se realizó simultáneamente a 488 nm y la emisión con filtros BP 500-530 IR y BP 565-615 IR, para NA y BrEt, respectivamente.

Para confirmar este resultado, se procedió a la extracción de ADN de pelos radicales jóvenes y se evaluó su degradación mediante electroforesis en agarosa. Satisfactoriamente, se observó que en las condiciones de muerte, los pelos radicales

presentaron degradación de ADN (Fig. 1.11A). Nuevamente, se pudo confirmar que dichas condiciones de muerte afectan solamente a los pelos radicales, mientras que la raíz mantiene la integridad de la cromatina (Fig. 1.11B).

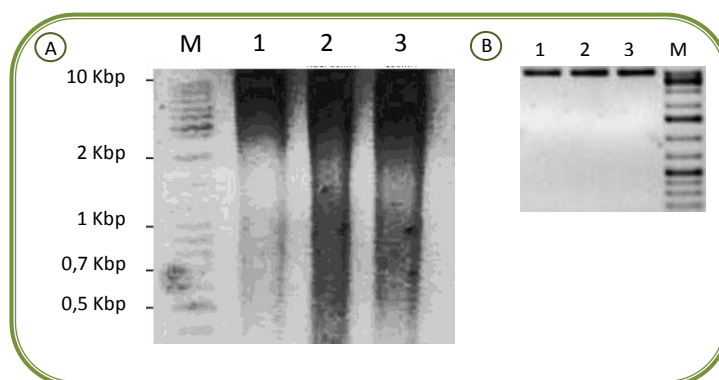


Fig. 1.11: A) Electroforesis de ADN de pelos radicales de raíces sometidas a condiciones inductoras de muerte. B) Electroforesis de ADN de raíces sometidas a condiciones de muerte celular. Agarosa 1,5 %. M: marcador de peso molecular, 1: control, 2: 50 mM NaCl + *B. japonicum*, 3: 150 mM NaCl.

### **Peroxidación de lípidos y niveles de glutatión en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte**

Se realizaron evaluaciones de parámetros de daño oxidativo en pelos radicales de raíces sometidas a tratamientos inductores de muerte celular. En este sentido, el contenido de Malon dialdehido (MDA), que es un indicador de peroxidación de lípidos de membranas, aumentó significativamente en pelos radicales de raíces inoculadas con el simbionte y en los tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum* (Fig 1.12A).

Otro parámetro evaluado para la estimación de estrés oxidativo fueron los niveles de glutatión, principal componente no enzimático del sistema antioxidante y regulador de la homeostasis redox celular (Noctor y Foyer, 1998). En la cuantificación de glutatión total (GSH+GSSG) no se registraron diferencias entre los pelos radicales de raíces sometidas a las condiciones inductoras de muerte celular (Fig. 1.13A). Por otro lado, el análisis de la relación GSH/GSH+GSSG en los tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum* no mostró cambios respecto del control, mientras que los tratamientos de 150 mM NaCl tuvieron una disminución del 35 %, aproximadamente (Fig. 1.13B).

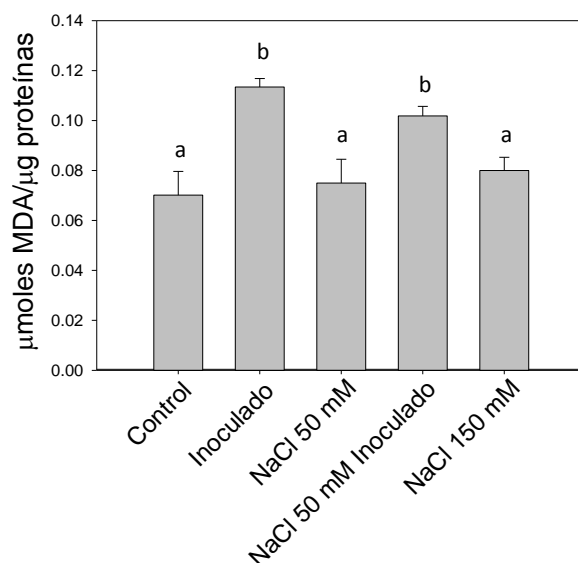


Fig. 1.12: Contenido de MDA en pelos radicales sometidos a condiciones de muerte. Los resultados son promedios de tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

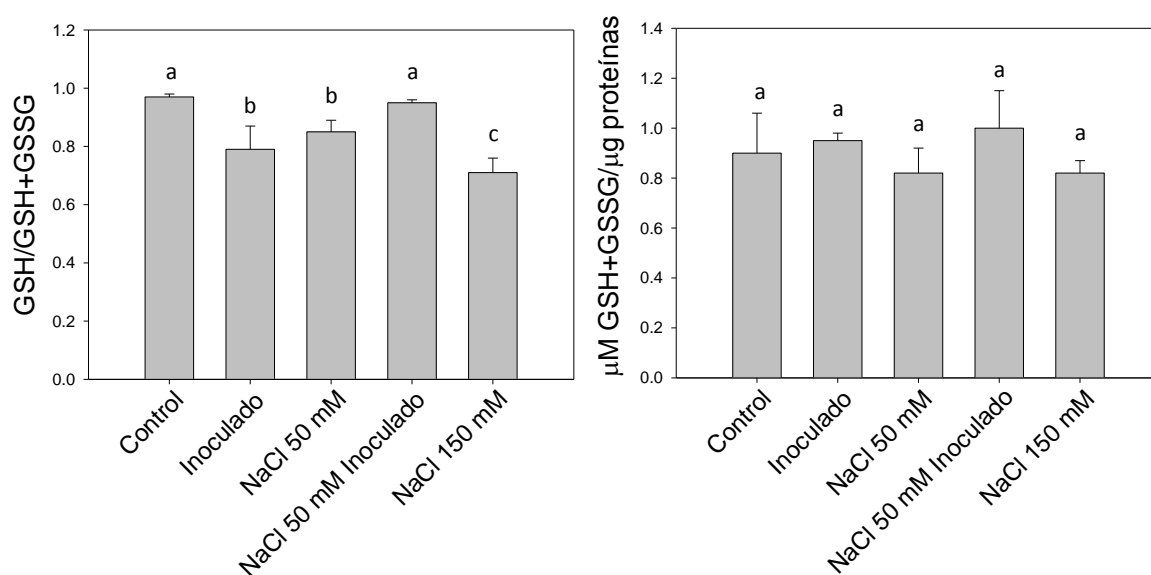


Fig. 1.13: A) Contenido de glutatión total (GSH+GSSG) y B) relación Glutatión reducido sobre el total (GSH/GSH+GSSG) en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones inductoras de muerte. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Niveles de ATP en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones generadoras de muerte

Se realizó la cuantificación, mediante luminiscencia, de los niveles de adenosin trifosfato (ATP) en los pelos radicales de raíces sometidas a condiciones inductoras de

muerte. Los resultados arrojaron diferencias entre las dos condiciones de muerte celular. Por un lado, los tratamientos de inoculación bajo estrés salino subletal (50 mM NaCl) tuvieron un aumento en los niveles de ATP, al igual que la condición control de inoculación (Fig. 1.14). Contrariamente, la condición de estrés salino severo (150 mM NaCl) no mostró cambios significativos en los niveles de ATP (Fig. 1.14).

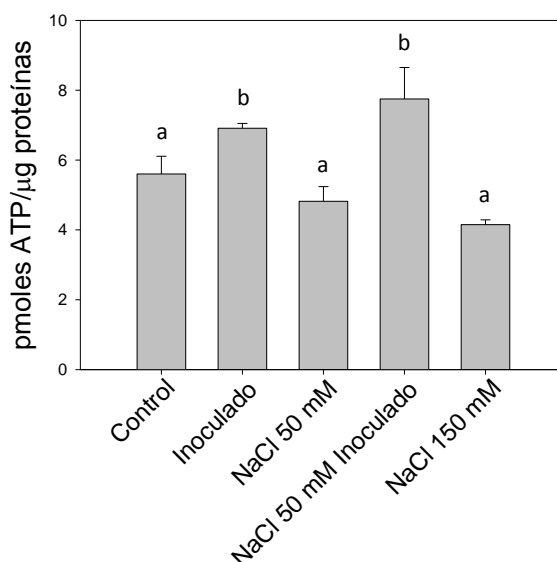


Fig. 1.14: Cuantificación de los niveles de ATP en pelos radicales de raíces sometidas a condiciones control y de estrés. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## Efectos de la expresión del supresor de muerte celular Ced-9 en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés

### **Evaluación de la estructura nuclear**

Mediante el uso de raíces en cabellera se evaluaron los efectos de la expresión del supresor de muerte celular de origen animal, Ced-9, bajo condiciones inductoras de muerte. Los tratamientos se realizaron durante 30 min y se estimó la muerte mediante la evaluación de la integridad de estructura nuclear por tinciones con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt) y la observación con microscopía confocal. En las raíces K599-vacía se observa que ambas condiciones generadoras de muerte afectaron dramáticamente la estructura nuclear (Fig. 1.18), mientras que la expresión de Ced-9 (raíces pBE-Ced-9) previno la muerte de los pelos radicales inducida por 150 mM NaCl y 50 mM NaCl + *B. japonicum* (Fig. 1.18).



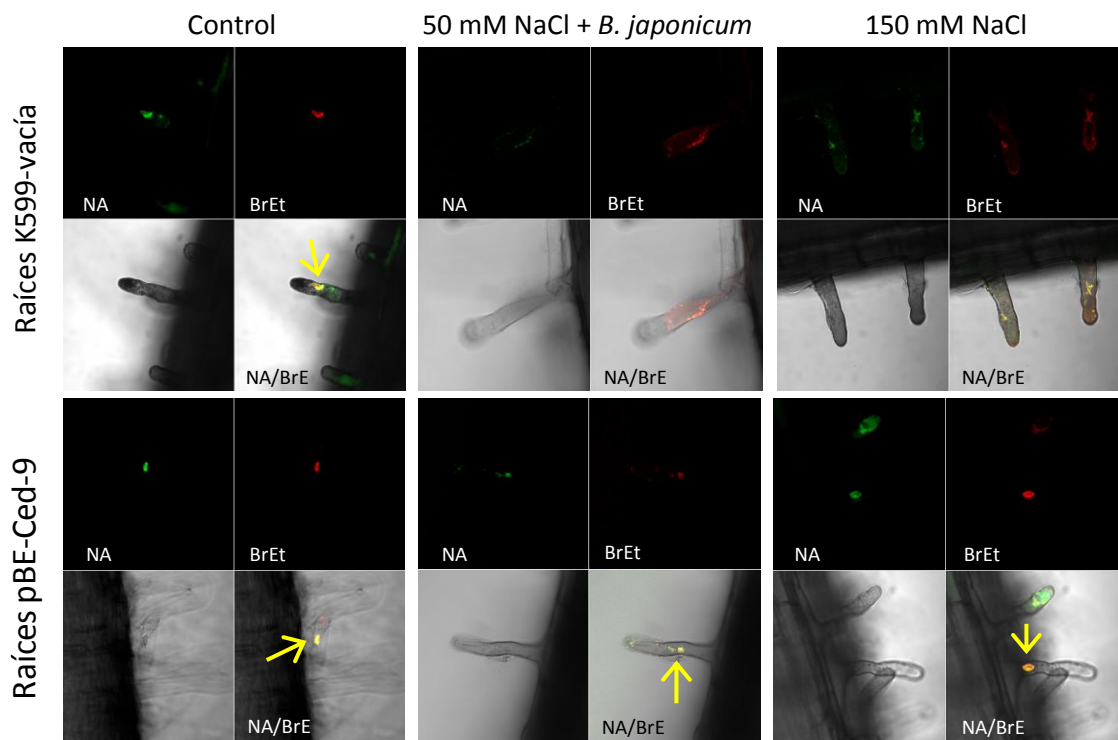


Fig. 1.18: Evaluación de estructura nuclear en pelos radicales de raíces K599-vacia y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés, mediante tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (NA/BrEt). Imágenes tomadas con microscopio confocal Zeiss. La excitación se realizó simultáneamente a 488 nm y la emisión con filtros BP 500-530 IR y BP 565-615 IR, para NA y BrEt, respectivamente. NA: canal Naranja de Acridina, BrEt: canal Bromuro de Etidio, NA/BrEt: superposición de imágenes NA y BrEt. La flecha marca el núcleo.

### **Peroxidación de lípidos en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés**

Se cuantificaron los niveles de MDA de raíces en cabellera K599-vacia y pBE-Ced-9 bajo condiciones de 150 mM NaCl y 50 mM NaCl + *B. japonicum*. Debido a las dificultades metodológicas implicadas a la extracción de pelos radicales de raíces en cabellera, las determinaciones fueron realizadas sobre las raíces. Como observamos previamente, incubaciones de 30 min bajo los tratamientos mencionados generan muerte celular de los pelos radicales, no así a nivel radical. De tal manera, doce días post-infección con *A. rhizogenes*, se realizó el corte por debajo de las raíces en cabellera y se pasaron las plantas a hidroponía. Alrededor del día 25 post-infección, las raíces fueron sometidas a condiciones de estrés durante 3 h.

Los contenidos de MDA en las raíces K599-vacia sometidas a condiciones de estrés mostraron un patrón similar a lo observado en los pelos radicales. Bajo el tratamiento de

NaCl 50 mM + *B. japonicum* se observó un incremento significativo en los niveles de MDA, mientras que en el tratamiento de NaCl 150 mM las diferencias no fueron significativas (Fig. 1.19). Por otro lado, las raíces en cabellera pBE-Ced-9 no manifestaron diferencias significativas en el contenido de MDA entre la condición control y los tratamientos de estrés (Fig. 1.19).

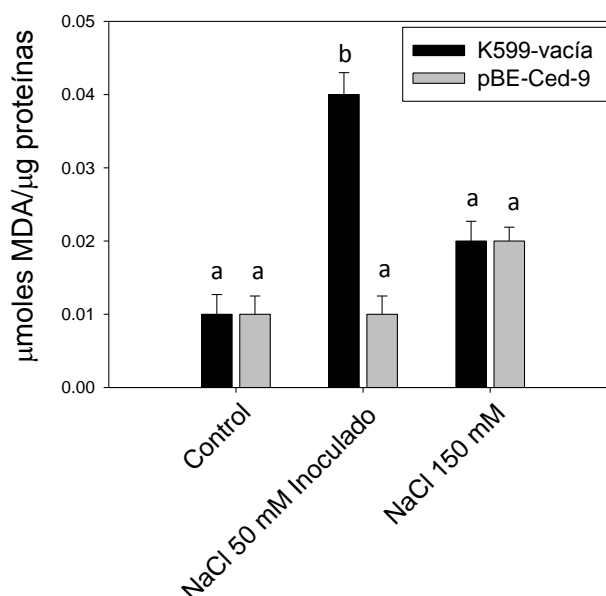


Fig. 1.19: Contenido de MDA en raíces en cabellera K599-vacía y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Niveles de ATP en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés

En la figura 1.20 se observa el contenido de ATP en raíces en cabellera K599-vacía y pBE-Ced-9 sometidas a tratamientos de estrés durante 3 h. En las raíces K599-vacía los niveles de ATP se vieron incrementados en la condición de 50 mM NaCl + *B. japonicum* mientras que no se observaron diferencias significativas en el tratamiento de 150 mM de NaCl (Fig. 1.20), patrón similar a lo observado en la cuantificación realizada en los pelos radicales. Notablemente, las raíces pBE-Ced-9 tuvieron aumentado el contenido de ATP bajo las condiciones de estrés, inclusive en el tratamiento de 150 mM de NaCl, donde se observan diferencias significativas respecto de las raíces K599-vacía (fig. 1.20).

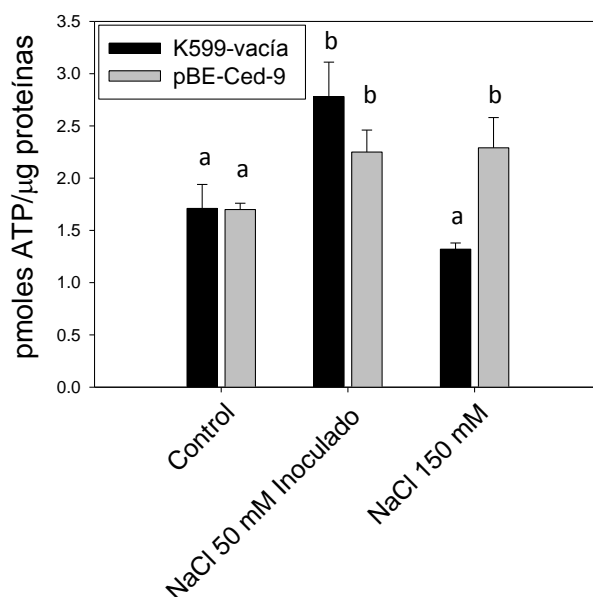


Fig. 1.20: Contenido de ATP en raíces en cabellera K599-vacía y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Contenido de iones sodio, potasio y calcio en raíces en cabellera pBE-Ced-9 sometidas a condiciones de estrés

El contenido de iones se realizó sobre las raíces en cabellera sometidas a los tratamientos de 50 mM NaCl inoculado con *B. japonicum* y 150 mM NaCl durante 3 h. La cuantificación de los iones se realizó por cromatografía líquida de alta presión.

El contenido de sodio aumentó respecto del tratamiento control en forma dosis dependiente de la concentración de sal, tanto en raíces control como pBE-Ced-9. Además, no se observaron diferencias significativas en la concentración de sodio entre las raíces control y pBE-Ced-9 en ninguno de los tratamientos realizados (Fig. 1.21A). Por otro lado, en el análisis de contenido de potasio, en las raíces control se evidenció una caída drástica en los niveles de potasio sólo en el tratamiento de 150 mM NaCl, mientras que en las raíces pBE-Ced-9 esta disminución fue menos marcada (Fig. 1.21B). Así, las raíces con expresión de Ced-9 presentaron menos alterada la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la condición 150 mM NaCl con respecto a las raíces control.

Al igual que lo observado en el contenido de potasio, la concentración de calcio disminuyó notablemente en las raíces control sólo en el tratamiento salino de 150 mM NaCl (Fig. 1.22), mientras que en las raíces pBE-Ced-9 no se registró disminución en el contenido de calcio luego de 3 h de tratamiento salino severo (Fig. 1.22).

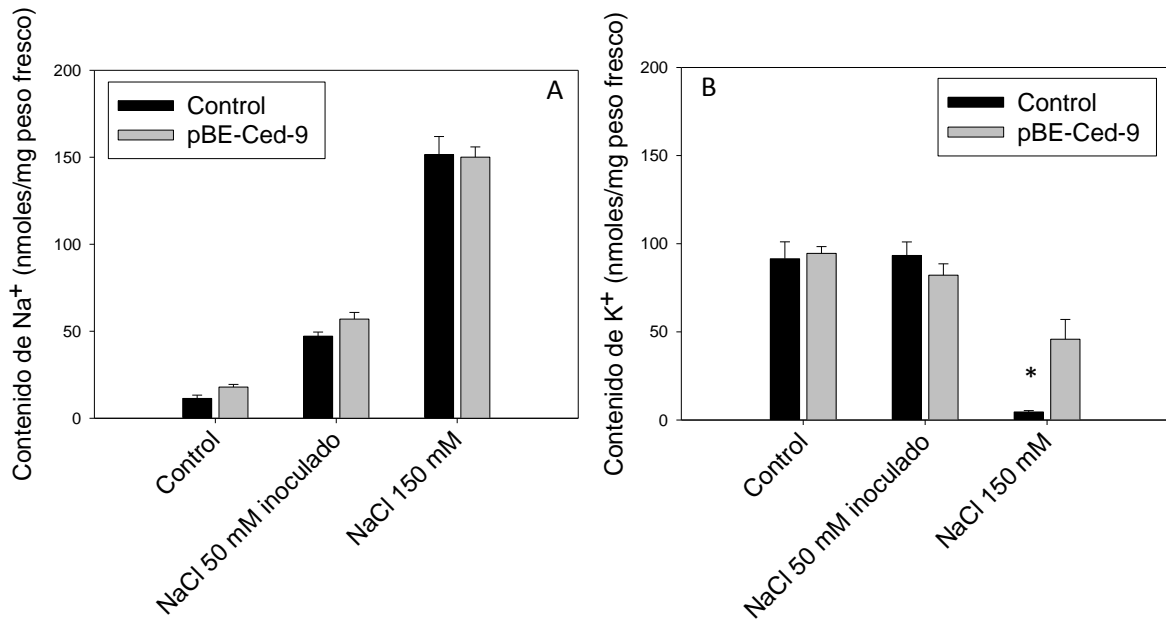


Fig. 1.21: Contenido de iones A) sodio y B) potasio en raíces en cabellera control y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones control y de estrés (50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas entre raíces K599-vacía y transgénicas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

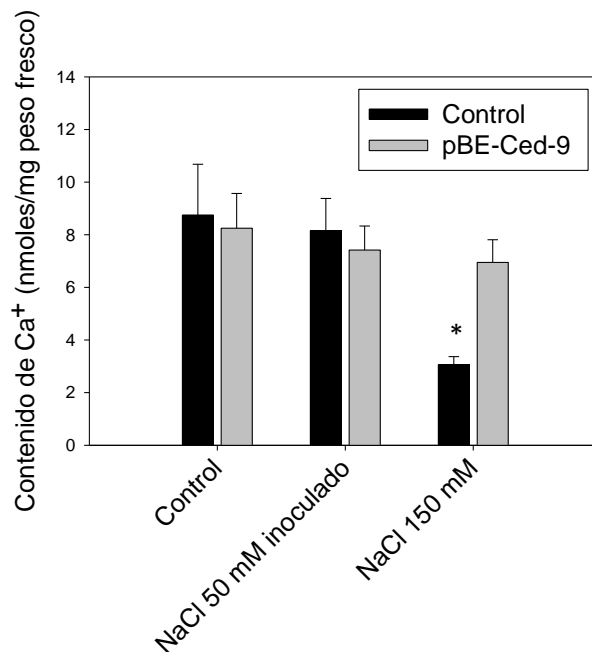


Fig. 1.22: Contenido de calcio en raíces en cabellera control y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones control y de estrés (50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas entre raíces K599-vacía y transgénicas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## ¿Conservación de los mecanismos de acción de Ced-9 en las plantas? Búsqueda de dominio putativo BH3 en ATG6/BEC-1 de *Glycine max*

Para la identificación de Atg6, se realizó una búsqueda *in silico* en la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>) que cuenta con la información de secuencias del genoma completo de soja. La estrategia utilizada fue la búsqueda por comparación empleando el algoritmo TBlastN que confronta la secuencia proteica con una base de datos de nucleótidos, traduciendo las secuencias de aminoácidos en sus seis marcos de lectura. Para cada uno de los posibles genes se analizó la puntuación general del alineamiento (*score*) y los dominios conservados en la estructura de la proteína. Se utilizaron la secuencia de aminoácidos de tres homólogos: beclina-1 de humano, Vps30 de levaduras y beclina-1 de *C. elegans*. Se identificaron dos genes, los cuales habían sido registrados previamente, Glyma11g21490 y Glyma04g26840.

El análisis de alineamiento de secuencias de los mensajeros GmAtg6/Bec-1 muestran altos niveles de identidad. Las mayores diferencias se encuentran en las regiones no codificantes (UTR). Asimismo, el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas predichas tuvo un nivel de ajuste de 95. Llamativamente, y a pesar de la alta homología entre los genes GmATG6 identificados; en la búsqueda realizada por comparación con beclina-1 de *C. elegans* mediante TBastN, solamente el gen de soja Glyma04g26840 resultó identificado. Dados estos resultados, se decidió continuar con los análisis *in silico* sobre Glyma04g26840, a quién se denominará GmAtg6.

En la Tabla 1 se observan los ajustes de alineamiento de GmAtg6 con beclina-1 de humano (HsBEC-1), Vps30/Atg6 de levaduras (ScVPS30) y otras Atg6 de plantas. Los niveles de ajuste de alineamiento entre GmATG6, HsBEC-1 y ScVPS30 fueron similares, estando alrededor del 30 % (Tabla 1). La comparación de secuencias de ATG6 de plantas mostró altos niveles de identidad, dando cuenta de la conservación de esta proteína en las plantas (Tabla 1). Asimismo, el filograma realizado muestra que ATG6 en plantas tiene un origen monofilético ancestral y altos niveles de conservación a lo largo de la evolución en las plantas (Fig. 1.23).

Nombre	Longitud (aa)	Nombre	Acceso a UniProt.org	Longitud (aa)	Ajuste del alineamiento
GmATG6	498	HsBEC-1	Q14457	450	28
GmATG6	498	ScVPS30	Q02948	557	23
GmATG6	498	MtATG6	Q4A185	508	88
GmATG6	498	PpATG6	A9S6A2	526	56
GmATG6	498	AtATG6	Q9M367	517	73
GmATG6	498	NbATG6	Q4QXM1	527	75
GmATG6	498	OsATG6	Q0JKD4	500	57
GmATG6	498	ZmATG6	Q4A190	499	57
GmATG6	498	NtATG6	A5HNG4	226	80
GmATG6	498	SmATG6	D8RIM5	483	52
GmATG6	498	CrATG6	A8HPU0	495	33
GmATG6	498	CeBEC1	Q22592	375	24
HsBEC-1	450	ScVPS30	Q02948	557	27

Tabla 1: Resultados de ajuste de los alineamientos de la secuencia de GmATG6 con beclina-1 de humano (HsBEC-1), Vps30/Atg6 de levaduras (ScVPS30), beclina-1 de *Caenorhabditis elegans* (CeBEC-1) y Atg6 de *Medicago truncatula* (MtATG6), *Nicotiana benthamiana* (NbATG6), *Arabidopsis thaliana* (AtATG6), *Zea mays* (ZmATG6), *Chlamydomonas reinhardtii* (CrATG6) y putativos ATG6 de *Physcomitrella patens* (PpAtg6), *Nicotiana tabacum* (NtATG6), *Oryza sativa* (subsp. japonica) (OsATG6) y *Selaginella moellendorffii* (SmATG6). El alineamiento fue generado mediante ClustalW.

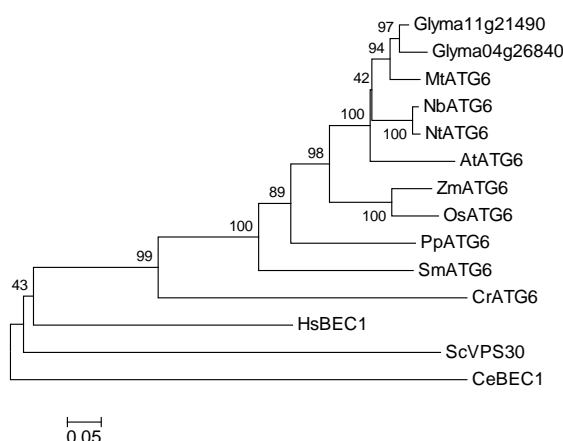


Fig. 1.23: Árbol filogenético de ATG6 de *Glycine max* (Glyma11g21490 y Glyma04g26840), *Medicago truncatula* (MtATG6), *Nicotiana benthamiana* (NbATG6), *Nicotiana tabacum* (NtATG6), *Arabidopsis thaliana* (AtATG6), *Zea mays* (ZmATG6), *Oryza sativa* (subsp. japonica) (OsATG6), *Physcomitrella patens* (PpAtg6), *Selaginella moellendorffii* (SmATG6), *Chlamydomonas reinhardtii* (CrATG6), beclina-1 de *Homo sapiens* (HsBEC-1) y de *C. elegans* (CeBEC1) y VPS30 de levadura (ScVPS30). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas por ClustalW y el árbol filogenético fue generado mediante el método de *vecino más próximo* usando MEGA5. Los valores de porcentaje de bootstrap de 1000 réplicas se dan en cada punto de ramificación.

Los mayores niveles de identidad entre GmATG6 y HsBEC-1 se encuentran en la región C-terminal, la cual se encuentra evolutivamente conservada, mientras que la región N-terminal es la más variable en secuencia. Llamativamente, se observa que en el

alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre GmATG6 y HsBEC-1 habría residuos esenciales conservados del dominio BH3 para la interacción con los homólogos de Bcl-2 (Fig. 1.24).

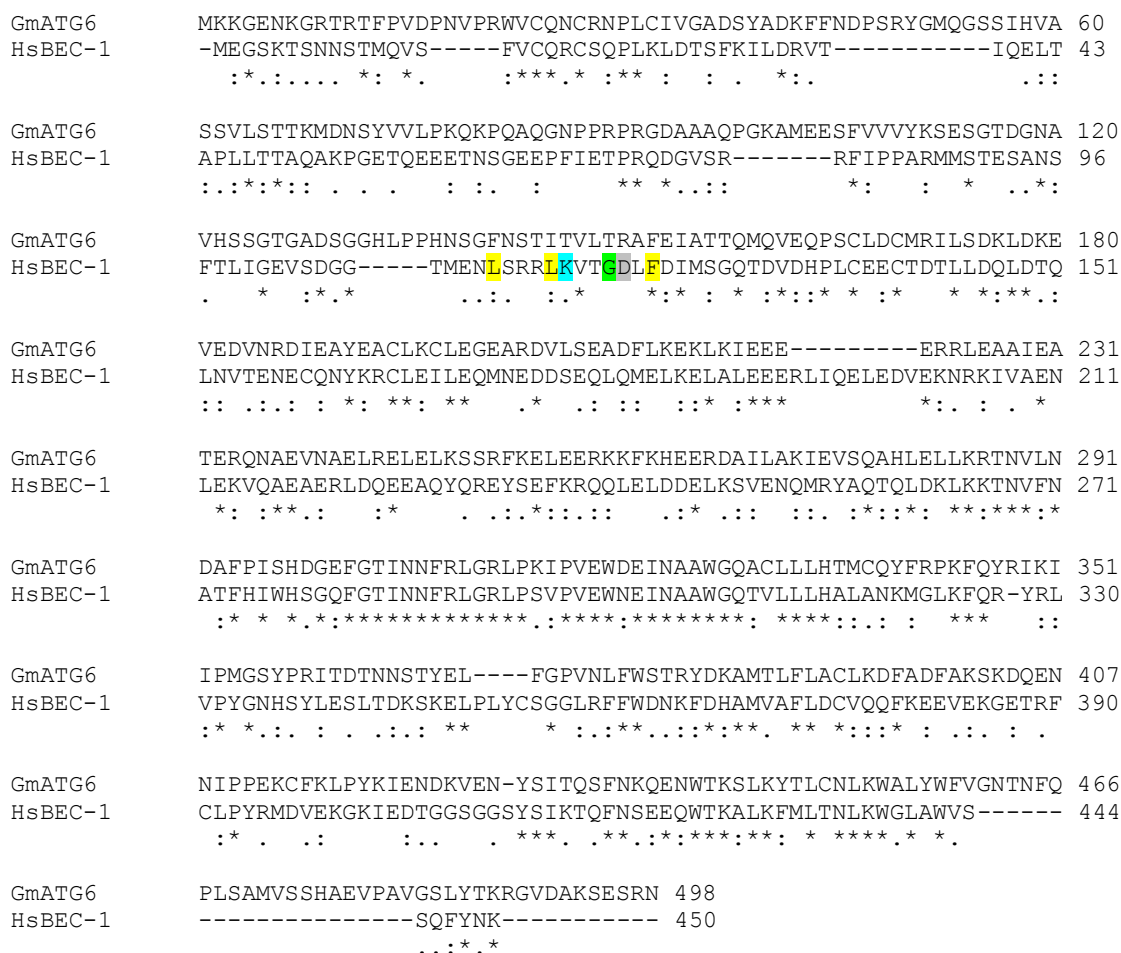


Fig. 1.24: Alineamiento de secuencia de aminoácidos de GmATG6 y HsBEC-1. Los números a la derecha marcan el número de aminoácidos. El fondo de los residuos conservados del dominio BH3 está coloreado según el tipo de aminoácido: amarillo, hidrofóbico; verde, pequeños; celeste, básicos y gris, ácidos. Asteriscos marcan residuos conservados, dos puntos sustitución conservativa y punto sustitución levemente conservativa.

Posteriormente, se realizaron alineamientos de la secuencia primaria de GmATG6 con una gran variedad de dominios BH3 de miembros conocidos de la subfamilia solo-BH3, beclina-1 de humano y ATG6/VPS30 de levaduras. Mediante estos análisis se identificó la secuencia probable de dominios BH3 cerca del extremo N-terminal de GmATG6 (Fig. 1.25A). Asimismo, los análisis de alineamiento de la secuencia del dominio

BH3 putativo mostraron altos niveles de conservación en las plantas evaluadas (Fig. 1.25B).

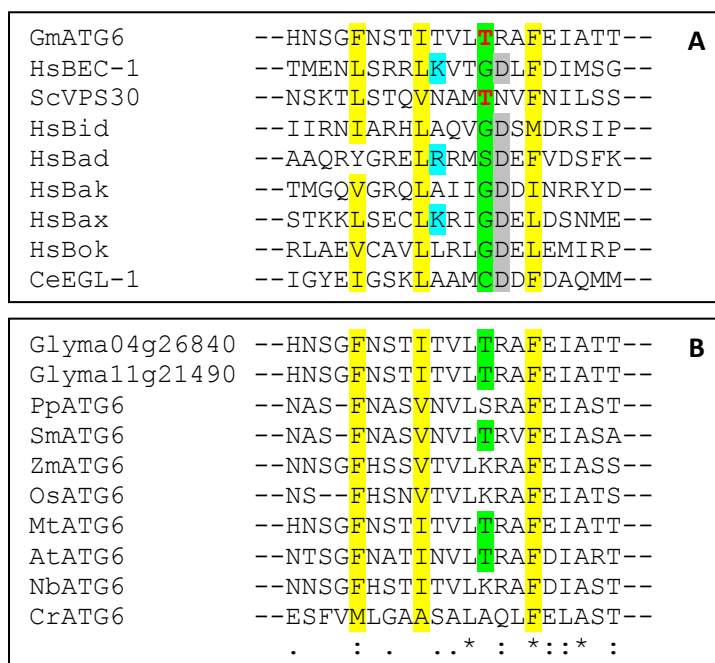


Fig. 1.25: A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región putativa BH3 de ATG6 de soja (GmATG6) y regiones de dominios BH3 de beclina-1 de humano (HsBEC-1), ATG6/VPS30 de levadura (ScVPS30) y dominios BH3 de proteínas proapoptóticas de la subfamilia solo-BH3 de humano (HsBid, HsBad, HsBax y HsBok) y de *C. elegans* (CeEGL-1). El fondo de los residuos conservados está coloreado según el tipo de aminoácido: amarillo, hidrofóbico; verde, pequeño; celeste, básico y gris, ácido. B) Región putativa BH3 en un alineamiento de secuencias de aminoácidos de ATG6 en plantas. *Medicago truncatula* (MtATG6), *Populus trichocarpa* (PtATG6), *Malus domestica* (MdATG6), *Arabidopsis thaliana* (AtATG6), *Solanum tuberosum* (StATG6), *Nicotiana benthamiana* (NbATG6), *Oryza sativa* (subsp. japonica) (OsATG6) y *Zea mays* (ZmATG6). Asteriscos marcan residuos conservados, dos puntos sustitución conservativa y punto sustitución levemente conservativa.

### Evaluación de la estructura secundaria de GmATG6

La estructura secundaria de GmATG6 y HsBEC-1 fue evaluada mediante análisis de predicción de estructura y dominios para proteínas de estructura desconocida realizados con las aplicaciones PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>), Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) y SABLE (<http://sable.cchmc.org/>) (Fig. 1.26).

Los resultados obtenidos se repitieron con el uso de los distintos programas, mostrando estructura secundaria conservada en ambas proteínas (Fig. 1.24), sin embargo, y a pesar de estar caracterizado el dominio BH3 en HsBEC-1 (Erlich *et al.*, 2007; Sinha y



Levine, 2009; He y Levine, 2010), no hubo predicción de BH3 en la secuencia de soja ni en la humana. No obstante, se observa en la región potencial del dominio BH3 en GmATG6, la predicción de una  $\alpha$ -hélice anfipática de cuatro vueltas, cercana al extremo N-terminal junto al dominio *coiled coil*, tal como se observa en HsBEC-1 (corchetes en Fig. 1.26).

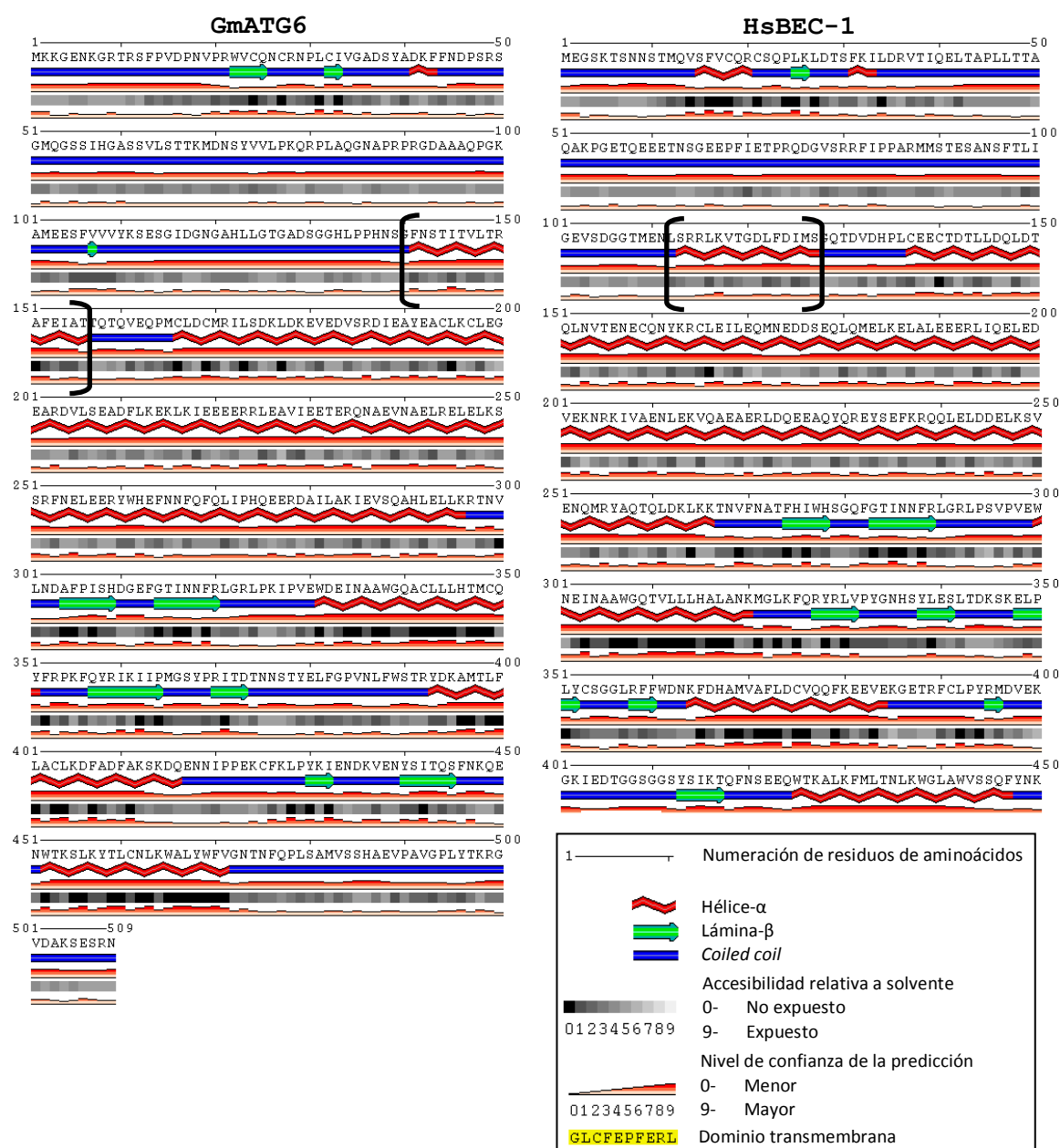
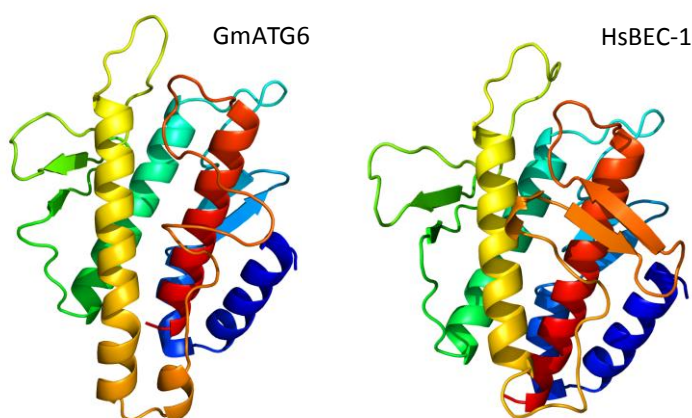


Fig. 1.26: Análisis de predicción de estructura secundaria de GmATG6 y HsBEC-1 (SABLE, <http://sable.cchmc.org/>). La zona demarcada en corchetes negros indica las regiones hélice- $\alpha$  que constituyen el dominio BH3.

## Estructura terciaria. Búsqueda de homólogos por estructura de proteínas

Recientemente, se han desarrollado varios programas de predicción de estructura de proteínas y están libremente disponibles en la web. Estos permiten la búsqueda de secuencias de la proteína diana en bases de datos de estructura de proteínas. Algunos de los más usados son PHYRE y PHYRE2 (por sus siglas en inglés, Proteome Homology/analogY Recognition Engine; [http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/\\_phyre/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/_phyre/) y <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) (Kelley y Sternberg, 2009). PHYRE y programas relacionados, pueden detectar aproximadamente tres veces el número de proteínas homólogas con respecto a programas tradicionales de búsqueda de similitud de secuencia, tales como BLAST (Kelley y Sternberg, 2009), sin embargo, también puede haber una alta tasa de falsos positivos cuando la similitud de secuencia es menor al 20 %. En general, el orden de potencia de los programas, en términos del porcentaje de un genoma típico que puede ser estructuralmente anotado utilizando estos programas, es: BLAST 20 %, PSI-Blast 40-50% y PHYRE 60-70%.



Confianza	% identidad	Función potencial
100	46	Beclina-1
100	32	VPS30

Fig. 1.27: Modelado 3D de GmATG6 realizado con PHYRE2 y comparado con el modelo de BECLINA-1 de humano (HsBEC-1). Confianza: representa la probabilidad (de 0 a 100) de que la coincidencia de secuencias entre la proteína modelo y la evaluada sea una verdadera homología. Niveles de confianza mayores al 90 % indican que la proteína evaluada está modelada con una alta precisión (2-4 Å rmsd de estructura nativa verdadera) y que adopta el plegado general que se muestra. Porcentaje (%) de identidad entre la secuencia evaluada y la modelo: para modelos de precisión extremadamente alta, se desea que este número sea superior al 30 – 40%. Sin embargo, incluso a muy bajos % de identidad (<15%) los modelos pueden ser muy útiles, siempre y cuando la confianza sea alta. Función potencial: está provista por los archivos SCOP y PDB.

Los análisis de predicción realizados con PHYRE2 mostraron un sorprendente parecido en la estructura terciaria entre GmATG6 y HsBEC-1, dado principalmente por el extremo C-terminal. Además, el análisis también arrojó altos niveles de porcentaje de identidad con VPS30, homólogo de levaduras (Fig. 1.27).

## DISCUSIÓN

Mediante la metodología de infección de meristemas cotiledonares con *A. tumefaciens* pudimos regenerar tallos transgénicos, prescindiendo de la fase de cultivo de tejidos (Fig. 1.4 y 1.5). Sin embargo, las evaluaciones de la F1 de aquellos eventos primarios positivos no mostraron resultados satisfactorios. En estos casos, las estructuras derivadas de las yemas cotiledonares (los tallos) presentan un genotipo en mosaico debido principalmente a la eficiencia de transformación de los meristemas, donde se encuentran células con genotipo silvestre y otras transgénicas. Este es un aspecto importante a optimizar y en el cual hemos seguido trabajando; no obstante, debido a la falta de resultados concluyentes en la obtención de plantas transgénicas, utilizamos herramientas alternativas para introducir en soja el gen que codifica a CED-9. En este sentido, trabajamos en la obtención de raíces *en cabellera* transgénicas mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* K599 (Fig. 1.6 y 1.7).

La obtención de raíces mediante *A. rhizogenes* ha sido descrita para numerosas leguminosas, donde las plantas compuestas con tallo sin transformar y raíces transgénicas, pueden ser noduladas por rizobios y colonizadas por micorrizas (Oldroyd *et al.*, 2005). Nuestros resultados revelaron que las raíces pBE-Ced-9 tuvieron afectado el crecimiento, mostrando un tamaño menor respecto de las raíces control (Fig. 1.8B). Este resultado está en concordancia según lo reportado por Xu y colaboradores (2004), quienes observaron que plantas de tomate transgénicas con alta expresión de Ced-9 o Bcl-xL, tuvieron afectado su crecimiento y el desarrollo de las semillas. Por otro lado, llamativamente, las plantas compuestas con raíces transgénicas pBE-Ced-9 tuvieron una nodulación marcadamente disminuida respecto de las raíces control (Fig. 1.8A), indicando que la proteína supresora de muerte celular de origen animal podría estar afectando el reconocimiento del simbionte y/o los mecanismos implicados en el establecimiento de la interacción.

Estos resultados, negativos para la puesta a prueba de nuestra hipótesis de retardo de los fenómenos de senescencia foliar y nodular, nos condujeron a estudiar los mecanismos de acción de las proteínas miembros de la familia Bcl-2. Sin embargo, a pesar del interés creciente sobre aspectos relacionados a los procesos de MCP y de los estudios realizados en plantas transgénicas con expresión de supresores de muerte celular de origen animal, donde se propone la conservación entre los reinos de los mecanismos que subyacen al proceso; no se ha esclarecido cómo estas proteínas ejercen su acción en las plantas.

Durante etapas tempranas de la interacción simbiótica soja-*B. japonicum*, la combinación de NaCl con el microsimbionte por un período reducido de tiempo (30 min)

genera la muerte de los pelos radicales (Fig. 1.9) (Muñoz *et al.*, 2012). Además, nuestros resultados muestran que los pelos radicales de raíces de poroto (*P. vulgaris*) sometidas a estas mismas condiciones, 50 mM NaCl (condición subletal) en presencia del simbionte y 150 mM NaCl, también sufrieron la inducción de eventos de muerte, sugiriendo un comportamiento común, al menos para estas dos leguminosas (Fig. 1.9). Asimismo, tratamientos de 30 min bajo condiciones de 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl conducen a la muerte celular de los pelos radicales, evaluada mediante la tinción con Azul de Evans, Azul de Trifano y la degradación de ADN, mientras que las raíces no presentaron ninguno de estos marcadores (Fig. 1.9, 1.10 y 1.11).

La primera evidencia que marcó diferencias en los procesos de muerte bajo estos tratamientos fue la generación de EAO intracelular (Muñoz *et al.*, 2012). La producción intracelular de EAO en las etapas tempranas de la interacción con el simbionte bajo condiciones de estrés salino subletal (50 mM NaCl), muestra un patrón similar al observado en las respuestas a elicitores patogénicos, los cuales no exhiben la caída posterior al pico de generación de EAO, observándose un incremento sostenido en el tiempo de los niveles de EAO intracelulares (Cárdenas *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2012), mientras que bajo condiciones de 150 mM NaCl, la producción de EAO intracelular se ve disminuída desde el comienzo del tratamiento (Muñoz *et al.*, 2012). En sintonía con este resultado, observamos diferencias en los niveles de MDA y en la relación GSH/GSH+GSSG en pelos radicales sometidos a estas condiciones promotoras de muerte celular (Fig. 1.12 y 1.13). El contenido de MDA se encontró aumentado en pelos radicales de raíces inoculadas con el simbionte y en los tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum*, condiciones en la que los niveles de EAO también se ven incrementados; mientras que no hubo cambios en la condición de muerte de 150 mM NaCl, en la cual los pelos radicales presentan una caída en la producción de EAO desde los primeros minutos (Fig. 1.12) (Muñoz *et al.*, 2011).

El glutatión se encuentra en la célula en forma principalmente reducida y la percepción de estímulos ambientales genera un incremento en el contenido de glutatión oxidado, impactando el estímulo sobre el estado redox celular (Potters *et al.* 2010). Específicamente, una caída drástica en la relación entre los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) ha sido propuesta como parámetro en la determinación de condiciones de estrés y muerte celular (Kranner *et al.*, 2006). En nuestras condiciones de muerte celular, sólo en los tratamientos de 150 mM NaCl se observó una caída del 35 % aproximadamente. En presencia del simbionte y bajo condiciones de estrés salino subletal, también hubo una disminución de la relación GSH/GSH+GSSG de alrededor del 20 % con respecto al control (Fig 1.13). Cabe recordar que durante las etapas tempranas de la

interacción rizobio-leguminosa tiene lugar un aumento en la generación intracelular de EAO, posiblemente impactando sobre el contenido de GSH.

Con el objetivo de discriminar procesos de muerte *ordenados*, se cuantificaron los niveles de adenosin trifosfato (ATP) (Casolo *et al.*, 2005) en los pelos radicales de raíces sometidas a condiciones de muerte (Fig. 1.14). Luego de la inoculación con *B. japonicum* bajo condiciones de 50 mM NaCl, los pelos radicales tuvieron niveles incrementados en la concentración de ATP, mientras que los tratamientos de 150 mM NaCl no mostraron cambios significativos en los niveles de ATP (Fig. 1.14), posiblemente debido a la intensidad del estímulo que lleva a una muerte *no ordenada*. En este sentido, la diferencia de marcación con Azul de Evans observada entre los tratamientos de muerte de 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl (Fig. 1.19A y B), también indicaría diferencias en las *velocidades de ejecución* de la muerte celular, sugiriendo la evolución de un proceso de muerte más lento u *ordenado* con respecto al otro. Por otro lado, los pelos radicales de raíces inoculadas con *B. japonicum* también mostraron aumentados los niveles de ATP (Fig. 1.14), quizás debido a incrementos en la actividad metabólica para sostener las respuestas tempranas y el crecimiento de los pelos radicales durante la interacción con el simbionte (Wan *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la expresión de Ced-9 en raíces en cabellera redujo los procesos de muerte celular bajo condiciones de estrés (Fig. 1.18). Asimismo, las raíces pBE-Ced-9 tuvieron menores niveles de MDA, indicador de peroxidación de membranas y daño oxidativo (Fig. 1.19). En adición, el contenido de ATP en las raíces transgénicas se mantuvo incrementado en los tratamientos de 50 mM de NaCl + *B. japonicum* y 150 mM de NaCl (Fig. 1.20). Estos resultados sugieren la inhibición o al menos un retardo en los procesos de muerte celular observados bajo condiciones de estrés debido a la mantención de la homeostasis celular en las raíces pBE-Ced-9.

En relación al flujo y homeostasis iónica en presencia de estrés salino, Demidchik y Maathuis (2007) sintetizan las funciones directas de los canales catiónicos no selectivos en plantas y comentan detalladamente que éstos son la principal vía de ingreso a las células vegetales de calcio y sodio. La puesta en marcha conjunta de cada tipo de canal catiónico no selectivo (CCNS) en presencia de estrés salino, determina la homeostasis iónica, evitando principalmente la pérdida de potasio y entrada de sodio. Los canales activados por despolarización (CCNS-AD) tienen alta permeabilidad al sodio y también tienen particular importancia en el movimiento de potasio. Bajo condiciones de estrés salino, altas concentraciones de sodio intra y extracelular, afectan la actividad de canales rectificadores de potasio impidiendo la salida del mismo. Sin embargo, bajo esta situación los CCNS-AD, se activan y ocurre entrada de sodio y salida de potasio. En nuestros resultados observamos que mientras el contenido de sodio se incrementa de manera dosis

dependiente en los tratamientos de estrés, sólo bajo condiciones de 150 mM NaCl la concentración de potasio presenta una caída significativa (Fig. 1.21). El contenido de iones en las raíces pBE-Ced-9 mostró diferencias con respecto a las raíces control sólo en los tratamientos de 150 mM NaCl. La expresión de Ced-9 no afectó los niveles de sodio, pero redujo la salida de potasio (Fig. 1.21). En este sentido, se ha puesto en relieve el papel fundamental de la homeostasis del potasio en la tolerancia a condiciones salinas (Shabala *et al.*, 2007; Cuin *et al.*, 2008; Shabala y Cuin, 2008). Más interesante aún, la expresión de Ced-9 en plantas de tabaco modifica el flujo de iones en respuesta a estrés salino y oxidativo, impidiendo la salida de potasio (Shabala *et al.*, 2007). Este estudio relaciona las “firmas” del flujo de iones y los mecanismos implicados en la regulación de MCP en plantas. Asimismo, en el análisis de contenido de calcio, observamos que altas concentraciones de NaCl afectaron negativamente la concentración del ión, mientras que las raíces pBE-Ced-9 no presentaron disminución significativa (Fig. 1.22). La aplicación exógena de calcio es comúnmente utilizada para aliviar los efectos negativos de la sal (Shabala *et al.* 2006) y su efecto positivo tiene fundamento en la dinámica/balance de apertura y cierre de CCNS. No obstante, estudios futuros relacionados a la localización subcelular del calcio en las raíces pBE-Ced-9 esclarecerían la participación del ión en las respuestas de tolerancia.

Se ha demostrado que la expresión de anti-apoptóticos de origen animal en plantas, influencia las vías regulatorias de activación y supresión de la muerte celular, indicando la existencia de contrapartes funcionales de dichos genes en las plantas. Esto sugiere que a pesar de las diferencias, habría un nivel de funcionalidad similar entre los componentes que forman parte de los mecanismos de MCP en plantas y animales. En animales, el principal mecanismo por el que las proteínas de la familia Bcl-2 desempeñan su función, es a través de la homo o heterodimerización con otras proteínas. Quizás el ejemplo más relevante es la modulación de autofagia mediante la unión al dominio BH3 de BECLINA-1/ATG6, mediador esencial de dicho proceso (Oberstein *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005; Takacs-Vellai *et al.*, 2005; Kourtis y Tavernarakis 2009). En plantas, se ha identificado una similitud en secuencia y a nivel funcional entre los dominios pro-apoptóticos de la proteína BID, específicamente en la región que contiene al dominio BH3, y proteínas de transferencia de lípidos en plantas. Mediante herramientas bioinformáticas identificamos dos genes putativos de ATG6 en soja, Glyma11g21490 y Glyma04g26840, cuyas proteínas predichas presentaron un alineamiento muy ajustado; mientras que los niveles de ajuste del alineamiento de GmATG6 con HsBEC-1 y con ScVPS30 estuvieron alrededor del 30 % (Tabla 1). Cabe destacar, que con dichos niveles de identidad, tanto beclina-1 de humano como ATG6 de Arabidopsis y de tabaco,

complementan levaduras mutantes *atg6* (Liang *et al.*, 1999; Fujiki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005).

En la región C-terminal de las proteínas se encontraron los mayores niveles de identidad entre GmATG6 y HsBEC-1, mientras que la región N-terminal fue la más variable en secuencia. Esta región variable de BEC-1/ATG6 participaría en la regulación de las interacciones con proteínas y/o en la regulación de la función de la región C-terminal en la autofagia. Experimentos realizados con formas truncadas de la proteína HsBEC-1, identificaron la región entre los aminoácidos 88 y 150 como el dominio mínimo de unión a Bcl-2 (Liang, *et al.*, 1998; Pattingre *et al.*, 2005). En nuestros análisis, observamos con satisfacción que las secuencias de aminoácidos entre GmATG6 y HsBEC-1 comparten residuos esenciales conservados del dominio BH3, implicados en la interacción con los homólogos de Bcl-2. Sin embargo, en la secuencia de aminoácidos de GmATG6 y en las plantas evaluadas, no se encuentra conservado el residuo D121, esencial para la interacción entre beclina-1 y Bcl-2 o Bcl-xL en animales (Fig. 1.24 y 1.25). Sin embargo, aunque las interacciones de los residuos del dominio BH3 se encuentran aparentemente conservadas en cada interacción con los homólogos de Bcl-2, la contribución de cada uno de estos residuos a la afinidad total de la interacción varía significativamente entre cada par de interacción. Por ejemplo, los residuos conservados del dominio BH3 de HsBEC-1, glicina 120 (G120) y aspártico 121 (D121), no son esenciales para la interacción con  $\gamma$ HV68 M11, homólogo viral de Bcl-2 (Sinha *et al.*, 2008). Asimismo, Erlich *et al.* (2007) evaluaron la interacción diferencial entre HsBEC-1 y distintos miembros de la familia Bcl-2 mediante ensayos de inmuno-precipitación y determinaron que HsBEC-1 se une eficientemente con Bcl-xL, Bcl-2 y Bcl-w, mientras que con Mcl-1 la interacción ocurre con menor afinidad. Además, se ha demostrado que la proteína Bcl-2 interacciona con el homólogo de beclina-1 en levaduras, ScVPS30/ATG6 y que dicha interacción afecta negativamente el proceso de autofagia en *Saccharomyces cerevisiae* (Pattingre, *et al.*, 2005), a pesar de que ScVPS30/ATG6 no conserva los residuos G120 y D121.

El dominio BH3 es difícil de identificar solamente a través de alineamientos de secuencia ya que no hay residuos invariables y que el patrón de algunos residuos se encuentra poco conservado, lo que resulta en variaciones de residuos esenciales y en la afinidad de interacción entre cada par de interacción. En consecuencia, para la identificación de este dominio, se requieren análisis combinados de secuencia y estructura molecular (Fig. 1.26 y 1.27). En este sentido, dando cuenta de la importancia no sólo de los residuos del dominio BH3 y del surco hidrofóbico, Woo *et al.* (2003) demostraron en *C. elegans* que el reconocimiento entre los miembros de la familia Bcl-2 involucraría también una superficie proteica más amplia que el dominio BH3.



## Capítulo 2

Participación del tráfico de endomembranas/autofagia en los procesos de muerte celular y en la interacción rizobio-leguminosa

# INTRODUCCIÓN

## 1. Expresión de Ced-9 en raíces en cabellera. Efectos negativos sobre la nodulación

Durante la percepción del rizobio y como respuesta específica temprana, ocurre una rápida despolarización de la membrana plasmática debida a cambios en el flujo de iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Cardenas *et al.* 2000; Felle *et al.* 2000). El único mecanismo documentado por el cual la expresión de Ced-9 en plantas ejerce sus efectos, es el descrito por Shabala y colaboradores (2007), quienes demuestran que el patrón de flujo de iones se encuentra alterado en las plantas transgénicas. Si bien bajo condiciones de estrés, específicamente salino y oxidativo, la prevención del eflujo de  $\text{K}^+$  en plantas Ced-9 retarda los síntomas de senescencia y muerte; estos cambios en las firmas del flujo iónico podrían afectar negativamente el reconocimiento del simbionte.

Por otro lado, ciertos virus han adquirido durante la evolución, genes que confieren ventajas selectivas. Las proteínas virales codificadas por estos genes suelen conservar o incluso mejorar las funciones ventajosas de sus homólogos en el hospedador y perder funciones que no benefician a los virus. En el caso de animales, proteínas virales de la familia Bcl-2 (v-BCL-2) están codificadas por todos los  $\alpha$ -herpesvirus, incluyendo los virus humanos de Epstein-Barr virus (EBV), el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) y el virus murino  $\alpha$ -herpesvirus 68 (cHV68) (Cuconati y White, 2002; Polster *et al.*, 2004). Se ha demostrado mediante resonancia magnética nuclear que las proteínas v-Bcl-2 presentan un surco hidrofóbico que interacciona con dominios BH3 de péptidos pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, tales como BAX, BAK y BEC-1, tal como ocurre con las proteínas BCL-2 de mamíferos (Loh *et al.*, 2005). De esta manera, las proteínas v-BCL-2 causan tumores y contribuyen a la persistencia del patógeno durante toda la vida del hospedador a través de la inhibición de la MCP, promoviendo la infección crónica. En este sentido, se ha encontrado cierto nivel de identidad entre los dominios NB-ARC de las proteínas promotoras de muerte celular y algunos genes de resistencia involucrados en la respuesta hipersensible (van der Biezen y Jones, 1998) lo que ha dado lugar a la presunción que la expresión de Ced-9/Bcl-2 en plantas podría afectar el desarrollo de la HR a través de la interacción con los receptores de las plantas, de manera similar a como se unen con las proteínas pro-apoptóticas. Recientemente, se ha determinado que los receptores de efectores simbióticos en soja, Rj2 y Rfg1, pertenecen a la clase de proteínas de resistencia (R). La participación de los genes de resistencia en el control de la infección y la nodulación, revela un mecanismo de reconocimiento que es común en las interacciones patogénicas y simbióticas, sugiriendo que el establecimiento de la simbiosis

exige la evasión de la respuesta inmune activada por efectores de rizobios (Yang *et al.*, 2010). De nuestros resultados se desprende la suposición que Ced-9 podría afectar el reconocimiento del rizobio debido a su potencial capacidad de interacción con los receptores de efectores simbióticos.

En las plantas, los rizobios son individualmente interiorizados a través de un proceso similar a la endocitosis. Sin embargo, el estudio de la localización de marcadores de identidad de membrana de los distintos compartimentos endocíticos, no mostró ninguna asociación de los reguladores clave de la vía de endocitosis en las etapas iniciales de la formación del simbiosoma. Sólo en etapas tardías del desarrollo del simbiosoma se observó la pequeña GTPasa Rab7, un marcador de endosoma tardío/vacuolar; mientras que el retraso en la adquisición de identidad vacuolar (capacidad lítica), aseguraría la supervivencia (Limpens *et al.*, 2009). Asimismo, el correcto desarrollo de los nódulos en *Medicago truncatula* requiere la secreción de proteínas específicas. El bloqueo de esta secreción ordenada mediante la mutación de una proteína clave, genera numerosos autofagosomas en las células de los nódulos, los cuales mostraron afectado el desarrollo de bacteroides y simbiosomas (Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha determinado si la acumulación de autofagosomas es una consecuencia primaria o indirecta de la mutación. Esta acumulación de autofagosomas puede reflejar el retraso en la maduración de vesículas en la planta mutante o pueden estar relacionados con el desarrollo alterado de la vacuola, observado en las células de los nódulos jóvenes.

Si bien no hay pruebas directas de la participación de autofagia en las interacciones rizobio/leguminosa, existen evidencias para la postulación de hipótesis vinculando dicho proceso con el desarrollo de la interacción. Además, el hecho de que los supresores llevan a cabo sus efectos a través de la interacción con otras proteínas, por ejemplo modulando autofagia por interacción con Beclina-1/Atg6, nuestros resultados nos estimulan a plantear la hipótesis de que la expresión en soja de supresores de muerte celular de origen animal pertenecientes a la familia Bcl-2, modula el proceso de autofagia a través de la interacción con el dominio BH3 de ATG6/BEC-1, afectando de esta manera la sobrevivencia celular y la interacción soja-*B. japonicum*.

Los antecedentes mencionados y los resultados obtenidos en esta Tesis, nos condujeron a evaluar los efectos de la expresión de Ced-9 en el tráfico de endomembranas y la participación de este proceso en los eventos de muerte celular y en la interacción soja-*B. japonicum*.

## 2. Metabolismo de lípidos y tráfico de vesículas. Participación de Fosfatidil-inositol 3-kinasa

Los organismos eucariotas responden a una amplia variedad de factores bióticos y abióticos a través de la activación de vías de señalización de lípidos mediante la producción de fosfatidil-inositoles (PI) (Meijer y Munnik, 2003). El grupo mioinositol sufre modificaciones por la acción de fosfoinosítido lípido-quinazas (Cote y Crain, 1993). Los PI participan en la regulación transcripcional (Gonzales y Anderson, 2006), en la activación de las vías autofágicas (Kihara *et al.*, 2001), en respuestas a patógenos (Yilmaz *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005), en el crecimiento celular polarizado (Monteiro *et al.*, 2005; Yuree Lee *et al.*, 2008), señalización celular (Meijer y Munnik, 2003) y en el mantenimiento de procesos de vesiculización constitutivo e inducido por estrés (Simonsen *et al.*, 2003). Gran parte de los efectos regulatorios de los PI son debidos a su capacidad de actuar como ligandos específicos para proteínas. Pueden unirse a proteínas integrales de membrana o reclutar proteínas citosólicas a la membrana (Heilmann, 2009) regulando su actividad. Esta interacción es posible debido a la presencia de dominios de unión a PI, presentes en ciertas proteínas. Algunos ejemplos son los dominios PH (*Pleckstrin homology*), dominios FYVE (la denominación FYVE hace referencia a las primeras cuatro proteínas descubiertas que contenían este dominio: Fab1, YOTB, Vac1, y EEA1) o dominios PX (*Phox homology*), los cuales pueden unir diferentes PI (Lemmon, 2003). Un gran número de proteínas codificadas en los genomas eucariotas contienen dominios específicos de unión a PI, lo que sugiere que una gran variedad de procesos celulares involucran esta interacción como parte de un mecanismo de control. Además de interactuar con proteínas, la acumulación localizada de PI afecta las propiedades biofísicas de las membranas. En este sentido, PI con ácidos grasos con alto grado de insaturación van a localizarse en áreas de curvatura de la membrana. De hecho, la presencia de estos lípidos favorece la formación de vesículas.

Entre las enzimas involucradas en el metabolismo de PI se encuentra el grupo de las PI-3-kinasa (PI3K), las cuales fosforilan el anillo inositol en la posición D-3 y se clasifican en tres clases de acuerdo a la relación de secuencia de aminoácidos (Fruman *et al.*, 1998). Los diversos efectos de la transducción de señales mediadas por PI3K dependen de la interacción de los productos lipídicos de las kinasas con múltiples proteínas. En animales, se han identificado moléculas señal relacionadas a PI3K clase-I e incluyen a fosfatidil-inositol 3-fosfatasa (PTEN), proteína kinasa-1 dependiente de 3-fosfoinosítido (PDK1) proteína kinasa B (PKB)/c-Akt. PTEN es una fosfatasa de lípidos que hidroliza el fosfato en posición D-3 del grupo inositol, atenuando así la señalización mediada por PI3K. AKT es reclutada a la membrana plasmática por unión a PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, donde a su vez fosforila numerosas proteínas e induce así efectos multifacéticos de PI3K. La

identificación de homólogos en las plantas de proteínas ubicadas *rio abajo* de PI3K, puede ser una forma de obtener indicios acerca de la señalización de PI3K. En efecto, se han identificado homólogos de PTEN y PDK1 en plantas (Deak *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002); sin embargo, las plantas no poseen PI3K clase-I ni el producto de su actividad, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Meijer y Munnik, 2003; Munnik y Testerink, 2009). Sólo PI3K clase-III se encuentra presente en plantas (Dove *et al.*, 1994; Welters *et al.*, 1994), conservada desde eucariotas inferiores hasta animales y se ha demostrado que tanto PTEN como PDK1 unen PI3P en plantas (Munnik y Testerink, 2009; Deak *et al.*, 1999).

La amplia y significativa participación de PI3K en el desarrollo y crecimiento de las plantas fue sugerido por los resultados de Welters y colaboradores (1994), quienes regeneraron plantas de *Arabidopsis* a partir de callos transformados con una construcción anti-sentido de *AtVps34*. La regeneración de tallos y raíces fue lenta y la producción de semillas fue pobre. La siguiente generación no sobrevivió al medio con antibiótico, de hecho, aún en medio sin antibiótico, las hojas tuvieron forma anormal y la elongación del pecíolo y la formación del tallo estuvieron seriamente afectadas.

En adición a la participación de PI3K en el desarrollo de los tejidos vegetativos, esta enzima también tiene roles en los tejidos reproductivos (Lee *et al.*, 2008). En este sentido, cuando plantas heterocigotas *VPS34/vps34* fueron autopolinizadas, tuvieron una proporción de segregación de 1:1:0 para fenotipo silvestre, heterocigota y homocigota, respectivamente. Por lo tanto, no se obtuvieron mutantes homocigotas sin expresión de PI3K, sugiriendo un defecto gametofítico.

El PI3P, producto de la actividad PI3K, cumple importantes roles en la regulación del tráfico constitutivo de proteínas y en el tráfico inducido por condiciones de estrés a través de vías autofágicas, es requerido para el tráfico continuo de proteínas sintetizadas *de novo* y receptores hacia endosomas y vacuola (Simonsen *et al.*, 2001; Nice *et al.*, 2002; Wurmser y Emr, 2002), para el movimiento de proteínas del trans-Golgi a vacuola/lisosoma (Schu *et al.*, 1993) y en la regulación del citoesqueleto de actina (Yin y Janmey, 2003; Dove *et al.*, 1994). En este sentido, proteínas con dominios de alta afinidad a PI3P, por ejemplo con dominios FYVE, median la actividad biológica del PI3P (Leever *et al.*, 1999; Gillooly *et al.*, 2001).

En el año 2011, Zhang y colaboradores mostraron que PTEN de *Arabidopsis* regula autofagia en tubos polínicos alterando la dinámica de PI3P. En dicho trabajo, la sobre-expresión de PTEN interrumpió la dinámica de autofagosomas y la población de endosomas. Asimismo, tratamientos con wortmanina, un inhibidor de PI3K, tuvieron consecuencias similares. Estos efectos fueron revertidos por adición exógena de PI3P o por sobre-expresión de PI3K clase-III.

### 3. Tráfico de endomembranas. Participación en las respuestas a condiciones de estrés

Diversos trabajos han evaluado que durante la autofagia también participan proteínas motoras del citoesqueleto, proteínas implicadas en la unión de vesículas a su objetivo, Rab GTPasas y sus efectores, como así también otras proteínas implicadas en el tráfico de endosomas, tales como los complejos SNARE y ESCRT; y han sugerido la importancia de las vías de tráfico vesicular en los procesos de autólisis (Ishihara *et al.*, 2001; Munafo *et al.*, 2002; Atlashkin *et al.*, 2003; Rusten *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Ravikumar *et al.*, 2008; Fader *et al.*, 2008). Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, la enzima PI3K tiene un rol clave en los eventos de endocitosis y también forma parte del complejo PI3K, junto a ATG6/BEC-1 y otras proteínas, el cual es requerido para el proceso de autofagia (Kihara *et al.*, 2001).

Por otro lado, estudios de complementación demostraron que la expresión de beclina-1 de humano puede restaurar la autofagia en levaduras mutantes *atg6*, pero no el tráfico de proteínas, por lo que su participación en las vías de tránsito de vesículas es controversial (Liang *et al.*, 1999). Sin embargo, un estudio posterior encontró que UVRAG, proteína que interacciona con HsBEC-1, participa en el tráfico de vesículas endocíticas, por lo que no se descarta la posibilidad de que HsBEC-1 tenga otras funciones además de autofagia en mamíferos (Itakura *et al.*, 2008). En las plantas, a pesar de que componentes claves del complejo PI3K, tales como ATG6/BEC-1, PI3K, VPS15 y UVRAG están presentes, aún no se han demostrado las interacciones. Asimismo, al igual que beclina-1 en animales, la expresión de Atg6/bec-1 de Arabidopsis y de tabaco también restablecieron el proceso de autofagia en levaduras mutantes *atg6* (Fujiki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005), mientras que un solo trabajo postuló que también restablecería la vía citoplasma-a-vacuola (Fujiki *et al.*, 2007). No obstante, un trabajo posterior no pudo restituir la vía citoplasma-a-vacuola en ensayos de complementación en levaduras (Harrison-Lowe y Olsen, 2008). En consecuencia, aún no hay consenso sobre la participación de ATG6/BEC-1 en el tráfico de proteínas en las plantas.

Nuevos estudios han revelado una alta vinculación entre procesos de tráfico de vesículas y autofagia, categorizados inicialmente como eventos separados, donde proteínas ATG participan también en eventos de tránsito y fusión de vesículas y miembros de proteínas implicadas en el tráfico durante la autofagia (Zeng *et al.*, 2006; Bassham, 2007; Farré y Subramani, 2011; Bodemann *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2011). De acuerdo a esta “multiplicidad” en la función de ciertas proteínas y a la alta interconexión de los procesos, denominaremos como *tráfico de endomembranas* a los eventos de tránsito de vesículas y autofagia.

**Vesiculización-** Condiciones de estrés inducen cambios en la producción de PI, sugiriendo la participación de PI en la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales y se ha reportado que PI3P actúa en los procesos adaptativos frente a condiciones de estrés salino a través de la activación del proceso de endocitosis e internalización de la membrana (Mazel *et al.* 2004; Leshem *et al.*, 2007). En este sentido, el tráfico intracelular de vesículas, ha sido propuesto como ruta de control en presencia de estrés. Las membranas, un blanco principal de daño oxidativo han de ser recicladas constantemente y el ajuste en la tasa de tráfico desde y hacia la membrana plasmática sería una vía de regulación en presencia de estrés (Levine 2002). En este sentido se ha citado que plantas que sobre-expresan proteínas asociadas al tráfico intracelular de vesículas, muestran tolerancia incrementada a estrés salino (acumulan sodio en vacuola) y osmótico, como así también reducida producción de EAO (Mazel *et al.* 2004).

Se ha citado que la producción de EAO en el apoplasto por actividad NADPH oxidasa se afecta en presencia de estrés salino pero no se modifica en condiciones de estrés osmótico. La carencia de producción de radical superóxido apoplastico en presencia de sal, ha sido correlacionada con una inhibición del crecimiento en la zona de elongación de raíces y hojas en monocotiledóneas (Rodriguez *et al.* 2002, 2004, 2007; Bustos *et al.* 2008). En contraste, otros trabajos muestran que condiciones de estrés salino inducen la generación apoplástica e intracelular de EAO y esta respuesta no se observa en condiciones de estrés osmótico (Miller *et al.* 2010). Leshem *et al.* (2007), observaron que en raíces de *Arabidopsis* tratadas con 150 mM NaCl, ocurre un incremento de EAO intracelulares cuyo origen es el complejo NADPH oxidasa. Estas EAO se encuentran concentradas en endosomas, producto de la inducción de procesos de endocitosis de la membrana plasmática donde reside el complejo NADPH oxidasa, y donde la actividad de la enzima PI3K parece jugar un rol clave. Cuando este proceso de vesiculización se inhibe, se incrementa la susceptibilidad a estrés salino y han sugerido un posible rol de esta respuesta en tolerancia a la sal. En un análisis exhaustivo, Leshem *et al.* (2006) describen la importancia del destino de endosomas que contienen EAO en raíces de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino. Detalla como estas vesículas con EAO en presencia de sal, se fusionan continuamente con el tonoplasto de la vacuola y afectan la funcionalidad de bombas y canales, generando un cambio en el pH de la vacuola, alteraciones en el contenido de la misma y vertido de calcio citoplásmico. Si se inhibe la fusión de estas vesículas que contienen EAO con la vacuola, se obtienen fenotipos con tolerancia incrementada a la salinidad.

La homeostasis iónica intracelular es fundamental en el mantenimiento de las funciones fisiológicas (Munns y Tester 2008). Una adecuada regulación del flujo iónico es necesaria para mantener en la célula, bajas concentraciones de iones tóxicos y altas

concentraciones de iones esenciales. Las plantas ponen en marcha diversas estrategias que permiten recluir grandes cantidades de sodio o eliminarlo al medio extracelular, por ejemplo a través de glándulas salinas (Zhu 2003). Para ello, se activan diversas formas de transporte de iones para mantener la homeostasis celular en presencia de sal: transporte activo mediado por H<sup>+</sup>-ATPasas, co-transporte y apertura de canales. A diferencia de los animales, las plantas no poseen Na<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasas y usan H<sup>+</sup>-ATPasas o H<sup>+</sup>-pirofosfatasas para generar la fuerza protón motriz que dirige el transporte de iones, por ejemplo, Na<sup>+</sup> del citoplasma hacia la vacuola. (Shi *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2002). Una práctica agrícola común para aliviar los efectos negativos de la sal es la aplicación exógena de calcio (Rengel *et al.* 1992; Shabala *et al.* 2006). Se ha sugerido que parte del efecto positivo del calcio está relacionado con el balance en la apertura y cierre de canales catiónicos no selectivos (CCNS), ya que éstos participan no sólo en la entrada de sodio, sino también en la salida de potasio, y contribuyen así a la homeostasis iónica celular (Demidchick *et al.* 2007).

**Autofagia-** En el análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 12 ortólogos de los 15 genes conocidos de autofagia en levaduras (Hanaoka *et al.*, 2002). Además, estos análisis revelaron que en las plantas ha ocurrido una expansión en muchos de estos genes claves. En los complejos de activación y reparto de membrana, la familia ATG1 cuenta con 4 genes, ATG13 con 2 y ATG18 con 8 genes, mientras que los sistemas de conjugación han incrementado la representación de ATG4 y ATG12 con 2 genes y ATG8 con 9 genes (Bassham *et al.*, 2006; Hanaoka *et al.*, 2003; Hayward *et al.*, 2009). Se puede inferir que la expansión de estas familias de genes en las plantas podría incrementar la amplitud y especificidad de las funciones de autofagia, sin embargo, no hay hasta el momento evidencias concretas que apoyen esta hipótesis. No obstante, existen evidencias de una expresión diferencial de estas proteínas bajo distintas condiciones (Seay *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2009). Además, en animales hay reportes que evidencian especificidad de sustratos dirigidos hacia la degradación autofágica dada por proteínas de interacción con LC3, ortólogo de ATG8 (Kirkin *et al.*, 2009). Contrariamente, en las plantas, aunque muchas de las familias que presentan miembros adicionales no han sido estudiadas profundamente, al menos los miembros adicionales de ATG1, ATG4 y ATG12 proveerían redundancia funcional (Chung *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2005; Yoshimoto *et al.*, 2004). Notablemente, ATG6/BEC-1 aparece como “interruptor” molecular del proceso de autofagia, debido a que el análisis de plantas mutantes en proteínas ATG reveló que *atg6* es la única mutación, hasta el momento, que presenta niveles nulos de autofagia (Hayward y Dinesh-Kumar, 2011).

El proceso de autofagia ha sido implicado en los mecanismos de tolerancia bajo condiciones de estrés abiótico, tales como sequía y estrés salino (Liu, *et al.*, 2009); estrés



oxidativo (Xiong *et al.*, 2007) y deficiencia de nutrientes (Yoshimoto *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2006; Bassham *et al.*, 2006). Sin embargo, las plantas deficientes en autofagia presentan homeostasis alterada, que se manifiesta en la pérdida rápida de las proteínas de los cloroplastos, mitocondrias y citoplasma (Thompson *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2008) e incrementos en los niveles de proteínas oxidadas en comparación con plantas silvestres (Xiong *et al.*, 2007). Esta alteración en la homeostasis podría conducir al fenotipo de senescencia prematura, de tal forma que la susceptibilidad de estas mutantes a las condiciones de estrés podría deberse a la fisiología afectada y no tanto a una participación específica de autofagia en los mecanismos de tolerancia. En este sentido, ensayos de inhibición farmacológica del proceso o mutantes inducibles son herramientas importantes para el estudio de autofagia.

Mediante ensayos con inhibidores del complejo NADPH oxidasa, Liu y colaboradores (2009) lograron inhibir la inducción de autofagia en plantas sometidas a estrés salino, pero no en plantas bajo estrés osmótico, sugiriendo la existencia de vías de regulación del proceso dependientes e independientes de la actividad NADPH oxidasa. Por otro lado, tratamientos de plantas de *Arabidopsis* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaron en estrés oxidativo severo y condujeron a la inducción de autofagia (Xiong *et al.*, 2007). En este sentido, diversos estudios en plantas y algas han demostrado la participación de la autofagia en las respuestas de adaptación a diferentes condiciones que involucran la generación de EAO (Xiong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Perez-Perez *et al.*, 2010, 2012), como así también la participación de las EAO en la inducción del proceso de autofagia (Minibayeva *et al.*, 2012).

### **3.1. Autofagia: ¿promoción o inhibición de la MCP?**

El proceso de autofagia fue identificado en un principio en respuesta a condiciones limitantes de nutrientes, ya que la degradación del material secuestrado genera nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos libres que serán reciclados para la síntesis de macromoléculas y la generación de ATP. Posteriormente se identificaron funciones homeostáticas y biosintéticas, por ejemplo en condiciones donde no son requeridos, los peroxisomas son degradados a través de un tipo específico de autofagia denominado pexofagia (Kim y Klionsky, 2000). Actualmente, autofagia se encuentra implicada en diversas respuestas a condiciones de estrés y en el desarrollo de plantas (Bassham *et al.*, 2006, 2007; Xiong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005, 2009; Liu y Bassham, 2011; Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Hayward *et al.*, 2009) y animales (Kourtis y Tavernarakis, 2009; Cao y Klionsky, 2007; Levine *et al.*, 2004).

Existen muchos ejemplos de MCP durante distintos estados del desarrollo y se ha sugerido que procesos de autofagia serían responsables de la muerte celular (Pennell y

Lamb, 1997; van Doorn y Woltering, 2005). Recientemente, se publicó un trabajo que muestra las funciones de autofagia en la diferenciación de los elementos del xilema en *Arabidopsis*, donde RabG3b, proteína de unión a GTP, funciona como componente regulador de autofagia activando el proceso de diferenciación (Kwon *et al.*, 2010). Otro proceso de MCP que tiene lugar durante el desarrollo de las plantas es la senescencia (Thomas *et al.*, 2003; Xu y Hanson, 2000; Quirino *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008; Myint *et al.*, 2011). Una característica común observada en distintas plantas mutantes (*atg4a/b*, *atg5*, *atg7*, *atg9*, *atg10* y *atg12*) es la ocurrencia de una senescencia temprana (Chung *et al.*, 2010; Doelling *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2005; Yoshimoto *et al.*, 2004; Hanaoka *et al.*, 2002). Este fenotipo parece contradictorio teniendo en cuenta que el proceso de autofagia formaría parte de los mecanismos de degradación y removilización durante la senescencia. Sin embargo, se ha demostrado que procesos vinculados a autofagia funcionan eficientemente también en tejidos jóvenes no senescentes (Sláviková *et al.*, 2005) y en la removilización del nitrógeno (Guiboileau *et al.*, 2012) bajo condiciones de crecimiento favorables y de deficiencia de nutrientes. La autofagia permite el reciclado de componentes celulares, incluyendo las organelas, durante el desarrollo y frente a condiciones de estrés. Además de proveer macromoléculas, este proceso degrada material tóxico o dañado, por ejemplo mitocondrias (Kanki *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2009) y cloroplastos (Ishida *et al.*, 2008, 2008b; Wada *et al.*, 2009) que son fuentes generadoras de EAO y señales inductoras de senescencia y MCP.

En el año 2005 se publicó un trabajo que iba a generar la explosión de estudios relacionados al proceso de autofagia (Liu *et al.*, 2005). En dicha publicación, los autores mostraron que las vías autofágicas juegan un rol esencial en las respuestas de inmunidad innata regulando negativamente la MCP durante la propagación de la lesión de RH. Trabajos posteriores obtuvieron resultados similares, postulando al proceso de autofagia como mecanismo de sobrevivencia (Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Hayward *et al.*, 2009). Contrariamente, en el año 2009, Hofius y colaboradores presentaron un primer ejemplo de vías de MCP específicas de la señalización inmune mediada por genes de resistencia, que involucran mecanismos de autofagia y que podrían funcionar paralelamente con otros caminos pro-muerte. Respecto a estos resultados, Hayward y Dinesh-Kumar (2011) atribuyen una posible falla de las plantas deficientes en autofagia en el reconocimiento de los patógenos y en la respuesta inmune basal o a una inducción lenta de las señales pro-muerte debido a la homeostasis alterada de las organelas en las plantas mutantes, manifestada en la pérdida rápida de proteínas de mitocondrias y cloroplastos (Thompson *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2008). No obstante, esta última hipótesis parece controversial, ya que resulta más esperable que una perturbación en la homeostasis de las organelas, principalmente mitocondrias y cloroplastos, induzca de manera más rápida el proceso de

senescencia y muerte celular. Por último, postulan la posibilidad que, tal como ocurre con el ácido salicílico (SA) y las EAO, en el sitio de infección ocurriría una marcada inducción del proceso de autofagia que contribuiría a una MCP tipo II o autofágica. Es probable que la señal asociada a esta inducción decaiga a medida que se extiende a tejidos vecinos, disminuyendo la actividad autofágica a un punto donde no es suficiente para causar la muerte celular, sino por el contrario, asumir roles citoprotectivos tal vez mediante la eliminación de señales pro-muerte (Hayward y Dinesh-Kumar, 2011). Recientemente, se identificó a Atg8h en estudios de doble híbrido en levaduras en búsqueda de proteínas interactoras con Adi3 (Devarenne, 2011), una serin/treonin AGC kinasa, producto del gen de resistencia Pto, que interacciona con la proteína bacteriana AvrPto generando RH (Pedley y Martin, 2003). En mamíferos, las kinasas del tipo AGC están reguladas por una proteína kinasa dependiente de fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) (PDK1) (Belham *et al.*, 1999). Adi3 parece funcionar de manera análoga a la proteína kinasa de mamífero AGC PKB/Akt, regulando negativamente la muerte celular a través de la fosforilación de PDK1 (Devarenne, *et al.*, 2006). Los autores especulan que la función de regulación negativa de Adi3 podría ser alterada por la interacción con AvrPto, que conduce a la muerte celular asociada con el ataque de patógenos (Devarenne *et al.*, 2006). Trabajos futuros podrían determinar el papel específico de la interacción Adi3/Atg8h en el control de la autofagia y la muerte celular.

#### 4. Interacción rizobio-leguminosa

Diversos cambios bioquímicos, genéticos y morfológicos son inducidos en pelos radicales de leguminosas durante la interacción simbiótica con rizobios (Gage 2004; Oldroyd y Downie *et al.* 2008; Smit *et al.* 2007; Meschini *et al.* 2008; Brechenmacher *et al.* 2008). La percepción de factores Nod por receptores específicos induce en pelos radicales, despolarización de la membrana plasmática, alcalinización intracelular, oscilaciones de calcio en cercanías del núcleo y producción de especies activas de oxígeno (EAO). Estas respuestas inducibles dan lugar a eventos de señalización que incluyen: fosfolípidos, citoesqueleto, vesiculización y expresión de genes específicos, que comienzan a conducir el reconocimiento e infección. Estos eventos ocurren en los minutos posteriores a la aplicación de factores Nod y algunos de ellos son comunes a los que se desencadenan en presencia de elicitors de patógenos (Cárdenas *et al.* 2000; Wais *et al.* 2000; Felle *et al.* 2000; Supanjania *et al.* 2006; Nanda *et al.* 2010).

La curvatura del pelo radical es uno de los primeros efectos morfológicos visibles y un paso esencial en la interacción simbiótica, ya que la deformación del pelo genera un espacio, donde el rizobio queda “protegido”, y de modo clonal comienza a dividirse y es incorporado por endocitosis hacia el interior del pelo, dando lugar a la formación de un

hilo de infección (Oldroyd y Downie 2008). En este sentido, para que la deformación de un pelo en crecimiento ocurra, toda la maquinaria que participa en el crecimiento debe funcionar correctamente y en asociación con las respuestas generadas por la percepción de factores Nod (Gage 2004; Oldroyd y Downie 2008). Algunos de los procesos celulares que forman parte activa en el mantenimiento del crecimiento polar son: producción de especies activas de oxígeno (Foreman *et al.* 2003; Rachel y Dolan 2006; Jones *et al.* 2007), flujo de iones (Very y Davis 2000; Demidchik y Maathuis 2007), modificaciones en los pH intracelulares y apoplásticos (Monshausen *et al.* 2007), activa ocurrencia de procesos de endo y exocitosis en estrecha asociación con el citoesqueleto (Bibikova *et al.* 1999; Baluska *et al.* 2000; Ketelaar y Emons 2001) y formación de nueva pared celular (Vissenberg *et al.* 2001).

En un pelo en crecimiento, el citoplasma y el núcleo están concentrados en la región subapical, mientras que la parte más basal del pelo está altamente vacuolada. La región citoplásmica subapical contiene retículo endoplásmico, mitocondrias, plastidios y cuerpos de Golgi. En la base de la región subapical se encuentra el núcleo y hacia el extremo, la punta en expansión. El extremo se encuentra lleno de vesículas que depositan y quitan material de la membrana plasmática de un pelo en elongación. Durante el crecimiento del pelo radical, la tasa de exocitosis es increíblemente alta y se ha sugerido que se deposita más membrana de la que realmente es necesaria para elongarse, por lo que en esta etapa los procesos de endocitosis cobran notable importancia, reingresando entre otras cosas, material depositado en exceso (Sieberer y Emons 2000; Sieberer *et al.* 2002; Ovecka *et al.* 2005). El movimiento de vesículas está regulado por vías de señalización que involucran pequeñas GTPasas, proteínas kinasas, influjo de calcio, EAO y fosfolípidos (Hepler *et al.*, 2001; Cole y Fowler, 2006; Samaj *et al.*, 2006).

#### **4.1. Participación de las especies activas del oxígeno en la interacción rizobio-leguminosa**

Durante el desarrollo del proceso de nodulación, desde la detección mutua planta-microsimbionte en la rizosfera, hasta el desarrollo del nódulo maduro y funcional, las EAO juegan roles claves (Santos *et al.* 2001; Ramu *et al.* 2002; Pauly *et al.*, 2006; Lee MY *et al.*, 2005; Cárdenas *et al.* 2008; Muñoz *et al.*, 2012). Se ha reportado en *Medicago truncatula* una reducción en los flujos de EAO luego de 20-30 minutos de la aplicación de factores Nod y mutantes que no nodulan no muestran esta respuesta frente a factores Nod (Shaw y Long, 2003). Algunos autores sugieren que una represión en la producción de EAO podría tener algún papel clave y específico en la deformación del pelo radical durante la interacción rizobio-leguminosa (Lohar *et al.* 2007; Cardenas *et al.* 2008).

Entre las primeras respuestas locales luego de la percepción mediante receptores específicos de simbiosis, ocurre un incremento rápido y transitorio de EAO intracelulares en los pelos radicales luego de aproximadamente 3 min de aplicado el factor Nod. Posteriormente, tiene lugar una caída en el contenido de EAO intracelular, siendo esta respuesta específica para elicitores simbióticos. Contrariamente, tratamientos con quitosán, un elicitador de patógenos fúngicos, no muestran la caída posterior al pico de generación de EAO, observándose un incremento sostenido en el tiempo de los niveles de EAO intracelulares (Cárdenas *et al.*, 2008). Asimismo, mediante aproximaciones farmacológicas utilizando ioduro de difenilo (DPI), un inhibidor de flavo proteínas comúnmente usado para inhibir la actividad del complejo NADPH oxidasa, se ha sugerido que esta dinámica de producción intracelular de EAO es dependiente de la actividad de dicha enzima (O'Donnel *et al.* 1993). Recientemente, también se ha involucrado al complejo NADPH oxidasa en el funcionamiento de los nódulos (Marino *et al.*, 2011).

El análisis en mutantes de *Arabidopsis thaliana rhd2-1* indican que la enzima de membrana plasmática NADPH oxidasa AtRBOH C es requerida para la producción localizada y oscilatoria de EAO durante la elongación del pelo. Curiosamente, en estas mutantes el “nacimiento” del pelo radical a partir de un tricoblasto epidérmico no está afectada. En estos mutantes los pelos radicales estallan cuando comienza el período de elongación sugiriendo que las EAO estarían involucradas en la rigidización de la pared celular. Asimismo, en pelos radicales no mutantes si se agrega peróxido de hidrógeno exógeno la elongación se detiene y si se agrega un secuestrante del mismo, la elongación se promueve (Swanson y Gilroy 2010).

Algunas vías estudiadas de regulación de la actividad de esta enzima incluyen, activación por fosfolípidos, calcio y disponibilidad de poder reductor (NADPH). Pequeñas GTPasas, ROP-GTPasa (Jones *et al.* 2007) y RhoGDI (Rachel y Dolan 2006) han sido recientemente citadas como importantes reguladoras de la producción de EAO por NADPH oxidasa durante el crecimiento del pelo y la percepción de factores Nod (Skupek y Irving 2006). Asimismo se las ha observado asociadas al movimiento de vesículas, al control funcional-espacial de la actividad NADPH oxidasa (Terada 2006; Takeda *et al.* 2008) y mediando eventos de muerte celular (Park *et al.* 2004).

La generación de EAO es un denominador común en presencia de diversos tipos de estrés. Su homeostasis y fina regulación espacio temporal es clave ya que también participan en vías de señalización del desarrollo, en la percepción de diferentes estímulos químicos y físicos, en la interacción de la planta con microorganismos, etc. En este sentido la regulación y mantenimiento del estado redox intracelular en presencia de estrés, se convierte en un aspecto esencial para el mantenimiento de funciones celulares que permitan la ocurrencia de la interacción simbiótica con rizobios.

La producción de EAO es analizada en forma general como generación de peróxido de hidrógeno intracelular, sin detallar posibles diferencias de producción apoplástica e intracelular asociadas a la actividad del complejo NADPH oxidasa. Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado en una cinética detallada durante la interacción soja-*B. japonicum*, la generación intracelular de EAO y apoplástica de radical superóxido, y se ha sugerido que la generación apoplástica de radical superóxido vía la actividad de NADPH oxidasa en presencia del microsimbionte, sostiene la curvatura del pelo radical mediante la relocalización asimétrica de su producción y el efecto sobre la rigidización de la pared celular. Se indicó también la ocurrencia de un incremento transitorio de EAO intracelulares pocos minutos después de la inoculación con *B. japonicum* en pelos radicales de soja y que esta respuesta es necesaria para que el proceso de percepción y/o infección ocurra (Muñoz *et al.*, 2012).

La generación de EAO ha sido también analizada en etapas más avanzadas de la infección que incluyen la formación del hilo de infección. Se ha citado que la disparidad en el gran número de pelos radicales infectados respecto del número final de nódulos formados implica un importante control en la infección, donde el aborto de hilos de infección es de especial importancia y se ha observado que estos hilos de infección que se detienen contienen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno (Vasse *et al.* 1993; Santos *et al.* 2001). Se sugirió entonces que, durante la formación del hilo de infección podrían ocurrir reacciones de tipo hipersensible que impedirían el ingreso de un gran número de eventos de infección en una misma raíz, generando principalmente estrés oxidativo en los microsimbiontes que ingresan en la raíz (Vasse *et al.* 1993). Investigaciones posteriores, demostraron que esta generación de peróxido de hidrógeno en los hilos de infección no genera estrés oxidativo en el rizobio y que cumple un rol crucial en optimizar el desarrollo del hilo de infección, posiblemente participando en el entrecruzamiento de glicoproteínas necesarias para mantener la estructura del hilo de infección (Jamet *et al.* 2007).

#### **4.2. Participación del tráfico de vesículas en la interacción rizobio-leguminosa**

En 1994, Hong y Verma realizaron el clonado y caracterización de la enzima kinasa de lípidos, fosfatidil-inositol 3-kinasa (PI3K) de soja y presentaron evidencias de la inducción específica de dos isoformas radicales, una en la raíz y nódulos maduros y la otra específica de nódulos en desarrollo. Este incremento temporal de actividad específica de PI3K durante la proliferación de membranas en los nódulos jóvenes sugiere un rol importante de PI3K en el desarrollo de la membrana peribacteroidea. Por otro lado, trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Ton Bisseling, señalaron la entrada del rizobio

a las células corticales a través de un proceso tipo endocítico, y al inicio de la senescencia del simbiosoma con la adquisición de proteínas SNAREs (SYP22 y VTI11) de identidad vacuolar (Limpens *et al.*, 2009).

Respecto a etapas más tempranas de la interacción rizobio-leguminosa, Peleg-Grossman y colaboradores (2007) analizaron la deformación y generación de EAO en pelos radicales de *Medicago truncatula* en presencia del microsimbionte específico y su posible relación con PI que participan activamente en procesos de endocitosis. Los autores sugieren que la inoculación de pelos radicales de *M. truncatula* induce la expresión de la enzima PI3K y la generación de EAO en raíces luego de 4 días post inoculación. Mediante aproximaciones farmacológicas, sugieren que la inhibición de PI3K suprime los procesos de endocitosis y la generación de EAO a nivel radial, y sugieren que a nivel de pelos se prevendría la deformación del pelo radical y la formación del hilo de infección. Efectos similares fueron observados cuando se inhibe fosfolipasa C (PLC). Sin embargo, estos tratamientos inhibitorios no perturbaron las respuestas típicas de calcio y expresión de nodulinas dadas por la presencia del rizobio, sino por el contrario, la expresión de estos genes se vio incrementada, proponiendo entonces que la percepción y consecuente deformación del pelo radical está regulada por dos vías independientes: una que implica la apertura de canales de calcio e influjo del mismo en el pelo radical, respuesta que es seguida de la inducción de nodulinas y otra vía dependiente de PI3K y PLC, cuya actividad es necesaria para la generación de EAO. El funcionamiento de ambas vías sería necesario para que la deformación del pelo radical y formación del hilo de infección ocurra. No obstante, hasta el momento no hay reportes sobre la participación de PI3K sobre los eventos tempranos (minutos post-inoculación) de la interacción rizobio-leguminosa.

Por otro lado, se ha demostrado la importancia que tiene RabA2, proteína asociada a vesículas, sobre la nodulación. Blanco y colaboradores (2009) determinaron que RabA2, gen perteneciente a la familia de pequeñas GTPasas, se expresa diferencialmente en raíces inoculadas, particularmente en pelos radicales, donde la proteína se encuentra asociada con vesículas que se mueven a lo largo de la célula. Mediante genética reversa, los autores evaluaron la participación de este gen en la nodulación y demostraron que las raíces con silenciamiento post-transcripcional de RabA2 tuvieron una fuerte reducción en el número y longitud de los pelos radicales y una nodulación afectada negativamente.

La participación del tráfico de endomembranas en las respuestas a condiciones de estrés salino, conjuntamente con la gran importancia que tienen los procesos de vesiculización en el crecimiento del pelo radical y deformación en presencia del rizobio, alientan a estudiar en nuestro sistema de muerte de pelos radicales, componentes claves y comunes de estos procesos. En este sentido, la enzima PI3K surge como elemento central de estudio.

### Objetivos específicos

- 1- Evaluar los efectos de la expresión de Ced-9 sobre procesos de tráfico de endomembranas/autofagia.
- 2- Evaluar la participación del tráfico de endomembranas en los eventos de muerte de raíces sometidas a condiciones de estrés.
- 3- Evaluar la participación del tráfico de endomembranas en la interacción rizobio-leguminosa.



## RESULTADOS

### Evaluación del proceso de autofagia en raíces en cabellera pBE-Ced-9

#### **Análisis de expresión de genes implicados en autofagia**

Se evaluaron los niveles de expresión de tres grupos de genes claves implicados en el proceso de autofagia: los que codifican para fosfatidil inositol 3-kinasa (GmVps34/PI3K: Glyma04g10090 y Glyma06g10090), ATG6 (GmAtg6/Bec-1: Glyma11g21490 y Glyma04g26840) y ATG8 (GmAtg8: GmAtg8a, Glyma17g01650; GmATG8b, Glyma07g39090 y GmATG8c, Glyma09g00630). Se utilizaron dos genes control: actina y factor de elongación 1 $\alpha$  (EIF1 $\alpha$ ), los cuales arrojaron resultados muy similares (Fig. 2.1). Los niveles de expresión se analizaron mediante la técnica de PCR-TR y los cálculos se realizaron mediante el método de Livak y Schmittgen (2001).

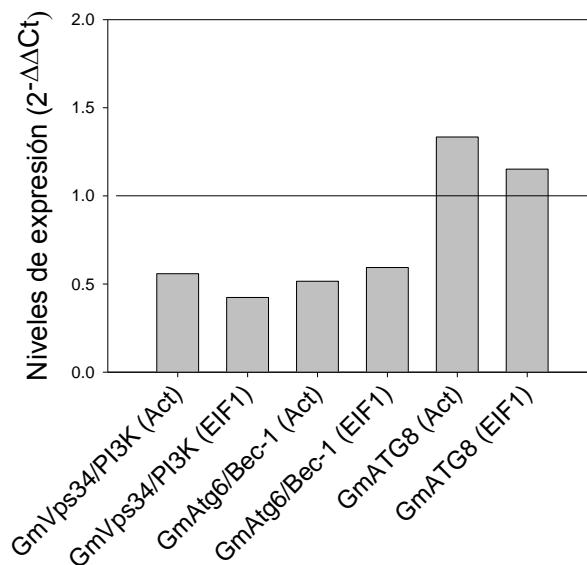


Fig. 2.1: Comparación de los niveles de expresión de genes implicados en el tráfico de endomembranas (GmVps34/PI3K, GmAtg6/Bec-1 y GmATG8) en relación a dos genes control: actina y EIF1 $\alpha$ , en raíces transgénicas pBE-Ced-9. Las determinaciones fueron realizadas mediante PCR-TR y los cálculos se expresaron relativos a raíces en cabellera K599-vacía (valor 1).

Las raíces transgénicas pBE-Ced-9 que presentaron afectada la capacidad de nodulación y tolerancia incrementada a condiciones inductoras de muerte, mostraron alteraciones en los niveles de mensajeros de genes claves implicados en la autofagia (Fig. 2.2). Particularmente, las raíces con el supresor de muerte celular de origen animal tienen

disminuida significativamente la expresión de GmVps34/PI3K y GmATG6/Bec-1, mientras que el incremento observado en el grupo GmATG8 no resultó significativo estadísticamente (Fig. 2.2).

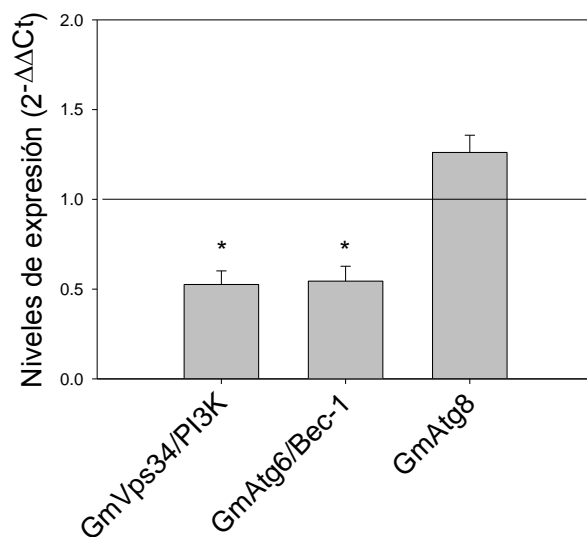


Fig. 2.2: Perfil de expresión de genes involucrados en el proceso de autofagia en raíces pBE-Ced-9 relativo a raíces en cabellera K599-vacía (valor 1), obtenidas mediante la infección con *A. rizogenes* no-transformada. Las determinaciones fueron realizadas mediante PCR-TR. Los resultados son los promedios de cinco raíces, asterisco indica diferencias significativas respecto del control. Prueba t para una media ( $p < 0.05$ ).

### **Evaluación del contenido de ATG8 en raíces en cabellera pBE-Ced-9 bajo condiciones de estrés**

Durante el proceso de autofagia, ATG8 es una de las pocas proteínas que se encuentran presentes desde etapas tempranas del proceso de formación del autofagosoma hasta su fusión y digestión en vacuola (Klionsky, 2005). Asimismo, ATG8 se conjuga covalentemente a una molécula de lípido, fosfatidil-etanolamina (PE) como resultado de una reacción similar a ubiquitinación, lo cual es requerido para el alargamiento de la membrana autofágica (Klionsky, 2005). En geles de proteínas SDS-PAGE, esta lipidización cambia el peso molecular de  $\approx 17$  kD en la forma citosólica libre de ATG8, a  $\approx 13$  kD en la forma ATG8-PE (Yoshimoto *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2009).

Se realizó la extracción de proteínas totales de raíces en cabellera control y pBE-Ced-9 sometidas a condiciones inductoras de muerte y se evaluó el contenido de proteína ATG8a mediante western blot (Fig.2.3). Cabe destacar que el anticuerpo utilizado fue obtenido a partir de ATG8a de Arabidopsis (AtATG8a - Abcam, ab77003), el cual detecta varios miembros de la familia ATG8 en extractos de esta planta (Thompson *et al.*, 2005;

Phillips *et al.*, 2008). Asimismo, estos anticuerpos fueron probados en Maíz, reconociendo cuatro proteínas recombinantes ATG8 de dicha planta. No obstante, en extractos de Maíz, una sola especie fue detectada preponderantemente (Chung *et al.*, 2009).

En el tratamiento de inoculación en presencia de estrés salino (50 mM), los niveles de ATG8 fueron mayores respecto del tratamiento de 150 mM NaCl. Además, se observa que las raíces pBE-Ced-9 presentaron diferencias en el contenido de ATG8 respecto de las raíces K599-vacía (Fig. 2.3).

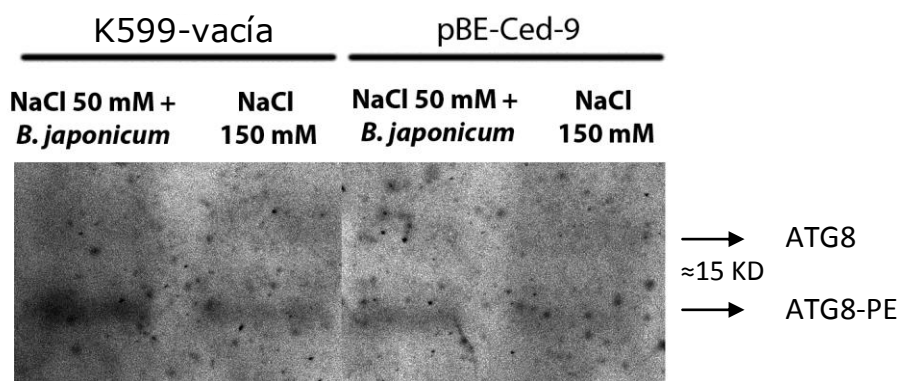


Fig. 2.3: Evaluación de los niveles de proteína ATG8 en raíces en cabellera K599-vacía y pBE-Ced-9 mediante anticuerpos anti-AtATG8a.

## Participación del tráfico de endomembranas en la muerte celular de raíces y pelos radicales bajo condiciones de estrés

### **Análisis de expresión de genes implicados en autofagia**

Para el análisis de expresión de genes implicados en el tráfico de endomembranas en soja, se seleccionaron genes claves implicados en dicho proceso: Atg6, Atg8 y PI3K/Vps34. Las secuencias de los genes GmAtg8 utilizadas fueron las identificadas previamente por Xia y colaboradores (2012).

En el año 1994, mediante el uso de una sonda diseñada sobre una región conservada de ScVps34, se identificó en una biblioteca de ADNc de nódulos de soja, dos formas de PI3K (GeneBank L27265 y L29770) (Hong y Verma, 1994). Utilizamos estas proteínas para la comparación con el algoritmo TblastN en la búsqueda de genes de PI3K de soja en la base de datos Phytozome. También utilizamos la secuencia de aminoácidos de la proteína de Arabidopsis (AtVps34/PI3K, GeneBank AEE33693) y de levaduras (ScVps34, GeneBank P22543). Los análisis realizados arrojaron los mismos resultados, identificando 2 genes putativos de PI3K en soja, Glyma04g10090 y Glyma06g10090, que corresponden a los ya identificados por Hong y Verma (1994).

Debido a la diversificación y expresión diferencial que presentan estos genes en las plantas y con el objetivo de tener una aproximación más general, cada par de oligonucleótidos utilizados fue diseñado sobre regiones conservadas. De esta manera, estudiamos la expresión en tres grupos de genes: 1) GmATG8 (conformado por GmAtg8a, Glyma17g01650; GmATG8b, Glyma07g39090 y GmATG8c, Glyma09g00630); 2) GmATG6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840) y 3) GmVps34/PI3K (Glyma06g10090 y Glyma04g10090).

Los niveles de expresión se analizaron mediante la técnica de PCR en tiempo real (PCR-TR) y los cálculos se realizaron mediante el método de Livak y Schmittgen (2001). Previamente, se determinó la eficiencia de cada juego de oligonucleótidos, debiendo estar entre 90 y 110%. Cabe destacar que utilizamos dos genes como controles internos, actina y factor de elongación-1 $\alpha$  (EIF1 $\alpha$ ) y que los resultados obtenidos para ambos fueron muy similares (Fig. 2.4). Además, analizamos la expresión de estos grupos de genes diferencialmente, en los pelos radicales y en segmentos radicales de la zona de crecimiento de pelos.

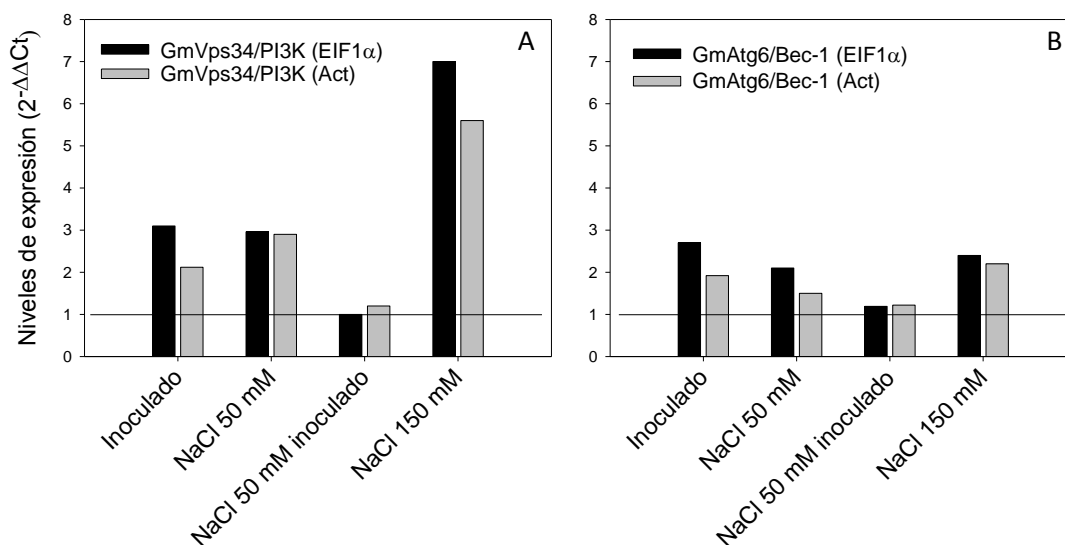


Fig. 2.4: Comparación de los niveles de expresión de genes implicados en el tráfico de endomembranas A) GmVps34/PI3K y B) GmAtg6/Bec-1, en relación a dos genes control: actina y EIF1 $\alpha$ , en segmentos de raíces sometidas 30 min bajo condición control, inoculadas con *B. japonicum*, 50 mM NaCl, 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl. Las determinaciones fueron realizadas mediante PCR-TR y los cálculos se expresaron relativos a la condición control (valor 1).

Los análisis de expresión en los segmentos de raíces mostraron incrementada la expresión de GmVps34/PI3K y GmAtg6/Bec-1 luego de 30 min de inoculación con *B. japonicum* (Fig. 2.5A y B). Bajo condiciones de estrés salino, 50 y 150 mM, hubo una inducción en la expresión de GmVps34/PI3K dependiente de la intensidad del estímulo, mientras que la inducción en GmAtg6/Bec-1 fue similar en ambas condiciones salinas. Llamativamente, la inoculación en presencia de 50 mM NaCl reprimió la expresión estimulada por la sal en ambos grupos de genes, sin observarse diferencias significativas respecto de los segmentos de raíces control (Fig. 2.5A y B).

El análisis de expresión de genes implicados en el proceso de autofagia en pelos radicales, presentó diferencias con respecto a lo observado en segmentos de raíz. Los pelos radicales de raíces inoculadas 30 min con el simbionte, no manifestaron incrementos en la expresión de GmVps34/PI3K y GmAtg6/Bec-1 (Fig. 2.6A y B). Asimismo, los aumentos observados en las condiciones de estrés salino, 50 mM NaCl y 150 mM NaCl, no tuvieron diferencias significativas respecto al control (Fig. 2.6A y B). Bajo tratamientos de inoculación en presencia de estrés salino, a diferencia de lo observado en segmento de raíz, la expresión de GmVps34/PI3K manifestó un marcado y significativo aumento, mientras que el incremento de GmAtg6/Bec-1 no tuvo diferencias estadísticas respecto del control (Fig. 2.6A y B).

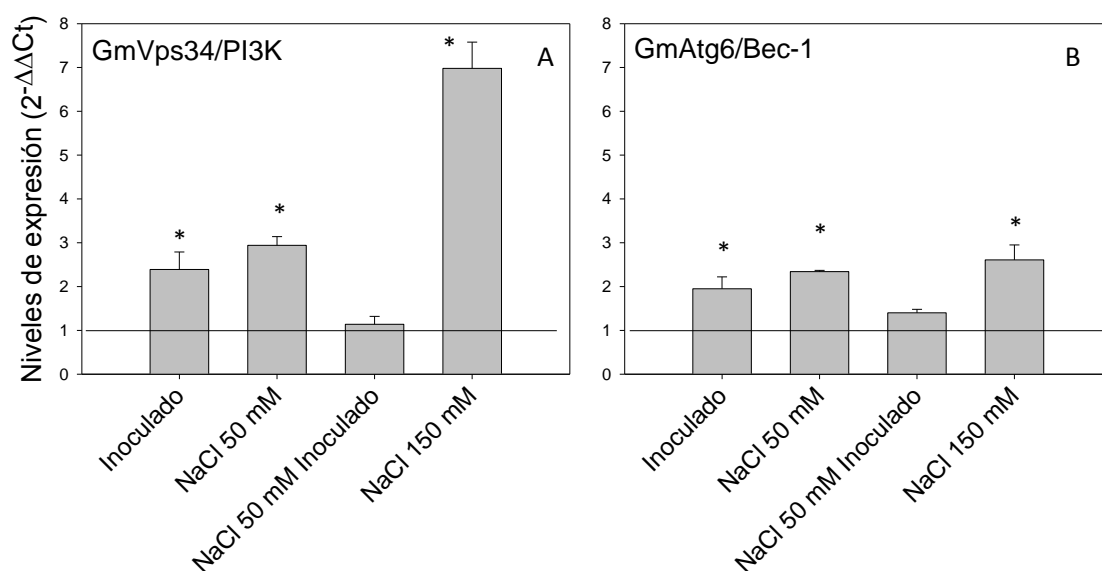


Fig. 2.5: Expresión de genes que codifican para A) GmVps34/PI3K (Glyma04g10090 y Glyma06g10090) y B) GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840) en segmentos de raíces tratadas 30 min con *B. japonicum*, 50 mM NaCl, 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl. Las determinaciones se realizaron mediante PCR-TR y los cálculos se expresaron relativos a la condición control (valor 1). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas respecto del control ( $p < 0.05$ ). Prueba t para una media.

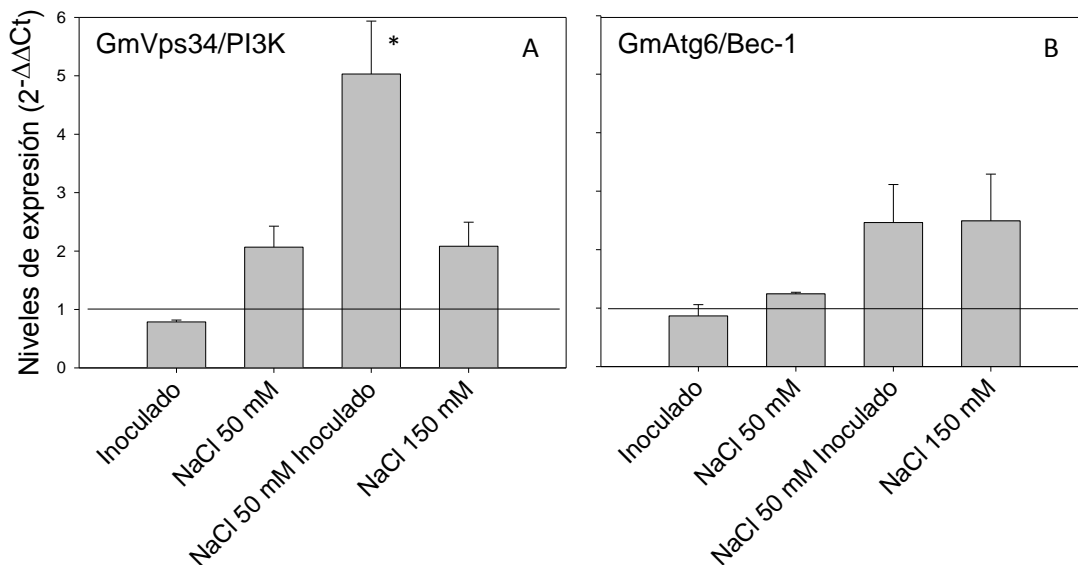


Fig. 2.6: Expresión de genes que codifican para A) GmVps34/PI3K (Glyma04g10090 y Glyma06g10090) y B) GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840) en pelos radicales de raíces tratadas 30 min con *B. japonicum*, 50 mM NaCl, 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl. Las determinaciones se realizaron mediante PCR-TR y los cálculos se expresaron relativos al control (valor 1). Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas respecto del control ( $p < 0.05$ ). Prueba t para una media.

### Inhibición farmacológica de PI3K

Se realizaron ensayos de inhibición farmacológica de la enzima PI3K con el reactivo LY294002. Previamente, se optimizaron las concentraciones y tiempos de tratamientos con el inhibidor. Las condiciones seleccionadas fueron pre-incubación de las raíces 30 min con LY294002 (30  $\mu$ M) y luego se realizaron los distintos tratamientos. Posteriormente, se incubaron las raíces con Azul de Evans, se tomaron las imágenes y se cuantificó la tinción mediante el software Optimas. En los tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum*, se observa un incremento en la tinción en raíces pre-tratadas con LY294002 (Fig. 2.7). Sin embargo, bajo tratamientos de 150 mM NaCl, las raíces pre-tratadas con LY294002 no mostraron diferencias significativas con respecto al control sin inhibición de PI3K (Fig. 2.7).

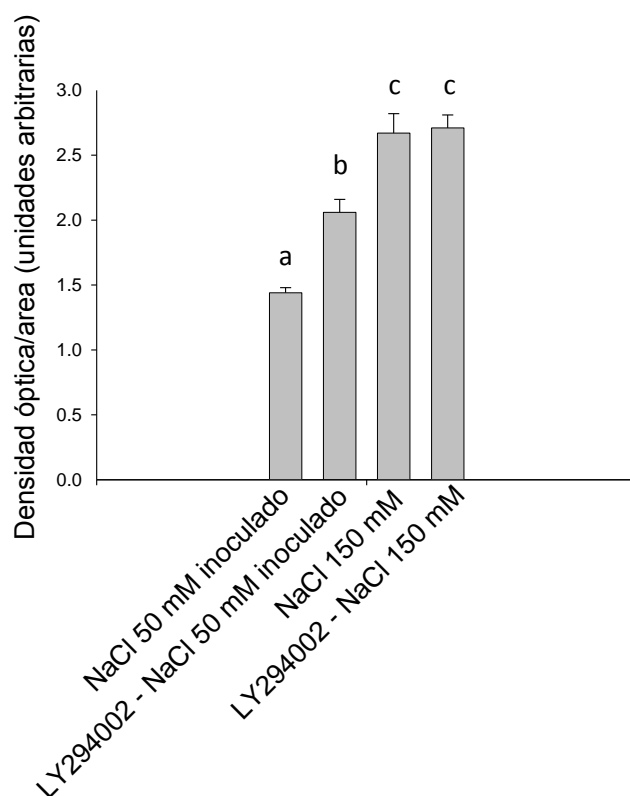


Fig. 2.7: Muerte de pelos radicales en raíces pre-tratadas con LY294002, inhibidor de PI3K y sometidas a condiciones inductoras de muerte. Cuantificación de la tinción con Azul de Evans mediante el software Optimas. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K

De acuerdo a lo observado en el análisis de expresión de genes involucrados en el tráfico de endomembranas y en los ensayos de inhibición farmacológica y con el fin de estudiar el rol de estos procesos en los eventos de muerte descritos, se utilizaron plantas compuestas con raíces en cabellera transgénicas con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K. Cabe destacar que estudios previos han reportado la imposibilidad de obtener descendencia de plantas homocigotas mutantes en el gen *Vps34*, debido a defectos en el desarrollo del gametófito masculino; mientras que la F<sub>1</sub> de las plantas heterocigotas no muestra diferencias con respecto a las salvajes (Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008b). Debido a este drástico fenotipo, y con el fin de bloquear la transducción de señal corriente abajo de PI3K, se ha utilizado la expresión de dominios proteicos FYVE que se unen al producto de la actividad PI3K, el fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P). Además, se ha demostrado que los dominios FYVE se unen específicamente y con alta afinidad a PI3P en levaduras, mamíferos y plantas (Gillooly *et al.*, 2000; Voigt *et al.*, 2005; Vermeer *et al.*, 2006).

Mediante silenciamiento post-transcripcional mediado por ARN interferente (ARNi), se obtiene una disminución de los niveles de mensajero específico y no una ausencia total. El silenciamiento es activado experimentalmente por ARN doble cadena, y su uso es una técnica potente para la inhibición específica de la expresión génica en una variedad de organismos (Fire *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Esta metodología fue utilizada en este conjunto de experimentos.

Debido a la alta similitud entre los genes de GmVps34/PI3K de soja (Glyma06g10090 y Glyma04g10090), se utilizó una región conservada en estos genes para la obtención de ARNi, por lo que el silenciamiento post-transcripcional de PI3K (PI3Ki) estuvo dirigido hacia ambos genes de soja (Fig. 2.8).

```

Glyma06g10090   TTTATCCGAGAATCGTAGCATCATAAGCTATTTGCAAAAGTTTCATCCTGATGACCATGG 2033
Glyma04g10090   TTTGT CAGAGAATCGTAGCATCATAAGCTATTTGCAAAAGTTTCATCCTGATGACCATGG 1983
*** ** *****

Glyma06g10090   GCCTTTTGGAAATTACAGCCACCTGCCTTGAACATTTATAAAAAGCTGTGCTGGCTACTC 2093
Glyma04g10090   GCCTTTTGGAAATTACAGCCACCTGCCTTGAACATTTATAAAAAGCTGTGCTGGATACTC 2043
*****

Glyma06g10090   TGT TATAACATATATACTTGGTATCGGAGACAGGCACCTTAGACAATCTCCTCCTTAGAAA 2153
Glyma04g10090   TGT TATAACATATATACTTGGTATCGGAGACAGGCATTTAGACAATCTCCTCCTTAGAAA 2103
*****

Glyma06g10090   TGACGGAGGTCTTTTCCATGTGTGATTTGGTTTTATTCTTGGGCGAGATCCTAAGCCATT 2213
Glyma04g10090   TGATGGAGGTCTTTTCCATGTGTGATTTGGTTTTATTCTTGGCCGAGATCCTAAGCCATT 2163
*** *****

Glyma06g10090   TCCACCACCAATGAAGCTTTGCAAGGAAATGGTTGAGGCTATGGGTGGAGCTGAAAGCCA 2273
Glyma04g10090   TCCACCACCAATGAAGCTTTGCAAGGAAATGGTTGAGGCTATGGGTGGAGCTGAAAGCCA 2223
*****

Glyma06g10090   ATATTATACAAGGTTCAAGTCTATTTGTTGAAGCATACCACATTTCTCGCAAATCCAG 2333
Glyma04g10090   ATATTATACAAGGTTCAAGTCTATTTGTTGAAGCATACAACATTTCTCGCAAATCCAG 2283
*****

Glyma06g10090   TAACCTAATTTTGAATCTATTTTACTTAATGGCGGGTTCCAATATTCCTGATATAGCTTC 2393
Glyma04g10090   TAACCTAATTTTGAATCTATTTTACTTAATGGCGGGTTCCAATATTCCTGATATAGCTTC 2343
*****

Glyma06g10090   TGATCCTGAAAAGGGGATTCCTTAAGCTTCAGGAAAAGTTTCGGTTGGACTTGGATGATGA 2453
Glyma04g10090   TGATCCTGAAAAGGGGATTCCTTAAGCTTCAGGAAAAGTTTCGGTTGGACTTGGATGATGA 2403
*****

Glyma06g10090   AGCCAGTATACATTTCTTCCAGGATCTTATCAATGAGAGTGTGAGTGCATTATTCCTCA 2513
Glyma04g10090   AGCCAGTATACATTTCTTCCAGGATCTTATCAATGAGAGTGTGAGTGCATTATTCCTCA 2463
*****

Glyma06g10090   GATGGTTGAGACTATCCATCGTTGGCTCAATATTGGCGGTAACCCCAATATTTATTGGG 2573
Glyma04g10090   GATGGTTGAGACTATCC-TCGTTGGGCTCAATATTGGCGGTAACCCCAATATTTATTGGG 2522
*****

```

Fig. 2.8: Alineamiento de la región conservada de los genes GmVps34/PI3K (Glyma06g10090 y Glyma04g10090) utilizada para el diseño del ARNi de PI3K (PI3Ki). En rojo, secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la obtención de la región conservada.

A partir de ARN de raíces de soja se obtuvo el ADNc para la obtención de los mensajeros de GmVps34/PI3K. Se verificó que la secuencia seleccionada no tuviera



blancos alternativos en la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el algoritmo BlastN. El ARNi de PI3K (PI3Ki) se obtuvo utilizando plásmidos con tecnología Gateway, diseñados para la generación de estructuras tipo *horquilla* (ARN de doble cadena unida por un lazo de una decena de pares de bases).

Se obtuvieron plantas compuestas de soja y de poroto con raíces en cabellera transgénicas inducidas luego de la infección con *A. rhizogenes*, según lo descrito anteriormente (ver *Sistema alternativo para la introducción de Ced-9...*). El sistema de raíces transgénicas presenta la particularidad de que cada raíz que emerge es un evento independiente de transformación, teniendo cada una de ellas diferentes niveles de expresión de la construcción transformante. El gradiente en los niveles de silenciamiento deriva en una herramienta valiosa para estudios de genómica funcional, ya que permite evaluar fenotipos “dosis-dependientes”. El silenciamiento post-transcripcional de PI3K (PI3Ki) se evaluó con los plásmidos, el pTDT-RNAi cuya proteína reportera es la *proteína roja del tomate* (tdTomato) y con pK7GWIWG2D (II) que contiene como reportero a la *proteína verde fluorescente* (GFP) (Fig. 2.9).

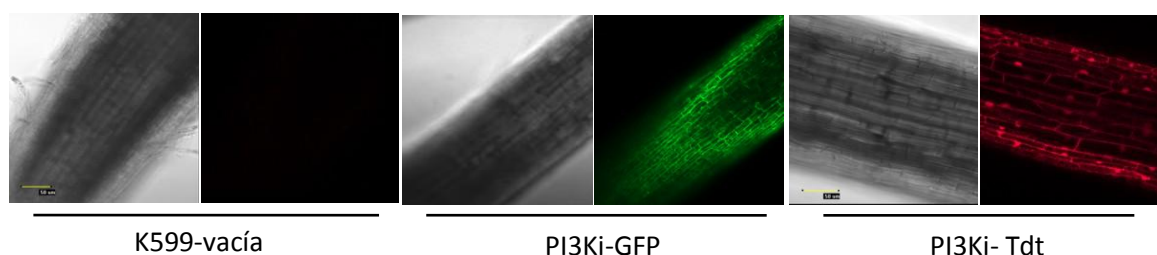


Fig. 2.9: Raíces en cabellera K599-vacia y con silenciamiento post-transcripcional de PI3K (PI3Ki), con GFP (PI3Ki-GFP) o Tdt (PI3Ki-Tdt) como reporteros. Imagen tomada con microscopía confocal. Excitación 488 nm y emisión BA 515/30 nm para GFP y excitación 543 nm y emisión BA 605/75 nm para Tdt.

### **Determinación de los niveles de expresión de GmPI3K/Vps34 en raíces transgénicas PI3Ki**

La evaluación del silenciamiento post-transcripcional en las raíces en cabellera PI3Ki se realizó mediante la cuantificación del ARN mensajero de GmVps34/PI3K (Glyma06g10090 y Glyma04g10090) por PCR-TR. Las raíces se agruparon según la intensidad de fluorescencia dada por las proteínas reporteras, identificando raíces con mucha señal fluorescente y raíces con fluorescencia tenue. De esta manera, también se evaluó la correspondencia entre la expresión del gen reportero y los niveles de

silenciamiento, con el fin de establecer un sistema rápido para la estimación de los niveles de mensajero de GmVps34/PI3K.

Notablemente, los resultados mostraron una correlación positiva entre los niveles de intensidad del reportero y los niveles de silenciamiento (Fig. 2.10A), proponiendo una herramienta de gran utilidad para el establecimiento de relaciones entre el fenotipo y el grado de silenciamiento de una manera rápida y simple. Sin embargo, en el análisis de frecuencias se puede evidenciar una gran heterogeneidad en los niveles de expresión de GmVps34/PI3K dentro de cada fenotipo (Fig. 2.10B). De hecho, y curiosamente, raíces no fluorescentes, igualmente exhibieron una disminución en los niveles de ARN mensajero de GmVps34/PI3K (Fig. 2.10B).

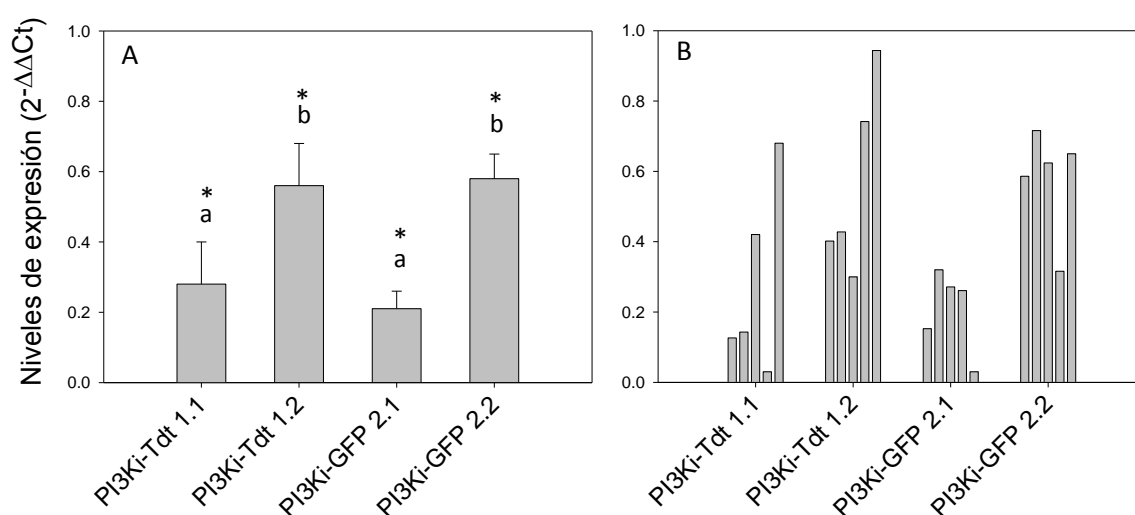


Fig. 2.10: Niveles de ARN mensajero de GmVps34/PI3K mediante PCR-TR en raíces con silenciamiento post-transcripcional de PI3K (PI3Ki-GFP y PI3Ki-Tdt). Las raíces fueron seleccionadas según la intensidad de fluorescencia: fluorescencia intensa (PI3Ki-Tdt 1.1 y PI3Ki-GFP 2.1) y fluorescencia muy tenue (PI3Ki-Tdt 1.2 y PI3Ki-GFP 2.2). A) Promedio de los niveles de expresión de PI3K en raíces en cabellera PI3Ki-Tdt o PI3Ki-GFP, agrupadas de acuerdo a la intensidad del reportero. B) Gráfico de frecuencias de A). Los resultados son promedios de cinco experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre raíces PI3Ki ( $p < 0.05$ ), test DGC de diferencias de medias. Asteriscos indican diferencias significativas respecto de raíces K599-vacía (valor 1), prueba t para una media ( $p < 0.05$ ).

### Evaluación del fenotipo de las raíces PI3Ki. Morfología

Una característica morfológica principal en las raíces con silenciamiento de GmVps34/PI3K es el crecimiento afectado de los pelos radicales (Fig. 2.11). Además, las raíces PI3Ki tuvieron afectado su crecimiento, con una reducción en la longitud de alrededor del 40 % respecto de las raíces control y de las raíces transgénicas con el

plásmido vacío (Tdt-ARNi) (Fig. 2.12). Es importante en destacar que la expresión de estos fenotipos en las raíces PI3Ki estuvieron asociados a los niveles de silenciamiento de los genes GmVps34/PI3K (Fig. 2.11 y 2.12).

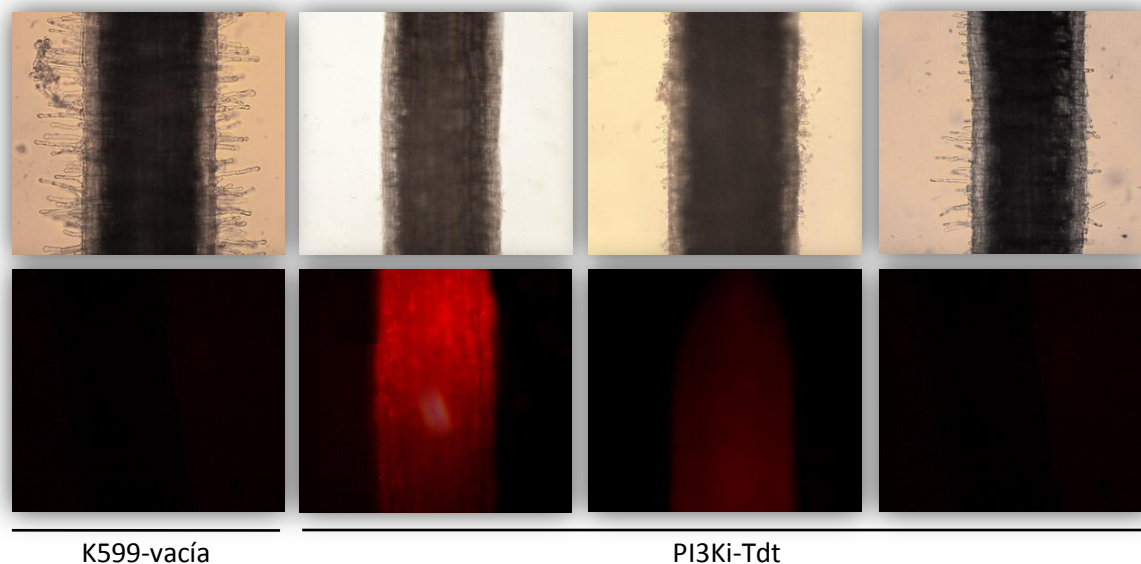


Fig. 2.11: Desarrollo de pelos radicales en raíces en cabellera K599-vacia y PI3Ki-Tdt. Cuadros superiores, imágenes en campo claro; cuadros inferiores, imágenes de fluorescencia del reportero Tdt. Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia Zeiss (filtro de excitación 510-560 nm y de emisión LP: 590).

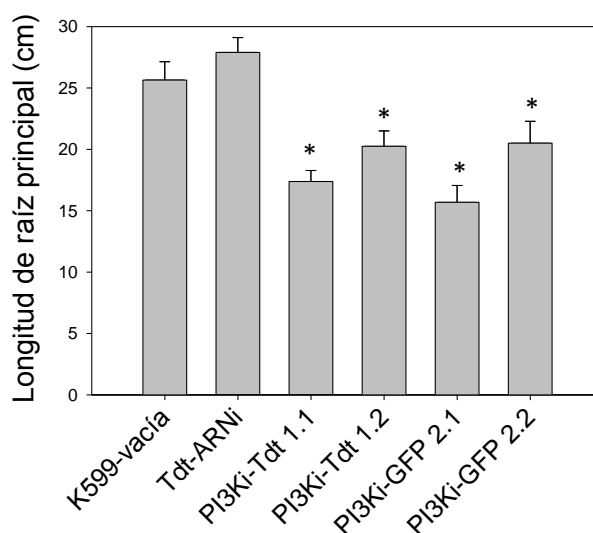


Fig. 2.12: Efectos del silenciamiento de GmVps34/PI3K sobre el crecimiento de la raíz principal. Las raíces fueron seleccionadas según la intensidad de fluorescencia, fluorescencia intensa (1.1 y 2.1) y sin fluorescencia (1.2 y 2.2). Promedio de la longitud (cm) de raíces K599-vacia, transgénicas con el plásmido vacío (Tdt-ARNi), y transgénicas con silenciamiento de GmVps34/PI3K (PI3Ki-Tdt y PI3Ki-GFP). Los resultados son promedios de ocho raíces. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## Evaluación del fenotipo de las raíces PI3Ki. Producción intracelular de EAO

Se estimó la generación de EAO intracelular mediante la sonda fluorescente dihidro-diclorofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Notablemente, las raíces PI3Ki-Tdt mostraron niveles inferiores de EAO intracelulares respecto de las raíces K599-vacía y de las raíces Tdt-ARNi (Fig. 2.13A, B, C y 2.14A). Sin embargo, mientras las células de la corteza de la zona de diferenciación presentaron bajos niveles de EAO, en la zona apical de las raíces PI3Ki-Tdt hubo una marcada producción de EAO, similar a lo observado en raíces K599-vacía (Fig. 2.13D y 2.14B). Además, se observó cierta correlación negativa entre los niveles de intensidad de reportero (niveles de silenciamiento) y la producción de EAO (Fig. 2.15).

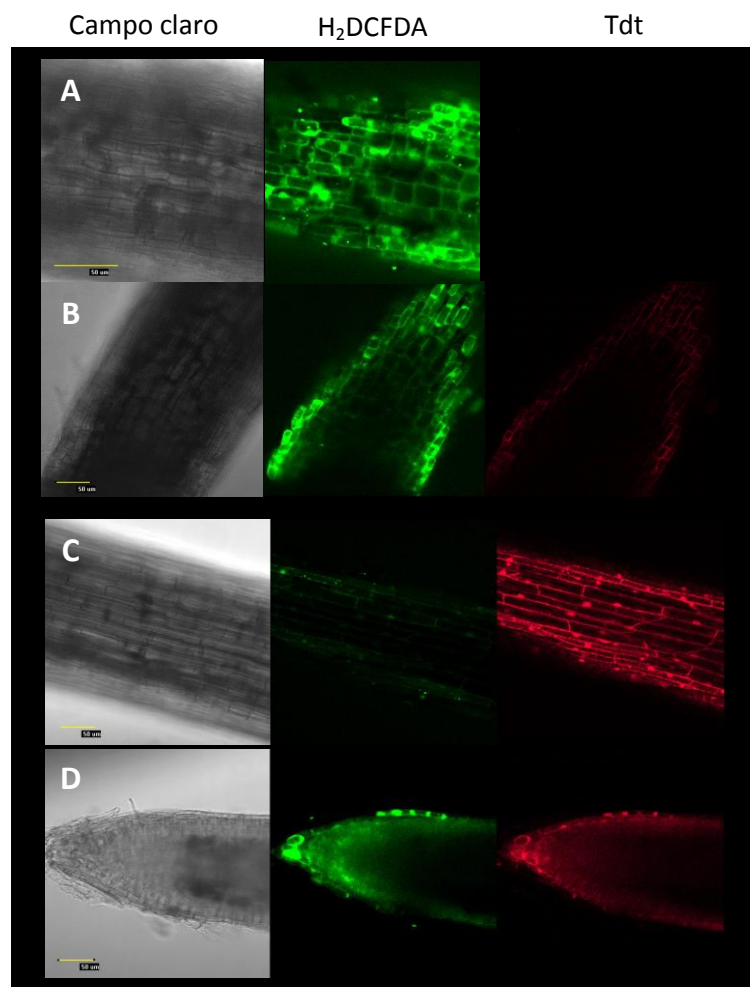


Fig. 2.13: Generación de EAO intracelular en raíces en cabellera PI3Ki-Tdt mediante H<sub>2</sub>DCFDA. A) Raíz K599-vacía, B) raíz transgénica con el plásmido vacío Tdt-ARNi, C) raíz PI3Ki-Tdt, D) región apical de raíz PI3Ki-Tdt. Imágenes tomadas con microscopio confocal Nikon. Excitación 488 nm y emisión BA 515/30 nm para H<sub>2</sub>DCFDA y 543 nm y emisión BA 605/75 nm para Tdt.

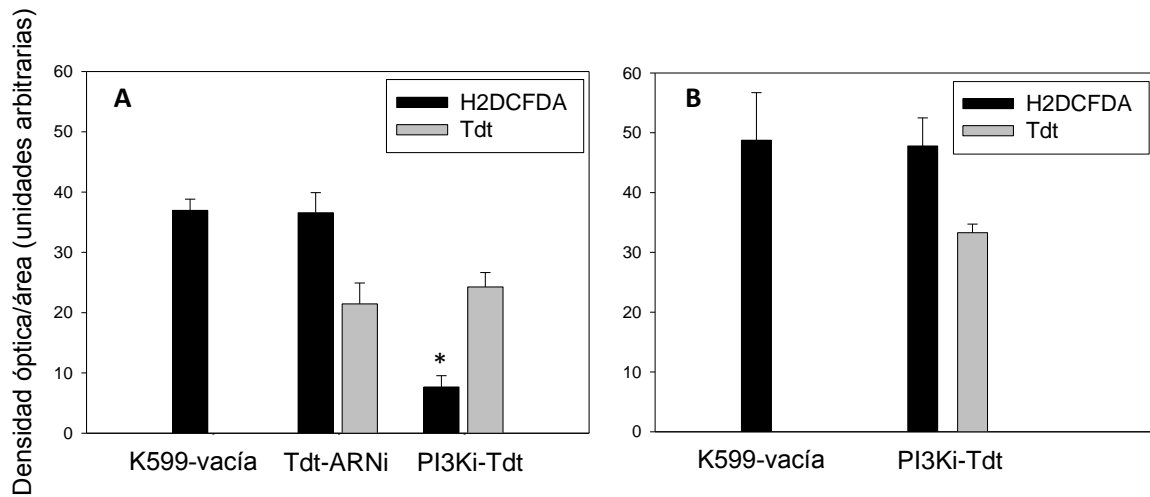


Fig. 2.14: Promedio de los niveles de producción de EAO intracelular (H<sub>2</sub>DCFDA) y fluorescencia de reportero (Tdt) en raíces en cabellera K599-vacía, Tdt-ARNi y PI3Ki-Tdt. Cuantificación de las fluorescencias mediante el software Optimas. A) EAO en la zona de diferenciación de pelos radicales, B) EAO en la zona apical. Los resultados son el promedio de seis experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

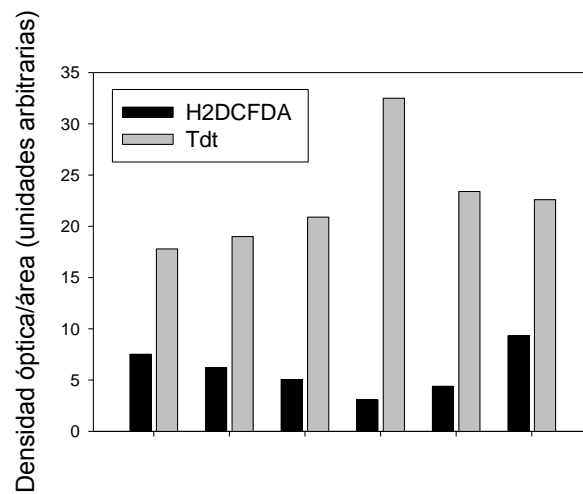


Fig. 2.15: Frecuencias de la generación de EAO intracelular (H<sub>2</sub>DCFDA) y niveles de fluorescencia de reportero (Tdt), en raíces PI3Ki-Tdt. Cuantificación de las fluorescencias mediante el software Optimas.

### Efectos del silenciamiento de GmVps34/PI3K en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés

Doce días post-infección con *A. rhizogenes*, se realizó el corte por debajo de las raíces en cabellera y se pasaron las plantas a hidroponía. Alrededor del día 25 post-infección, las raíces PI3Ki fueron sometidas a condiciones de estrés. Debido al fenotipo *sin*

pelos de las raíces PI3Ki, los tratamientos se realizaron durante 3 h y se evaluó mediante tinciones con Azul de Evans la muerte celular en las raíces. Las raíces con silenciamiento de GmVps34/PI3K mostraron mayor marcación con Azul de Evans respecto a plantas con raíces en cabellera K599-vacía y Tdt-RNAi (Fig. 2.16)

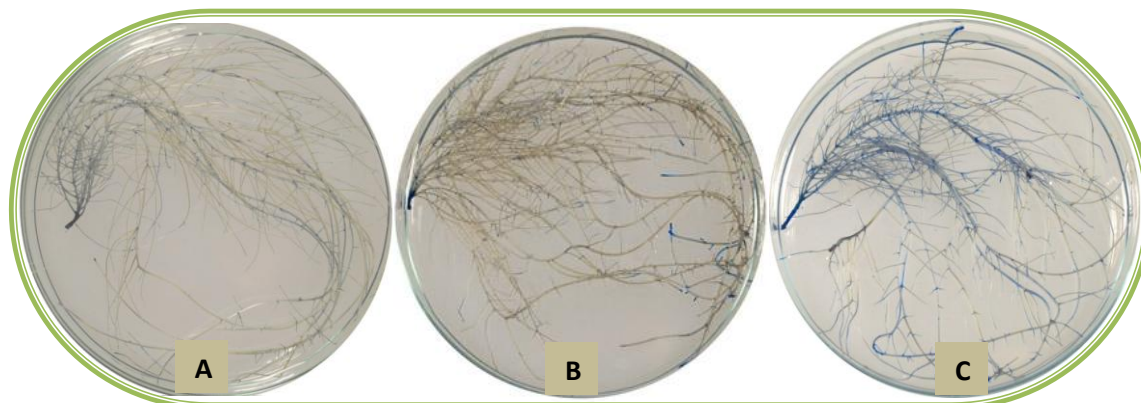


Fig. 2.16: Evaluación de muerte mediante tinción con Azul de Evans en raíces en cabellera inoculadas con *B. japonicum* en presencia de estrés salino (50 mM NaCl) durante 3 h. A) Raíces K599-vacía, B) raíces Tdt-ARNi y C) raíces PI3Ki-Tdt.

### **Peroxidación de lípidos en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés**

La figura 2.17 muestra la cuantificación de los niveles de MDA de raíces en cabellera K599-vacía y PI3Ki sometidas a condiciones de 150 mM de NaCl y 50 mM de NaCl + *B. japonicum*. Llamativamente, los niveles de MDA no tuvieron diferencias significativas entre la condición control y los tratamientos de estrés en las raíces con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K. Más interesante aún, el contenido de MDA en las raíces transgénicas estuvo incrementado inclusive en el condición control (Fig. 2.17).

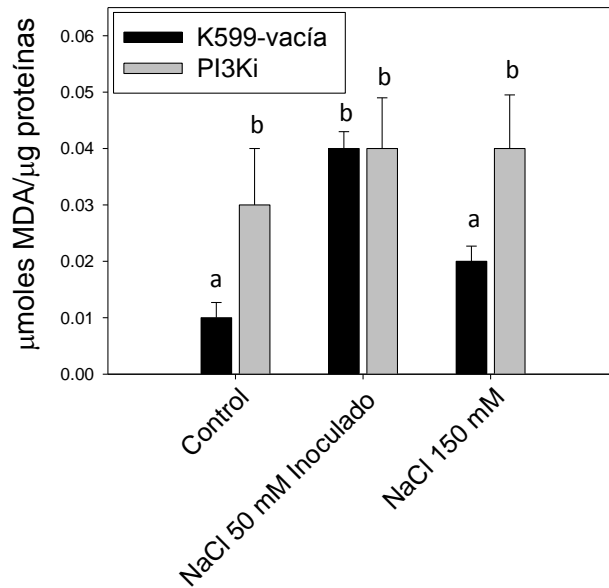


Fig. 2.17: Contenido de MDA en raíces en cabellera K599-vacia y PI3Ki sometidas a condiciones de estrés. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Evaluación del contenido de proteína ATG8 en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés

Se realizó la extracción de proteínas totales de raíces en cabellera K599-vacia y PI3Ki sometidas a condiciones inductoras de muerte y se evaluó mediante *Western blot* el contenido de proteína ATG8a (Fig. 2.18). Las raíces PI3Ki presentaron una reducción dramática en los contenidos de ATG8 en ambas condiciones (Fig. 2.18), estando este resultado en concordancia con lo observado en la expresión de genes *GmAtg8*.

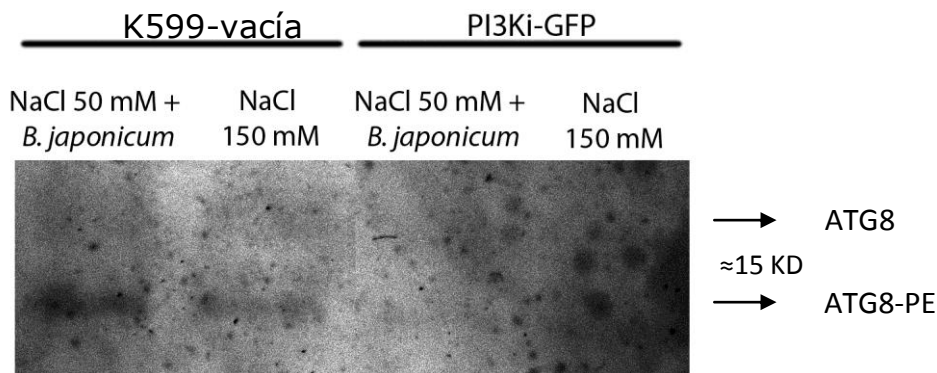


Fig. 2.18: *Western blot* de proteína ATG8 en raíces en cabellera K599-vacia y PI3Ki.

## Contenido de iones sodio y potasio en raíces en cabellera PI3Ki sometidas a condiciones de estrés

Se evaluó el contenido de iones por cromatografía líquida de alta eficiencia en raíces en cabellera control y con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K en tratamientos de 50 mM NaCl + *B. japonicum* y 150 mM NaCl.

En la figura 2.19 se observan los niveles de sodio y potasio en los diferentes tratamientos. El contenido de sodio se incrementa respecto del tratamiento control en forma dosis dependiente de la concentración de sal, tanto en raíces control como PI3Ki-GFP, mientras que el contenido de potasio cae drásticamente en los tratamientos de estrés salino severo (150 mM NaCl) (Fig. 2.19A y B). Bajo condiciones de 150 mM NaCl, las raíces con silenciamiento de GmVps34/PI3K exhibieron un aumento en el ingreso de Na<sup>+</sup> y en la salida de K<sup>+</sup> (Fig. 2.19A y B), afectando la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

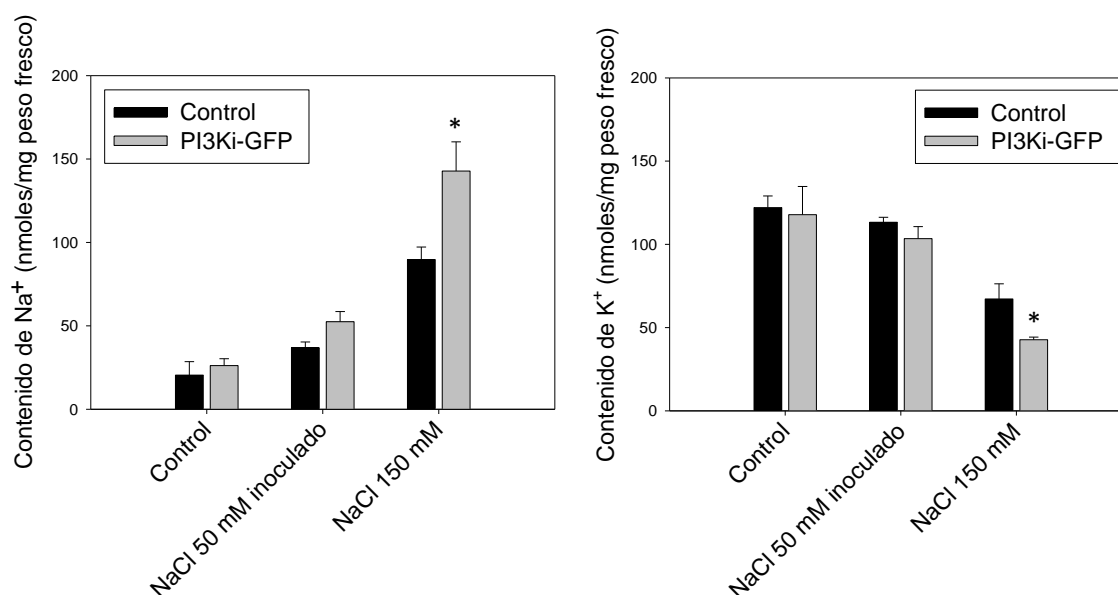


Fig. 2.19: Contenido de iones A) sodio y B) potasio en raíces en cabellera control y PI3Ki-GFP, sometidas a condiciones control y de estrés (NaCl 50 inoculado y 150 mM). Los resultados son los promedios de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas entre raíces K599-vacía y PI3Ki ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.



## Participación del tráfico de endomembranas en la interacción rizobio-leguminosa

### **Efectos del silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K sobre la nodulación**

Con el objetivo de evaluar la participación de PI3K en la interacción rizobio-leguminosa, plantas compuestas con raíces transgénicas con ARN interferente de PI3K (PI3Ki) fueron inoculadas con el microsimbionte para la posterior evaluación de la nodulación (Fig. 2.20). Para la obtención de raíces en cabellera se utilizó la metodología descrita previamente. Una vez emergidas las raíces transgénicas (alrededor del día 12 post-infección con *A. rhizogenes*) se realizó la ablación por debajo de las mismas y se transfirieron al sistema de hidroponía. Luego de 3 días, se inocularon las plantas de soja con *B. japonicum* USDA138 y se evaluó la nodulación después de transcurridos 21 días, aproximadamente.

Las raíces con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K tuvieron afectada drásticamente su capacidad de nodulación, mostrando una reducción alrededor del 80 % respecto de las raíces control (obtenidas mediante la infección con *A. rhizogenes* sin la construcción ARNi) y de raíces Tdt-ARNi (plásmido vacío) (Fig. 2.20). Notablemente, el fenotipo de nodulación reducida se repitió en plantas de soja compuestas con raíces transgénicas sobre-expresando péptidos FYVE (Fig. 2.21A y B). Estos dominios interaccionan específicamente con PI3P, producto de la actividad PI3K.

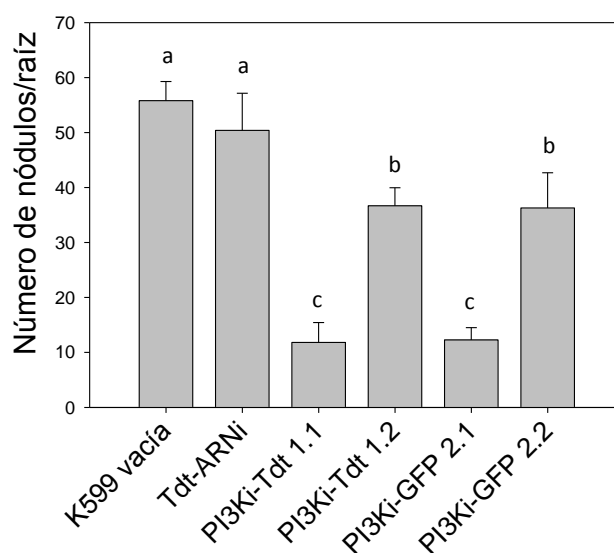


Fig. 2.20: Número de nódulos por raíz en plantas de soja compuestas. Los resultados son los promedios de diez experimentos independientes, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

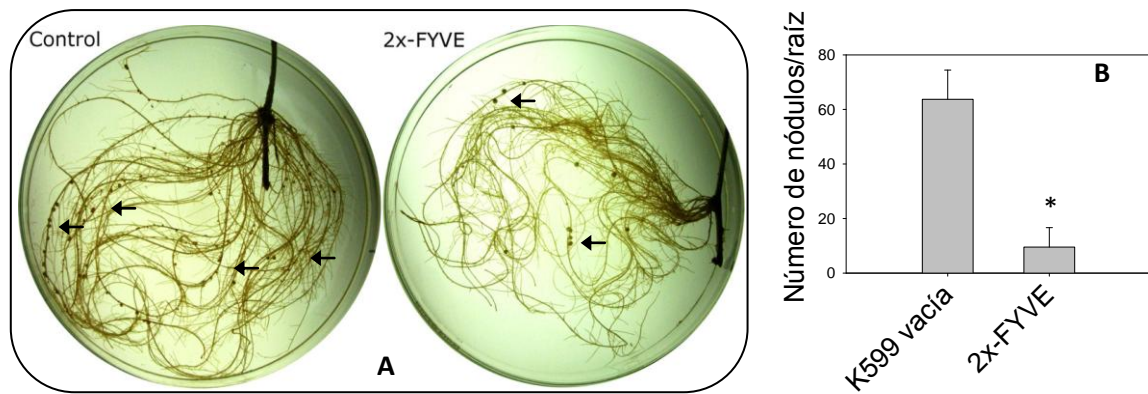


Fig. 2.21: Número de nódulos por raíz en plantas de soja compuestas con raíces K599-vacía y 2x-FYVE (A). Cuantificación de los nódulos formados en raíces control y 2x-FYVE (B). Los resultados son los promedios de seis experimentos independientes, asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Expresión de genes implicados en autofagia en raíces PI3Ki

Mediante PCR-TR se evaluó la expresión de genes claves implicados en el proceso de autofagia en las raíces PI3Ki noduladas (Fig. 2.22). Las raíces con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K tuvieron una disminución en la expresión del grupo de genes Atg8 (conformado por *GmAtg8a*, Glyma17g01650; *GmATG8b*, Glyma07g39090 y *GmATG8c*, Glyma09g00630), mientras que la expresión de GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840) no mostró cambios respecto de raíces noduladas no transformadas (Fig. 2.22)

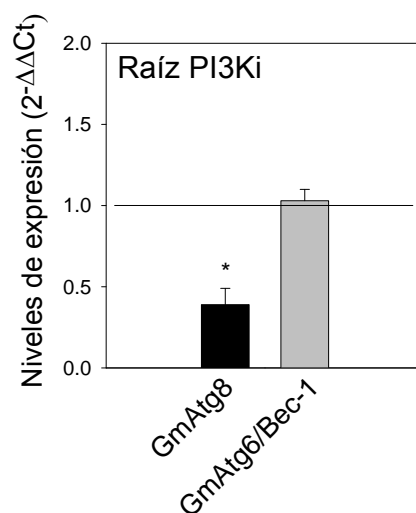


Fig. 2.22: Expresión de genes implicados en autofagia en raíces PI3Ki. Promedio de los niveles de expresión de GmAtg8 (Glyma17g01650, Glyma07g39090 y Glyma09g00630) y GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840) en raíces en cabellera PI3Ki, relativo a raíces en cabellera K599-vacía. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas respecto de raíces K599-vacía (valor 1), prueba t para una media ( $p < 0.05$ ).

## Evaluación de la colonización nodular por el microsimbionte en raíces en cabellera PI3Ki

Con la finalidad de evaluar la presencia del microsimbionte en los nódulos formados en las raíces PI3Ki, se trabajó con la interacción que se establece entre *P. vulgaris* y *R. tropici* CIAT899, ya que contamos con dicha cepa expresando la proteína fluorescente roja *Ds-Red*. Esta poderosa herramienta posibilitó el análisis de colonización nodular mediante microscopía confocal (Fig. 2.23).

Curiosamente, pudimos observar que las raíces transgénicas PI3Ki presentaron diferentes fenotipos en su capacidad de nodulación, desde ausencia de nódulos a la presencia de nódulos vacíos (Fig. 2.23A) o con una infección anormal, caracterizada por el aglutinamiento de las células infectadas en pequeñas zonas ubicadas en la periferia del nódulo (Fig. 2.23B).

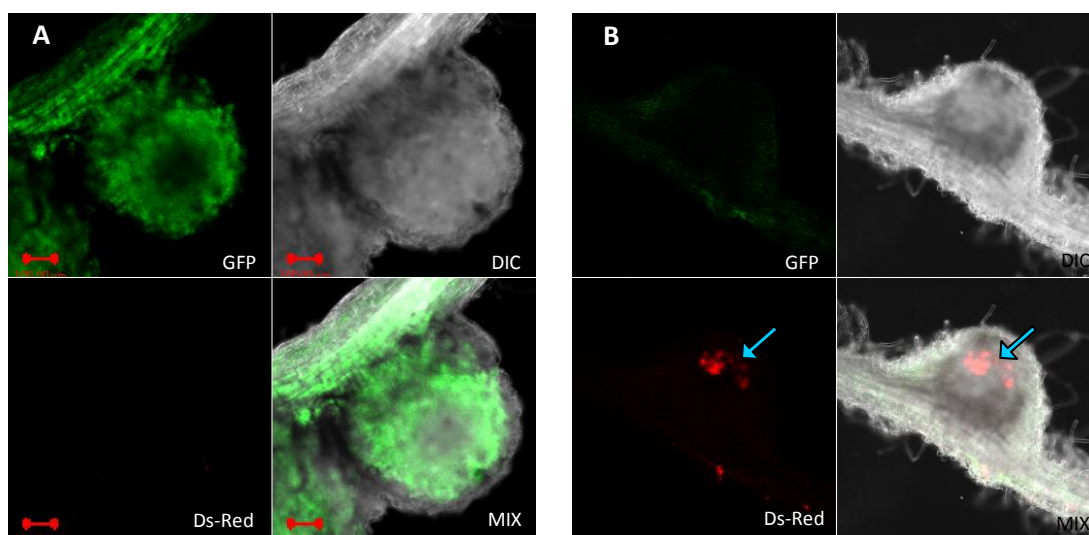


Fig. 2.23: Evaluación de la colonización de los nódulos de raíces PI3Ki en la interacción que se establece entre *P. vulgaris* y *R. tropici/Ds-Red*. A) Formación de nódulos vacíos donde no se detecta la presencia del microsimbionte (canal Ds-Red) y B) nódulos con infección anormal, presentando aglutinamiento del microsimbionte en regiones discretas (flecha). Imagen tomada con microscopía confocal Zeiss. Excitación 488 nm y emisión BA 515/30 nm para GFP y 543 nm nm y emisión BA 605/75 nm para Ds-Red.

## Participación de PI3K en etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*. Generación de EAO

Con el objetivo de estudiar la participación de eventos de endocitosis en etapas tempranas de la interacción simbiótica, se evaluó la generación de EAO intracelulares 5 min post-inoculación en raíces pre-tratadas con LY294002 (30  $\mu$ M), inhibidor

farmacológico de la actividad de PI3K (Fig. 2.24A y B). Previamente, se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación con LY294002 para descartar efectos negativos sobre la sobrevivencia de los pelos radicales. Para la determinación de EAO en los pelos radicales, utilizamos la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA y se tomaron las imágenes con microscopía de epifluorescencia. La cuantificación se llevó a cabo mediante análisis de imágenes con el software Optimas.

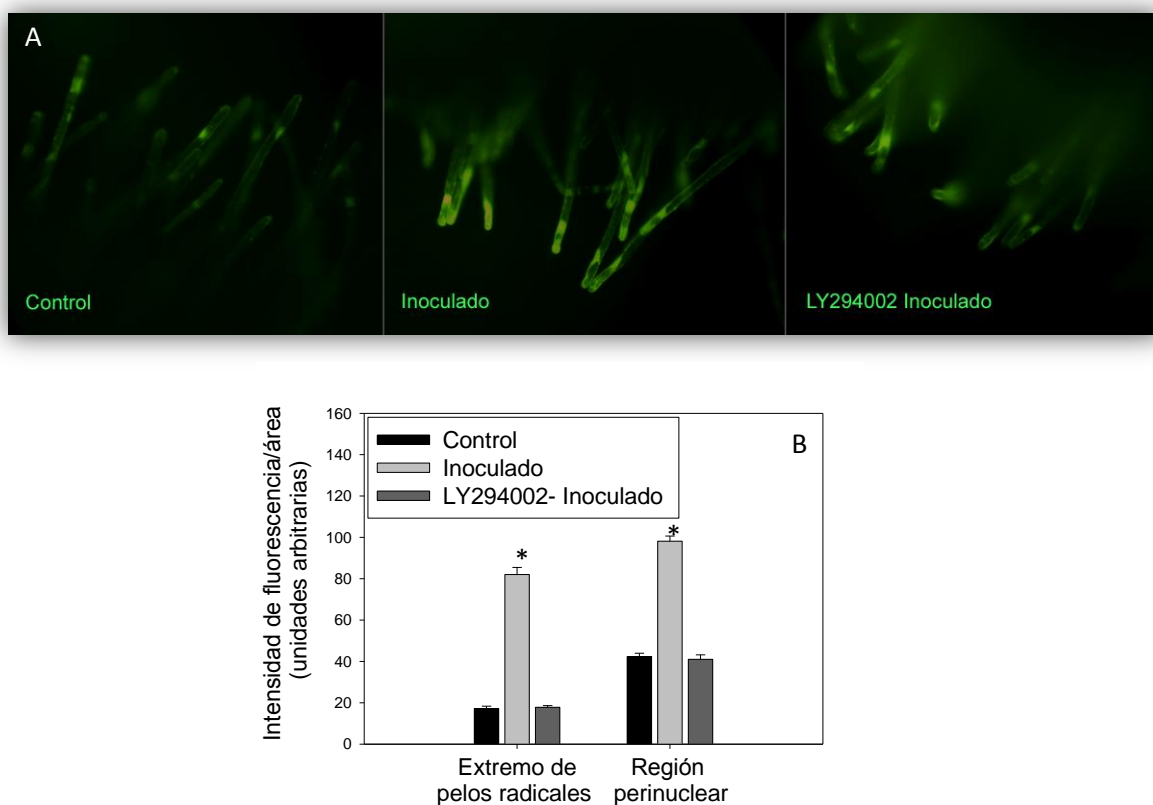


Fig. 2.24: Generación intracelular de EAO en pelos radicales de soja 5 min post-inoculación con *B. japonicum*. A) Pelos radicales teñidos con H<sub>2</sub>DCFDA en tratamientos control, inoculado e inoculado en raíces pre-tratadas con LY294002 (30 μM). Microscopía de epifluorescencia con filtro de excitación BP: 450-490 nm y de emisión LP: 520 nm. B) Cuantificación de H<sub>2</sub>DCFDA mediante análisis de imágenes con software Optimas, discriminando la generación apical y peri nuclear. Los resultados son promedios de tres experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas (p<0.05). Test DGC de diferencias de medias.

En la figura 2.24 se observa que en las raíces inoculadas 5 min con *B. japonicum*, los pelos radicales exhiben producción incrementada de EAO intracelulares. Asimismo, esta generación de EAO fue discriminada en dos zonas, perinuclear y en la punta de los pelos (Fig. 2.24B), tal como ya se ha reportado (Muñoz *et al.*, 2012). Si bien la dinámica general en la generación de EAO se mantiene para ambas fuentes en los distintos

tratamientos, estas parecieran aportar con diferente intensidad a la generación total. Es así que se cuantificó independientemente la generación de EAO que aporta la región apical o punta del pelo radical y la región peri-nuclear. Llamativamente, ésta respuesta específica de percepción del microsimbionte estuvo inhibida en las raíces pre-tratadas con LY294002, afectando en igual medida la generación apical y perinuclear de EAO (Fig. 2.24B).

Por otro lado, mediante detección histoquímica, determinamos la generación de radical superóxido en el apoplasto de raíces control e inoculadas con *B. japonicum* con o sin pre-tratamiento de LY294002. Las tinciones se realizaron con Nitro Blue Tetrazolium (NBT), se tomaron imágenes de las raíces y se realizó el análisis mediante el software Optimas en dos zonas de la raíz: en la región de diferenciación de pelos radicales jóvenes y en el ápice radical. Tal como se reportó previamente (Muñoz *et al.*, 2012), tratamientos de 5 min en presencia del rizobio inducen un incremento en la producción de radical superóxido apoplástico en las raíces (Fig. 2.25). Resulta interesante destacar, que el ápice radical también responde con incrementos de radical superóxido luego de la inoculación. Asimismo, esta respuesta al microsimbionte en ambas zonas, pero no la producción basal observada en las condiciones control, estuvo inhibida en las raíces con actividad PI3K inhibida (Fig. 2.25).

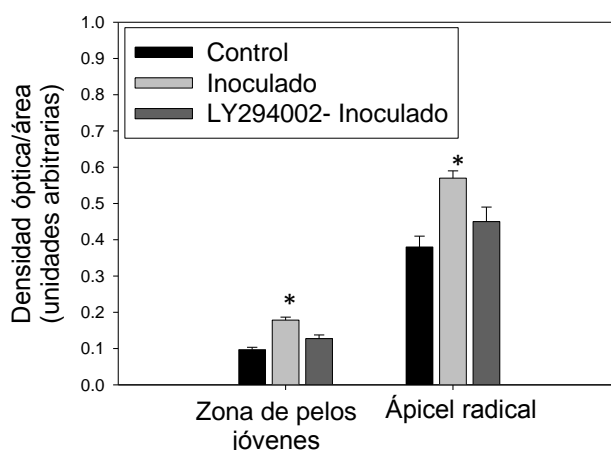


Fig. 2.25: Generación apoplástica de radical superóxido en pelos radicales de soja luego de 5 min post inoculación con *B. japonicum*. Cuantificación de NBT (coloración azul), evaluada en dos zonas de la raíz, mediante análisis de imágenes con software Optimas. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## Participación del complejo NADPH oxidasa en etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*

Con el objetivo de determinar el origen de las EAO, se evaluó la participación del complejo NADPH oxidasa en las respuestas tempranas. Para tal motivo, las raíces fueron pre-tratadas 30 min con difenil iodonium (DPI) (50  $\mu$ M), inhibidor suicida del complejo NADPH oxidasa. Posteriormente, realizamos el tratamiento con *B. japonicum* y se evaluó la producción de EAO intracelulares 5 min post-inoculación. Notablemente, pudimos observar los mismos efectos que tuvieron los tratamientos de inhibición de PI3K (Fig. 2.26). Los pre-tratamientos con DPI bloquearon el incremento en la producción de EAO intracelular en respuesta a la inoculación, tanto en la zona perinuclear como en la apical, pero no afectaron la generación de EAO basal en las condiciones control (Fig. 2.26B).

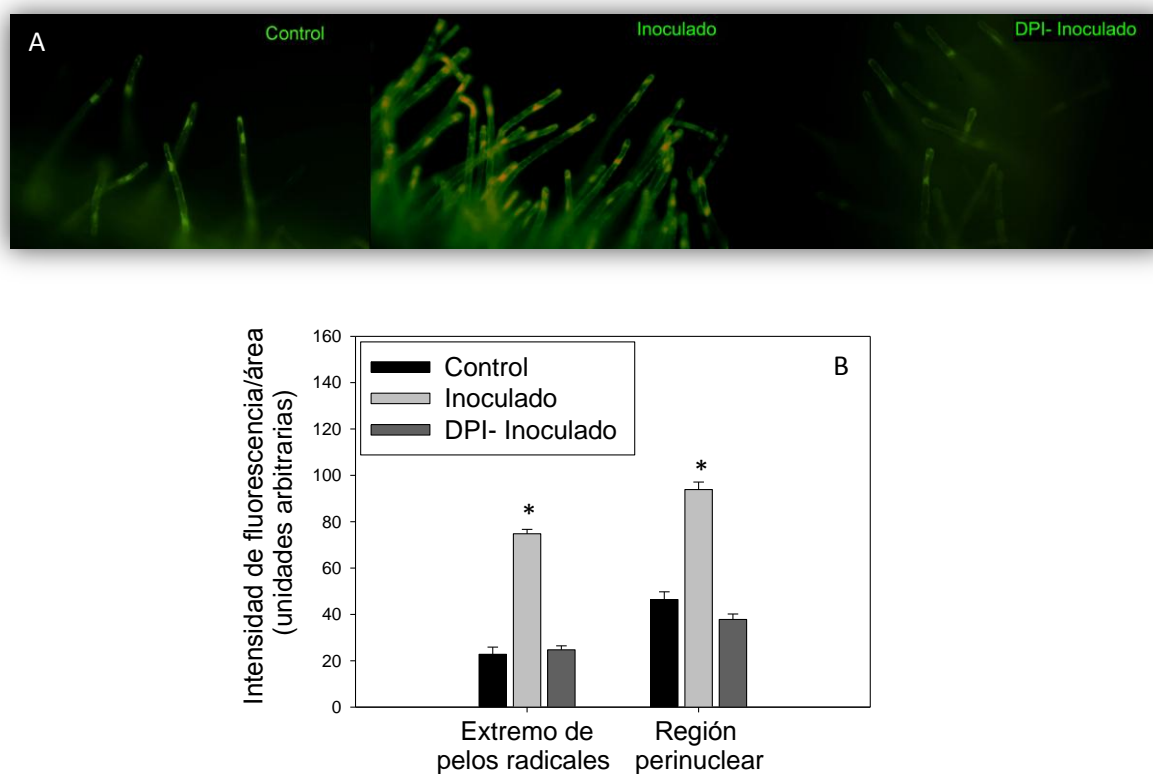


Fig. 2.26: Generación intracelular de EAOs en pelos radicales de soja luego de 5 min post inoculación con *B. japonicum*. A) Se observan pelos radicales teñidos con H2DCFDA en tratamientos control, inoculado e inoculado con actividad NADPH oxidasa inhibida. Microscopia de epifluorescencia con filtro de excitación BP: 450-490 nm y de emisión LP: 520 nm. B) Cuantificación de H2DCFDA mediante análisis de imágenes con software Optimas, discriminando la generación apical y peri nuclear. Los resultados son promedios de tres experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

## Respuestas tempranas moduladas por PI3K en la interacción soja-*B. japonicum*. Efectos sobre la nodulación

Debido a la importancia de la actividad PI3K en etapas muy tempranas de la interacción, participando en las primeras respuestas de percepción que conducen a la infección, particularmente en la generación intracelular de EAO, quisimos evaluar cómo afecta esta vía de señalización tan temprana a etapas posteriores como la formación de nódulos. Para ello, semillas germinadas dos días en cámara húmeda fueron pre-tratadas 30 min con LY294002 (30  $\mu$ M) y después se inocularon 30 min con *B. japonicum*. Posteriormente, se lavaron las radículas para eliminar las bacterias y se las transfirió a medio hidropónico con aireación. A los 24 días post-inoculación, se evaluó el número, el peso y la actividad nitrogenasa de los nódulos. La zona de la radícula que estuvo 30 min en contacto con el inhibidor de PI3K y que luego fue sometida 30 min en presencia del microsimbionte, es el área de la raíz que posteriormente da lugar a la formación de nódulos en corona. Estos nódulos son los que se forman sobre la raíz principal en los primeros centímetros y son los de mayor importancia en el sistema nodular de soja.

En la figura 2.27 se observa que la inhibición de la actividad de PI3K en etapas tempranas de la interacción afectó negativamente etapas tardías, conduciendo a una disminución en el número de nódulos en corona respecto del control. Por el contrario, el peso de los nódulos y la actividad nitrogenasa, estimada mediante la reducción de acetileno a etileno y su cuantificación mediante cromatografía gaseosa, no evidenciaron diferencias significativas entre las raíces pre-tratadas con LY294002 y las raíces control (Fig. 2.28A y B, respectivamente).

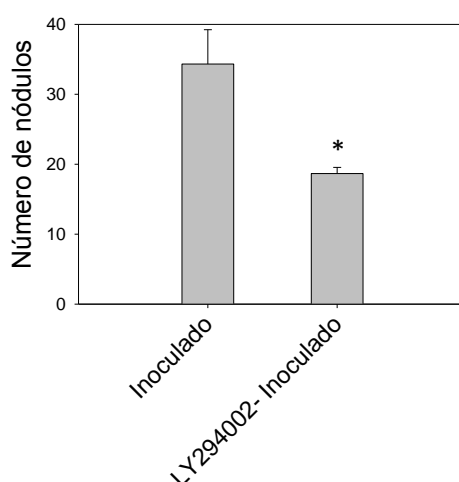


Fig. 2.27: Efectos de la inhibición de la actividad de PI3K en etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*, sobre la nodulación. Cuantificación del número de nódulos en raíces control y pre-tratadas con LY294002 (30 $\mu$ M). Los resultados son promedios de cinco experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

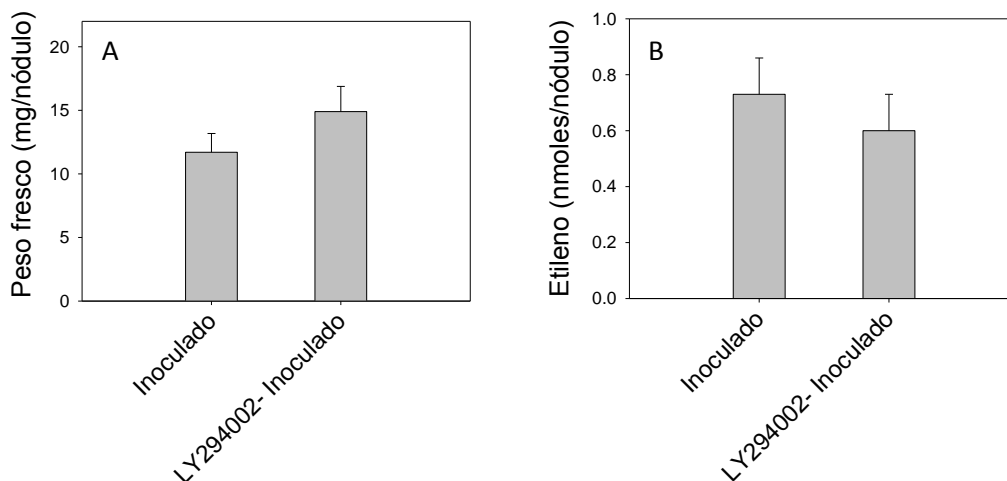


Fig. 2.28 Efectos de la inhibición de la actividad PI3K, en etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*, sobre la nodulación. A) Peso fresco de nódulos (mg) y B) estimación de la actividad nitrogenasa. Los resultados son promedios de cinco experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Respuestas tempranas moduladas por el complejo NADPH oxidasa en la interacción soja-*B. japonicum*. Efectos sobre la nodulación

De acuerdo a lo observado en nuestros resultados, donde PI3K y el complejo NADPH oxidasa estarían modulando la inducción en la producción de EAO en respuesta al microsimbionte; se evaluó los efectos de inhibición temprana del complejo NADPH oxidasa sobre la nodulación. Para tal motivo, se realizaron pre-tratamientos con DPI (50  $\mu\text{M}$ ), tal como se realizó previamente con LY294002.

Las plantas cuyas radículas fueron previamente sometidas a pre-tratamientos con el inhibidor del complejo NADPH oxidasa, tuvieron una disminución en el número de nódulos, cercana al 50 % respecto del control (Fig. 2.29A); mientras que no se observaron diferencias significativas en el peso nodular (Fig. 2.29B).



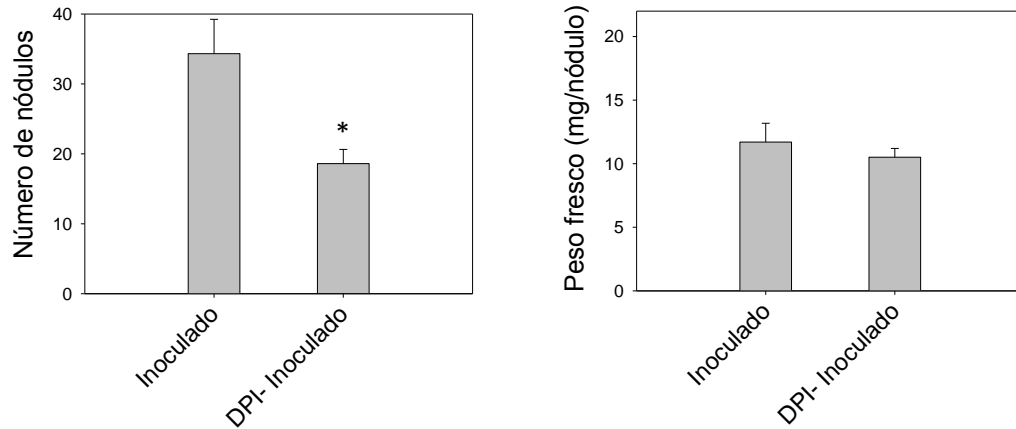


Fig. 2.29: Efectos de la inhibición del complejo NADPH oxidasa, en etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*, sobre la nodulación. A) Cuantificación del número de nódulos y B) peso fresco de nódulos (mg), en raíces control y pre-tratadas con DPI (50  $\mu$ M). Los resultados son promedios de cinco experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

### Silenciamiento post-transcripcional de GmAtg6/Bec-1

Con el objetivo de evaluar específicamente la participación de la autofagia en el establecimiento de los nódulos en soja, diseñamos una construcción para la obtención de ARNi de GmAtg6/Bec-1. Debido a la alta similitud entre los genes GmAtg6/Bec-1 de soja (Glyma11g21490 y Glyma04g26840), utilizamos una región conservada para la obtención del ARNi, por lo que el silenciamiento post-transcripcional de ATG6 (ATG6i) está dirigido hacia los dos genes de soja (Fig. 2.30). El aislamiento de dicha región se realizó mediante la obtención del ADNc a partir de la extracción de ARN de raíces de soja. Se utilizó el plásmido pK7GWIWG2D (II) con tecnología Gateway, diseñado para la generación de estructuras tipo *horquilla* y que contiene como reportero a la *proteína verde fluorescente* (GFP).

```

Glyma04g26840      TGCCAATATTTCCGACCGAAGTTTCAATATCGAATAAAGATAATTCCTATGGGTAGCTAC 1087
Glyma11g21490      TGCCAGTATTTCCGACCGAAGTTTCAATATCGAATAAAGATAATTCCTATGGGTAGCTAC 1298
*****.*****

Glyma04g26840      CCTCGTATCACAGACACCAATAACAGTACCTACGAGCTGTTTGGTCTGTCAACTTGTTTC 1147
Glyma11g21490      CCTCGAATCACAGACACCAATAACAGTACTTACGAGCTGTTTGGTCCAGTCAACTTGTTTC 1358
*****.*****

Glyma04g26840      TGGAGTACTCGCTATGACAAAGCAATGACTTTGTTTTAGCATGCCTCAAGGATTTTCGCA 1207
Glyma11g21490      TGGAGTACTCGCTATGACAAAGCAATGACATTTGTTTTAGCATGCCTCAAGGATTTTCGCA 1418
*****.*****

Glyma04g26840      GACTTTGCCAAATCTAAGGATCAAGAGAATAACATCCCACCTGAGAAATGTTTCAAATTC 1267
Glyma11g21490      GACTTTGCCAAATCCAAGGATCAAGAGAATAACATACCACCTGAGAAATGTTTCAAATTC 1478
*****.*****

Glyma04g26840      CCTTACAAGATTGAGAATGACAAGGTGGAAAACCTATCCATCACTCAAAGCTTCAATAAG 1327
Glyma11g21490      CCTTACAAGATTGAGAATGACAAGGTGGAAAACCTATCCATCACCCAAGCTTCAATAAG 1538
*****.*****

Glyma04g26840      CAGGAAAATTGGACTAAATCTCTCAAGTACACTCTTTGCAATTTGAAATGGGCCCTCTAT 1387
Glyma11g21490      CAGGAAAATTGGACTAAATCTCTCAAGTACACTCTTTGCAATTTGAAATGGGCCCTCTAT 1598
*****.*****

Glyma04g26840      TGGTTTGTGGAAATACTAACTCCAGCCCTTTCAGCAA 1427
Glyma11g21490      TGGTTTGTGGAAATACTAACTCCAGCCCTTTCAGCAA 1638
*****.*****

```

Fig. 2.30: Alineamiento de la región conservada de los genes GmAtg6/Bec-1 (Glyma04g26840 y Glyma11g21490) utilizada para el diseño del ARNi. En rojo, secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la obtención de la región conservada.

## Evaluación de la nodulación en raíces en cabellera ATG6i

El análisis de capacidad de nodulación de las raíces en cabellera ATG6i se llevó a cabo tal como se realizó con las raíces PI3Ki. Alrededor del día 21 post-inoculación con *B. japonicum* se evaluó el número de nódulos por raíz (Fig. 2.31). Las raíces fueron seleccionadas según la fluorescencia del reportero, siendo ATG6i-GFP 2.1 raíces con alta intensidad y ATG6i-GFP 2.2, raíces con fluorescencia nula. Las raíces con silenciamiento post-transcripcional de GmAtg6/Bec-1 mostraron una marcada disminución en su capacidad de nodulación, donde el número de nódulos por raíz cayó un 70 % con respecto a las raíces K599-vacía (Fig. 2.31A). Asimismo, las raíces ATG6i tuvieron afectado su crecimiento, evaluado como longitud de raíz principal, el cual presentó una reducción del 40 %, aproximadamente, respecto de raíces K599-vacía (Fig. 2.31B). Cabe destacar que, estos resultados de capacidad de nodulación y crecimiento de raíces ATG6i fueron dependientes de los niveles de silenciamiento y similares a los obtenidos en raíces PI3Ki. Además, se evaluó mediante PCR-TR, la expresión de genes claves implicados en el proceso de autofagia en las raíces ATG6i-GFP2.1 (fig. 2.32).

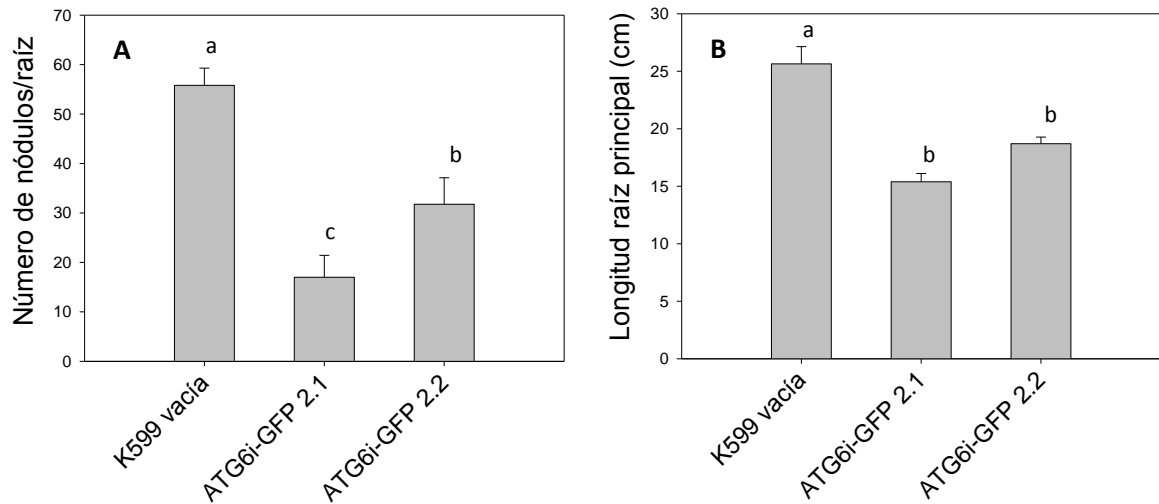


Fig. 2.31: A) Número de nódulos por raíz y B) promedio de la longitud (cm) de raíces K599-vacía y ATG6i. Los resultados son los promedios de diez experimentos independientes, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Test DGC de diferencias de medias.

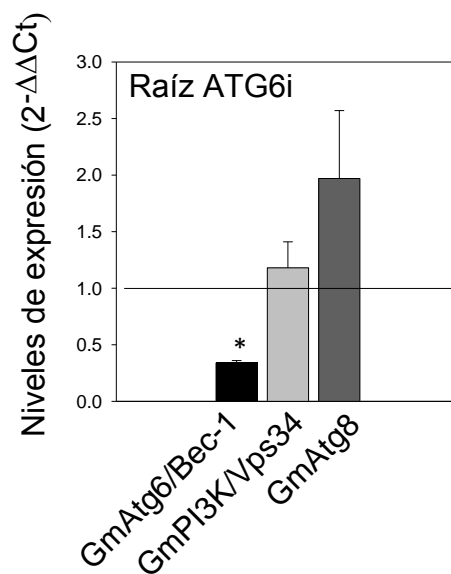


Fig. 2.32: Silenciamiento post-transcripcional de GmAtg6/Bec-1. Expresión de genes implicados en autofagia en raíces en cabellera ATG6i. Promedio de los niveles de expresión de GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840), GmAtg8 (Glyma17g01650, Glyma07g39090 y Glyma09g00630) y GmVps34/PI3K (Glyma06g10090 y Glyma04g10090) en raíces en cabellera ATG6i, relativo a raíces en cabellera control no transformadas. Los resultados son promedios de cuatro experimentos independientes. Asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (valor 1), prueba t para una media ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La expresión de Ced-9 en raíces de soja inhibió eventos de muerte celular y afectó la interacción soja-*B. japonicum*. En el estudio de los mecanismos de acción de los supresores de muerte celular de origen animal pertenecientes a la subfamilia Bcl-2, la capacidad de modulación del proceso de autofagia ha surgido como una forma de acción, quizás la más relevante de estas proteínas. La expresión de Ced-9 en las raíces en cabellera afectó el proceso de autofagia en los ensayos de nodulación y en bajo los tratamientos de estrés, donde la expresión de genes claves, tales como GmVps34/PI3K, GmATG6/Bec-1, GmAtg8 (Fig. 2.1 y 2.2) y el contenido de proteína ATG8 (Fig. 2.3) se vieron alterados, respectivamente. En este sentido, el dominio BH3 putativo en GmATG6 sienta las bases para la hipótesis de la regulación de la MCP y autofagia en plantas a través de la interacción de componentes claves mediante estos dominios y podría explicar, al menos en parte, la función conservada de los anti-apoptóticos de animales en plantas transgénicas. Trabajos futuros sobre la interacción molecular entre estas proteínas, tales como inmuno-precipitación o estudios de doble híbrido, validarían experimentalmente nuestros resultados. En este sentido, estamos generando las herramientas necesarias para este tipo de abordajes.

El proceso de autofagia tiene vital relevancia en las respuestas de las plantas frente a condiciones de estrés. En este sentido, Liu y colaboradores (2009) demostraron la participación de autofagia en las respuestas a estrés hídrico y salino, donde plantas de *Arabidopsis* con silenciamiento de AtATG18a fueron más sensibles a dichas condiciones. Nuestros resultados evidencian que los pelos radicales de raíces inoculadas en presencia de estrés salino tuvieron una marcada inducción de GmVps34/PI3K; mientras que GmAtg6/Bec-1 no tuvo diferencias significativas respecto al control (Fig. 2.6). El análisis de expresión de genes en pelos radicales, también arrojó resultados diferenciales entre las dos condiciones inductoras de muerte evaluadas, ya que bajo condiciones de 150 mM NaCl no se observaron diferencias significativas en los niveles de mensajero respecto del control (Fig. 2.6). Este resultado también se observó en el análisis de la proteína ATG8, donde bajo condiciones salinas severas se evidencia una disminución en sus niveles, contrario a lo observado en condiciones de 50 mM NaCl + *B. japonicum* (Fig. 2.18).

Para el estudio de la participación del tráfico de endomembranas en los eventos de muerte celular y en la interacción soja-*B. japonicum* realizamos inhibiciones farmacológicas de PI3K mediante pre-tratamientos con LY294002 y utilizamos herramientas de ingeniería genética para la obtención de raíces con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K y de ATG6/Beclina1 y con expresión de sitios FYVE. Mediante estos abordajes se pudo determinar que la actividad PI3K participa tanto en las

respuesta frente a situaciones de estrés (Fig. 2.5, 2.6, 2.7, 2.16, 2.17, 2.18 y 2.19) como en los mecanismos de interacción leguminosa-rizobio (Fig. 2.20, 2.21, 2.22, 2.23, 2.24, 2.25 y 2.27).

Los tratamientos de inoculación en presencia de 50 mM NaCl tuvieron efectos más drásticos, tanto en raíces con actividad PI3K inhibida farmacológicamente (Fig. 2.7) como en aquellas con silenciamiento post-transcripcional de GmVps34/PI3K (Fig. 2.16). Además, los ensayos de inhibición farmacológica indican que la sensibilidad de las raíces PI3Ki a las condiciones de estrés se deben a la participación directa de PI3K sobre mecanismos de adquisición de tolerancia, descartando los efectos de la homeostasis alterada, propia de las mutantes *atg*. Por otro lado, en tratamientos de 150 mM NaCl no se observaron diferencias luego de la inhibición farmacológica de la actividad de PI3K, tal vez debido a la metodología utilizada en la estimación de muerte, la cual presentó saturación de tinción (Fig. 2.7). No obstante, la cuantificación de los iones sodio y potasio en las raíces PI3Ki indican una sensibilidad incrementada a las condiciones de 150 mM NaCl (Fig. 2.19). En estos tratamientos encontramos afectado el contenido de los iones en las raíces PI3Ki, con incrementos en el contenido de sodio y en la salida de potasio, mientras que no se registraron diferencias en las condiciones de inoculación en presencia de estrés salino. Resultados similares fueron obtenidos por Leshem y colaboradores (2007), quienes reportaron un fenotipo más sensible al estrés salino en plantas mutantes *pigk*.

Uno de los principales fenotipos encontrados de las raíces con silenciamiento de GmVps34/PI3K es la falta de pelos radicales, principalmente en aquellas que presentaron una alta señal de la proteína reportera (Fig. 2.11). Este resultado está en sintonía con los resultados obtenidos en plantas transgénicas con secuestro metabólico de PI3P, mediado por la expresión del dominio FYVE. En este sentido, Lee Y. *et al.* (2008) evaluaron la participación de PI3K en el crecimiento polar de pelos radicales de *A. thaliana* y demostraron, mediante la expresión de dominios FYVE, que la actividad PI3K era requerida para el crecimiento de los pelos radicales. Más aun, resulta importante destacar la presencia de fenotipos intermedios en las raíces con silenciamiento de PI3K, que van desde raíces que no presentaron pelos a raíces con diferentes niveles de desarrollo de pelos radicales (Fig. 2.11), de crecimiento radical (Fig. 2.12) y de generación de EAO (Fig. 2.13, 2.14 y 2.15).

Llamativamente, se ha registrado que plantas mutantes para el proceso de autofagia contienen niveles de EAO y daño oxidativo incrementados (Bassham, 2007b; Yoshimoto *et al.*, 2009), lo cual estaría en contradicción con nuestros resultados en las raíces PI3Ki. No obstante, PI3K no solo participa en el proceso de autofagia, sino también del tráfico de vesículas, tal vez por eso la diferencia en el fenotipo de producción de EAO con respecto a otras mutantes *atg*. Asimismo, nuestros resultados están en concordancia

con los obtenidos por Lee y colaboradores (2008), quienes demostraron que raíces tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002, tuvieron niveles reducidos de EAO intracelulares. Además, recientemente, Liu y colaboradores (2012) demostraron que PI3K activa la generación de EAO por el complejo NADPH oxidasa a través del reclutamiento de proteínas Rac hacia la membrana plasmática. Se ha postulado que el complejo NADPH oxidasa estaría participando en la inducción del proceso de autofagia en respuesta a estrés salino pero no en respuesta a estrés osmótico, sugiriendo distintas vías de regulación de la autofagia bajo diferentes condiciones (Liu *et al.*, 2009). También se ha postulado que las vías de señalización para la adquisición de tolerancia son dependientes de la generación de EAO mediada por el complejo NADPH oxidasa (Leshem *et al.*, 2007). Esto podría explicar, en parte, la susceptibilidad incrementada de las raíces PI3Ki a las condiciones de estrés. En este contexto, resulta interesante estudiar como las EAO estarían participando en la regulación de la autofagia.

Los diferentes niveles de silenciamiento también afectaron el número y la colonización de los nódulos de manera proporcional (Fig. 2.20, 2.21 y 2.23). Sin embargo, considerando que los pelos radicales son la estructura por la cual se percibe y comienza a establecerse la interacción simbiótica (Santos *et al.* 2001, Ramu *et al.* 2002, D’Haeze *et al.* 2003, Oldroyd y Downie 2008), resulta esperable que raíces PI3Ki sin pelos radicales pierdan su capacidad de nodulación, sin significar por ello que tengan un rol directo o específico durante la simbiosis. Entonces, ¿en qué medida participa la enzima PI3K en los procesos de interacción entre soja y *B. japonicum*? Para resolver este interrogante, se evaluaron las respuestas tempranas típicas que se generan en los pelos radicales en presencia del microsimbionte, específicamente la generación de EAO (Cárdenas *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2012) en raíces pre-tratadas 30 min con LY294002. Si bien se ha reportado previamente la participación de PI3K en la interacción rizobio-leguminosa (Peleg-Grossman *et al.*, 2007), nuestros resultados evidencian un rol importante de PI3K en las etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*, participando en la regulación de la generación de EAO intracelulares y en el apoplasto (Fig. 2.24 y 2.25). Además, determinamos que la inducción de la producción de EAO dependiente de PI3K en pelos radicales luego de la inoculación con el rizobio, es a través de la actividad del complejo de membrana NADPH oxidasa (Fig. 2.26).

Notablemente, los resultados obtenidos sugieren que los incrementos en la generación intracelular de EAO ocurren a nivel vesicular/endosomal y a nivel perinuclear (Fig. 2.24 y 2.26). En este sentido, un trabajo reciente ha demostrado que PI3K modula la actividad del complejo NADPH oxidasa a través de la regulación del reclutamiento de Rac-1, miembro de la familia de las GTPasas, hacia la membrana plasmática (Liu *et al.*, 2012). Para trabajos futuros, nos hemos propuesto explorar el mecanismo por el cual PI3K

promueve la generación intracelular de EAO dependiente del complejo NADPH oxidasa y evaluar si el incremento de EAO intracelulares, tanto en la punta del pelo como en la región perinuclear, es producido por endocitosis activa del complejo NADPH oxidasa y/o mediante la activación del complejo que pudiera encontrarse en compartimentos intracelulares y/o endosomas. La actividad de la enzima PI3K ha sido propuesta en funciones nucleares debido al hecho de que ha sido encontrada asociada a sitios de transcripción activa en las plantas (Bunney *et al.*, 2000). De 16 proteínas con dominios FYVE en *Arabidopsis*, 9 contienen dominios de regulación de condensación de cromosomas (RCC1) (Van Leeuwen *et al.*, 2004). Estos descubrimientos sugieren una posible vinculación entre la actividad de PI3K y la transcripción. Además, muchos factores de transcripción son sensibles a cambios redox y requieren una señal oxidativa en el citoplasma para iniciar la señalización de activación (Abate *et al.*, 1990; Allen y Tresini, 2000). En animales, se ha demostrado que Nox2 y sus proteínas regulatorias se encuentran como un complejo pre-ensamblado en compartimentos perinucleares (Li y Shah, 2002). Asimismo, se ha demostrado que Nox4 se localiza preferencialmente a nivel nuclear en células endoteliales vasculares de humano, donde la generación de EAO dependiente de Nox4 se encuentra involucrada en la expresión de genes sensibles al estrés oxidativo (Kuroda *et al.*, 2005).

Por otro lado, diversos reportes sugieren la orientación del complejo NADPH oxidasa y la consecuente generación de EAO en endosomas (Li *et al.*, 2006). A través de estos procesos, los endosomas se vuelven una fuente de producción de EAO, estableciéndose la formación de una plataforma de señalización redox, conduciendo a la activación de efectores “río abajo”. Esta ubicación/activación en compartimentos subcelulares discretos, facilita la producción de EAO en proximidad de los objetivos sensibles a los cambios redox, permitiendo la activación de eventos específicos de señalización redox. Experimentos futuros deberían estar direccionados hacia la determinación de la importancia funcional de la generación localizada de EAO intracelular y los mecanismos de orientación del complejo NADPH oxidasa, donde PI3K jugaría un papel crucial.

Llamativamente, la generación de EAO intracelular moduladas por PI3K, que tiene lugar en los pelos radicales de raíces de soja luego de la inoculación con *B. japonicum*, tiene una importante relevancia en el establecimiento de la simbiosis, no solo para el diálogo molecular que sostiene al reconocimiento temprano, sino también sobre etapas tardías, como lo es el número de nódulos (Fig. 2.27 y 2.29). Estos resultados destacan la importancia que tienen las respuestas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum* sobre el proceso de nodulación, resaltando la estricta modulación de las EAO como una respuesta específica requerida para el reconocimiento de un microsimbionte por parte de

la planta, donde la actividad PI3K también tiene un rol clave en el control temprano del proceso. Por otro lado, los efectos de la inhibición de PI3K en etapas tempranas de la interacción solo afectaron el número de nódulos, mientras que el peso y la actividad nitrogenasa permanecieron sin diferencias significativas con respecto al control, lo que sugiere que no hubo efectos sobre la funcionalidad de los nódulos (Fig. 2.28B). De esta manera, en los primeros 30 min de la interacción rizobio-leguminosa, se establece el primer control de la capacidad de nodulación de la planta. Proponemos, por lo tanto, un nuevo nivel de control de la nodulación, previo al aborto de los hilos de infección. Este podría ser un mecanismo temprano de *evaluación* de las capacidades de nodulación, por ejemplo cuando las condiciones ambientales no son propicias, inhibiendo la nodulación y por lo tanto la formación de un nuevo órgano a donde destinar energía. Por último, estos resultados destacan la importancia que tiene el estudio de los mecanismos de respuestas tempranas, ya que afectarán la capacidad de nodulación de la planta.

Con el fin de sobrevivir en el interior de la célula huésped, patógenos de animales han desarrollado una variedad de mecanismos para evitar o interferir con las defensas inmunes innatas. Varios informes han demostrado que patógenos bacterianos son eliminados por vías autofágicas, y la autofagia ha sido cada vez más reconocida como un importante mecanismo de defensa para eliminar los microorganismos intracelulares (Yoshikawa *et al.*, 2009; Mostowy *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas bacterias han desarrollado mecanismos para evadir el reconocimiento autofágico o incluso cooptar la maquinaria autofagia para su propio beneficio como un nicho replicativo (Brumell y Grinstein, 2004; Zheng *et al.*, 2009). Resultados recientes destacan un nuevo papel para la autofagia que no implica la degradación del contenido del autofagosoma, sino en cambio, implica su reorientación hacia el espacio extracelular por una secreción de manera no convencional (Manjithaya y Subramani, 2011), desempeñando un papel importante en la formación de tejidos especializados y en la remodelación tisular (Deretic *et al.*, 2012). Debido a la participación diversa que tiene PI3K en los eventos de tráfico de endomembranas, tales como la endocitosis y la autofagia, se evaluó la participación de GmAtg6/Bec-1 en la interacción de soja con *B. japonicum*. Como mencionamos anteriormente, los análisis de plantas mutantes en proteínas ATG revelaron que *atg6* es la única mutación, hasta el momento, que presenta niveles nulos de autofagia, postulando a ATG6/BEC-1 como “interruptor” molecular del proceso de autofagia (Hayward y Dinesh-Kumar, 2011). Las raíces ATG6i tuvieron disminuida su capacidad de formación de nódulos (Fig. 2.31). Notablemente, y por primera vez, nuestros resultados proponen la participación del proceso de autofagia, o al menos de proteínas que están implicadas en este proceso, durante la interacción rizobio-leguminosa. Este aspecto será objetivo de futuros estudios a abordar por nuestro grupo de trabajo.



# **CONCLUSIONES FINALES**

Etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum* en presencia de estrés salino sub-letal (50 mM NaCl) y condiciones de estrés salino severo (150 mM NaCl) fueron identificadas previamente por nuestro grupo de trabajo como inductoras de muerte celular en raíces de soja. Estos eventos de muerte mostraron características distintivas en la generación de EAO (Muñoz *et al.*, 2012), en marcadores de estrés oxidativo, en niveles energéticos, en la homeostasis iónica y en la actividad autofágica. Estas diferencias, sumado al gradiente observado en la pérdida de selectividad de membrana, señalaron la evolución de un proceso de muerte celular más ordenado (50 mM NaCl + *B. japonicum*) con respecto al otro (150 mM NaCl). Asimismo, estos eventos de muerte celular estuvieron inhibidos, o al menos retardados, en raíces transgénicas con expresión de Ced-9, supresor de muerte celular de origen animal, indicando la conservación de la función de esta proteína en soja. Curiosamente, la expresión de Ced-9 en raíces de soja afectó negativamente la capacidad de nodulación con *B. japonicum*.

En condiciones de 150 mM NaCl, la expresión de Ced-9 afectó la homeostasis iónica, impidiendo la salida de potasio y calcio. Sin embargo, bajo tratamientos de inoculación en presencia de 50 mM NaCl no hubo diferencias con respecto a raíces no transformadas, sugiriendo que bajo estas condiciones, tanto la muerte celular como la adquisición de tolerancia por Ced-9, fueron independientes de la homeostasis de los iones. En este sentido, la modulación del proceso de autofagia apareció como otro mecanismo de acción de Ced-9, posiblemente a través de su capacidad de interacción con el dominio putativo BH3 de la proteínas ATG6/BEC-1 de soja.

Para evaluar la implicancia del tráfico de endomembranas/autofagia en los eventos de muerte celular y en la interacción soja-*B. japonicum* se utilizaron abordajes farmacológicos y herramientas de ingeniería genética. Los resultados demostraron la participación de PI3K en las respuestas frente a condiciones de estrés. En tratamientos de 150 mM NaCl, las raíces con silenciamiento de GmVps34/PI3K fueron más susceptibles al movimiento de iones, incorporando más Na<sup>+</sup> y perdiendo más K<sup>+</sup>, respecto de las raíces no transformadas; mientras que bajo condiciones de 50 mM NaCl + *B. japonicum* el contenido de iones no mostró diferencias entre raíces PI3Ki y control. Este resultado sugiere que la susceptibilidad de las raíces PI3Ki a las condiciones de 150 mM NaCl y 50 mM NaCl + *B. japonicum* fue dependiente e independiente de la homeostasis iónica, respectivamente; indicando diversidad de función para la actividad de PI3K. Respecto de la simbiosis, se observó que PI3K modula la producción de especies activas del oxígeno generadas por el complejo NADPH oxidasa en las etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*. Asimismo, esta respuesta temprana de reconocimiento del rizobio impactó sobre etapas tardías del proceso afectando la nodulación. Finalmente, nuestros resultados muestran las primeras evidencias de la participación del proceso de autofagia, o al menos

de proteínas que están implicadas en este proceso, durante la interacción rizobio-leguminosa.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Material vegetal

### 1.1. **Transformación de meristemas cotiledonares de plantas de soja**

Semillas de soja fueron desinfectadas y germinadas durante 2 días en cámara húmeda y posteriormente crecidas en invernadero. Luego de 6 días de crecimiento se realizó la ablación del epicótilo, favoreciendo la regeneración de yemas cotiledonares en detrimento de la dominancia apical. Posteriormente, se procedió a la ablación sobre las yemas cotiledonares y se realizó la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Luego de 10 días aproximadamente, el 90% de las plantas regeneró una de las yemas infectadas, mientras que un porcentaje menor regeneró ambas yemas. Se cosecharon las semillas de las ramas generadas. Este protocolo fue generado en nuestro laboratorio con éxito de transformación en eventos primarios pero con pérdida del transgen en F1.

### 1.2. **Generación de raíces en cabellera en plántulas de soja mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599**

Semillas pre-germinadas 48 h fueron transferidas a un sistema de hidroponia y cámara húmeda con doble tubo y sellado con film transparente. Luego de 3 días en cámara húmeda a 27°C y fotoperiodo 16:8 (luz/oscuridad), se realizó la infección sobre la yema cotiledonar con jeringas y agujas de tuberculina con *Agrobacterium rhizogenes* K599, transformada con las distintas construcciones utilizadas en esta tesis. Para la infección se prepara una suspensión bacteriana haciendo crecer la bacteria 24 h en medio LB sólido con antibiótico. Se raspa el cultivo bacteriano de la placa y se resuspende en 1 ml de agua estéril. Una vez pinchadas las plantas, se colocan nuevamente en la cámara húmeda y se rocía con agua una vez al día la zona lastimada e infectada. Entre 12 y 15 días pos infección aparecen raíces en cabellera, se corta el tallo debajo del cotiledón y es posible pasar las plántulas a cultivo hidropónico.

### 1.3. **Germinación de semillas de soja y obtención de pelos radicales**

Semillas de soja DM4800 fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5 % V/V por 5 minutos y enjuagadas 4 veces con agua destilada estéril. Las semillas se seleccionaron por tamaño y estado general y se colocaron simétricamente (2.8 x 2.8 cm) en cajas plásticas de germinación que contenían papel de filtro y algodón humedecido con agua estéril. Las mismas se colocaron en incubadora 24 h a 28 °C y 24 h a 37 °C. Durante las primeras 24 h las semillas se hidratan y comienza a aparecer la radícula, durante las segundas 24 h, el incremento de temperatura induce el crecimiento de la raíz que alcanza unos 3 cm y se incrementa la humedad de la cámara favoreciendo la aparición de pelos radicales. Si las 48 h se respetan con exactitud, la mayoría de los pelos radicales son jóvenes, en activo crecimiento e infectables por *B. japonicum*.

#### **1.4. Condiciones de estrés y muerte celular de pelos radicales y raíces en cabellera**

Para la inducción de muerte de pelos radicales, raíces de soja germinadas en cámara húmeda (apartado 1.3) fueron sometidas a tratamientos de 30 min de duración en 150 mM NaCl o NaCl 50 mM + *B. japonicum* (Muñoz *et al.*, 2012).

Las raíces en cabellera fueron sometidas a los mismos tratamientos durante 3 h.

#### **1.5. Cultivo bacteriano e inoculación de tratamientos**

Para los diferentes tratamientos de inoculación se utilizó *B. japonicum* USDA138. La misma se hizo crecer en medio YEM (Vincent 1970) con agitación constante a 28 °C por 5 días. Para la inoculación de raíces y plántulas, el cultivo se centrifugó a 12.000 rpm por 30 minutos y se resuspendió en agua destilada estéril para el control y en soluciones de NaCl (50 o 150 mM) para los diferentes tratamientos. Para todos los tratamientos se centrifugaron 2 ml de cultivo y se resuspendió en el mismo volumen de agua o de soluciones salinas.

## **2. Extracción de pelos radicales para determinaciones bioquímicas**

Para las determinaciones de metabolitos y expresión se extrajeron pelos radicales de raíces que fueron sometidas a los diferentes tratamientos utilizados en esta tesis. Para la extracción se realizó “peeling” de la zona de la raíz que contenía pelos radicales jóvenes e inmediatamente fueron congelados en aire líquido. El “peeling” se realizó haciendo una incisión con bisturí debajo de la lupa y tirando el tejido epidérmico que contiene los pelos radicales con una pinza de punta fina. Pelos de aproximadamente 100 raíces generan material suficiente para una muestra.

## **3. Extracción de ARN**

Muestras previamente congeladas a -80 °C se homogeneizaron en TRIZOL (Invitrogen) 1/10 P/V. Se mezcló con vortex 1 min y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, 0.2 ml de cloroformo por ml de TRIZOL fueron agregados y se agitó en vortex durante 15 seg. Se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 4 °C, 13.000 rpm, la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se agregó 1 volumen de isopropanol. Se Incubó 10 min a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar 10 min a 4 °C, 13.000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 75%, se centrifugó nuevamente por 5 min a 4 °C, 13.000 rpm. Finalmente, se secó el precipitado y se resuspendió el ARN total en 25 µl H<sub>2</sub>O DEPC. Para chequear la calidad del ARN se corrió gel de agarosa al 1 %, observándose el bandeo característico del ARN íntegro. Por otra parte se cuantificó el ARN en nanodrop. Aproximadamente 10 µg de ARN total se utilizaron para tratamiento con 2 U de DNAsaI. Se incubó 10 min a 37 °C y se detuvo la reacción con EDTA 0.5 M y 10 min a 75 °C. Finalmente, se extrajo la enzima con fenol y se volvió a chequear la calidad y la cantidad de ARN total antes de realizar la transcripción reversa.

### **3.1. Transcripción reversa**

Aproximadamente 10 µg de ARN total se utilizaron para la obtención de ADNc. Se realizó una mezcla que contenía ARN, oligo-dT y H<sub>2</sub>O y se calentó durante 10 min a 70 °C. Luego se agregó buffer para la transcriptasa reversa, la enzima M-MLV y dNTPs (según indicaciones del fabricante de la enzima). Esta mezcla se la colocó 1 h a 37 °C.

### **3.2. PCR en tiempo real**

#### **3.2.1. Mezcla de reacción y condiciones de PCR**

Cada reacción de PCR contenía un volumen final de 15 µl: 2 µl de ADNc, 7.5 µl de iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad) y 1 µl de cada cebador (5 pmoles/ml). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termociclador iQ5 (Bio Rad).

Se realizó un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95° C y 40 ciclos de: 15 seg de desnaturalización a 95° C, 30 seg de hibridación a 59° C y 30 seg de extensión a 68° C, con un paso final en el que se realizó una curva de Melting para cada gen analizado.

#### **3.2.2. Calculo de eficiencia de oligonucleótidos**

Para poder calcular los niveles de expresión de cada gen analizado mediante el método de Livak y Schmittgen (2001), se realizaron curvas para cada juego de cebadores haciendo diluciones del ADNc de 1, 1x10<sup>-1</sup>, 1x10<sup>-2</sup> y 1x10<sup>-3</sup>. Se estableció la eficiencia de los cebadores entre 90 y 110 %. En los casos en los que la eficiencia estaba fuera de este rango los cebadores fueron diseñados nuevamente.

## **4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12.8 %, de acuerdo con el método de Laemmli (1970).

Se evaluó la presencia de la proteína CED-9 y ATG8 mediante *western blot* utilizando anticuerpos policlonales. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (NC) o de PVDF (polivinideno difluor) durante 1 h a 100V constantes, en tampón de trasferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-HCl, 0.037% SDS 20% metanol pH 8.3). La membrana fue lavada con TBS (50mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7.5) y bloqueo con TBS + 5% de leche descremada durante 1 h. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 1 h en TBS + 0.5 % de leche descremada. La membrana se lavó tres veces con TBST (TBS+ 0.1%Tween 20). La incubación con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (PA) se realizó en TBS + 0.5 % de leche durante 1 h a T° ambiente. El revelado de la actividad de PA se realizó en tampón (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 5 mM MgCl, y 100 mM NaCl con 4 mM NBT y 12mM BCIP).

## 5. Proteínas totales

Las determinaciones fueron realizadas por el método de Lowry (1951) utilizando como estándar proteína albúmina de suero bovina (BSA).

## 6. Determinación histoquímica de radical superóxido apoplástico

Se realizó mediante el uso de Nitro Blue Tetrazolium (NBT Sigma), una sal que se reduce en presencia de radical superóxido y genera un precipitado azul que se denomina blue formazan. Este precipitado puede observarse directamente en el material vegetal por microscopia o cuantificarse mediante análisis de imágenes. Raíces control y pre tratadas 30 minutos con: LY294002 30  $\mu$ M y DPI 50  $\mu$ M, con sus respectivas combinaciones inoculado y no inoculado, se incubaron en NBT 0.01% P/V durante 30 minutos. La reacción se detuvo con alcohol 96%. Para la cuantificación de imágenes se tomaron fotografías de la raíz entera.

## 7. Determinación de especies activas de oxígeno intracelulares por microscopia de epifluorescencia y confocal

Raíces provenientes de los distintos tratamientos fueron incubadas por 15 minutos en dihidro-diclorofluoresceína-diacetato ( $H_2DCFDA$ , Molecular probes, Invitrogen) 10  $\mu$ M (siempre respetando las presiones osmóticas de cada tratamiento). Este fluorocromo reacciona con especies reactivas de oxígeno y fluoresce de color verde/amarillo. Inmediatamente transcurrido el tiempo de incubación con el fluoro cromo, se realizó “peeling” de raíces provenientes de los diferentes tratamientos que se montaron en porta objetos para la observación. Se analizaron 3 experimentos independientes por tratamiento y 2 “peeling” por raíz. En cada “peeling” se analizaron 4 campos. La fluorescencia fue observada en microscopio de epifluorescencia Axiophot – Zeiss Alemania con filtro de excitación BP 450–490 y de emisión LP 520. Se tomaron fotografías por campo y se cuantificó por análisis de imágenes la fluorescencia perinuclear y del citoplasma de pelos radicales individuales para cada tratamiento. Se cuantificó un total de 50 pelos radicales por tratamiento. La fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia respecto de la fluorescencia del control a la que se le asignó un valor de 1.

## 8. Evaluación de muerte de pelos radicales y de raíces sometidas a los tratamientos de estrés

### **8.1. Viabilidad por tinciones con azul de evans y azul de tripano**

Para la cuantificación de muerte en pelos radicales se utilizaron el colorante azul de evans y azul de tripano (Sigma) según Qiao *et al.* (2002). Estos ingresan a la célula cuando existe pérdida de selectividad de membranas. Raíces provenientes de los diferentes tratamientos, fueron incubadas por 10 min en azul de evans o azul de tripano 0.05% P/V (siempre respetando las



presiones osmóticas de cada tratamiento). Se tomaron fotografías por campo y se cuantificó por análisis de imágenes la intensidad de color azul para cada tratamiento.

## **8.2. Evaluación de la degradación nuclear por microscopía confocal**

Raíces provenientes de los distintos tratamientos fueron incubadas con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA-BrEt) (Sigma), 50 µg/ml de cada uno. Esta técnica se basa en el principio de que NA y el BrEt son colorantes que se intercalan en el ADN y fluorescen bajo la luz UV. El color naranja y la presencia de la cromatina dispersa en el citoplasma indican que las células han perdido la integridad de la membrana nuclear y que están en una fase muy tardía de apoptosis. Ambos colorantes se excitan con 488 nm y se observa la emisión a 500-530 nm para NA y 565-615 nm para BrEt.

## **8.2. Evaluación de la degradación nuclear por electroforesis en gel de agarosa**

Se realizó la extracción de ADN de pelos y raíces sometidos a los distintos tratamientos según Saghai-Marooof y colaboradores (1984). 2 µg de ADN fueron sembrados en gel de agarosa 1.5 % y BrEt. La corrida electroforética se visualizó en trans-iluminador BioRad.

## **9. Extracción ácida para la determinación de Glutación, MDA y ATP**

Se extrajeron pelos radicales de raíces que fueron sometidas 30 min a condiciones de estrés NaCl 50 mM; NaCl 50 mM + *B. japonicum*; NaCl 150 mM y condiciones control y control inoculado. Los mismos se homogeneizaron en mortero con aire líquido y ácido tricloro acético (TCA) al 3 % V/V. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se colocó en un tubo limpio y puede ser almacenado a -40°C hasta su cuantificación.

### **9.1. Determinación de antioxidantes no enzimáticos: glutación**

La determinación se realizó según Griffith (1980), con algunas modificaciones. Se colocaron 30 µl de muestra (apartado 9), 30 µl de mezcla de reacción (Por muestra: 1 µl de Glutación reductasa 5 u/ml, 2.8 µl de MgCl<sub>2</sub> 60 mM, 7.5 µl de NADPH 1 mM disuelto en Tampón Tris-Cl pH 8 50 mM, 2.8 µl de ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) 20 mM, 36.5 µl de Tampón Tris-Cl pH 8 2M) y 35 µl de agua. Se incubó a 28 °C por 30 minutos y luego se le agrego 5 µl de ácido 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) y se incubo 15 minutos más a temperatura ambiente. Para determinar el contenido de glutación reducido de la muestra se colocaron 30 µl de muestra, 40 µl de Tampón Tris-Cl pH 8 1M y 25 µl de agua. Se incubó a 28 °C por 30 minutos y luego se le agregó 5 µl de ácido 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y se incubó 15 min mas a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en espectrofotómetro a 412 nm.

El cálculo de concentración se realizó mediante el uso de curva patrón y se expresó por cantidad de proteínas resuspendidas del precipitado con SDS 1 % luego de la extracción.

### **9.2. Determinación de malondialdehído (MDA)**

Se mezclaron 100 µl de muestra (apartado 9) con 100 µl de una mezcla que contiene TCA 20 % y ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.5 %, se incubó a 90°C por 20 minutos y se colocó rápidamente en hielo. Estas muestras se centrifugaron a 12000 por 10 minutos para eliminar posibles precipitados. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y 600 nm (Heath y Packer 1968).

El cálculo de concentración se realizó mediante el uso del coeficiente de extinción molar del MDA ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y se expresó por cantidad de proteínas resuspendidas del precipitado con SDS 1 % luego de la extracción.

### **9.3. Determinación por luminiscencia de los niveles de ATP**

Se tomaron 10 µl de muestra (apartado 9) y se agregó 390 µl de tampón Tris-Acetato 0,1 M pH 7,8. Luego, 50 µl de esta solución se mezclaron con 75 µl de H<sub>2</sub>O libre de ATP y 25 µl de reactivo Luciferasa/Luciferina (rL/L) (Enliten, Promega) en placa especial de Luminómetro (Promega). Se realizó una curva calibración con una solución de ATP de concentración conocida provista por el fabricante.

La luciferasa recombinante cataliza la siguiente reacción:



Cuando el ATP es el componente limitante en la reacción de luciferasa, la intensidad de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP. La medición de la intensidad de luz en el luminómetro permite la cuantificación de ATP.

## **10. Efectos tempranos sobre etapas tardías de la interacción simbiótica**

Semillas germinadas 2 días fueron pre-tratadas durante 30 min con DPI 50 µM o LY294002 30 µM, posteriormente se inocularon 30 min con *B. japonicum* o no (control), se lavaron para eliminar el exceso de bacterias y se colocaron en hidroponia con solución nutritiva B y D sin nitrógeno. Luego de 24 días de crecimiento en cámara de cultivo a 27 °C y fotoperiodo 16:8 (luz/oscuridad respectivamente) se determinó el número de nódulos de corona, peso fresco y actividad nitrogenasa.

## **11. Actividad Nitrogenasa**

La actividad nitrogenasa fue estimada mediante reducción de acetileno a etileno y cuantificada por cromatografía gaseosa según Drevon y colaboradores (1988).

## 12. Construcción de los plásmidos

Para la realización de las construcciones de silenciamiento mediado por ARNi de GmVps34/PI3K y GmAtg6/Bec-1, se amplificó por PCR un fragmento correspondiente a la región codificante a partir del ADNc obtenido de raíces de soja. Dicha región se encuentra altamente conservada por lo que el silenciamiento estuvo dirigido para ambos genes, tanto de GmVps34/PI3K (Glyma04g10090 y Glyma06g10090) como de GmAtg6/Bec-1 (Glyma11g21490 y Glyma04g26840). Los oligonucleótidos utilizados para GmVps34/PI3K fueron 5'-CACCCCGAGAATCGTAGCATCATAAGC-3' y 5'-CCATCTGAGGGAATAATGCACTC-3' y para GmAtg6/Bec-1 5'-CACCTGCCAGTATTTCCGACC-3' y 5'-TTGCTGAAAGAGGCTGGAAGTTAG-3'. El producto de PCR fue clonado en el vector de entrada pENTR/D-TOPO según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y recombinado en los vectores destino pK7GWIWG2D (II) y Tdt-RNAi. pK7GWIWG2D (II) que contiene como reportero a la *proteína verde fluorescente* (GFP) y el pTDT-RNAi cuya proteína reportera es la *proteína roja del tomate* (tdTomato).

La construcción pBE2113-Ced-9 (pBE-Ced-9) fue realizada por Mitsuahara y colaboradores (1996 y 1999) y pGreend35S::YFP-2x-FYVE (2x-FYVE) fue cedida por Veermer (Veermer *et al.*, 2006). Todas las construcciones fueron introducidas en *Agrobacterium rhizogenes* K599 por electroporación.

## 13. Preparación de plásmidos (Miniprep)

Se extrajeron los plásmidos a partir de 3 ml de cultivo líquido bacteriano de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  con las diferentes construcciones utilizadas en esta Tesis (pBE-Ced-9; ARNi-Tdt; PI3Ki-Tdt; PI3Ki-GFP; 2x-FYVE y ATG6i-GFP). Las bacterias cosechadas se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 200  $\mu$ l de solución de resuspensión y se homogeneizó. Se agregó 0.5  $\mu$ g de ARNasa y 200  $\mu$ l de solución de lisis [Na(OH) 0.2M y 1% SDS]. Se mezclaron los tubos por inversión, se agregó 200  $\mu$ l de solución de neutralización y se volvió a mezclar la solución. Se incubó 5 min en hielo, se centrifugó 3 min a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se agregó 300  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub>, se agitó con vortex y se centrifugó 5 min a máxima velocidad. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se agregaron 2:3 del volumen de Isopropanol. Se mezcló con vortex y se incubó durante 10 min a -20° C. Se centrifugó 15 min a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500  $\mu$ l de etanol 70%. Se secó el precipitado con vacío y se resuspendió en 32  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC. El precipitado resuspendido se mezcló suavemente con NaCl 1 M y PEG 8000 6.5 %. Se incubó en hielo 1 h y se centrifugó 30 min a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70 %. El precipitado se secó con vacío y se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC.

#### **14. Cuantificación de iones en raíces en cabellera sometidas a condiciones de estrés**

La cuantificación de los iones sodio, potasio y calcio se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (Shimadzu). Las muestras fueron incubadas en ácido nítrico 0,1 N durante una semana para la extracción de los iones. Posteriormente, se filtraron las muestras y se realizaron las diluciones necesarias en agua previamente filtrada.

#### **15. Análisis y cuantificación de imágenes**

La cuantificación en imágenes de color y fluorescencia se llevó a cabo usando el programa OPTIMAS 6.1 Optimas Corporation, Bothell, WA. La coloración o fluorescencia fue cuantificada como luminiscencia y transformada en unidades de densidad óptica (DO). La intensidad se cuantificó siempre respecto del área analizada.

#### **16. Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  error estándar de las réplicas independientes. El test de diferencias de medias (DGC) y prueba t para una media se realizaron utilizando el programa InfoStat/Profesional ver. 2007p, Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Abate C, Patel L, Rauscher FJ, Curran T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161.

Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. (2012). Role of AMPK-mTOR- Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32, 2-11.

Allen RG y Tresini M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28, 463-499.

Allison DG. (2000). Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN 0-521-79302-5.

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92 (6), 773-784.

Alvarez, M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. (2000). *Plant Mol. Biol.* 44, 429-442.

Ameisen JC (1996). The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279.

Ameisen JC (1998). The evolutionary origin and role of programmed cell death in single celled organisms: a new view of executioners, mitochondria, hostpathogen interactions, and the role of death in the process of natural selection. In *When cells die*, Lockshin R, Zakeri Z y Tilly J, eds. (New York: Wiley-Liss, Inc.) pp. 3 - 56.

Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi MA (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.* 2, 285-300.

Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell death and differentiation*, 9 (4), 367-93.

Anthony, R. G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T. (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 23 (3), 572-81.

Arpagaus S, Rawyler AJ, Braendle RA. (2002). Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Biol Chem* 277, 1780-1787.

Asai, T. Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene- and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823-1836.

Baehrecke, E.H. (2003). Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 10, 940-945.

Baenziger P, Dickman M, Clemente T, Sato S, Mitra A, Watkins J, Langston B, LaVallee B, Schimelfenig J, Mitra S, Bohlmann J, Montgomery M. (2004) Wheat transformation: a needed tool for wheat genetics and germplasm improvement.

Proceedings of the 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight. Genetic Engineering, Pag. 259.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, *et al.* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658– 662.

Balk J., Chew S.K., Leaver C.J., McCabe P.F. (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.* 34, 573-583.

Balk J., Leaver C.J., McCabe P.F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett.* 463, 151-154.

Balk J. y Leaver C.J. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13, 1803-1818.

Barlow P.W. (1982). Cell death-An integral part of plant development. In *Growth Regulators in Plant Senescence*, M.B. Jackson, B. Grout, and I.A. Mackenzie, eds (Wantage, UK: British Plant Growth Regulator Group), pp. 27-45.

Bassham DC (2007) Plant autophagy—more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* 10, 587-593.

Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen, L. J., y Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2, 2–11.

Bassham DC. (2007b). Disruption of Autophagy Results in Constitutive Oxidative Stress in Arabidopsis. *Autophagy*, 3 (3), 257-258.

Beers E. P. y McDowell J. M. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 561–567

Belham C, Wu S, Avruch J (1999). Intracellular signalling: PDK1- a kinase at the hub of things. *Curr Biol* 9: R93–R96.

Benedict CA, Norris PS, Ware CF. (2002). To kill or be killed: Viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 3, 1013-1018.

Bleecker A.B. y Patterson S.E. (1997). Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *Plant Cell* 9, 1169- 1179.

Bodemann B. O., Orvedahl A., Cheng T., Ram R. R., Ou Y-H., Formstecher E., Maiti M (2011). RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell*, 144 (2), 253-267.

Brumell J.H. y Grinstein S. (2004). Salmonella redirects phagosomal maturation. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 78-84

Bunney T.D., Watkins P, Beven F, Shaw P.J, Hernandez L.E, Lomonosoff G.P., Shanks M. (2000). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *The Plant cell*, 12 (9), 1679-1688.

Cao Y., y Klionsky D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell research*, 17 (10), 839-849.

Casano LM, Martín M y Sabater B. (1994). Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature- senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106, 1033-1039.

Casano LM, Zapata JM, Martín M y Sabater B. (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport: plastoquinone as an electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 942-948.

Casolo V., Petrusa E., Krajnáková J., Macri F., Vianello A. (2005). Involvement of the mitochondrial  $K^+_{ATP}$  channel in  $H_2O_2$ - or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *Journal of experimental botany*, 56 (413), 997-1006.

Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sanderman HJ, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by  $H_2O_2$  in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5818-5823.

Chen S., y Dickman M.B. (2004). Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 55 (408), 2617-2623.

Chiandussi E, Petrusa E, Macri F, Vianello A. (2002). Modulation of a plant mitochondrial  $K^+$  ATP channel and its involvement in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr.* 34, 177-184.

Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124 (4), 803-814.

Chung T, Phillips AR, Vierstra RD. (2010). ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in Arabidopsis require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. *Plant J.* 62, 483-493.

Chung T., Suttangkakul A., Vierstra R.D. (2009). The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant physiology*, 149 (1), 220-234.

Cole R.A. y Fowler J.E. (2006). Polarized growth: Maintaining focus on the tip. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 579-588.

Conradt B. y Horvitz H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93 (4), 519-529.



Costa M.D.L., Reis P.B., Valente M.A.S., Irsigler A.S.T., Carvalho C.M., Loureiro M.E., Aragão F.J.L. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *The Journal of biological chemistry*, 283 (29), 20209-19.

Cote G.G. y Crain R.C. (1993). Biochemistry of phosphoinositides. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 333-356.

Cuconati A, y White E. (2002). Viral homologs of BCL-2: Role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev* 16, 2465-2478.

Cuin T. A., Betts S., Chalmandrier R., Shabala S. (2008). A root's ability to retain K<sup>+</sup> correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of experimental botany*, 59 (10), 2697-706.

Curtis M.J. y Wolpert T.J. (2002). The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J.* 29, 295-312.

Dangl J.L. y Jones J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.

Danon A., Rotari V., Gordon A., Mailhac N, Gallois P. (2004) UV-C overexposure induces a programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *J. Biol. Chem.* 279, 779-787.

Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F. (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 33, 621-632.

Davletova, Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., Mittler R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 268-281.

Deak M, Casamayor A, Currie RA, Downes CP, Alessi DR. (1999). Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett*, 451, 220-226.

Degli Esposti, M. (2002). Sequence and functional similarities between proapoptotic Bid and plant lipid transfer proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1553 (3), 331-340.

Deretic V., Jiang S., Dupont N. (2012). Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends in cell biology*, 22(8), 397-406.

Devarenne T. P. (2011). The plant cell death suppressor Adi3 interacts with the autophagic protein Atg8h. *Biochemical and biophysical research communications*, 412, 699-703.

Devarenne T.P., Sophia K., Pedley K.F., y Martin G.B. (2006). Adi3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death. *The EMBO Journal*, 25 (1), 255-265.

Diamond M. y McCabe P.F. (2007). The mitochondrion and plant programmed cell death. In: Logan, D.C. (Ed.), *Plant Mitochondria – Annual Plant Reviews*. Black-well Publishing, pp. 308–334.

Dickman M.B., Park Y.K., Oltersdorf T., Li W., Clemente T., French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS* 98 (12), 6957-6962.

Dickman M.B., Park Y. K., Oltersdorf T., Li W., Clemente T., y French R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS* 98 (12), 6957–6962.

Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 33105-33114.

Doorn W. G. V. (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany*, 62 (14), 4749-4761.

Dove S.K., Lloyd C.W., Drobak B.K. (1994). Identification of a phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase in plant cells: association with the cytoskeleton. *Biochem J.* 303, 347-350.

Durrant WE y Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42, 185-209.

Dutilleul C., Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer C, Noctor G. (2003). Functional mitochondrial complex I is required for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol.* 131, 264-275.

Earnshaw WC (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 337-343.

Edinger A.L. y Thompson C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16 (6), 663-669.

Ellis H.M., y Horvitz H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Farré J-C y Subramani S. (2011). Rallying the exocyst as an autophagy scaffold. *Cell*, 144 (2), 172-4.

Fath A, Bethke PC, Jones RL (1999). Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J.* 20, 305–315.

Fath A., Bethke P., Beligni V, Jones R. (2002). Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J. Exp. Bot.* 53, 1273-1282.

Flor H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.

Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G.E., Capaccioli S. y Orlandini S.Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.* 182, 41-49.

Fortes F, Castilho RF, Catisti R, Carnieri EGS, Vercesi AE. (2001). Ca<sup>2+</sup> induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* 33, 43-51.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 481-507.

Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9, 1147-1156.

Fukuda, H. (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44, 245-253.

Giacomello M., Drago I., Pizzo P., Pozzan T. (2007). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. *Cell death and differentiation*, 14 (7), 1267-74.

Gillooly D.J., Simonsen A., Stenmark H. (2001). Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem. J.*, 355, 249-258.

Gonzales M.L. y Anderson R.A. (2006). Nuclear phosphoinositide kinases and inositol phospholipids. *J Cell Biochem.* 97, 252-260.

Gozuacik D. y Kimchi A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906.

Green D.R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102:1-4.

Greenberg J.T. (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12094-12097.

Groover A. y Jones A.M. (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119, 375-384.

Groover A., DeWitt N., Heidel A. y Jones, A. M. (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* 196, 197–211.

Guiboileau A., Yoshimoto K., Soulay F., Bataille M-P., Avice J-C., Masclaux-Daubresse C. (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-

plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*, 194 (3), 732-740.

Gupta R, Ting JT, Sokolov LN, Johnson SA, Luan S. (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN, is essential for pollen development in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2495-2507.

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166.

Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y. (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* 129, 1181–93.

Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.

Hayward A.P, Dinesh-Kumar S.P. (2011). What can Plant Autophagy Do for an Innate Immune Response? *Annual review of phytopathology*, 49, 1-20.

Hayward A.P., Tsao J., Dinesh-Kumar S.P. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in cell & developmental biology*, 20 (9), 1041-1047.

Heilmann I. (2009). Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends Plant Sci.*, 14, 171-179.

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356 (6369), 494-499.

Hepler P.K., Vidali L., Cheung A.Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 159-187.

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hoeberichts F.A, Woltering E.J. (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessay* 25, 47-57.

Hoefnagel M.H.N, Atkin O.K, Wiskich J.T. (1998). Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 235-255.

Hofius D., Schultz-Larsen T., Joensen J., Tsitsigiannis D.I., Petersen N.H.T., Mattsson O., Jørgensen L.B., Jones D.G., Mund J., Petersen M (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell*, 137 (4), 773-783.

Hong Z., Verma D.P. (1994). A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 19 (20), 9617-9621.

Hu G., Yalpani N., Briggs S.P, Johal G.S. (1998). A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell* 10, 1095-1105.

Ihara-Ohori Y., Nagano M., Muto S., Uchimiya H., Kawai-Yamada, M. (2007). Cell death suppressor *Arabidopsis* bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant physiology*, 143 (2), 650-660.

Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, Murphy E. (2004). Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 95, 734-741.

Inohara N., Ogura Y., Nuñez G. (2002). Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 76-80.

Ishida H., Yoshimoto K. (2008). Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, 4 (7), 961-962.

Ishida H., Yoshimoto K., Izumi M., Reisen D., Yano Y., Makino A., Ohsumi Y., Hanson M, Mae T. (2008b). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant physiology*, 148 (1), 142-155.

Ishikawa T., Watanabe N., Nagano M., Kawai-Yamada M., Lam E. (2011). Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. *Cell death and differentiation*, 18 (8), 1271-1278.

Jackson M.B., Fenning T.M., Drew M.C., Saker L.R. (1985). Stimulation of ethylene production and gas-space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. by small partial pressures of oxygen. *Planta* 165, 486-492.

Jacobson M.D., Weil M. y Raff M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.

Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K, Walker G.C. (2008). Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2), 704-709.

Jones R.L., Jacobsen J.V. (1991). Regulation of synthesis and transport of proteins in cereal aleurone. *Int. Rev. Cytol.* 126, 49-88.

Jones A.M. Programmed cell death in development and defense. (2001) *Plant Physiol.* 125, 94-97.

- Jung J., Kim Y., Kwak J., Hwang J., Young J., Schroeder J., Hwang I., Lee Y. (2002). Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* 14, 2399-2412.
- Kachroo A, He Z, Patkar R, Zhu Q, Zhong J, Li D, Ronald P, Lamb C, Chattoo B. (2003). Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Res.* 12, 577-586.
- Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. (2009). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* 17, 98-109.
- Kelley L, Sternberg M.J.E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, 4 (3), 363-371.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 (4), 239-257.
- Kerr JF. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *Journal of Pathology and Bacteriology* 90 (90), 419-435.
- Kihara A., Noda T., Ishihara N, Ohsumi Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519-530.
- Kim C., Meskauskiene R., Zhang S., Lee KP, Lakshmanan Ashok M, Blajicka K, Herrfurth C, Feussner I, Apel K. (2012). Chloroplasts of *Arabidopsis* Are the Source and a Primary Target of a Plant-Specific Programmed Cell Death Signaling Pathway. *The Plant cell*, 24 (7), 3026-3039.
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (1999). Vacuolar processing enzyme is upregulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* 19, 43-53.
- Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Øvervatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* 33, 505-516.
- Klionsky D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science*, 118, 7-18.
- Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP. (1995). Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1271, 63-66.
- Kourtis N., Tavernarakis N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation*, 16 (1), 21-30.

Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB, Fiskum G. (2002). Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem* 277, 42802-42807.

Kowaltowski AJ, Fenton RG, Fiskum G. (2004). Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 37, 1845-1853.

Kuriyama H. y Fukuda H. (2002). Developmental programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 568–573.

Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K, Sumimoto H. (2005). The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* 10, 1139-1151.

Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (2005). VPE is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol. Chem.* 280, 32914-32920.

Kwon S. y Park O. (2008). Autophagy in Plants. *Journal of Plant Biology*, 51 (5), 313-320.

Kwon SI, Cho HJ, Jung JH, Yoshimoto K, Shirasu K, Park OK. (2010). The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 64, 151-164.

Lam E, del Pozo O. (2000). Caspase-like proteases involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44, 417-428.

Lam E., Kato N., Lawton M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.

Lee S.B., Bae I.H., Bae Y.S., Um H-D. (2006). Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *The Journal of biological chemistry*, 281 (47), 36228-36235.

Lee Y, Bak G, Choi Y, Chuang W.I, Cho H-T, Lee Y. (2008). Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Root Hair Growth *Plant Physiology* 147, 624-635.

Lee Y., Kim E., Choi Y., Hwang I., Staiger C.J., Chung Y., Lee Y. (2008b). The *Arabidopsis* Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Important for Pollen Development. *Plant Physiol.* 147, 1886–1897.

Leevers S.J., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current opinion in cell biology*, 11 (2), 219-225.

Lemmon M.A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 4, 201-213.

Leon J., Lawton M.A., Raskin I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 1673-1678.

Leshem Y., Seri L., Levine A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant journal* 51 (2), 185-197.

Levine A, Belenghi B., Damari-Weisler H., Granot D. (2001). Vesicle-associated membrane protein of Arabidopsis suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *The Journal of biological chemistry*, 276 (49), 46284-46289.

Levine B., Klionsky D.J., Arbor A. (2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy, *Autophagy* 6, 463-477.

Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R. y Lamb C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6, 427-437.

Li J y Yuan J (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.

Li J-M y Shah AM. (2002). Intracellular Localization and Preassembly of the NADPH Oxidase Complex in Cultured Endothelial Cells. *J Biol Chem* 277, 19952-19960.

Li Q, Harraz MM, Zhou W, Zhang LN, Ding W, Zhang Y, Eggleston T, Yeaman C, Banfi B, Engelhardt JF. (2006). Nox2 and Rac1 regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. *Molecular and cellular biology* 26, 140-154.

Li H., Zhu H., Xu C.J. y Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. y Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.

Liang X.H., Kleeman L.K., Jiang H.H., Gordon G., Goldman J.E., Berry G., Herman B., Levine B. (1998) *J. Virol.* 72, 8586-8596.

Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., Fedorova E., Bisseling T. (2009). Medicago N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *The Plant cell*, 21 (9), 2811-2828.

Liu J., Zhou J., Xing D. (2012). Phosphatidylinositol 3-kinase plays a vital role in regulation of rice seed vigor via altering NADPH oxidase activity. *PloS one*, 7 (3), e33817.

Liu Y. y Bassham D.C. (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63 (8), 1-23.

Liu Y., Burgos J.S., Deng Y., Srivastava R., Howell S.H., Bassham D.C. (2012). Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis. *The Plant cell*, 1-18.



Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallóczy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121 (4), 567-577.

Liu Y., Xiong Y., Bassham D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5 (7), 954-963.

Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. y Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147–157.

Livak K.J. y Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4), 402-408.

Loh J., Huang Q., Petros A.M., Nettesheim D., van Dyk L.F., Labrada L., Speck S. H. (2005). A surface groove essential for viral Bcl-2 function during chronic infection in vivo. *PLoS pathogens*, 1 (1), 80-91.

Lorrain S., Vaillau F., Balague C., Roby D. (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 8, 263-271.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. y Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.

Maiuri M.C., Le Toumelin G., Criollo A., Rain J-C., Gautier F., Juin P., Tasdemir E. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal*, 26 (10), 2527-2539.

Manjithaya R. y Subramani S. (2011). Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? *Trends in cell biology*, 21 (2), 67-73.

McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI (1997). A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 12: 267–280

Meijer H.J. y Munnik T. (2003), Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 54, 265-306.

Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M., Shulaev V., Dangl J.L., Mittler R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2 (84), 1-10.

Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A., Ryabovol V. (2012). Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria. *Plant physiology and biochemistry* 59, 11-19.

Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y. (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* 37, 49-59.

Mitsuhara I., Malik K., Miura M., Ohashi Y. (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current biology*, 9 (14), 775-778.

Mittler R. y Lam E. (1995). In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiol.* 108, 489-493.

Mittler R., Simon L. y Lam E. (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110, 1333-1344.

Miura M y Yuan J (1997). Mechanisms of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 32, 139-174.

Monteiro D., Liu Q., Lisboa S., Scherer G.E., Quader H, Malho R. (2005). Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of  $[Ca^{2+}]_c$  and membrane secretion. *J Exp Bot.* 56, 1665-1674.

Moon H, Baek D, Lee B, Prasad DT, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Choi MS, Bahk J, Kim MO, Hong JC, Yun D-J. (2002). Soybean ascorbate peroxidase suppresses Bax-induced apoptosis in yeast by inhibiting oxygen radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 457-462.

Mostowy S, Sancho-Shimizu V, Hamon MA, Simeone R, Brosch R, Johansen T, Cossart P (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 26987-26995.

Munnik T. y Testerink C. (2009). Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”. *Journal of lipid research*, 50, 260-265.

Muñoz N., Robert G., Melchiorre M., Racca R., Lascano R. (2012). Saline and osmotic stress differentially affects apoplastic and intracellular reactive oxygen species production, curling and death of root hair during *Glycine max* L.–*Bradyrhizobium japonicum* interaction. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 76-83.

Mur L.J., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental botany*, 59 (3), 501-520.

Murphy A, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G. (1996). Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 93, 9893- 9898.

Murphy E., Imahashi K., Steenbergen C. (2005). Bcl-2 regulation of mitochondrial energetics. *Trends in cardiovascular medicine*, 15 (8), 283-290.

Myint N., Sin P., Yuasa T., Ishibashi Y., Tanigawa H., Okuda M., Zheng S., Iwaya-Inoue M (2011). Leaf Senescence of Soybean at Reproductive Stage is Associated with Induction of Autophagy-related Genes. *Plant Production Science*, 14 (2), 141-147.

Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nair U., Jotwani A., Geng J., Gammoh N., Richerson D., Yen W-L., Griffith J. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell*, 146 (2), 290-302.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.

Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (2005) A novel-type VPE, dVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell*, 17, 876-887.

Nice D., Sato T., Stromhaug P., Emr S., Klionsky D. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 y Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the preautophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem*. 277, 30198-30207.

Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in plant science*, 12 (3), 125-134.

Noodén L.D. (1988). The phenomenon of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants*, L.D. Noodén and A.C. Leopold, eds (San Diego, CA: Academic Press), pp. 1-50.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith A, Loureiro ME, Ratcliffe G, Sweetlove L, Fernie A. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol*. 137, 611-622.

Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev*. 198, 249-266.

O'Brien IEW, Baguley BC, Murray BG, Morris BAM, Ferguson IB (1998). Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *Plant J*. 13, 803-814.

Obara K., Kuriyama H. y Fukuda H. (2001). Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol*. 125, 615-626.

Oberstein A., Jeffrey P.D., Shi Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *The Journal of biological chemistry*, 282 (17), 13123-13132.

Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17, 87-97.

Oldroyd G., Harrison M., Udvardi M. (2005). Peace talks and trade deals: keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol*. 137, 1205-1210.

Orzaez D y Granell A. (1997). DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J.* 11, 137-144.

Park K., Jung J., Park J., Hwang J., Kim Y., Hwang I, Lee Y. (2003). A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol.* 132, 92-98.

Pastore D, Stoppelli MC, Di Fonzo N, Passarella S. (1999). The existence of the K<sup>+</sup> channel in plant mitochondria. *J Biol Chem.* 274, 26683-26690.

Patel S., Caplan J., Dinesh-Kumar S.P. (2006). Autophagy in the control of programmed cell death. *Current opinion in plant biology*, 9 (4), 391-396.

Patel S. y Dinesh-Kumar S.P. (2008). Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4 (1), 20-27.

Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider MD., Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122 (6), 927-939.

Pedley KF y Martin GB. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease. *Annu Rev Phytopathol* 41, 215-243.

Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. (2007). Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of experimental botany*, 58 (7), 1637-1649.

Pennell R.I. y Lamb C. (1997). Programmed Cell Death in Plants. *The Plant cell*, 9 (7), 1157-1168.

Perera I.Y., Hung C.Y., Brady S., Muday G.K. Boss W.F. (2006) A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. *Plant Physiol.*, 140, 746-760.

Perera I.Y., Hung C.Y., Moore C.D., Stevenson-Paulik J., Boss W.F. (2008). Transgenic Arabidopsis plants expressing the type 1 inositol 5-phosphatase exhibit increased drought tolerance and altered abscisic acid signaling. *Plant Cell* 20, 2876-2893.

Perera I.Y., Love J., Heilmann I., Thompson W.F., Boss W.F. (2002) Up-regulation of phosphoinositide metabolism in tobacco cells constitutively expressing the human type I inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant Physiol.* 129, 1795-1806.

Perez-Perez ME, Couso I, Crespo JL. (2012). Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 8, 376-388.

Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. (2010). Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 152, 1874-1888.

Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun HP, Bhushan S, Glaser E, Salamini F, Leister D. (2006). Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* 18, 970-991.

Peter M.E. y Krammer P.H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 545-551.

Petrussa E, Casolo V, Braidot E, Chiandussi E, Macri F, Vianello A. (2001). Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective channel in higher plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 33, 107-117.

Petrussa E, Casolo V, Peresson C, Braidot E, Vianello A, Macri F. (2004). The K<sup>+</sup> ATP channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion* 3, 297-307.

Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD. (2008). The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 178, 1339-1353.

Pich MM, Raule N, Catani L, Fagioli ME, Faenza I, Cocco L, Lenaz G. (2004). Increased transcription of mitochondrial genes for complex I in human platelets during ageing. *FEBS Lett.* 558, 19-22.

Polster BM, Pevsner J, Hardwick JM. (2004). Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 1644, 211-227.

Pontier D., Gan S., Amasino R. M., Roby D., Lam E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant molecular biology*, 39 (6), 1243-1255.

Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in plant science*, 5 (7), 278-282.

Raghavendra A.S. y Padmasree K. (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* 8, 546-553.

Rao M.V. y Davis K.R. (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213, 682-690.

Robert G., Melchiorre M., Racca R., Trippi V., Lascano H.R. (2009). Apoplastic superoxide level in wheat protoplast under photooxidative stress is regulated by chloroplast redox signals: Effects on the antioxidant system. *Plant Science* 177, 168-174.

Rojo E., Marti R., Carter C., Zouhar J., Pan S., Plotnikova J., Jin H. (2004). VPE Exhibits a Caspase-like Activity that Contributes to Defense against Pathogens. *Current Biology*, 14, 1897-1906.

Ron D. y Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (7), 519-529.

Rose T.L., Bonneau L., Der C., Marty-Mazars D., Marty F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biol Cell* 98, 53-67.

Samaj J., Muller J., Beck M., Bohm N., Menzel D. (2006). Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 11, 594-600.

Sano R, Hou Y-C, Hedvat M, Correa R, Shu C-W, Krajewska M, Diaz P, Tamble C, Quarato G, Gottlieb R, Yamaguchi M, Nizet V, Dahl R, Thomas D, Tait S, Green D, Fisher P, Matsuzawa S, Reed J. (2012). Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca<sup>2+</sup>-mediated bioenergetics to promote autophagy. *Genes & Dev.* 26, 1041-1054.

Schu P., Takegawa M., Fry J., Stack M., Waterfield M., Emr S. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes S., Mannella C., Korsmeyer S. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

Scott I. y Logan D.C. (2007). Mitochondrial dynamics: the control of mitochondrial shape, size, number, motility, and cellular inheritance. In: Gray, J. (Ed.), *Programmed Cell Death in Plants*. Blackwell, Oxford, pp. 1-35.

Scott I. y Logan D.C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis. *New Phytol.* 177, 90-101.

Seay M, Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP. (2009). Something old, something new: plant innate immunity and autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 287-306.

Shabala S. y Cuin T. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133 (4), 651-669.

Shabala S., Cuin T., Prismall L., Nemchinov L.G. (2007). Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. *Planta*, 227 (1), 189-97.

Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T., Smith J., Miller A., Davies J., Newman I. (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup>-permeable channels. *Plant physiology*. 141, 1653-1665.

Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D., Stenmark H. (2001). The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 485-492.

Sláviková S., Shy G., Yao Y., Glozman R., Levanony H., Pietrokovski S., Elazar Z. (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of experimental botany*, 56 (421), 2839-2849.

Staskawicz B.J., Mudgett M.B., Dangl J.L., Galan J.E. (2001). Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292, 2285-2289.

Strasser, A., A. W. Harris, D. C. S. Huang, P. H. Krammer, y S. Cory. 1995. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 14, 6136-6147.

Sulston J.E., y Horvitz H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–156.

Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G., y Thomson J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64–119.

Svetleva D, Velcheva M, Bhowmik G. (2003). Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica* 131 (2), 189-200.

Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs A.L., Müller F. (2005). Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Current biology*, 15, 1513-1517.

Tan F.J., Fire Z., Hill R.B. (2007). Regulation of apoptosis by *C. elegans* CED-9 in the absence of the C-terminal transmembrane domain. *Cell death and differentiation*, 14 (11), 1925-1935.

Thomas H. (2003). Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*, 54 (385), 1127-1132.

Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A., Vierstra R.D. (2005). Autophagic Nutrient Recycling in *Arabidopsis* Directed by the ATG8 and ATG12 Conjugation Pathways 1. *Plant Physiology*, 138, 2097-2110.

Tiwari B.S., Belenghi B., Levine, A. (2002). Oxidative stress increased respiration of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.* 128, 1271-1281.

Torres M.A, Jones J.D.G., Dangl J.L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics*, 37 (10), 1130-1134.

Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.L. (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 517-522.

Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Pathology*, 141, 373-378.

Trick H, Dinkins R, Santarem E, Di R, Samoylov V, Meurer C, Walker D, Parrot W, Finer J, Collins G. (1997). Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3, 9.



Tsujimoto Y. y Shimizu S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7, 1174-1181.

Tsujimoto Y. y Shimizu S. (2002). The voltage dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochim.* 84, 187-193.

Uren A, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6, 961-967.

Vacca R.A., Valenti D., Bobba A., Merafina R.S., Passarella S., (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol.* 141, 208-219.

Van der Biezen EA. y Jones JD. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol*; 8, 226-227.

van Doorn WG y Woltering EJ. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 117-122.

van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangel, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, a M., et al. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation*, 18(8), 1241-1246.

Van Doorn, W.G. (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany*, 62 (14), 4749-4761.

van Leeuwen W., Okresz L., Bogre L., Munnik T. (2004). Learning the lipid language of plant signalling. *Trends Plant Sci* 9, 378-384.

Vander Heiden M, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. (2000). Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci* 97, 4666-4671.

Vanhee C., Zapotoczny G., Masquelier D., Ghislain M., Batoko H. (2011). The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *The Plant cell*, 23 (2), 785-805.

Vauclare P., Bigny R., Gout E., De Meuron V., Widmer F. (2010). Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: an electron microscopy and <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *Planta*, 231 (6), 1495-1504.

Vaux DL, Cory S, Adams JM (Sep 1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 (6189), 440-2.

Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999). Cell death in development. *Cell.* 96, 245-254.



Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (Dec 1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258 (5090), 1955-1957.

Veltcheva M, Svetleva D, Petkova S, Perl A. (2005). In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. *Scientia Horticulturae* 107 (1), 2-10.

Virolainen E, Blokhina O, Fagerstedt K. (2002). Ca<sup>2+</sup>-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann Bot* 90, 509-516.

Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A. (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* 149, 885-893.

Wan J., Torres M., Ganapathy A., Thelen J., DaGue B.B., Mooney B., Xu D. (2005). Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI*, 18 (5), 458-467.

Wang D., Griffiths J., Starker C., Fedorova E., Limpens E., Ivanov S., Bisseling T. (2010). A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science*, 327 (5969), 1126-1129.

Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG (1996). The apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*. 8, 375-391.

Watanabe N. y Lam E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry*, 283 (6), 3200-3210.

Welters P, Takegawa K, Emr S.D, Chrispeels M.J. (1994). AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc Natl Acad Sci*. 91, 11398-11402.

Woffenden B.J., Freeman T. B, Beers E.P. (1998). Proteasome inhibitors prevent tracheary element differentiation in *Zinnia mesophyll* cell cultures. *Plant Physiol*. 118, 419-430.

Wurmser A. y Emr S. (2002). Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J Cell Biol*. 158, 761-772.

Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306 (1980).

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–306 (1980).

Xia T, Xiao D., Liu D., Chai W., Gong Q., Wang N.N. (2012). Heterologous Expression of ATG8c from Soybean Confers Tolerance to Nitrogen Deficiency and Increases Yield in Arabidopsis. *PloS one*, 7 (5), 1-15.

Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 42, 535-546.

Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143, 291-299.

Xiong Y., Contento, A. L., Bassham, D. C. (2007b). Disruption of Autophagy Results in Constitutive Oxidative Stress in Arabidopsis. *Autophagy*, 3 (3), 257-258.

Xu P, Rogers S.J., Roossinck M.J. (2004). Expression of antiapoptotic genes bcl-xL and ced-9 in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (44), 15805-15810.

Xu Y. y Hanson M. R. (2000). Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant physiology*, 122 (4), 1323-1333.

Yaeno O., Matsuda K. (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses, *Plant J.* 40, 931-941.

Yamada T., Ichimura K., Kanekatsu M., van Doorn W.G. (2009). Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of Ipomoea nil petals. *Plant & cell physiology*, 50 (3), 610-625.

Yamamoto R. Fujioka S, Demura T, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuda H. (2001). Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant Physiol.* 125, 556-563.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise L.H., Thompson C.B, Korsmeyer S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80 (2), 285-291.

Yang S., Tang F., Gao M., Krishnan H.B, Zhu H. (2010). R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (43), 18735-18740.

Yang T.F., Gonzalez-Carranza Z.H., Maunders M.J., Roberts J. (2008). Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Annals of botany*, 101 (2), 301-310.

Yao N, Eisfelder B.J, Marvin J, 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. *The Plant Cell*, 18, 397-411.

Yeung E.C. y Meinke D.W. (1993). Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *Plant Cell* 5, 1371-1381.

Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius D.M. (2004). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 72, 3743-3751.

Yoda H., Yamaguchi Y., Sano H. (2003). Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132, 1973-1981.

Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* 11, 1233-1240.

Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21 (9), 2914-2927.

Yoshimoto K., Hanaoka H., Sato S., Kato T., Tabata S., Noda T. (2004). Processing of ATG8s , Ubiquitin-Like Proteins , and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy, 16, 2967-2983.

Young T.E. y Gallie D.R. (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 42, 397-414.

Yu L., Wan F., Dutta S., Welsh S., Liu Z., Freundt E., Baehrecke E.H. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (13), 4952-4957.

Yu X-H., Perdue T.D., Heimer Y.M., Jones A.M. (2002). Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ.* 9, 189-198.

Zapata J.M, Guéra J, Carrasco E, Martín M, Sabater B. (2005). Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell death and differentiation*, 12 (10), 1277-1284.

Zeng X, Overmeyer J.H, Maltese W (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of cell science*, 119, 259-270.

Zhang, Li S, Zhou L.Z, Fox E, Pao J, Sun W, Zhou C, McCormick S. (2011). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* PTEN Caused Accumulation of Autophagic Bodies in Pollen Tubes by Disrupting Phosphatidylinositol 3-Phosphate Dynamics. *Plant Journal* 68 (6), 1081-1092.

Zheng Y.T, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 183, 5909-5916

Zuppini A, Navazio L, Mariani P. (2004). Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *Journal of cell science*, 117 (12), 2591-2598.