

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expansión y senescencia foliar en soja
(*Glycine max* L.): cambios redox y su
modulación por condiciones de estrés

Biol. Rodrigo Parola

Director: Dr. Hernán Ramiro Lascano

Co-director: MSc. Roberto Walter Racca

IFRGV-CIAP-INTA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2016

COMISIÓN EVALUADORA

Dra. Karina Grunberg

IFRGV-CIAP-INTA

Dr. Juan Alberto Argüello

FCA-UNC

Dr. Atilio J. Barneix Inst. de Suelos-CIRN-INTA

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha: Córdoba, 06 de diciembre de 2016

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Dedicado a:

Moira, Fausto y Catalina.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue posible gracias al apoyo tanto institucional como al de muchas personas que de alguna u otra manera influyeron sobre la entropía que representa el desarrollo de una tesis doctoral.

En primer lugar quiero agradecer el apoyo institucional del IFRGV-CIAP perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y particularmente al programa de posgrado que me permitió solventar algunos de los gastos del desarrollo de tesis, dándome la posibilidad además de realizar los cursos de especialidad necesarios para mi formación.

Agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba, y a sus representantes los profesores, que pudieron convencerme de la belleza que tiene la biología desde el momento en que ingresé a la carrera de Ciencias Biológicas, paso previo obligado para este doctorado.

Como algunos sabrán el comienzo de este camino fue acompañado por Victorio Trippi (el Inge) como director y es a él a quien quiero agradecer sus enseñanzas y agradecer sus charlas enriquecedoras donde me demostró (entre otras cosas) que la vida no es más que una reacción unidireccional de síntesis y acumulación de materia que influye en el ambiente interno de un organismo (nada menos!). Espero algún día estar a la altura para generar comentarios sobre esta hipótesis de trabajo.

Por supuesto que el desarrollo y la finalización de esta etapa no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de mi compañera de vida Moira y de nuestros retoños asistentes Fausto y Catalina, a los que además de dedicar esta tesis, agradezco infinitamente todo el tiempo que dejé de dedicarles a ellos a cambio de esta realización personal.

A mi director, el Dr. Ramiro Lascano, el cual se hizo cargo de dirigirme en esta tesis que terminamos replanteando y redirigiendo con todo lo que esto implica. Agradezco mucho más que su apoyo académico, agradezco su amistad, comprensión y

sobre todo agradezco los momentos compartidos, espero algún día tener una parte de su capacidad para relacionar temas tan complejos como los abordados aquí.

A mi co-director Roberto Racca, por darme la posibilidad de ingresar a esta maravillosa institución como es el INTA allá por el año 2004 y por su amistad incondicional de todos estos años.

A mis amigos del Lab con los cuales compartimos más de 12 años de amistad, trabajo, discusiones, peleas, planteos, mates, alegrías y amarguras y tantas otras cosas... Germán, Marianela, Nacira, Pablín... GRACIAS TOTALES! Por varios años más....

Mil gracias a Poli y Dani por estar cada vez que las necesité en el lab!

Gracias a muchos otros amigos del INTA con los cuales compartimos las mismas frustraciones que incluye el paquete de "la" tesis doctoral, Gastón, Franco, Nathalie, Mariana, Lore, Tiki y seguro que me olvido de alguno.

Gracias a los nuevos becarios del lab, porque de ellos aprendí muchas cosas y gracias por soportar mis delirios y escuchar atentamente nuestras discusiones...Tadeo, Sofi y Miguel, sigan adelante y muchos éxitos!

Un agradecimiento especial a los integrantes de mi comisión asesora los Doctores Atilio J. Barneix y Juan A. Argüello que me acompañaron, aconsejaron y guiaron siempre con la mejor predisposición en este camino.

A la Dra. Karina Grunberg que se tomó el trabajo de leer el manuscrito de forma tan detallada y hacer aportes más que significativos durante la corrección.

En fin, seguro me olvido de muchos que fueron partícipes directo e indirectos de esta etapa de mi vida y espero poder agradecerles de alguna manera por fuera de este escrito.

Por último, pero no por eso menos importante el agradecimiento eterno a mis padres y hermanos que gracias a ellos soy lo que soy.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes Congresos:

- 1- XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 13 al 16 de noviembre de 2016 Corrientes. Argentina.
“Expresión diferencial de genes relacionados a senescencia, estrés y defensa en plantas de soja (*Glycine max* L.) bajo condiciones inductoras de senescencia”
Parola Rodrigo, Andreola Sofía, Rodriguez Marianela y Lascano H. Ramiro.
- 2- XV Congreso Latinoamericano, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21 al 24 de Setiembre de 2014 Mar del Plata. Argentina.
“Expresión diferencial de genes relacionados al estado redox en el desarrollo foliar de soja: Efectos de tratamiento salino”
Parola Rodrigo, Robert Germán, Rodriguez Marianela, Racca Roberto Walter y Lascano H. Ramiro
- 3- XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 17 al 30 de Setiembre de 2012 Mar del Plata, Argentina. Presentación libre.
“Niveles de Especies Activas del Oxígeno durante la expansión foliar en soja (*Glycine max* L.) bajo condiciones control y de estrés salino: comportamiento del sistema antioxidante”.
Parola Rodrigo, Trippi Victorio S., Racca Roberto W. y Lascano H. Ramiro.
- 4- XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 26 al 30 de setiembre de 2010 La Plata, Argentina. Presentación libre.
“Niveles de ión superóxido y peróxido de hidrógeno en hojas durante el desarrollo vegetativo de soja (*Glycine max*)”.
Parola Rodrigo, Victorio S. Trippi y Roberto W. Racca

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	6
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN GENERAL	15
Estado redox en plantas	15
Estrés oxidativo y estado redox	17
Especies Reactivas del Oxígeno (EROs).....	20
Producción de EROs en plantas.....	21
Generación de EROs	21
Degradación de EROs	27
EROs como moléculas señales	30
Senescencia Foliar	31
El cultivo de soja en Argentina y el mundo.....	34
Efectos de la salinidad en el cultivo de soja.	35
Desarrollo foliar y estrés salino	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
CAPÍTULO I	53
Desarrollo foliar en soja: parámetros fisiológicos asociados.	53
INTRODUCCIÓN.....	54
RESULTADOS	59
1. Caracterización fisiológica del desarrollo foliar en soja: efectos del estrés salino	60
1.1 Expansión foliar en soja, efectos del estrés salino.....	61
1.2 Variables asociadas a fotosíntesis durante la expansión y efectos del estrés salino....	62
1.3 Proteínas y aminoácidos libres durante la expansión y efectos del estrés salino	64
1.4 Proteínas asociadas a fotosíntesis durante la expansión foliar y efectos del estrés salino.....	67
1.5 Efecto sobre carbohidratos no estructurales	68
DISCUSIÓN	71
CAPITULO II.....	76
Desarrollo foliar en soja: estado redox asociado.	76
INTRODUCCIÓN.....	77

RESULTADOS	83
1. Determinación de los niveles de EROs (H_2O_2 y $\cdot O_2^-$) durante el desarrollo foliar. Efectos del estrés salino.....	83
2. Determinación de la actividad/contenido de enzimas del sistema antioxidante durante el desarrollo foliar.....	87
2.1 Enzimas que interactúan directamente con las EROs	87
2.2 Actividad de glutatión reductasa (GR).....	91
3. Cuantificación de contenidos de antioxidantes no enzimáticos en las distintas fases del desarrollo foliar.....	92
4. Niveles de daño oxidativo	96
5. Efectos de tratamientos moduladores del estado redox sobre el proceso de expansión foliar.	97
DISCUSIÓN.....	99
CAPÍTULO III	103
Desarrollo foliar en soja: regulación transcripcional de los cambios redox de genes del sistema antioxidante y genes asociados a senescencia.	103
INTRODUCCIÓN.....	104
RESULTADOS	111
1. niveles de transcritos foliares de genes del sistema antioxidante de soja.....	111
1.1 Cloroplasto	111
1.2 Mitocondria	112
1.3 Peroxisoma	113
1.4 Citosol.....	114
1.5 Extracelular.....	115
2. niveles de transcritos foliares de NADPH oxidasas de soja.....	115
3. niveles de transcritos foliares de genes asociados a senescencia de soja.	117
4. niveles de transcritos de genes relacionados al proceso de autofagia y de respuesta sistémica adquirida en hojas de soja.....	117
DISCUSIÓN.....	120
CAPÍTULO IV	128
Conclusiones y perspectivas.....	128
BIBLIOGRAFÍA	133

ABREVIATURAS

·OH: radical hidroxilo

¹O₂: oxígeno singulete

ADN: ácido desoxirribonucleico

APX: ascorbato peroxidasa

ARN: ácido ribonucleico

ASC: ácido ascórbico

CAT: catalasa

CTE: cadena transportadora de electrones

Cu/ZnSOD: cobre/zinc superóxido dismutasa

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DEPC: dietilpirocarbamato

DHAR: dehidro ascorbato reductasa

DMSO: dimetilsulfoxido

dNTP: dinucleótidos trifosfatos

DPI: difenil iodonium

DTNB: ácido 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenediaminotetraacético

EGTA: ácido etilenglicol-bis (-aminoetileter)-N,N,N,N_-tetraacético

EROS: especies reactivas del oxígeno

Fd: ferredoxina

FeSOD: hierro superóxido dismutasa

FTs: factores de transcripción

GPX: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazine-N'-2-etanesulfónico

MCP: muerte celular programada

MDA: malondialdehído

MDHAR: monodehidroascorbato reductasa

MnSOD: manganeso superóxido dismutasa

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NBT: nitroblue tetrazolium

ND-PAGE: geles de poliacrilamida no desnaturizantes

NEM: N-etilmadeimida

O₂: oxígeno triplete en estado basal

PA: fosfatasa alcalina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PVPP: polivinilpolipirrolidona

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

RLKs: receptores-*like* proteínas quinasas

Rubisco: ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa

SAR: resistencia sistémica adquirida

SDS: Duodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: geles de poliacrilamida desnaturizantes en presencia de SDS

SOD: superóxido dismutasa

SYBR: syber green

TAE: tris acetato EDTA

TBA: ácido tiobarbitúrico.

TCA: ácido tricloro acético

TRIS: tris-(hidroximetil) aminometano

UV: Ultra violeta

ΦPSII: rendimiento cuántico del fotosistema II

RESUMEN

El estado redox celular, determinado principalmente por la relación entre generación y degradación de especies reactivas del oxígeno (EROs), tiene un rol clave en la homeostasis celular, la modulación del crecimiento y desarrollo, y, en las respuestas a condiciones de estrés ambiental. Particularmente durante la senescencia y bajo diferentes condiciones de estrés ocurren aumentos en la generación de EROs, lo que puede devenir en procesos oxidativos deletéreos conocido como estrés oxidativo. Sin embargo, se ha reconocido la capacidad de las EROs de actuar como moléculas señales, modulando vías de señalización implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La hipótesis propuesta en este trabajo fue que las diferentes etapas del desarrollo foliar en soja (expansión y madurez/senescencia) van acompañadas de cambios redox diferenciales, los cuales son alterados por condiciones de estrés y participan en la modulación de las respuestas al estrés. El objetivo principal fue estudiar los cambios redox que ocurren durante las etapas de expansión y madurez/senescencia foliar, y su relación con la modulación de las respuestas al estrés. Los cambios observados en las tasas de expansión y superficie foliar estuvieron acompañados por una dinámica diferencial en los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ y similares niveles de H_2O_2 . Los mayores niveles se asociaron a una mayor velocidad de expansión, principalmente en la condición control. La expansión foliar pudo ser modulada con la aplicación externa de H_2O_2 y MnCl_2 , indicando la participación de las EROs en el desarrollo foliar. Los parámetros relacionados al funcionamiento fotosintético evidenciaron diferencias dinámicas significativas entre los tratamientos con una disminución marcada a partir del final de la expansión en plantas bajo estrés. El sistema antioxidante enzimático presentó comportamientos diferenciales a lo largo del desarrollo foliar y entre ambos tratamientos. Particularmente isoformas cloroplásticas de SOD respondieron tanto al estadio de desarrollo como a la condición de estrés. Los antioxidantes no enzimáticos estuvieron asociados principalmente a la edad foliar. La expresión de los genes de las enzimas relacionadas al estado redox, evidenciaron un

control diferencial asociado tanto a la edad foliar como al estrés, con patrones diferenciales de expresión de sus isoformas en los distintos compartimentos celulares. En base a los resultados obtenidos proponemos que el estado redox mediado por la generación/degradación de EROs tiene participación directa sobre el desarrollo foliar, modulando la expansión, con consecuencias sobre la madurez/senescencia. Condiciones estresantes generan cambios en el estado redox que se traducen en efectos deletéreos sobre el proceso.

SUMMARY

Cellular redox state, mainly determined by the relationship between generation and degradation of reactive oxygen species (ROS), plays a key role in cellular homeostasis, modulation of growth and development, and in responses to environmental stress conditions. Particularly during senescence and different stress conditions increases in ROS generation occurs, which may become deleterious in oxidative processes known as oxidative stress. However, it has been recognized the ability of ROS to act as signals molecules, modulating signaling pathways involved in growth and development of plants. The proposal in this working hypothesis was that the different stages of leaf development in soybean (expansion and maturity/senescence) are accompanied by differentials redox changes, which are altered by stress conditions and are involved in modulating stress responses. The main objective was to study the redox changes that occur during periods of expansion and maturity/leaf senescence, and its relationship with the modulation of stress responses. The observed changes in the rates of expansion and leaf area were accompanied by a differential dynamic $\cdot\text{O}_2^-$ levels and similar levels of H_2O_2 . The highest levels were associated with a higher rate of expansion, mainly in the control condition. Leaf expansion could be modulated with the external application of H_2O_2 and MnCl_2 , indicating the involvement of ROS in leaf development. The photosynthetic performance related dynamic parameters showed significant differences between treatments with a marked decrease from the end of the expansion in plants under stress treatment. Enzymatic antioxidant system showed differential behavior along the leaf development and between treatments. Particularly chloroplast SOD isoforms responded both to the development stage as to the condition of stress. Nonenzymatic antioxidants were primarily associated with leaf age. The gene expression of redox state related enzymes, showed a differential control associated both leaf age and stress, with differential expression patterns of its isoforms in different cellular compartments. Based on the results obtained we suggest that the redox state mediated by the ROS

generation/degradation has direct participation on leaf development, modulating the expansion, with consequences on the maturity/senescence. Stressful conditions cause changes in the redox state that result in deleterious effects on the process.

INTRODUCCIÓN GENERAL

A lo largo de su ciclo ontogénico, las plantas, desarrollan órganos especializados en cumplir funciones específicas tales como las hojas. La formación de estos órganos consiste en dos fases bien caracterizadas, una fase inicial de proliferación celular y morfogénesis primaria, seguida de una segunda fase caracterizada por la expansión celular, morfogénesis secundaria y en algunos casos endoreduplicación (Johnson and Lenhard, 2011). El control de esta formación es altamente complejo e incluye la actividad de un gran número de genes encargados de promover o inhibir distintas vías o procesos.

Si bien se conocen los componentes encargados de controlar los ciclos celulares en plantas, queda mucho por develar sobre cómo estos procesos son influenciados por el estado redox.

Estado redox en plantas

Todos los seres vivos son sistemas termodinámicos abiertos, que intercambian materia, energía e información con el ambiente. El flujo constante de materia/energía es una condición necesaria para el mantenimiento de la vida, transformando la materia y obteniendo energía a través de reacciones de óxido-reducción. La vida aeróbica supuso una optimización de estas reacciones redox, ya que el oxígeno es un potente aceptor de electrones que sustenta una mayor capacidad de extraer energía a partir de moléculas reducidas. Esta mayor ventaja energética no es inocua, ya que por su gran capacidad oxidante, el oxígeno induce procesos oxidativos deletéreos a nivel celular. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica.

La química redox es una parte intrínseca del metabolismo de las plantas. El estado redox celular se encuentra determinado por la oxidación o reducción de varias

especies redox-activas, que están involucradas en un gran número de reacciones metabólicas (Foyer and Noctor, 2009).

Además de ser una parte intrínseca del metabolismo, el estado redox desempeña un papel activo en la regulación metabólica. Opera como un importante integrador del metabolismo celular y al mismo tiempo es regulado por procesos metabólicos. Esto permite el reajuste constante de vías metabólicas globales y del estado homeostático redox en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Implicando la reprogramación de la expresión génica y modificaciones post-traduccionales de las enzimas *target* mediante por ejemplo, modulaciones tiol-disulfuro (Balmer *et al.*, 2003, 2004; Brautigam *et al.*, 2009; Kolbe *et al.*, 2006.).

La idea de homeostasis celular regulada por el estado redox ha sido extrapolada al concepto de “estado redox celular” (Potters *et al.*, 2010). Esencialmente, el estado redox celular es visto como la suma de moléculas redox activas en sus estados oxidado y reducido. Este estado redox mantiene la homeostasis, y en particular, la capacidad de la célula de contrarrestar por ejemplo el estrés oxidativo (Foyer and Noctor, 2005a).

Como tales, los estados redox no son sólo puntos de control en las respuestas al estrés de las plantas, sino que también desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo. De hecho, el control redox está involucrado en la regulación de muchos procesos no relacionados a condiciones de estrés, tales como la expresión de un gran número de genes, la producción de energía en las mitocondrias y los cloroplastos, la oxidación y reacciones de reducción, así como muchas reacciones en el metabolismo primario y secundario.

Del concepto de “estado redox celular” derivan los conceptos de “estados redox organelares”, tales como el de la mitocondria (Wilson *et al.*, 2006), cloroplasto (Pfannschmidt, 2003) y de la pared celular (de Pinto and De Gara, 2004; Pignocchi *et al.*, 2003). En una escala de organización mayor, la literatura contiene referencias a los tejidos e incluso a los estados redox de órganos. Este último incluye los estudios del estado redox en capullos de flores (Tada *et al.*, 2001; 2003), hojas y raíces (García-Limones *et al.*, 2009).

Recientemente se han descrito vías de señalización subyacentes a estos procesos (Foyer and Noctor, 2013). Aunque se sabe mucho sobre señales derivadas del estado redox implicadas por ejemplo en los procesos fotosintéticos activados por luz, poco se sabe acerca de la regulación redox de otras vías metabólicas en plástidos y del metabolismo extra-plastidial. Si bien, los estudios recientes proporcionan evidencia de la existencia de señales redox que coordinan el metabolismo y la expresión génica entre los diferentes orgánulos, tales como plástidos, mitocondria y el núcleo, su naturaleza no se ha aclarado todavía (Geigenberger and Fernie, 2014).

Estrés oxidativo y estado redox

Debido a su condición de organismos sésiles, las plantas se encuentran sometidas a un amplio rango de condiciones estresantes. Existen numerosos estudios que demuestran que la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) aumenta bajo diferentes condiciones de estrés. Estas EROs tradicionalmente fueron asociadas con daños inespecíficos a macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos (Pitzschke *et al.*, 2006), daños que pueden ser evidenciados a nivel celular y eventualmente llevar a la muerte de la célula, el órgano o el organismo, configurando lo que históricamente se conoce como estrés oxidativo (Fig. 1).

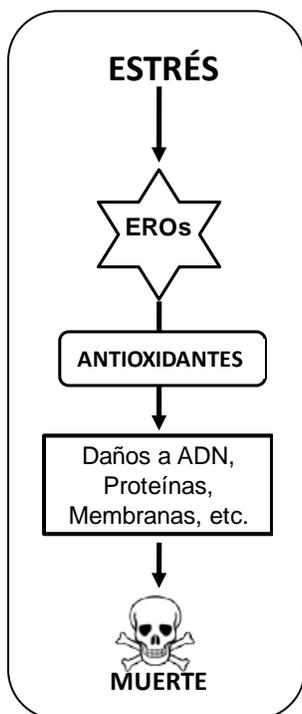


Figura 1: Visión tradicional de asociación directa entre la producción de EROs por condiciones de estrés con subsecuente daño a nivel de macromoléculas y consiguiente muerte del organismo. (Adaptado de *Potters et al*, 2010)

En esta visión tradicional, los antioxidantes solo cumplían con el rol de mantener controlados los niveles de las EROs de manera tal que no produzcan daños oxidativos. Es decir cuando los antioxidantes no eran capaces de controlar los niveles de EROs, se producía lo que se denominó “estrés oxidativo” con los consiguientes efectos deletereos asociados.

Durante la última década han surgido numerosas evidencias demostrando que muchas de las respuestas inducidas por estrés, se encuentran finamente reguladas por procesos específicos, en vez de tratarse de consecuencias de daños no específicos inducidas por EROs (Noctor, 2006). Las EROs pueden ser producto de un desbalance metabólico como así también pueden ser generadas por la actividad de las NADPH oxidadas (Apel and Hirt, 2004).

Si bien la utilización de términos como “estrés”, “daño” y “señalización” mediados por EROs siempre fue confusa y a veces conflictiva, hoy existe sobrada evidencia que soporta la existencia de un **estado homeostático celular redox-regulado** y que los actores involucrados no solo son las EROs, sino también las enzimas productoras de EROs, los antioxidantes, y sus estados redox, el estado redox de las cadenas transportadoras de electrones cloroplásticos y mitocondriales, niveles y estado redox de piridín nucleótidos, azúcares y ATP. Para cada molécula redox activa, su estado redox se puede definir como la proporción de moléculas en estado reducido en relación con el tamaño total del *pool*, o, alternativamente, como la relación entre las moléculas en estado reducido y en estado oxidado dentro del *pool*. Cuantificar los estados redox de un solo metabolito purificado en condiciones *in vitro* es relativamente sencillo, el problema surge al momento del análisis, ya que el estado redox celular se encuentra definido por un gran número de compuestos redox activos diferentes que interactúan unos con otros.

Por ejemplo, además de los dos mayores antioxidantes en proporción que se encuentran en una célula, ascorbato (ASC) y glutatión (GSH) las plantas contienen un gran número de compuestos fenólicos redox-activos como carotenoides, citocromos, tocoferoles, poliaminas, etc. Y para acomplejar un poco más el entendimiento de este

sistema, se suma que las concentraciones de los compuestos antes mencionados varían dependiendo del órgano que se trate, el estadio de desarrollo de la planta, la condición de cultivo y hasta su localización subcelular (de Pinto *et al.*, 1999; Horemans *et al.*, 2000; Smirnov, 2001).

El conocimiento de esta dinámica de compuestos redox-activos, conjuntamente con sus estados de oxidación/reducción lleva a proponer el estado redox celular “hipotético” representado en la Figura 2.

Donde las EROs (y sus enzimas productoras/degradadoras) tienen un papel preponderante.

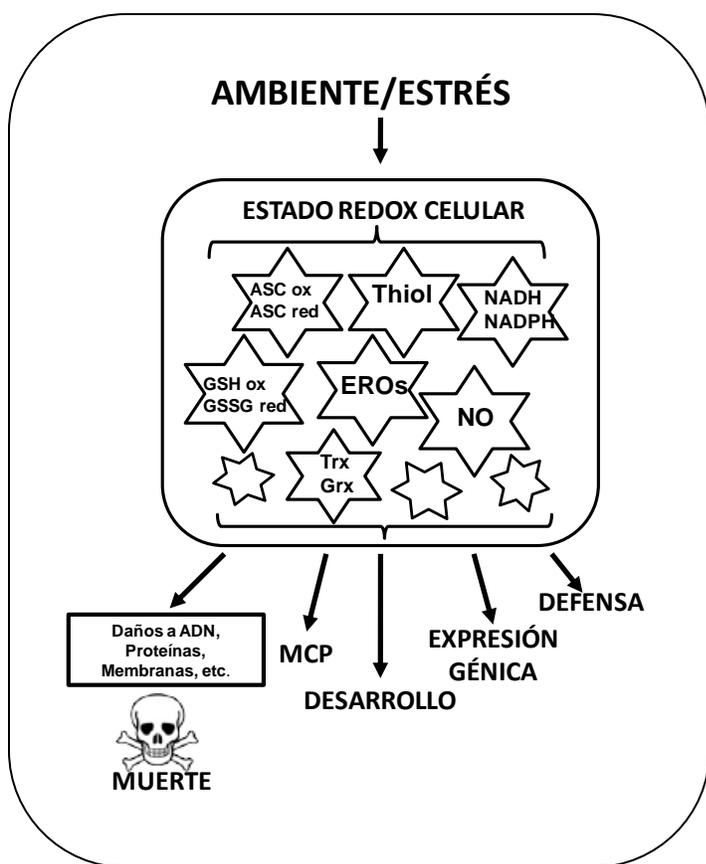


Figura 2: Diagrama representando el estado redox celular “hipotético” definido por el estado de las diferentes moléculas redox-activas mediando entre las señales de percepción (ambiental/estrés) hacia respuestas en plantas. (MCP= Muerte Celular Programada; EROs= Especies Reactivas del Oxígeno; ASC ox/ASC red=ácido ascórbico oxidado/reducido; GSH ox/GSH red= glutatión oxidado/ reducido; NO= óxido Nítrico). (Adaptado de Potters *et al.*, 2010)

Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)

Como parte del metabolismo aeróbico normal, los organismos generan Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), entre ellas: Anión Superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH) y oxígeno singulete (1O_2). Durante muchos años y producto de la alta capacidad de generar daño a diferentes moléculas celulares, las EROs fueron estudiadas como productos indeseables del metabolismo celular, y se aunaron esfuerzos en detallar los mecanismos de remoción. A partir de estos estudios se lograron grandes avances en relación a este aspecto fascinante del oxígeno en el metabolismo aeróbico de las plantas (Trippi and De Luca, 1985; De Luca and Trippi, 1987; Trippi *et al.*, 1989; Casano *et al.*, 1990, 1997; Lascano *et al.*, 2001).

Gran cantidad de información acumulada, señalaba entonces a la producción de EROs como eje común en el desbalance oxidativo, base del desarrollo, senescencia y muerte normal en las plantas. Asimismo, este desbalance oxidativo es una respuesta muy común en presencia de diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Muñoz *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2004), donde pueden provocar daños en macromoléculas conduciendo hacia la pérdida progresiva de funcionalidad celular y la muerte.

La regulación entre la generación de EROs y su remoción es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y funcionalidad celular. Con base en la complejidad del control en la producción de EROs, es que se ha propuesto a estas moléculas, como reales encargadas de regular vías de señalización (Lascano *et al.*, 2003; Foyer and Noctor, 2003).

Esta regulación se presenta mediante el balance entre producción y degradación. Distintas señales de crecimiento y medioambientales influyen en vías de señalización de EROs afectando su homeostasis en compartimentos específicos, en forma señal dependiente y de manera célula específica.

Producción de EROs en plantas

Existen gran cantidad de fuentes potenciales de EROs en plantas, muchas como producto del metabolismo normal, por ejemplo, fotosíntesis y respiración, procesos en los que la presencia de una cadena transportadora de electrones (CTE), incrementa la posibilidad de que los electrones sean transferidos al oxígeno (Asada and Takahashi, 1987). Otras fuentes de generación de EROs, toman mayor relevancia en condiciones de estrés biótico y abiótico; por ejemplo por actividad glioxilato oxidasa en peroxisomas durante la fotorrespiración (Noctor *et al.*, 2002; Foyer and Noctor 2003) y el complejo NADPH oxidasa de membrana plasmática en infecciones por patógenos y durante la ocurrencia de muerte celular programada (MCP) (Van Breusegem and Dat, 2006). Cada tipo particular de EROs se produce en uno o varios compartimentos subcelulares y la intensidad y duración de esta producción es dependiente del tipo e intensidad de la señal que es censada por la planta.

Generación de EROs

La molécula de oxígeno en su estado basal es incapaz de reaccionar con moléculas orgánicas debido a que en su último orbital de mayor energía posee dos electrones desapareados de espines paralelos.

Cuando esta molécula es activada, la capacidad de reacción cambia. Para esta activación se han descripto dos mecanismos: a) la absorción de energía suficiente como para cambiar el spin de uno de sus electrones desapareados y de esta forma pasar a un estado singulete. En esta forma el oxígeno puede participar de reacciones que impliquen la transferencia simultánea de dos electrones (reducción divalente) como la mayoría de las moléculas orgánicas.

b) la reducción monovalente, donde debido a la restricción del spin electrónico o principio de exclusión de Pauli se generan diferentes estados de reducción del O_2 hasta llegar a H_2O . A partir de un proceso endotérmico se forma anión superóxido (O_2^-) y en

posteriores reacciones exotérmicas, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

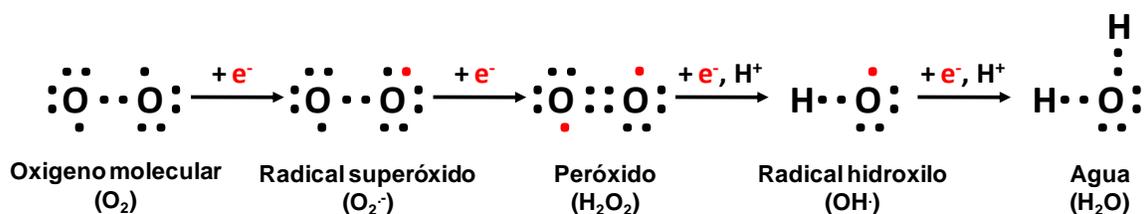


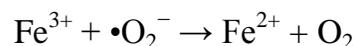
Figura 3. Estados de activación del oxígeno por reducción monovalente (electrones rojos =desapareados).

Estos diferentes estados de reducción del oxígeno, junto con el oxígeno singulete conforman las denominadas Especies Reactivas del oxígeno (EROs) (Asada and Takahashi, 1987, Fridovich, 1991, Scandalios, 1993).

El radical superóxido puede actuar tanto como agente oxidante como reductor, oxidando al ácido ascórbico (ASC) y al NADPH y reduciendo al citocromo c y a iones metálicos (Salim, 1988). Su dismutación tanto sea espontanea como catalizada enzimáticamente producen H_2O_2 y O_2 .

El H_2O_2 es la ERO que mayor vida media presenta, con una marcada capacidad de atravesar membranas celulares. Esto se debe a que se presenta como una molécula apolar, con todos sus electrones apareados por lo que no es considerada un radical. Posee una baja reactividad *per se* (Salim, 1988) y es el responsable, en presencia de sales de hierro y de radical superóxido, de la formación de radical hidroxilo según las reacciones de Fenton (Fenton 1984; 1989) y de Haber and Weiss (1934)

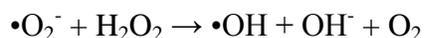
Primero se da una reducción del catión férrico a catión ferroso:



El segundo paso consiste en la reacción de Fenton:



Dando como resultado la reacción neta de Haber Weiss



El radical hidroxilo es la ERO más oxidante que se conoce, su tasa de reacción con moléculas orgánicas está limitada por difusión (Salim, 1988).

Generación subcelular de EROs

Apoplasto y pared celular

El apoplasto es el espacio intercelular por fuera de la membrana plasmática formado por el continuo de las paredes celulares y los espacios extracelulares. La difusión a través de este espacio es mucho más rápida que a través del citosol, lo que facilita una rápida comunicación célula-célula.

Utilizando inhibidores específicos, se han identificado a las NADPH oxidasas como principales complejos enzimáticos implicados en la producción de EROs a nivel apoplástico (Mittler, 2002). Estos complejos con unión a membranas tienen la capacidad de transferir electrones desde el NADPH intracelular (a través de la membrana plasmática) al oxígeno apoplástico, y de esta forma generar O_2^- que luego puede ser dismutado a H_2O_2 (Fig. 4). Las familias multigénicas de estas NADPH oxidasas en plantas se denominan Rboh (*Respiratory burst oxidase homologs*) haciendo referencia a su homología con las presentes en neutrófilos humanos. Se encuentran representadas por 10 miembros en el caso de *Arabidopsis thaliana* y 9 miembros en *Oryza sativa* (Torres *et al.*, 2002; Sagi and Fluhr, 2006; O'Brien *et al.*, 2012b; Skelly and Loake, 2013).

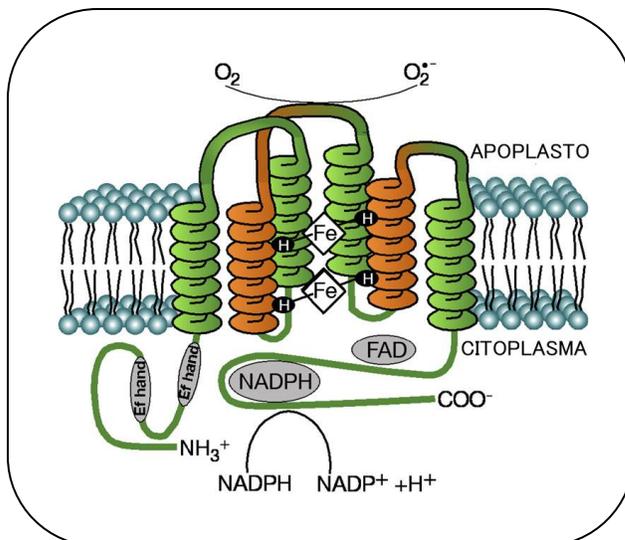


Figura 4. Complejo NADPH oxidasa en membrana plasmática de célula vegetal. (Adaptado de Sagi and fluhr, 2006)

La actividad de las NADPH oxidasas se encuentra relacionada a diversos procesos vegetales, incluyendo el crecimiento celular (Foreman *et al.*, 2003), desarrollo y cierre estomático (Shi *et al.*, 2012) y respuestas a estrés abiótico y patógenos (Wojtaszek, 1997; Torres *et al.*, 2002; Daudi *et al.*, 2012; Siddique *et al.*, 2014).

El O_2^- producido por las NADPH oxidasas puede ser dismutado a H_2O_2 por la acción de Superóxido Dismutasa (SOD) enzima clave del sistema antioxidante.

A nivel apoplástico existen además otras fuentes enzimáticas de H_2O_2 que incluyen amino oxidasas, peroxidasas y oxalato oxidasas (Bolwell *et al.*, 2002).

El apoplasto presenta características distintivas que afectan sus propiedades redox (Potters *et al.*, 2009); por un lado posee un pH menor al del citosol (Gao *et al.*, 2004) lo que conllevaría a que las proteínas sean menos redox-sensibles y por otro lado presenta menor capacidad buffer asociada a las menores concentraciones de antioxidantes de bajo peso molecular presentes tales como ASC y GSH. Por lo tanto las EROs pueden acumularse en el apoplasto permitiendo la activación de vías de señalización que pueden contrarrestar los efectos del pH bajo sobre la sensibilidad redox de las proteínas.

Por otra parte, los cambios en los niveles de EROs apoplásticas pueden afectar el gradiente de ascorbato y dar lugar a cambios en la homeostasis redox celular (Foyer *et al.*, 2009; Munné-Bosch *et al.*, 2013).

Cloroplastos

En la célula vegetal, los cloroplastos representan la principal fuente de generación de EROs. La combinación de la acción de la luz sobre los pigmentos y las altas concentraciones de O_2 conforman un ambiente propicio para esta generación.

En los tilacoides cloroplásticos, los centros de reacción PSI y PSII se presentan como los sitios principales de generación de EROs. Como consecuencia de la transferencia de electrones desde el PSI hacia el O_2 se producen grandes cantidades de O_2^- el cual puede dismutar espontáneamente o por una reacción catalizada por la SOD

presente en tilacoides y estroma cloroplástico. Luego el H_2O_2 es reducido a H_2O por medio de la transferencia de electrones desde el ASC, en una reacción catalizada por las ascorbato peroxidases (APXs) cloroplásticas (Asada, 1992). Este movimiento de electrones, que comienza con la producción de O_2 y la transferencia de electrones desde el H_2O hacia el PSII, y termina con el consumo de O_2 y la producción de H_2O_2 en el PSI, se denomina ciclo de H_2O - H_2O (Asada, 1999).

Se ha demostrado que la generación de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en algas y tilacoides iluminados (Elstner *et al.*, 1978; Dykens *et al.*, 1992) ocurre vía metales de transición, como Fe^{2+} y Cu^+ , mediante las reacciones de Fenton y Haber Weiss detalladas anteriormente. Las formas oxidadas de estos metales pueden ser re-reducidos por superóxido, ASC o GSH. La Ferredoxina (Fd) reducida puede reducir al H_2O_2 generando $\cdot\text{OH}$ (Hosein and Palmer, 1983).

Una EROs particular (por presentarse como un no radical y su escasa vida media) es el Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). En organismos fotosintetizantes, la generación del $^1\text{O}_2$ se encuentra relacionada a la captación de luz por parte de los cloroplastos, en una reacción entre las clorofilas excitadas en su estado triplete y el O_2 en estado fundamental, ($^3\text{O}_2$). En plantas expuestas a altas intensidades de luz, la producción de $^1\text{O}_2$ aumenta significativamente (Telfer *et al.*, 1994; Hideg *et al.*, 1998; Krieger-Liszky, 2005) causando daños a lípidos, proteínas y ADN.

En membranas relacionadas al proceso fotosintético, el control de los niveles de $^1\text{O}_2$ es mediado por antioxidantes solubles como carotenoides y α -tocoferoles. Por ejemplo, en los complejos antena, el estado triplete de las clorofilas puede ser “apagado” directamente por los carotenoides que se encuentran en la proximidad (Edge and Truscott, 1999). En los centros de reacción del fotosistema II, dos beta-carotenos están implicados en la detoxificación de $^1\text{O}_2$ formado durante reacciones de recombinación de cargas (Moan, 1990; Telfer, 2002). Debido a que los carotenoides, los α -tocoferoles y muchas otras moléculas presentan una alta reactividad al $^1\text{O}_2$, por mucho tiempo no fue considerada como una molécula implicada en señalización hasta

que se demostró su capacidad de activar la expresión de genes nucleares en *Arabidopsis thaliana* (op den Camp *et al.*, 2003)

Mitocondrias

La CTE en la respiración mitocondrial se encuentra formada por cuatro complejos proteicos íntimamente asociados. En este sistema, el O_2 es reducido a H_2O . Los electrones normalmente fluyen desde los complejos NADH-deshidrogenasa o succinato deshidrogenasa (I y II Fig. 5) hacia las ubiquinonas (Q), de éstas hacia el complejo citocromo (III) y por último al complejo citocromo oxidasa (IV), que es donde se produce la reacción de reducción de O_2 a H_2O .

En las plantas existe una vía alternativa para esta reducción, denominada Oxidasa alternativa (AOX por sus siglas en ingles), la cual a diferencia del complejo citocromo oxidasa es insensible al cianuro (Fig.5).

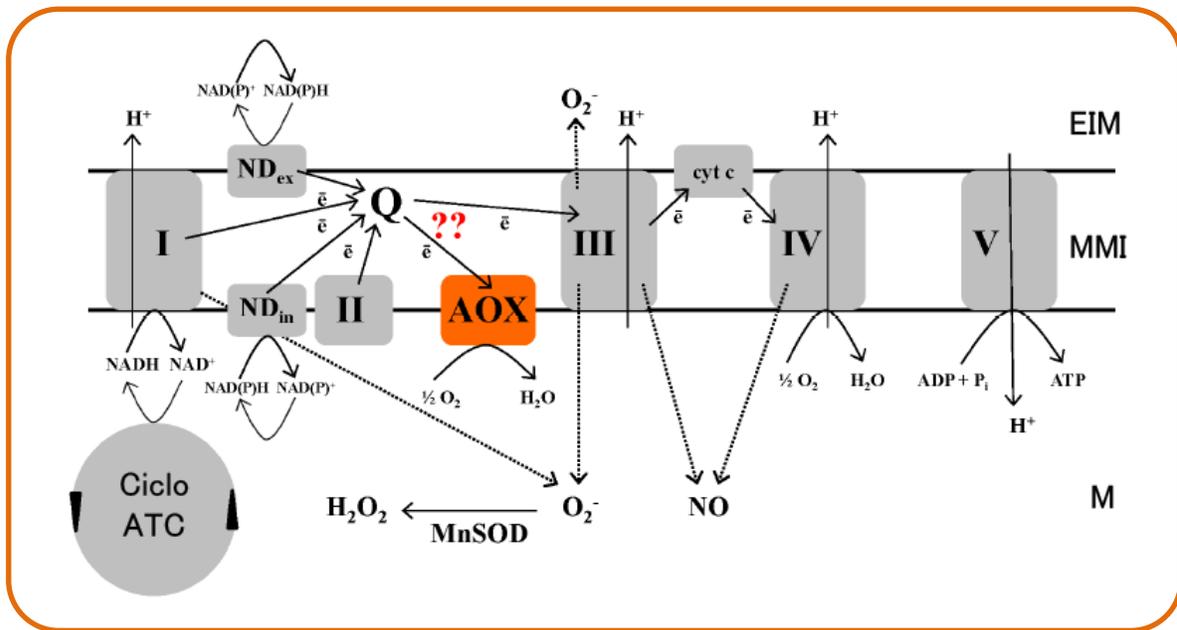


Figura 5. Esquema de la cadena transportadora de electrones respiratoria mitocondrial (adaptado de Vanlerberghe, 2013). ATC: ácido tricarboxílico; EIM: espacio intermembrana; MMI: membrana mitocondrial interna; M: matriz mitocondrial.

Una restricción en el flujo de electrones a través del citocromo conduciría a la generación de superóxido y H_2O_2 . Se han identificado dos sitios generadores de superóxido en mitocondrias: 1) el complejo NADH-deshidrogenasa, por flavoproteínas o por núcleos de Fe-S, y 2) las ubiquinonas, por ubisemiquinonas (Purvis and Shewfeldt, 1993).

Peroxisomas y glioxisomas

Dependiendo del tejido vegetal, podemos encontrar diferentes tipos de peroxisomas y asociado a esto, diferentes procesos metabólicos que incluyen la generación de H_2O_2 (del Río *et al.*, 1998). En plantas con metabolismo tipo C3, como resultado de la fotorrespiración (en tejidos fotosintetizantes) se genera H_2O_2 dentro de los peroxisomas donde se libera a partir de la oxidación del glicolato catalizada por la glicolato oxidasa (Foyer and Noctor, 2003; Mittler, 2002; Noctor *et al.*, 2002;). Por otro lado, en tejidos de reserva de plantas oleaginosas podemos encontrar glioxisomas (peroxisomas especializados) donde se encuentran las enzimas del ciclo del glioxalato y donde la vía más importante de generación de H_2O_2 está representada por la β -oxidación de los ácidos grasos. Asimismo, en estos orgánulos también existe generación de $\cdot O_2^-$ y H_2O_2 por la acción de las enzimas implicadas en la degradación de bases nitrogenadas, como xantina oxidasa y urato oxidasa (del Río *et al.*, 1998).

Degradación de EROs

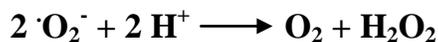
Los niveles de EROs en las células vegetales son producto tanto de la tasa de producción como de la tasa de degradación, en este balance toman principal relevancia los componentes del sistema antioxidante. Este sistema antioxidante se encuentra conformado por mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos que captan e inactivan eficientemente a las EROs y de esta forma modulan sus efectos. La localización subcelular, las propiedades bioquímicas, su inducción diferencial, tanto a nivel de actividad como a nivel de expresión génica de las enzimas que componen el

sistema antioxidante, constituyen, junto con la presencia de los antioxidantes no enzimáticos, un sistema altamente flexible y versátil que mantiene en lo posible un control sobre la producción y acumulación temporal y espacial de las EROs.

Degradación enzimática de EROs

Las principales enzimas que conforman los mecanismos de defensa antioxidante y que remueven EROs son Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Ascorbato peroxidasa (APX). La actividad de estas tres enzimas es crucial en el mantenimiento de los niveles de radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El control de estas EROs, es también clave para evitar la formación de radical hidroxilo (OH^\cdot) que se desprende de la reacción de Haber-Weiss o de tipo Fenton en presencia de metales y es una de las más reactivas.

Las **SOD**, constituyen la primera línea de defensa contra las EROs. Son metaloenzimas que dismutan los radicales $\cdot\text{O}_2^-$ de acuerdo a la siguiente reacción:



La identidad de las isoenzimas (isoformas) de SOD es definida por el cofactor metálico al cual se encuentren asociadas.

En general, las plantas contienen Mn-SOD mitocondrial y peroxisomal, así como Cu/Zn-SOD cloroplástica, citosólica y apoplástica. Se sabe que en los cloroplastos de algunas especies se encuentra además FeSOD (Kanematsu and Asada, 1989; Bowler *et al.*, 1992). En hojas maduras del 60 al 80% de la actividad SOD se encuentra en cloroplastos (Bowler *et al.*, 1992).

Las **CAT** dismutan el H_2O_2 a H_2O y O_2 y de esta manera controlan los niveles de H_2O_2 en las células.

Sus isoformas se encuentran, principalmente, en peroxisomas y glioxisomas donde catalizan la degradación del H_2O_2 producido durante el ciclo del glicolato y la β -oxidación de ácidos grasos. Esta enzimas se caracterizan por su baja afinidad por el

H_2O_2 (Scandalios, 1994), es de fundamental importancia en la remoción del H_2O_2 durante etapas tempranas del desarrollo y en la hoja madura bajo condiciones normales, pero no en condiciones donde la generación de EROs se encuentra incrementada.

Se postula que las **APXs** son las enzimas más importantes en la degradación del H_2O_2 , principalmente cloroplástico pero también citosólico, y tiene un rol clave en la regulación de los niveles y señalización de H_2O_2 (Asada, 1999; Apel and Hirt, 2004). Se han descrito varios genes que codifican para distintas APX en *Arabidopsis*, al menos dos de ellos (APX1 y APX2) se encuentran en el citosol (Panchuk *et al.*, 2002) mientras que hay otros de localización cloroplástica y peroxisomal (Asada, 2006). Cabe destacar la función de las isoformas tilacoidales de APX, que, presentándose como enzimas asociadas a membranas, forman parte de la primera barrera de control de los niveles de EROs. Estas isoformas toman relevancia en la conversión del H_2O_2 (proveniente de la actividad SOD) a H_2O utilizando ascorbato como donador de electrones.

Además de los componentes enzimáticos, el sistema antioxidante se encuentra formado por antioxidantes no enzimáticos, como ser ácido ascórbico (ASC), glutatión (GSH), carotenoides y α -tocoferol. ASC y GSH se encuentran en altas concentraciones en cloroplastos y otros compartimentos subcelulares y son cruciales en la remoción de EROs. Para la protección real se requieren altos niveles de ASC y GSH reducidos y el *pool* de reducción de estos compuestos es mantenido mediante el ciclo del ascorbato-glutatión (Ciclo de Foyer-Halliwell-Asada) por la actividad de las enzimas, glutatión reductasa (GR), Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y Dehidroascorbato reductasa (DHAR) que utilizan como fuente de poder reductor al NADPH (Fig. 6).

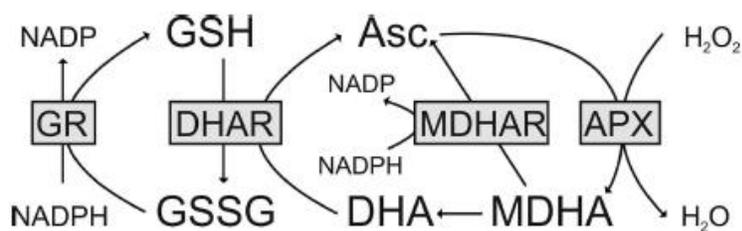


Figura 6. Ciclo de ascorbato-glutatión. GR: glutatión reductasa, DHAR: dehidroascorbato reductasa; MDHAR: monodehidroascorbato reductasa; APX: ascorbato peroxidasa.

EROs como moléculas señales

Las EROs presentan roles duales, actuando por un lado como compuestos altamente reactivos (conduciendo a daño en distintos niveles celulares), y por otro lado actúan como moléculas señal, modulando procesos complejos tanto a nivel local como sistémico en respuesta a estreses abióticos y bióticos, señales hormonales, crecimiento, senescencia y muerte celular (Mittler *et al.*, 2004). La determinación de los roles antes señalados, se da por el tipo de ERO, el estado fisiológico de la célula, la localización subcelular y el balance entre su generación y degradación (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Foyer and Noctor, 2005b; Halliwell and Gutteridge, 2007). Debido a que estos dos procesos siempre se producen de manera simultánea, el equilibrio entre las velocidades de generación y degradación da lugar a rápidas alteraciones en sus niveles, generando una señal.

En muchos sistemas biológicos los picos de producción de EROs (a menudo dos picos bien diferenciados), acompañan a varios eventos de señalización diferentes (Nishimura and Dangl, 2010). Estudios donde se utilizaron herramientas tales como la expresión de luciferasa (bajo control de promotor EROs-sensible) (Miller, *et al.*, 2009), o GFP unido a un sensor de H₂O₂ en pez cebra (Niethammer *et al.*, 2009), revelaron que el primer pico de producción de EROs podría desencadenar una cascada de comunicación de célula a célula resultando en la formación de una onda de EROs que se propaga a lo largo de los diferentes tejidos y lleva la señal a través de largas distancias. A partir de esto es que se propone un concepto de señalización espacio-temporal dependiente de EROs. Entonces, podemos imaginar a este proceso de señalización como un proceso dinámico que se produce dentro de las células, entre diferentes orgánulos, así como entre las células a través de largas distancias.

Este punto de vista claramente mecanicista implica que la onda de EROs se auto-propaga. Se ha demostrado (Miller *et al.*, 2009) que una onda de EROs inducida por diferentes estímulos puede ser bloqueada por la aplicación local de CAT o un inhibidor de NADPH oxidasa. Además, esta señal que se extiende por toda la planta

requiere la presencia de NADPH oxidasas (Miller *et al.*, 2009). Estos experimentos demuestran claramente la naturaleza de auto-propagación de la onda de EROs. Por consiguiente, el inicio de la onda en células específicas debe estar asociado con una señal de larga distancia que hace que las células individuales a lo largo de su trayectoria, activen la producción de EROs por medio de sus propios mecanismos de producción.

Teniendo en cuenta los reportes existentes que hacen referencia a cambios en los niveles de EROs, y/o sus patrones de oscilación en distintos procesos y órganos (pelos radicales, células de la guarda, interacciones entre polen y estigma, además de estreses bióticos y abióticos) (Monshausen *et al.*, 2007; Nishimura and Dangl, 2010, McInnis *et al.*, 2006, Jammes *et al.*, 2009), como así también su capacidad de transmitir señales a largas distancias, es que se propone a las EROs como moléculas de señalización altamente dinámicas.

Los cambios en la generación de EROs en los distintos compartimentos subcelulares, se encuentran relacionados además con cambios en el transcriptoma nuclear, cloroplástico y mitocondrial. Esto indica la participación de la EROs como moléculas señales en la regulación transcripcional anterógrada y retrograda donde la información es de alguna manera transmitida desde una organela hasta el núcleo. Se postulan tres vías principales de acción para explicar cómo las EROs podrían afectar la expresión génica. La primera, donde los sensores de EROs podrían ser activados e inducir una cascada de señales que finalmente afectaría la expresión génica. Alternativamente se propone que los componentes de la vía de señalización podrían ser directamente oxidados por las EROs. Finalmente, las EROs podrían alterar la expresión génica por modificaciones en los factores de transcripción (Apel and Hirt, 2004).

Senescencia Foliar

El proceso de senescencia puede definirse como una serie sincronizada de eventos moleculares y bioquímicos (genéticamente regulados) que se producen durante

el curso de desarrollo de la planta. Se presenta como un proceso de deterioro complejo que puede conducir a la muerte del organismo entero o de un órgano en particular y se encuentra regulado por diversos factores tales como la edad, el desarrollo reproductivo, los niveles de fitohormonas y señales ambientales, estreses tales como sequía, ozono, deficiencia de nutrientes, y sombreado (Lobell *et al.*, 2012; Gan and Amasino, 1997; Lim *et al.*, 2003).

La senescencia foliar representa una fase fundamental del desarrollo, tanto en plantas anuales como perennes, la cual se presenta tan compleja y ordenada como cualquier otra fase del desarrollo. Se caracteriza por una transición entre etapas de asimilación de nutrientes a una de removilización y reciclado, donde la muerte de la hoja se retrasa hasta que todos son removidos (Feller and Fischer 1994; Hörtenstein and Feller, 2002; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Los cloroplastos son las primeras organelas en mostrar signos de deterioro caracterizado por la disociación de la grana y daños a nivel de la envoltura cloroplástica (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). Uno de los principales síntomas asociados a este proceso es la pérdida de la capacidad fotosintética, acompañada por el catabolismo de las clorofilas y la degradación de las proteínas y del ARN (Noodén *et al.*, 1997; Himelblau and Amasino, 2001). Esta degradación cloroplástica incluye la pérdida progresiva de proteínas como la Rubisco y proteínas de unión entre clorofilas a y b como consecuencia de su hidrólisis y consiguiente producción de aminoácidos libres mediada por la actividad de endo y exopeptidasas (Xie *et al.*, 2015).

El desensamblaje de los complejos fotosintéticos causa cambios estequiométricos que llevan a desbalances en las cadenas transportadoras de electrones fotosintéticas (Mulisch and Krupinska, 2013), traducándose esto en un aumento de la producción de EROs, (Apel and Hirt 2004; Karpinski *et al.*, 2013).

Al día de hoy no existen dudas acerca de la participación de las EROs como iniciadoras del proceso de senescencia como así también responsables de la progresión. Si bien este proceso se estudia hace décadas, existe poca información referente a las fuentes celulares de aumentos en la producción de EROs, excepto por la evidencia de

H₂O₂ en peroxisomas (Pastori and del Rio 1997; del Rio *et al.*, 1998) y las producidas a nivel de las cadenas transportadoras de electrones antes mencionada.

Asociado al avance en la etapa de senescencia los incrementos en los niveles de EROs, se relacionan con una disminución de la protección antioxidante (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Zimmermann and Zentgraf, 2005). Como así también con niveles incrementados de proteínas modificadas por oxidación (Mehta *et al.*, 1992) y aumentos en niveles de peroxidación lipídica en cloroplastos (Hopkins *et al.*, 2007).

A pesar de que estos altos niveles de EROs pueden inducir muerte celular y por lo tanto ser perjudiciales para una eficiente removilización de nutrientes desde esta hoja hacia otras partes de la planta incluyendo semillas (Juvany *et al.*, 2013), las EROs son necesarias como moléculas señal para la inducción de respuestas a estrés, desarrollo y senescencia (Apel and Hirt 2004; Foyer and Noctor 2013; Li *et al.*, 2009).

En agronomía, la senescencia foliar es un rasgo importante que lo convierte en un objetivo ideal para el mejoramiento de cultivos, y, avances recientes en la comprensión de sus mecanismos regulatorios hicieron posible el diseño de estrategias de manipulación del proceso buscando incrementar el rendimiento y mejorar la calidad de cultivos hortícolas luego de su cosecha (Guo and Gan, 2014).

Existen tres mayores razones por las que la senescencia foliar se presenta como un rasgo crucial. Primero, la hoja es un órgano donde son sintetizados los carbohidratos, y otros nuevos compuestos, además de ser la mayor fuente durante el llenado de granos (por ejemplo en arroz, trigo y cebada donde la hoja bandera juega un rol fundamental). La duración de la senescencia en las hojas es por lo tanto un importante determinante del rendimiento de los cultivos y de la acumulación de biomasa. Por ejemplo, en soja, la senescencia de las hojas fotosintéticamente activas inducida por estreses abióticos, causan una pérdida de productividad ligada a un decremento en su capacidad asimilatoria (Egli, 2004).

Segundo: Durante la senescencia foliar, no solo son rápidamente degradadas las clorofilas, sino muchos compuestos como el ácido ascórbico (antioxidante) además de

las proteínas, reduciendo la longevidad pos-cosecha de vegetales de hoja y devaluando los cultivos para alimentación animal.

Tercero: Una hoja senescente se vuelve vulnerable a la infección por patógenos, especialmente hongos, algunos de los cuales pueden producir tóxicos, representando una amenaza para la alimentación.

Es sabido que el proceso de senescencia foliar puede ser regulado por varias sustancias que afectan el crecimiento (Gan, 2010), además de existir evidencia de que puede ser regulada tanto a niveles transcripcionales como post-transcripcionales (ver artículo especial en: *Plant Molecular Biology*, Vol 82, Issue N6, agosto de 2013).

Los mayores aportes logrados en referencia al proceso de senescencia, se realizaron utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Gan and Hörtensteiner, 2013). Algunas de las conclusiones básicas obtenidas han sido traducidas a la aplicación práctica de la manipulación de la senescencia foliar en diversos cultivos agronómicos y hortícolas.

Entre las estrategias utilizadas, podemos mencionar 1) tecnologías basadas en la biología de las hormonas (especialmente citoquininas). 2) tecnologías basadas en la biología de factores de transcripción implicados en senescencia y 3) tecnologías basadas en factores de iniciación de la traducción (Guo y Gan, 2014).

El cultivo de soja en Argentina y el mundo

La soja (*Glycine max* L.) es una especie perteneciente a la familia de las leguminosas (Fabaceae), herbácea, anual y de clima templado. Dentro de esta familia, es la que mayor cantidad de hectáreas cultivadas presenta a nivel mundial constituyendo un importante recurso de proteínas y aceite para el mercado alimentario.

En lo que respecta a la producción de semillas oleaginosas, en el año 2012 se cultivaron aproximadamente 281 millones de hectáreas a nivel mundial, con una producción total de 917 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014), representando la soja el 37% y el 26% de la superficie y la producción respectivamente.

La producción del cultivo de soja a nivel mundial se ubica en cuarto lugar luego del trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) (FAOSTAT, 2014).

En Argentina, la campaña 2013/2014 representó poco más de 20 millones de hectáreas sembradas de soja, con una producción cercana a los 56 millones de toneladas (www.bcr.com.ar). Posicionándose el país como tercer productor y exportador mundial de granos de dicho cultivo después de Brasil y Estados Unidos y como productor principal de productos derivados como harina y aceite.

Efectos de la salinidad en el cultivo de soja.

El nivel excesivo de sales disueltas en los suelos puede limitar el rendimiento en los cultivos (Munns and Tester, 2008). Los suelos afectados por la salinidad representan el 8% a nivel mundial (FAO, 2000) y se predice que el área cultivada afectada por la salinidad se duplicará hacia el año 2050 mediado por la agricultura irrigada y por las áreas semiáridas (Pitman and Läuchli, 2002; Rengasamy, 2006). El área irrigada representa el 17% del área total cultivada y produce a nivel mundial el 40% del alimento (FAO 2002). A la luz de la predicción se necesitará incrementar entre un 70% y un 110% la producción de alimentos para satisfacer las necesidades alimentarias para el año 2050, respondiendo al rápido incremento demográfico (Tilman *et al.*, 2011), y sin la opción de expandir el área de la tierra cultivada. Para esto, será necesario un incremento en la tolerancia a la salinidad de los cultivos convencionales, asistiendo a mejorar la productividad y la seguridad alimentaria (Yamaguchi and Blumwald, 2005).

La soja, representa el cultivo mayormente utilizado para proveer alimento para animales y humanos por su alto contenido de aceites y proteínas (Pazdernik *et al.*, 1997). Se encuentra clasificada como moderadamente sensible a la salinidad (Munns and Tester, 2008). En el estudio de Papiernik *et al* (2005), se presentan evidencias donde la producción de plantas de soja fue reducida en un 40% con el incremento en el

estrés por salinidad (de 2 a 7dS/m). Sin embargo, el germoplasma existente, ha demostrado un gran espectro de genotipos de tolerancia a la salinidad (Phang *et al.*, 2008), presentándose cultivares donde el rendimiento fue afectado en un 37%, a cultivares tolerantes a condiciones de salinidad a campo (Parker *et al.*, 1983). Esta variación natural en la tolerancia a la salinidad indica un potencial para la identificación de genes que incrementen la producción bajo condiciones salinas. Sin embargo, es limitada la información detallada de los mecanismos que conceden esta variación en la tolerancia a la salinidad en soja.

Desarrollo foliar y estrés salino

El desarrollo foliar es un proceso complejo que se encuentra controlado por múltiples factores (Van Lijsebettens and Clarke 1998). Normalmente, la ontogenia de la hoja incluye una fase temprana con incremento en la tasa fotosintética cuando la hoja se encuentra en activa expansión, una fase madura con tasa máxima, y una fase senescente que se caracteriza por la disminución en la tasa fotosintética (Gepstein, 1988; Miller *et al.*, 2000).

Morfológicamente, el síntoma más típico del daño salino en las plantas es el retardo en el crecimiento mediado por la inhibición de la expansión celular (Lazof and Bernstein, 1998; Munns, 2002). Esta sensibilidad a la salinidad en el crecimiento varía entre los órganos de una planta, donde el crecimiento expansivo de las raíces es usualmente menos sensible a la salinidad que el crecimiento de las hojas. Más aún, el grado de sensibilidad a la salinidad varía dentro de un mismo órgano vegetal. En órganos unidireccionales como ser las hojas y raíces de maíz, el crecimiento se restringe a distintas regiones en la base del órgano donde existe una sensibilidad diferencial a la salinidad en este tejido de solo milímetros para el caso de las raíces y de centímetros para el caso de las hojas (Bernstein *et al.*, 1995; Zhong and Lauchli, 1994). No se conoce hasta el momento si la variabilidad en el grado de sensibilidad (del crecimiento) a la salinidad entre diferentes órganos de una planta o entre células de

diferentes estadios de desarrollo dentro de un órgano, se encuentra relacionada a los componentes de la respuesta del sistema antioxidante a la salinidad.

Los efectos del estrés salino sobre las respuestas antioxidantes se ha estudiado en un amplio rango de especies vegetales, encontrándose bien documentados los cambios que presentan las actividades del sistema antioxidante inducidos por salinidad (Singh *et al.*, 2007; de Azevedo Neto *et al.*, 2006; Menezes-Benavente *et al.*, 2004). Más aún, los estudios indican que la respuesta antioxidante se encuentra correlacionada con la sensibilidad en el crecimiento y la tolerancia de los distintos cultivares a la salinidad. Sin embargo, se ha demostrado que las EROs se encuentran involucradas y son requeridas en los procesos de desarrollo (Rodriguez *et al.*, 2002; Foreman *et al.*, 2003), y se sugiere que las EROS apoplásticas cumplen un rol en la expansión celular por medio de los efectos sobre el ablandamiento de la pared celular (Schopfer, 2001).

A partir de lo expuesto anteriormente proponemos;

HIPÓTESIS GENERAL de trabajo:

“las diferentes etapas del desarrollo foliar en soja (expansión y madurez/senescencia) van acompañadas por cambios redox los cuales son modificados por condiciones de estrés, regulando las respuestas a los mismos.”

OBJETIVO GENERAL

“estudiar los cambios redox que ocurren durante las etapas de expansión y madurez/senescencia foliar en soja, y su relación con la modulación de las respuestas al estrés”.

Los OBJETIVOS ESPECÍFICOS propuestos son los siguientes:

- 1. Determinar la dinámica de la expansión, los efectos de estrés salino y establecer el comportamiento de variables fisiológicas asociadas al proceso de desarrollo foliar.**

- 2. Estudiar el estado redox, determinando las relaciones entre generación y degradación de especies reactivas del oxígeno durante el desarrollo foliar, los efectos de tratamientos salinos y moduladores del estado redox.**
- 3. Determinar la relación entre estado redox y niveles de expresión de genes implicados en la generación y degradación de especies reactivas del oxígeno y genes marcadores de senescencia.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Cultivar de soja utilizado

El cultivar de soja utilizado en el desarrollo de la tesis fue el denominado Don Mario 4800 (DM4800), perteneciente al grupo de madurez IV largo, cultivado principalmente en el centro del país. Este cultivar fue obtenido del banco de germoplasma de soja de la EEA INTA Marcos Juárez.

Cultivo de plántulas de soja

Las semillas de soja fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% V/V por 10 min y enjuagadas 4 veces con agua destilada. Las semillas se seleccionaron por tamaño y estado general y se colocaron en cajas plásticas con cierre hermético conteniendo papel de filtro y algodón humedecido con agua destilada. Se incubaron durante 72 h a 2 °C en oscuridad. Luego fueron transferidas a recipientes para cultivo hidropónico de 4 l de capacidad con aireación continua conteniendo medio B&D (Broughton and Dilwort, 1971) 1/2X, el nivel del medio fue mantenido por la adición de agua destilada con recambio total de medio cada 10 días. Las plantas se cultivaron en cámara de cría con régimen de luz 16/8 h (Luz/oscuridad) con una intensidad de 350 PAR y a una temperatura de 28 °C.

Tratamiento salino

Para los tratamientos de estrés salino se procedió al agregado de NaCl al medio de cultivo con una concentración final de 75 mM al día 13 (inicio de la expansión de la hoja 2).

Muestras de hoja para determinaciones bioquímicas

Para las determinaciones de metabolitos, expresión y actividades enzimáticas se trabajó con la hoja 2 (primera trifoliada) de plántulas de soja. Los muestreos se realizaron a partir del día 13 (contabilizando como día 1 el día en que se desinfectaron las semillas) y hasta la finalización de la experimentación. Se escindieron las hojas, se colocaron en sobres de papel aluminio y se sumergieron en nitrógeno líquido, luego las muestras vegetales se almacenaron en ultrafreezer (-80 °C) hasta su utilización.

Tratamientos de modulación de la expansión foliar con H₂O₂ y MgCl₂

Los tratamientos para la modulación de la expansión foliar se realizaron en forma de spray aplicado a la hoja 2 y a la planta entera (parte aérea) durante el periodo de mayor expansión (día 13 a 20) mediante dos aplicaciones diarias (08:00 h y 16:00 h).

Para el caso de H₂O₂ se ensayaron las concentraciones 5, 10, 25 y 50 mM en solución acuosa con el agregado de 0,01% de tween 20. Para el caso de los tratamientos con MgCl₂ se ensayaron las concentraciones de 0,05 %, 0,1 % y 0,5 % P/V en solución acuosa con el agregado de 0,01 % de tween 20.

Los tratamientos de las situaciones Control se realizaron con H₂O destilada con el agregado de 0,01 % de tween 20.

Determinaciones de la superficie foliar

Se realizaron capturas fotográficas de las hojas durante el ensayo a intervalos regulares. Las imágenes fueron procesadas para la obtención de la superficie foliar mediante el software Image-Pro plus versión (v4.5) MediaCybernetics.

Determinación histoquímica de anión superóxido (O_2^-) apoplástico

La determinación histoquímica de O_2^- se realizó mediante el uso de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma Co.), sal que al reducirse en presencia de radical anión superóxido, genera un precipitado azul denominado blue formazan. Este precipitado puede observarse directamente en el material vegetal por microscopia o cuantificarse mediante análisis de imágenes. Las hojas provenientes de los distintos tratamientos en distintos estadios de desarrollo fueron sumergidas en Buffer K-Hepes 25 mM, pH 7,6 con el agregado de 0,1 mg/ml de NBT, se incubaron por 16 h en estufa a 28 °C. Luego de esto fueron sumergidas en alcohol etílico al 80 % V/V a 90 °C durante 30 min para su decoloración. Las hojas fueron luego digitalizadas con un scanner de oficina para su posterior cuantificación mediante análisis de imágenes. Para esto se utilizó el programa Image Pro-plus versión (v4.5) MediaCybernetics.

Determinación histoquímica de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) apoplástico.

La determinación histoquímica de H_2O_2 se realizó mediante el uso de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), una sal que forma un precipitado color marrón en presencia de peróxido de hidrógeno. Este precipitado puede observarse directamente en el material vegetal por microscopia o cuantificarse mediante análisis de imágenes. Las hojas provenientes de los distintos tratamientos en distintos estadios de desarrollo fueron sumergidas en Buffer Tris-Acetato 50 mM, pH 5.0 con el agregado de 0,2 mg/ml de DAB, se incubaron por 16 h en estufa a 28 °C. Luego de esto fueron sumergidas en alcohol etílico al 80 % V/V a 90 °C durante 30 min para su decoloración. Las hojas fueron luego digitalizadas con un scanner de oficina para su posterior cuantificación mediante análisis de imágenes. Para esto se utilizó el programa OPTIMAS 6.1 Óptimas Corporation, Bothell, WA.

Determinación de Malondialdehído (MDA) y α -aminoácidos

Para ambas cuantificaciones se utilizaron extractos obtenidos de la siguiente manera: Se tomaron 3 discos de cada hoja (uno por cada folíolo) de aproximadamente 1 cm de diámetro, se sumergieron en 3 ml de Alcohol Etilico al 80 %V/V a 80 °C durante 20 min. Luego de enfriado se procedió al enrase a volumen inicial.

Para la determinación de **MDA** se procedió según Heath and Packer (1968), se tomaron 0.5 ml del extracto vegetal y se les agregó 0.5 ml del reactivo de TBA. Los tubos fueron calentados 20 min a 100 °C. Se los enfrió en hielo y se los enrazó al volumen inicial. Se realizó la lectura mediante espectrofotometría a 532 nm y 600 nm. Se restó la absorbancia de 532 a la de 600 nm y se calculó la concentración de MDA utilizando un coeficiente de extinción de $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para la determinación de **α -aminoácidos**, se procedió según Moore and Stein (1948), se tomaron 0,1 ml de los extractos vegetales y se les agregó 0,5 ml de reactivo de ninhidrina. Los tubos fueron incubados 20 min a 100 °C. Se los enfrió y se les agregó 2,5 ml de Alcohol etílico 80 % V/V. lectura mediante espectrofotometría a 570 nm luego de 15 min de terminado el baño de agua hirviendo. Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de leucina entre 0,5 y 2 mM.

Determinación de proteínas solubles

La determinación de proteínas solubles se realizó mediante espectrofotometría con Coomasie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). 100 μl de extracto se mezclaron con 1 ml de reactivo de Bradford, y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia a 595 nm fueron referidos a una curva con sero albúmina bovina en un rango entre 5-40 μg de proteína, con un valor de r^2 superior al 0,95.

Determinación de actividad de enzimas del sistema antioxidante

Para la determinación de actividad de enzimas antioxidantes se tomaron 3 discos por hoja (uno de cada folíolo) de aproximadamente 1 cm de diámetro, se

homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido y polivinilpolipirrolidona (PVPP) en 500 µl de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 conteniendo EDTA 1 mM. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 15 min. Se utilizó el mismo extracto para las determinaciones de actividades CAT, SOD y GR.

La actividad SOD fue determinada según Beauchamp and Fridovich (1973). A 10 µl del extracto vegetal se le agregaron 100 µl de una mezcla conteniendo Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, metionina 13 mM, NBT 75 µM, EDTA 100 nM, riboflavina 4 µM y 790 µl de H₂O destilada. La mezcla de reacción se incubó bajo luz UV por 5min. Una unidad SOD fue definida como la cantidad de enzima capaz de inhibir al 50% de la máxima reducción del NBT (valor del testigo). Se realizaron tres réplicas independientes con 3 muestras cada una.

La actividad CAT fue determinada según Aebi (1984), por cambios de la absorbancia a 240 nm, debida al consumo de H₂O₂. A 70 µl de muestra se le agregaron 50 µl de la mezcla de reacción que contenía buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4, 10 µl de H₂O₂ 50 mM y 380 µl de H₂O. Se registró la disminución de la absorbancia en una cinética de 60 s con determinaciones cada 1 s. El cálculo de actividad se realizó mediante el uso del coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno ($43.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se expresó por cantidad de proteínas y por minuto. Se realizaron tres réplicas independientes con 3 muestras cada una.

La actividad GR fue determinada según Schaedle and Bassham (1977), por disminución de la absorbancia a 340 nm. A 50 µl de muestra se le agregaron 100 µl de la mezcla de reacción que conteniendo buffer Tris-Cl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, GSSG 0.5 mM y 1µl de NADPH 0.2 mM. Se registró la variación de la absorbancia en una cinética de 60 s con determinaciones cada 1 s. El cálculo de actividad se realizó utilizando un coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se realizaron tres réplicas independientes con 3 muestras cada una.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (1970), y no desnaturalizantes (ND-PAGE), siguiendo lo propuesto por Davies (1971). La concentración de poliacrilamida utilizada fue del 11 % P/V.

Los geles SDS- PAGE fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Los geles ND-PAGE fueron utilizados para revelar los zimogramas de diferentes actividades enzimáticas estudiadas.

Detección de proteínas en geles SDS- PAGE, tinción con Coomasie

Una vez separadas en SDS-PAGE las proteínas se fijaron y colorearon con una solución de azul Coomasie (Brillant Blue R 250, Sigma) al 0,01 % en metanol: ácido acético:agua (40:10:50), durante 30 min. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos con una solución metanol: ácido acético: agua (40:10:50), hasta que el fondo quedó transparente.

Transferencia electroforética de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Western Blotting)

Luego de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore) durante 1 h a 100 V constantes, en buffer de transferencia. La membrana fue lavada con TBS y bloqueada con TBS + 5 % de leche descremada durante 1 h. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 1 h en TBS + 0,5 % P/V 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 temperatura ambiente. El revelado de la actividad de PA se realizó en buffer de revelado

Los análisis de inmunoblot fueron realizados por la técnica estándar usando anticuerpo secundario conjugado con PA en una concentración 1:10000. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-subunidad mayor de Rubisco (RbcL) 1:5000; anti-PsbA (proteína D1 del PSII) 1:4000 (Agrisera Co., Suiza); anti-FeSOD 1:5000 (Agrisera Co., Suiza); y anti-Cu/ZnSOD (Agrisera Co., Suiza).

Buffer de transferencia: glicina 39 mM; Tris-HCl 48 mM; SDS 0,037 %; metanol 20 %; pH 8,3.

TBS: Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5.

Buffer de revelado: Tris-HCl 100 mM pH 9,5; MgCl₂ 5mM; y NaCl 100 mM con NBT 4 mM y BCIP 12 mM.

Geles ND-PAGE de Actividad SOD.

La actividad **SOD** se visualizó en geles de poliacrilamida no desnaturizantes ND-PAGE según protocolo de Rao *et al.*, 1995. Los geles de separación se prepararon al 12% de concentración, se sembraron 20 µg de proteínas totales solubles en cada calle y se corrieron a 60 mV/gel constantes durante 2 h. El revelado de la actividad SOD se realizó incubando el gel 25 min en oscuridad a temperatura ambiente, en 10 ml de mezcla de reacción compuesta por 2,5 mM de NBT, seguido por una inmersión de 20 min en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8, 28 µM riboflavina, 8 mM tetrametil-etilen diamino. La reacción prosiguió durante 10-15 min en luz y se detuvo por un lavado breve en agua.

Determinación de antioxidantes no enzimáticos, ácido ascórbico y glutatión

Para la obtención del extracto vegetal a utilizar en la determinación de los antioxidantes no enzimáticos se procedió de la siguiente manera: se tomaron 3 discos de hojas (uno de cada foliolo) de aproximadamente 1 cm de diámetro, se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido y 1,5 ml de 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.

Para la determinación del contenido de **ácido ascórbico total** (modificado de Gillespie and Ainsworth, 2007) se colocaron 50 µl de extracto vegetal, 25 µl de buffer fosfato de potasio 75 mM, pH 7.0 y 25 µl de ditioneitol (DTT). Esta mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se le agregaron 25 µl de N-etilmaleimida (NEM) y 325 µl de una mezcla conteniendo: TCA 3 %, ácido orto fosfórico 50 %, Biperidil 4 % disuelto en 70 % etanol y 50 µl de FeCl₃ 3 %. Se incubó 1h a 37 °C y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 525 nm. Para la determinación del contenido de ácido ascórbico reducido se procedió de la misma forma pero sin el agregado de NEM y DTT.

Para la determinación de **Glutación total** (Modificado de Griffith, 1980) se mezclaron 30 µl de extracto vegetal y 30 µl de mezcla de reacción (por muestra: 1 µl de Glutación reductasa 5 u/ml, 2.5 µl de MgCl₂ 60 mM, 7.5 µl de NADPH 1 mM disuelto en buffer Tris-Cl 50 mM, pH 8, 2.5 µl de ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) 20 mM, 36.5 µl de buffer Tris-Cl pH 8 2 M) y 35 µl de agua. Se incubó a 28 °C por 30 min y luego se le agregaron 5 µl de ácido 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y se incubó 15 min más a temperatura ambiente. Para determinar el contenido de **glutación reducido** se mezclaron 30 µl de muestra y 40 µl de buffer Tris-Cl 1 M pH 8 y 25 µl de agua. Se incubó a 28 °C por 30 min y luego se le agregó 5 µl de DTNB; se incubó 15 min más 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 superficie foliar.

Determinaciones del Contenido relativo de Clorofilas y Eficiencia cuántica del FII

El **Contenido Relativo de Clorofilas** se determinó en la zona central del folíolo central utilizando un detector SPAD Chlorophyl Content Meter Model CL-01 (Hansatech Instruments).

Las determinaciones de **Eficiencia Cuántica del FII** se realizaron sobre la zona central del folíolo central utilizando el sistema Fluorescence monitoring System FM52 (Hansatech Instruments).

Determinación de Azúcares solubles totales y almidón

La determinación de **azúcares solubles totales y almidón** se realizó según el siguiente protocolo (Guan and Janes, 1991):

Extracción: el tejido congelado de hoja se homogeneizó 1/1 %P/V en buffer de extracción. El extracto fue centrifugado a 9000 xg durante 30 min a 4 °C, y el sobrenadante fue usado para la cuantificación de azúcares solubles. La fracción insoluble fue usada para cuantificación del contenido de almidón.

Buffer de extracción: HEPES-KOH 50 mM (pH 8,3); EDTA 2 mM; EGTA 2 mM, MgCl₂ 1 mM; MnCl₂ 1 mM; y DTT 2 mM.

Determinación del contenido de azúcares solubles totales:

Se mezclaron 0,5 ml de sobrenadante con 1 ml del reactivo de Antrona (Fales, 1951). Se incubó a 100 °C durante 5 min, y luego se enfriaron los tubos a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia a 620 nm fueron referidos a una curva con glucosa en un rango entre 6-24 µg del monosacárido, con un valor de r² superior al 0,95.

Reactivo de antrona: H₂SO₄ con anthrona 0,2 % P/V.

Determinación del contenido almidón:

El contenido de almidón fue determinado a partir de azúcares reductores (Sumner and Somers, 1944) liberados después de hidrólisis con la enzima amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3). Se resuspendió la fracción insoluble de las muestras en

H₂O destilada y se incubaron a 100 °C durante 30 min para gelatinizar el almidón de las mismas. Después se digirieron las muestras con 76 U de amiloglucosidasa disuelta en buffer acético-acetato 200 mM pH 4,6 cada 0,25 g de peso fresco, a 55 °C durante toda la noche, y finalmente se centrifugaron a 1200 xg durante 10 min. Para realizar la determinación se hirvieron 120 µl del sobrenadante con 500 µl de reactivo de Sumner durante 5 min. A continuación se agregaron 600 µl de H₂O destilada a temperatura ambiente a cada tubo para detener la reacción. Los valores de absorbancia a 550 nm fueron referidos a una curva con glucosa en un rango entre 60-210 µg del monosacárido.

Reactivo de Sumner: 88 ml de H₂O, 8ml de NaOH 2N, tartrato de NaK. 4H₂O 17,6g y ácido 3,5-dinitrosalicílico 0,4g.

Extracción de ARN de hojas

Para la extracción de ARN se utilizaron las muestras de hoja almacenadas a -80 °C. 100 mg de tejido vegetal se homogeneizaron en TRIZOL (Invitrogen) 1/10 P/V. Se agitó con vortex durante 1 min y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de TRIZOL y se agitó con vortex durante 15 s. Se incubó de 2 a 3 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó 15 min a 4 °C, 18000 xg, la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se agregó 1 volumen de isopropanol. Se Incubó 10min a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 18000 xg durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75 %, se centrifugó nuevamente por 5 min a 4 °C y 18000 xg. Finalmente, se secó el pellet y se resuspendió el ARN total en 25 µl H₂O DEPC (agua tratada con dietil pirocarbonato). Como control de la integridad del ARN se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1%. La cuantificación de la concentración de ARN se realizó utilizando un nanodrop. Con la finalidad de obtener un ARN de mejor calidad, aproximadamente 10 µg de ARN total se trataron con 2 U de DNAsaI. Se incubó 10 min a 37°C deteniéndose la reacción con EDTA 0.5 M incubando 10 min a 75°C.

Retrotranscripción

Aproximadamente 20 µg de ARN total se utilizaron para la obtención de ADNc. Para esto realizó una mezcla que contenía el ARN, oligo (dT) y H₂O, se incubó 10 min a 70 °C. Luego se agregó buffer para la retrotranscriptasa M-MLV, dNTPs (según indicaciones del fabricante de la enzima). Esta mezcla se la incubo 1 h a 37 °C. Los ADNc obtenidos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

PCR en tiempo real (mezcla de reacción y condiciones de PCR)

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 15 µl conteniendo: 2 µl de ADNc, 7.5 µl de iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad) y 1 µl de cada primer 5 µM y 4,5 µl de H₂O milliQ. Las reacciones de PCR se realizaron en termociclador iQ5 (Bio Rad).

El ciclado de las reacciones consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, luego 40 ciclos consistentes en 15 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de hibridación (temperatura propia para cada juego de primers) y 30s de extensión a 68 °C. Como paso final, se realizó una curva de melting para cada gen analizado.

Los resultados de niveles de expresión se presentan como el valor $2^{-\Delta\Delta cT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) promedio entre 3 determinaciones independientes. Se utilizó como gen *housekeeping* al de actina (Glyma09g39380). El valor $2^{-\Delta\Delta cT}$ representa los niveles de expresión de cada gen en cada tratamiento respecto de la condición control para el día 15 (inicio de la expansión). Se estableció que un aumento es biológicamente significativo cuando presenta un valor de 2 o superior respecto de la condición control para el día 15. Los valores de expresión crecientes se presentan asociados a cambios crecientes de intensidad de coloración azul, mientras que una disminución en su expresión se representa de color rojo.

Genes analizados y primers utilizados

En la siguiente tabla se presentan los genes analizados con sus correspondientes juegos de primers utilizados, además de la localización subcelular putativa de cada gen analizado por ExPASy (Proteomics Server) in silico.

A partir de la secuencia completa del genoma de soja se realizó una búsqueda de los posibles genes utilizando BlastN como aproximación de búsqueda en Phytozome.

Gen	Número de acceso en <i>Phytozome</i>	Posible ubicación subcelular	Primers 5' → 3'	Tamaño del amplificado	Temperatura de annealing (°C)
Actina	Glyma09g39380	-	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	150	60
CAT1	Glyma17g38140	Peroxisomal	GCCCATCACACAATCACCA ACTTTTCACGCTTCCCACCT	148	58
CAT2	Glyma06g02040	Peroxisomal	CTTTAACCGTTGGAGCTAGA TGTGTGACCTCAAAGAAACC	145	57
CAT3	Glyma04g01920	Peroxisomal	AGATAGATTTGCTCGCCGAT GCTGAGATGAGAAGCTATCT	133	57
APX1	Glyma12g07780	Citosólica	AGCGCTGATTACCAGAAGGC AGCTCACGTCGTAAGTTCCA	127	60
APX2	Glyma12g03610	Peroxisomal	TATGCAAAGGACGAGGATGC GCGGCAGTAACTACAACCTCC	152	60
APX4	Glyma11g08320	Peroxisomal	CAGACAAGAGTTGAATCACG TGCAACAACACCAGCTAGCT	127	58
APX7	Glyma06g12020	Cloroplástica Tilacoidal	GGAGGATACGGAACGGTATC CAGTGGCCACTCTCAATAT	177	60
CuZnSOD1	Glyma12g30260	Cloroplástica	CAAGCAGCAATTGCAGCCAT GACGGAGGAATTGCCCTTGA	126	60
CuZnSOD2	Glyma12g08650	Cloroplástica	CATGAGCTTGAGGATGACCT TTATGCTGGAGTCAAACCAA	108	58
CuZnSOD3	Glyma11g19840	Cloroplástica	CCCAATCCATAACGCTTTCA TTCTTGATGAGAGTGGCGA	119	58
CuZnSOD4	Glyma03g40280	Citosólica	GTGAAGGCTGTGGCCGTTCT CCCAAGGCATGGACATGGAA	146	60
CuZnSOD5	Glyma16g27020	Extracelular	GAAGCTGCAAAGGGAACCGT ATGAAAGCCTTGGGACAACC	141	60
FeSOD1	Glyma10g33710	Cloroplástica	CTCATTGGGTGGGTTACAAA GAAACTCAAGTGCTGCTGG	149	58
FeSOD3	Glyma02g09630	Cloroplástica	CTCATGGTTCCACCTGGTTC CAAAGGATATGGTGGTGGCT	128	60

FeSOD4	Glyma20g12510	Cloroplástica	TGATGGCTCACCTAGATCCT ATCATCCTTCTCCAGCTGTT	172	58
FeSOD5	Glyma20g33880	Cloroplástica	TGAAGCCGCCACCATATCCA AGCTCTGTCCCAACAACCTG	130	60
MnSOD1	Glyma06g14960	Mitocondrial	ACGCCATCGCCAAGAAAGAT TGTGTGTCAATAGCCCATCC	169	58
MnSOD2	Glyma04g39930	Mitocondrial	GCTACTCATTCTCGTGGGTT CCTTGTTGAAGTTGGTGATG	145	58
GR2	Glyma10g03740	Cloroplástica Mitocondrial Citosólica	CATCGCTCTCCGTTTCGCCA AGAGAGGAGGGATTGGGGA	113	60
NADPH ox.2	Glyma10g29280	ND	CAATCAACCCACATAACCAC CCCAGAGGGCGTTCCAATTG	145	60
NADPH ox.3	Glyma03g39610	ND	GAGCAGCAACAGGAAACATG CATCCTCTTGGTCCTTGAAC	148	58
NADPH ox.7	Glyma06g17030	ND	CATTGCCACTGCTGAAAGGG CACAGAGCCACCTTGATGT	184	60
NADPH ox.9	Glyma05g33280	ND	GCTGGCAATGATGTTGGACT CAGCACTCATGTCAACACCG	151	60
NADPH ox.10.	Glyma05g37330	ND	TTCTCGCAGGAGCTGAAAGC TGTTTCTGAGAGCACGAGC	176	60
NADPH ox.11	Glyma01g43190	ND	ACTTCGCCGGAACTGAGTA TCGTTTCCACTTGTTCGAC	149	60
NADPH ox.13	Glyma09g08470	ND	GGAGCTTGTGAGATCACGC GACGTAATCGAAAGACTCCG	159	58
NADPH ox.15	Glyma05g00420	ND	TCCCAAGCTCCTCATGAACG CATCGTTAGGCCACATTTCG	148	60
NADPH ox.16	Glyma07g15690	ND	GCATGGGGGCAGAATCAAAG TGGTCATGTCTCCAGAAT	126	58
Gmsark	Glyma13G266100	ND	AATATCAGACTTGGTTTGCCAAGCTTG GCAACAATTCAAAGCTATAGACGTCTGC	153	60
GmNAC3	Glyma06g38410	ND	GAATGCAGCAATGGGTTCATCA ATCCTGCTGGTGCATTGTTCTG	132	60
GmNAC4	Glyma12g35000	ND	TGACCTCTATGTCCCTGCGTTA CCCTGTGTGAAATCATTCTGA	136	60
GmNAC6	Glyma12g02540	ND	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA GGACTATTCAACTGAGCCAAAAG	124	60
ATG6	Glyma11g21490	ND	TTGAACAGCCTATGTGCCTTACT AATCAGCCTCACTCAGGACATCTC	124	60
PI3K	Glyma04g10090	ND	CCTGAAAAGGGG ATTCTT AAGC CCAACGATGGATAGT CTCAACC	141	60
NPR1-1	Glyma09g02430	ND	CCAACCCCTCACAAAGATTCC AGTTTGAACAAGGGGGATTCC	174	58

PR1	Glyma07g30520	ND	AACTATGCTCCCCCTGGCAACTATATTG TCTGAAGTGGTAGCTTCTACATCGAAACAA	123	60
PR2	Glyma03g28850	ND	TGAAATAAGGGCCACGAGTCCAAATG ATGGTACATGCAGACTTCAAGAATGCAGAT	135	60
PR5	Glyma09g31381	ND	GCGCTTGCTCCGCTTTCAACT CTTGAATAGACGGTGGGCTTGC	122	60

Análisis estadístico

Para cada variable determinada y en cada condición ensayada se realizaron de 3 a 6 repeticiones independientes utilizando como mínimo 3 réplicas biológicas de cada tratamiento. Los resultados se expresan como media aritmética \pm error estándar de las experiencias independientes. Se realizaron test de diferencias de medias (DGC) utilizando el programa InfoStat/Profesional ver. 2009, Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

CAPÍTULO I.

Desarrollo foliar en soja: parámetros fisiológicos asociados.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo foliar

El desarrollo foliar es producto de una compleja secuencia de eventos interrelacionados (Van Lijsebettens and Clarke, 1998) y puede ser descrito como la sucesión de tres fases superpuestas e interconectadas: una fase de **emergencia** (temprana) acompañada de un aumento en la tasa fotosintética, una fase de **madurez**, con tasa fotosintética máxima y una fase de **senescencia** caracterizada por una disminución progresiva de la tasa fotosintética (Gepstein, 1988; Miller *et al.*, 2000) (Fig. 1.1). El tamaño final de la hoja sólo se puede lograr a través de un estricto control genético espacial y temporal y la coordinación de estos tres eventos diferentes.

Por lo tanto, el entendimiento de estas redes génicas además de esta coordinación al representa un reto importante, no sólo por el papel fundamental de las plantas como alimentos y fuentes de energía renovables, sino también para una mejor comprensión del control del tamaño en los organismos multicelulares.

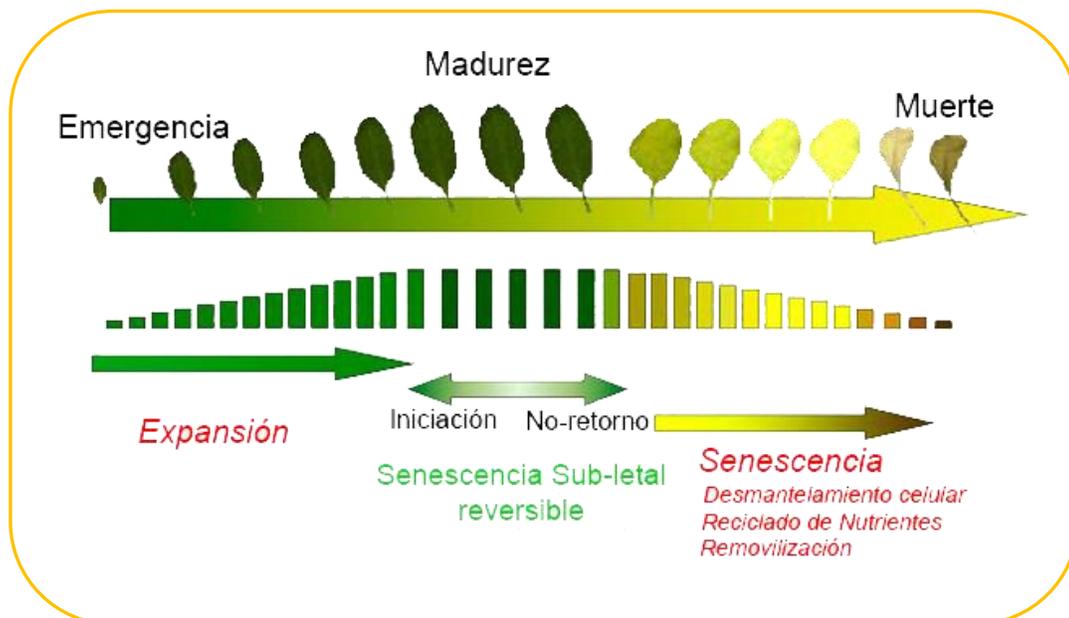


Figura 1.1: Esquema de las etapas de desarrollo de una hoja (traducido de Guiboileau *et al.*, 2010)

Desde el punto de vista energético, las hojas son órganos especializados en transformar (a través del proceso fotosintético) la energía proveniente de la luz solar, en energía biológica (Barber, 2009; Zhu *et al.*, 2010).

Dado que la mayoría de esta energía en la planta se produce a nivel foliar, la fotosíntesis se encuentra fuertemente influenciada por el tamaño y la forma de las hojas, caracteres que muestran una notable variación entre distintas especies (Efroni *et al.*, 2010).

Fase de expansión foliar

El proceso de expansión foliar abarca la fase de emergencia y culmina en la fase de madurez (Fig. 1.1), donde la hoja crece en tamaño y gracias a la actividad de su aparato fotosintético, se convierte en un órgano autótrofo y eficiente en la asimilación primaria de carbono y nitrógeno (Avila-Ospina, *et al.*, 2014). Como producto de la actividad fotosintética las plantas producen inicialmente triosas fosfato, la cual va a ser utilizada como forma de energía y para la síntesis de carbohidratos que van a cumplir funciones estructurales (celulosa), de reserva energética (almidón) y transporte (sacarosa). Los carbohidratos, son utilizados como constituyentes estructurales de las hojas durante la primera fase de la expansión y luego se almacenan. Estos, se utilizarán posteriormente para la exportación a nuevos órganos para apoyar la respiración y para mantener la energía durante la senescencia cuando el proceso fotosintético se ve disminuido.

Como productos de la asimilación del nitrógeno las células vegetales sintetizan aminoácidos que van a ser exportados o van formar parte de proteínas. El contenido de aminoácidos libres total, que es alto durante la expansión de la hoja, disminuye en paralelo a la disminución de las actividades enzimáticas cloroplásticas implicadas en la asimilación de carbono (Rubisco) y de amonio (glutamina sintetasa cloroplástica GS2). El amonio, fuente principal de nitrógeno para la biosíntesis de aminoácidos, es abundante en hojas muy jóvenes, así como también en las más viejas. El origen del amonio es diferente en ambos casos, donde en hojas jóvenes proviene de la captación

de suelo, mientras que en hojas viejas proviene de la proteólisis y del catabolismo de aminoácidos. Tanto el catabolismo como la exportación de aminoácidos se producen en paralelo en las hojas viejas. La razón de esto es que la eficiencia en la exportación de aminoácidos depende de la naturaleza de la molécula (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Tegeder and Rentsch, 2010). Además, cuando las células son depletadas de azúcares, necesitan catabolizar aminoácidos para mantener la respiración mitocondrial y así sobrevivir. El NH_4^+ liberado de esta forma a partir del catabolismo de los aminoácidos es reasimilado como glutamina y asparagina, moléculas conocidas en muchas plantas como forma de transporte floemático maestro de nitrógeno.

Entonces, el proceso de expansión foliar va a estar directamente influenciado por el estado fotosintético de la hoja y los procesos de asimilación.

Fase de madurez

Por definición, la madurez de la hoja se extiende desde el cese de la expansión foliar hasta la aparición de los primeros síntomas de senescencia. Durante la fase de madurez, la hoja se enfrenta a numerosos eventos subletales donde se alternan muchos síndromes (cambios que acompañan a la senescencia fisiológica) de senescencia crónica y eventos de recuperación (Fig. 1.1) (Guiboileau *et al.*, 2010). Es por esto que se propone a esta fase como la fase de senescencia subletal reversible. Una vez que la hoja alcanza el punto de no retorno (no reversibilidad) comienza la fase de senescencia.

Fase de Senescencia

La senescencia foliar es un proceso de degeneración activa y regulada que parece básicamente regida por la edad de desarrollo.

Se presenta como una fase importante en el período de vida útil de la hoja y puede durar tanto como la fase de madurez (Fig. 1.1). Durante la senescencia foliar, las células experimentan cambios tanto en su estructura, como en el metabolismo y la expresión génica (Buchanan-Wollaston, 1997); estos cambios son altamente

ordenados. El cambio más temprano y significativo en la estructura celular es la degradación cloroplástica. El cloroplasto contiene hasta 70% de las proteínas de las hojas y la mayoría de las enzimas metabólicas implicadas en el proceso de fotosíntesis, la fotorrespiración, la asimilación de nitrógeno, y de la biosíntesis de amino ácidos. Metabólicamente, los procesos de asimilación de carbono y nitrógeno se sustituyen por el catabolismo de las clorofilas y macromoléculas tales como proteínas, ARN y lípidos de membrana. La función principal de la senescencia foliar es reciclar el material celular acumulado durante el crecimiento y la maduración de la hoja, en nutrientes reutilizables y exportables para ser suministrados a los órganos destino. Por lo tanto, la senescencia foliar puede ser entendida como un proceso de reciclaje que contribuye a una mejor gestión de los nutrientes conduciendo a una economía eficiente de los recursos para la producción de nuevos órganos y el rendimiento de la planta. En hojas que senescen de forma natural, el proceso de senescencia se produce de una manera coordinada, a nivel de hoja completa, a partir del ápice foliar y los márgenes hacia la base de la hoja. La senescencia foliar puede ocurrir sin correlación obvia con la senescencia de otros órganos de la planta. Durante el desarrollo de una planta puede presentarse un proceso denominado senescencia foliar secuencial que se relaciona directamente a la competencia por los recursos entre las hojas inferiores (viejas) y las más jóvenes. Esta senescencia foliar secuencial no está obligatoriamente relacionada con la floración ya que puede presentarse durante el periodo vegetativo (Wingler *et al.*, 2010).

Una cuestión importante para la investigación en senescencia foliar (como así también de importancia agrícola) es determinar cuándo comienza y cuánto tiempo dura el proceso de senescencia foliar antes de la muerte. La duración del proceso y la coordinación estrecha de su comienzo con el desarrollo de órganos destino son importantes para la eficiencia en la removilización de nutrientes y, por lo tanto, para el llenado de grano en los cultivos.

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización fisiológica del desarrollo foliar de soja en condiciones control y los efectos del estrés salino. Esta

caracterización incluyo variables asociadas al proceso fotosintético, niveles de proteínas y carbohidratos no estructurales.

RESULTADOS

Sistema de cultivo utilizado

Con el objetivo de implementar una condición experimental estresante homogénea y que genera marcados efectos sobre el crecimiento y el estado redox, se optimizó un sistema de cultivo hidropónico suplementado con NaCl. La elección de esta condición de estrés se basó en trabajos previos del grupo donde claramente se estableció la relación entre reducción del crecimiento y alteraciones en la producción de EROs.

El **cultivo hidropónico** se utiliza a menudo como un sistema para superar los problemas de heterogeneidad, drenaje, y potencial hídrico inconstante. Se han ensayado una gran variedad de compuestos no iónicos para imitar la disminución del potencial hídrico del medio, incluyendo manitol, sorbitol y polietilenglicol. Sin embargo, estos compuestos formados por pequeñas moléculas son capaces de ingresar a las raíces y moverse a través del xilema hasta los brotes, ya que las membranas son permeables a solutos neutros de este tamaño. Según Hohl and Schopfer (1991), el manitol fue tomado rápidamente por las células, especialmente a bajo potencial hídrico. Además, como los hidratos de carbono también son compatibles con el crecimiento bacteriano, resulta imposible crear un entorno de crecimiento aséptico.

Teniendo en cuenta que tanto los tratamientos de sequía como los de salinidad provocan una inhibición del crecimiento relacionada a la reducción del potencial hídrico del medio de cultivo, a tiempos cortos de tratamiento, se puede utilizar un medio de cultivo suplementado con NaCl como modulador de las respuestas de crecimiento. Los tratamientos con NaCl además de presentar un componente osmótico, tienen un componente iónico, donde tanto el Na^+ como el Cl^- , dependiendo de la concentración ensayada y los tiempos de ensayo pueden presentar consecuencias tóxicas (Munns, 2002). En el presente estudio optamos por la implementación de un cultivo hidropónico con aireación continua como se aprecia en el detalle.



Detalle del sistema hidropónico utilizado para el cultivo de plántulas de soja.

1. Caracterización fisiológica del desarrollo foliar en soja: efectos del estrés salino

Durante el proceso de desarrollo foliar, las hojas presentan distintas fases, las cuales pueden ser afectadas por condiciones de estrés abiótico. Teniendo en cuenta resultados previos del grupo donde se ensayaron diversas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo optamos por un tratamiento con 75mM NaCl como modulador de la expansión foliar. En la figura 2.1 se representa la secuencia de los experimentos.

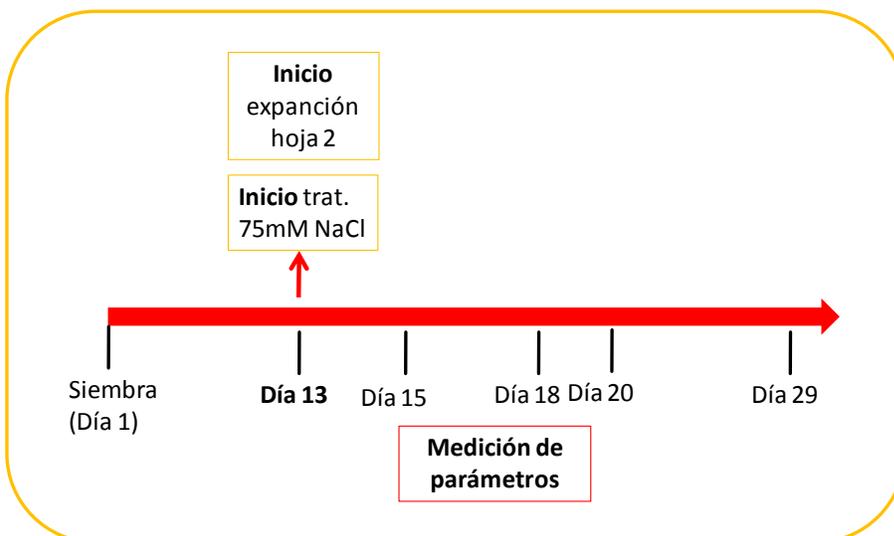


Figura 2.1: representación esquemática de la secuencia de experimentación sobre plántulas de soja DM4800.

Para los análisis de este capítulo y capítulos subsiguientes utilizamos el cultivar de soja DM4800 el cual había demostrado previamente ser susceptible a las concentraciones de NaCl ensayadas (datos no mostrados).

1.1 Expansión foliar en soja, efectos del estrés salino.

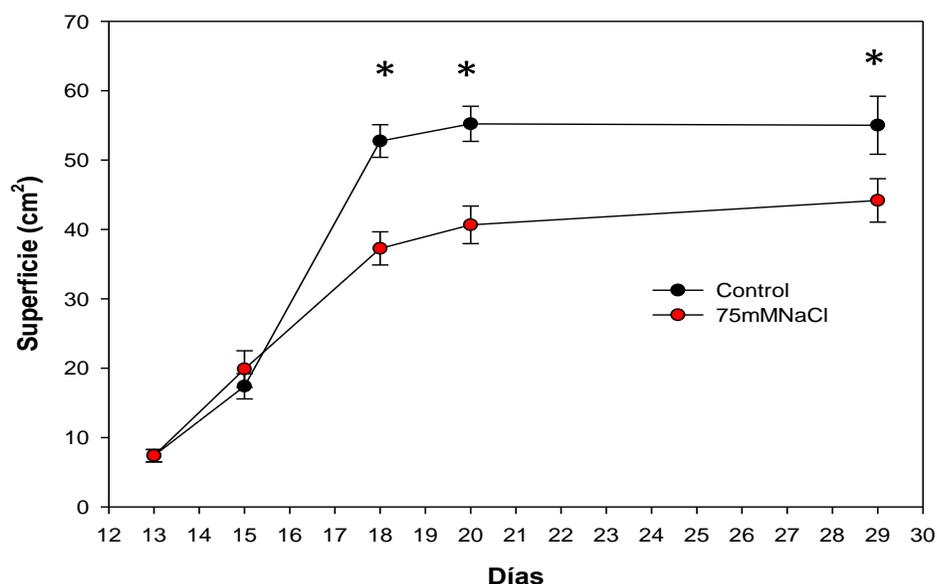


Figura 3.1: Superficie foliar de la hoja 2 de soja DM4800 desde el comienzo de la expansión en condiciones Control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

Con respecto a la superficie foliar se evidenciaron dos fases de desarrollo con velocidades de expansión diferenciales, la primera entre los días 13 y 18/20 (mayor velocidad de expansión) y la segunda entre los días 20 y 29 donde cesó la expansión (Fig. 3.1). La expansión foliar fue afectada a partir del día 15 por el estrés salino, observándose menor superficie foliar con diferencias significativas a partir del día 18 y hasta el día 29 con respecto al control (Fig. 3.1).

1.2 Variables asociadas a fotosíntesis durante la expansión y efectos del estrés salino

Verdor (SPAD)

Las mediciones de verdor sobre las hojas en expansión mostraron diferencias significativas (entre tratamientos) en todos los tiempos de medición posteriores al inicio de la experimentación salvo en el día 20 (Fig.4.1A).

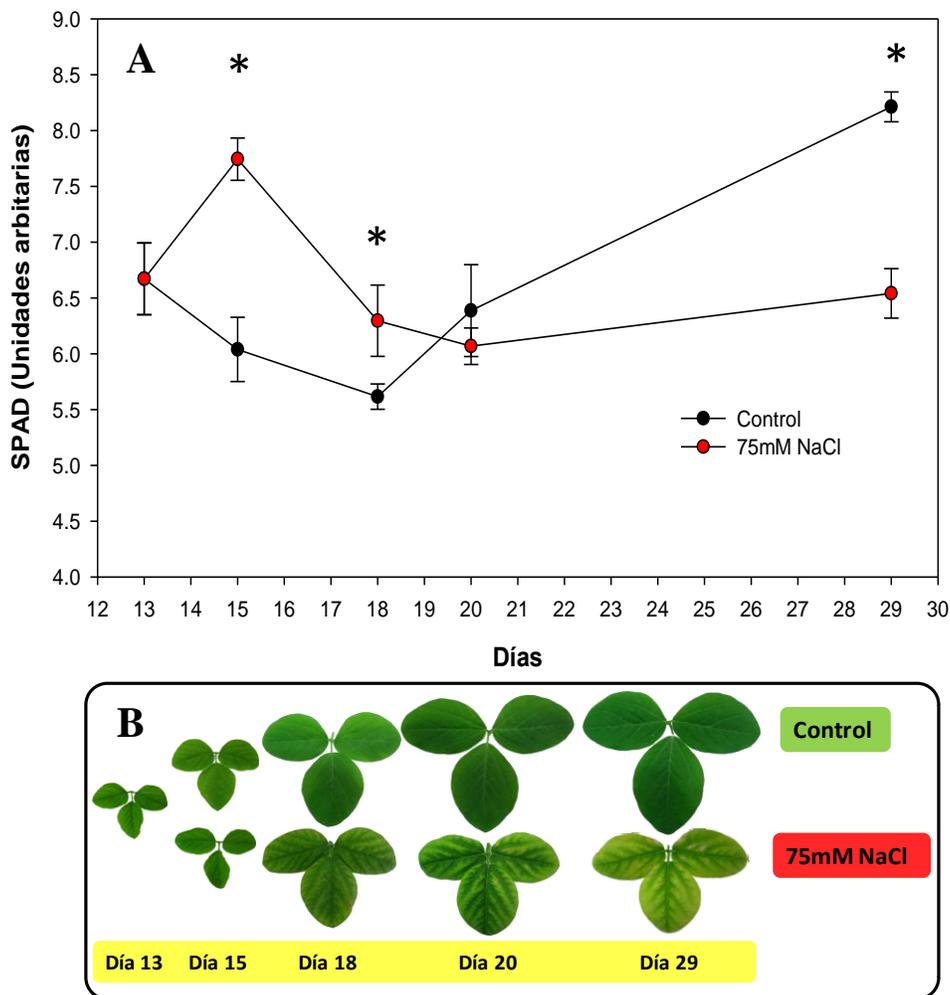


Figura 4.1: **A)** Determinaciones de Verdor (SPAD) en hoja 2 de soja DM4800 desde el comienzo de la expansión en condiciones Control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$). **B)** Fenotipo de hoja 2 de soja DM4800 a lo largo de la experimentación.

Durante los primeros días (13 a 18) los valores de verdor para el tratamiento salino fueron significativamente superiores al control. En el tratamiento control se observó un aumento sostenido del verdor a partir del día 20 y hasta el día 29, mientras que en el tratamiento salino los niveles se mantuvieron similares hasta el día 29 (Fig.4.1A).

Eficiencia cuántica del FOTOSISTEMA II (Φ_{FII})

Las mediciones de Eficiencia cuántica del FOTOSISTEMA II (Φ_{FII}) evidenciaron un comportamiento similar entre los días 13 y 15 en ambos tratamientos. Presentando diferencias significativas al día 18. A partir del día 20 (con diferencias significativas entre tratamientos) la condición control evidenció un aumento sostenido hasta el día 29. Mientras que en el tratamiento salino, disminuyó de manera marcada, hasta alcanzar valores similares a los del inicio de la experimentación, mostrando diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 5.1).

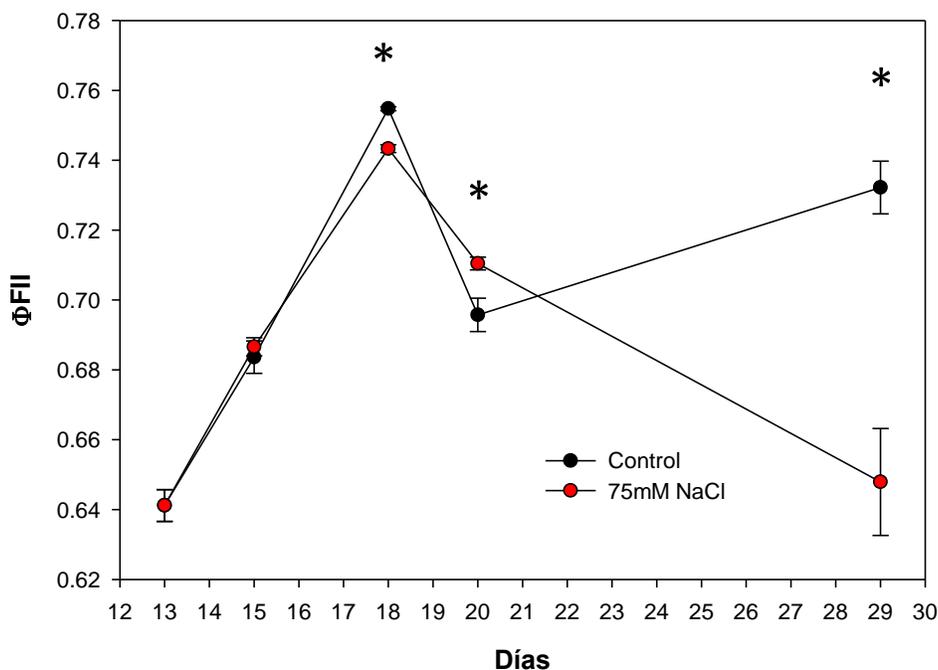


Figura 5.1: Mediciones de Eficiencia cuántica del FOTOSISTEMA II (Φ_{FII}) en hoja 2 de soja DM4800 desde el comienzo de la expansión en condiciones Control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

1.3 Proteínas y aminoácidos libres durante la expansión y efectos del estrés salino

Proteínas solubles

Para el caso de las proteínas solubles determinadas mediante espectrofotometría el tratamiento control presento una disminución en los niveles entre el día 13 y el 15, con un aumento sostenido luego, hasta el día 20, a partir de allí se mantuvieron constantes hasta el final de la experimentación (Fig. 6.1). La condición salina presentó un aumento en los niveles de proteínas solubles hacia el día 18, disminuyendo luego a partir del día 20, paulatina y significativamente respecto de la situación control hasta el final de la experimentación (Fig. 6.1).

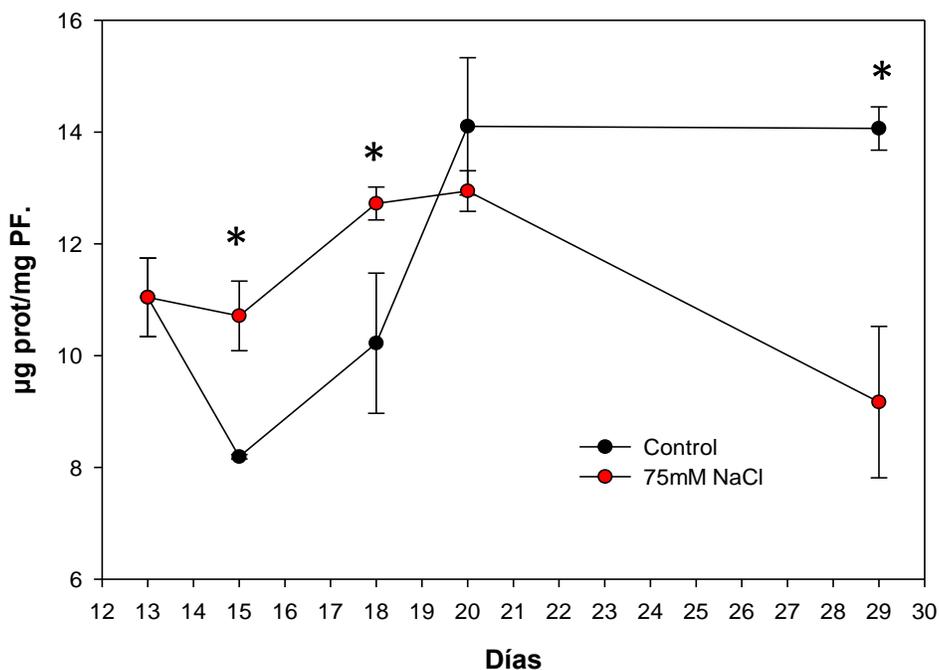


Figura 6.1: Determinaciones espectrofotométricas de proteínas solubles en hoja 2 de soja DM4800 desde el comienzo de la expansión en condiciones Control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

Perfil proteico (proteínas totales)

A partir de extracciones totales de proteínas se realizaron geles de acrilamida para evidenciar cambios en el perfil proteico de la hoja 2 a lo largo del proceso de desarrollo. La siembra de las muestras se realizó a igualdad de superficie foliar. Los resultados se muestran en la figura 7.1.

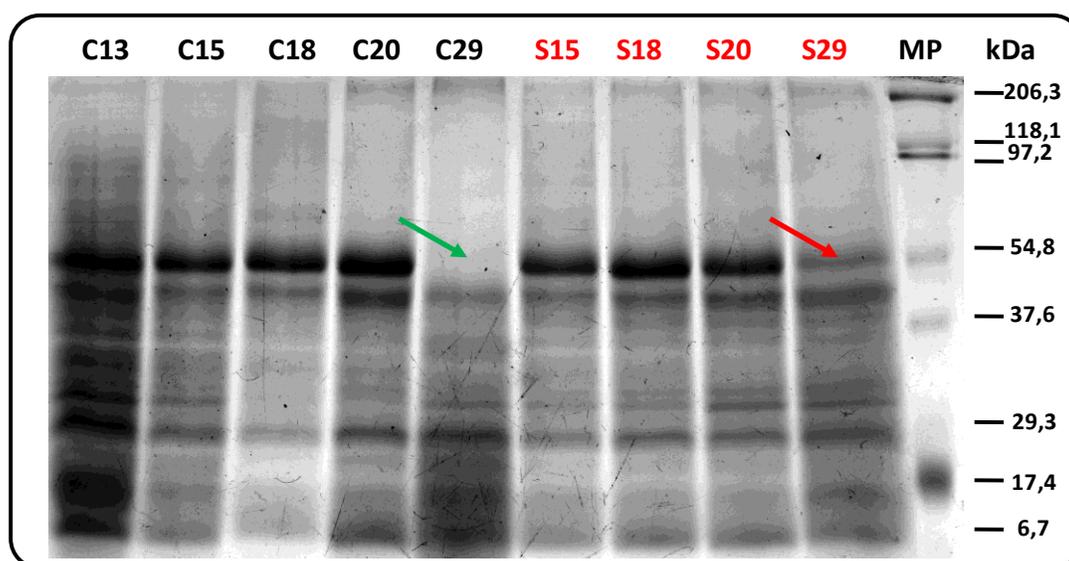


Figura 7.1: Gel de perfil proteico con tinción de coomasie de distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. C13: Control día 13, S15: 75mM NaCl día 15.

El mayor cambio observado en el perfil proteico, estuvo asociado a una banda de aproximadamente 54,8 kDa que desaparece en la condición control al día 29 (flecha verde). Mientras que el mismo día en la condición de 75mM NaCl (flecha roja) muestra una marcada disminución respecto a fases previas del desarrollo (Fig.7.1). Esta banda proteica (según su peso molecular y abundancia) podría representar a la proteína cloroplástica Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-oxigenasa (Rubisco). Nótese que a igualdad de muestra sembrada (representado igualdad de superficie foliar) se evidencia mayor cantidad de proteínas totales en la condición control al día 13 (Fig.7.1)

Niveles de α -aminoácidos (aminoácidos libres)

Las determinaciones de los niveles de α -aminoácidos presentaron un aumento paulatino a medida que transcurrió la experimentación (Fig.8.1). La condición control registró aumentos hasta el día 20, para luego mantener los niveles hasta el día 29, mientras que la condición salina evidenció aumentos en los niveles de α -aminoácidos hasta el día 29. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos los días 15, 18, y 29 donde en la situación salina los niveles de α -aminoácidos fueron superiores (Fig.8.1).

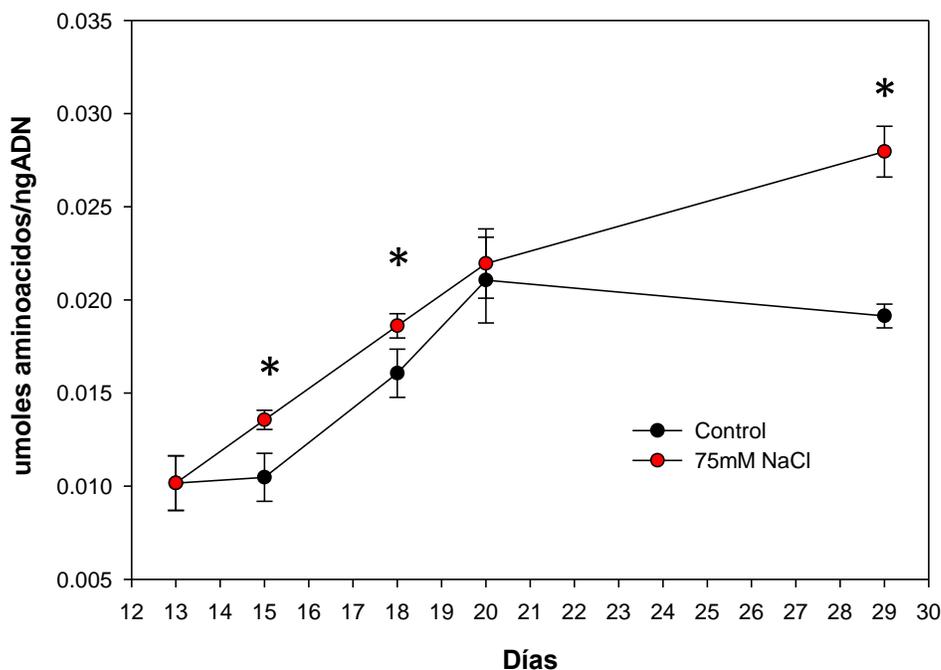


Figura 8.1: Determinaciones espectrofotométricas de α -aminoácidos en hoja 2 de soja DM4800 desde el comienzo de la expansión en condiciones Control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

1.4 Proteínas asociadas a fotosíntesis durante la expansión foliar y efectos del estrés salino

Niveles de proteína cloroplástica Rubisco

Con el objetivo de verificar los cambios propuestos en los niveles de la proteína cloroplástica Rubisco (Fig.7.1), se utilizó la técnica de *western-blot* hibridando con anticuerpos policlonales que reconocen la subunidad mayor (RbcL) de la proteína.

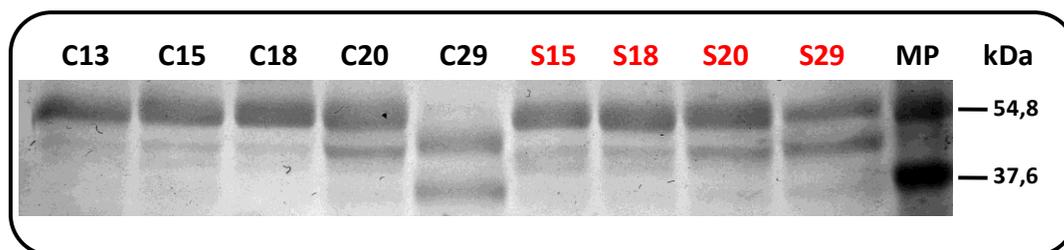


Figura 9.1: Western blot de proteína Rubisco en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. C13: Control día 13, S15: 75mM NaCl día 15.

En la condición control se observó que la banda de mayor peso molecular (~54,8kDa) desaparece en el día 29 (Fig. 9.1), evidenciándose la aparición de una banda de menor peso molecular (~45kDa) desde el día 13, que aumenta su intensidad hacia el día 20 (fin de la expansión foliar) presentando su mayor intensidad el día 29 acompañada con la aparición de una banda de aproximadamente 37kDa. Para el caso del tratamiento con 75mM NaCl, la banda de aproximadamente 45kDa presentó el mismo comportamiento que el tratamiento control. El cambio más importante se presentó al día 29 donde la banda de mayor peso molecular (~54,8kDa) presentó una degradación parcial. Estos resultados sugieren una degradación diferencial de Rubisco dependiente del tratamiento al cual fueron sometidas las plántulas de soja.

Niveles de proteína D1

Se evaluaron los niveles de la proteína D1 (PsbA) implicada en el proceso fotosintético como constituyente del centro de reacción del fotosistema II.

En la condición control, la proteína D1 evidenció aumentos en sus niveles durante el proceso de expansión (días 13 al 20) (Fig. 10.1). Mientras que al día 29 no se detectó la proteína.



Figura 10.1: *Western blot* de proteína D1 en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. C13: control día 13. S15: 75mM NaCl día 15.

Para el caso del tratamiento salino, los niveles de proteína D1 fueron menores respecto al tratamiento control durante todo el proceso de desarrollo foliar (Fig. 10.1), indicando una degradación activa dependiente del tratamiento.

1.5 Efecto sobre carbohidratos no estructurales

Con el objeto de conocer los efectos del tratamiento salino sobre los niveles de carbohidratos no estructurales, (relacionados a funciones energéticas y de almacenamiento) se realizaron determinaciones de almidón y de azúcares totales. En este caso se decidió realizar los muestreos de material en las dos fases bien diferenciadas del desarrollo foliar de soja, al día 15 (fase de expansión) y al día 29 (fase de madurez).

Contenido de almidón

El contenido de almidón evidenció tendencias de aumento en sus niveles asociado a la edad foliar solo para la condición de salinidad respecto al día 15 del control (Fig. 11.1). No se observaron diferencias significativas entre las condiciones control para el día 15 y 29 y la condición de salinidad el día 15 (Fig. 11.1).

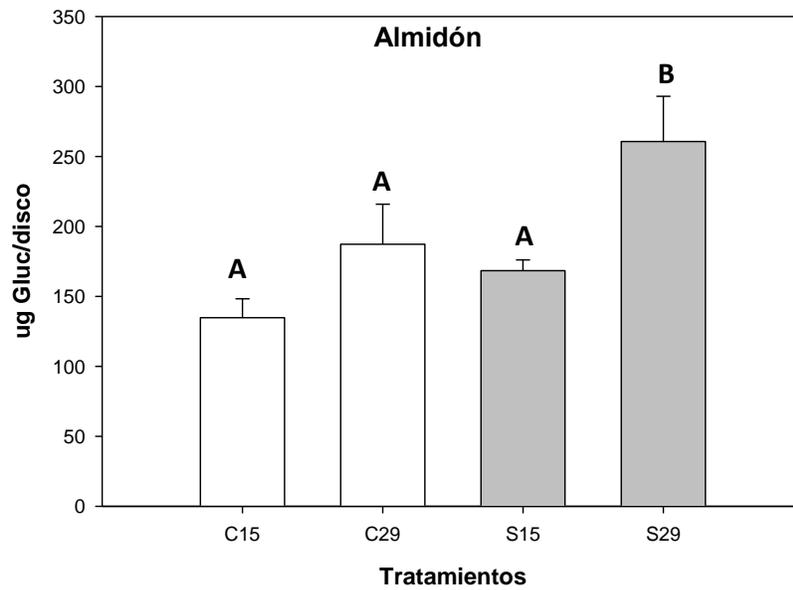


Figura 11.1: Niveles de almidón foliar en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. Gluc: glucosa, C15: Control día 15, S15: 75mM NaCl día 15. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Contenido de azúcares solubles totales

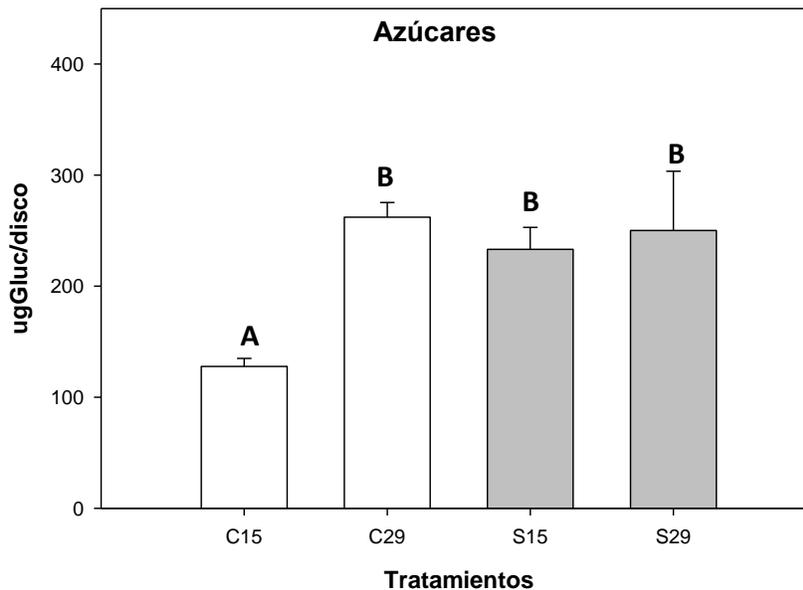


Figura 12.1: Contenido de azúcares totales foliares en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. Gluc: glucosa, C15: Control día 15, S15: 75mM NaCl día 15. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los contenidos de azúcares totales en condición control mostraron aumentos asociados a la edad foliar (Fig. 12.1). Mientras que el tratamiento salino, al día 15 evidenció niveles significativamente mayores respecto del mismo día para la condición control. Es destacable que el contenido de azúcares en ambos días del tratamiento salino presentó niveles similares al día 29 de la condición control (Fig. 12.1).

DISCUSIÓN

El proceso de desarrollo foliar puede ser descrito como la sucesión de tres fases superpuestas e interconectadas: emergencia, madurez y senescencia (Gepstein, 1988; Miller *et al.*, 2000), en el caso de este trabajo encontramos bien diferenciadas las dos primeras etapas durante desarrollo foliar de la hoja 2 de soja DM4800. La primera etapa, caracterizada por un aumento sostenido de la expansión, entre los días 13 y 18-20 y una segunda etapa que presentó una superficie foliar constante y un aumento en las variables asociadas al proceso fotosintético verdor y Φ FII (días 18-20 a 29, fase madura).

Nuestros resultados evidenciaron algunas de las alteraciones fisiológicas que se producen a nivel foliar por un tratamiento de estrés salino (75mM NaCl) durante el proceso de desarrollo. Dentro de éstas alteraciones la superficie foliar es la que más consecuencias tiene sobre el desarrollo de la planta al funcionar la hoja como órgano generador de energía biológica a través del proceso fotosintético. (Barber, 2009; Zhu, *et al.*, 2010). A nivel productivo, el estrés salino se puede traducir en menor desarrollo de la parte aérea, con menor acumulación de biomasa (Essa *et al.*, 2001; Essa, 2002) y por consiguiente menor rendimiento (Katerji *et al.*, 2000).

En este caso el tratamiento salino produjo una disminución de la expansión, como así también en el tamaño final de la hoja. En las variables asociadas al proceso fotosintético se observaron efectos directos sobre el verdor, el cual aumentó en la etapa de expansión, posiblemente ligado a la disminución de la expansión. Esto es, como la síntesis/degradación de clorofilas no se ve afectada en los primeros 7 días de tratamiento, pero si la expansión foliar, esto produciría un efecto de mayor cantidad de clorofilas por superficie foliar. Este efecto fue reportado en el trabajo de Wang and Nii del año 2000, en plantas de amaranto. Mientras que durante la etapa de madurez en la condición salina, el verdor se mantuvo constante asociado posiblemente a una menor síntesis o mayor degradación de clorofilas.

Otra de las variables que se vio afectada fue la eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{FII}). Esta técnica cuantifica la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte fotosintético de electrones y suele ser directamente proporcional a la tasa de fijación de CO_2 (Schreiber *et al.*, 1995). Desde hace varios años se utiliza esta técnica para realizar investigaciones referentes a estrés salino (Smillie and Nott 1982; Ball and Anderson 1986; Jimenez *et al.*, 1997, Kao and Tsai, 1999)

Según nuestros resultados el tratamiento salino produjo una disminución marcada en la Φ_{FII} durante la fase de madurez foliar. Como así también cambios a nivel de la proteína D1 (componente del centro de reacción del fotosistema II), presentándose como una caída de sus niveles respecto de la condición control, sin distinguir entre estadios de desarrollo. Esto, sumado a los cambios observados en las clorofilas podemos suponerlo como un proceso fotoinhibitorio para el estadio de madurez foliar.

La síntesis de proteínas y su degradación son igualmente importantes para los cambios en el patrón proteico y son de fundamental importancia para el desarrollo normal, la homeostasis y la muerte de una célula vegetal (Vierstra, 1996). La proteólisis en las plantas es un proceso complejo que implica muchas enzimas y vías proteolíticas múltiples en diversos compartimentos celulares (Grudkowska and Zagdańska, 2004). Por lo tanto la proteólisis es un proceso importante para mantener la funcional en condiciones óptimas y de estrés.

Los resultados en nuestro sistema, referente a proteínas solubles y aminoácidos libres, nos permiten proponer la existencia de dos escenarios de metabolismo proteico. Por un lado en la fase de expansión foliar, donde podemos ver que en la condición control existe un aumento paulatino en la cantidad de proteínas solubles y aminoácidos libres y luego, a partir del día 20 (fase de madurez), el mantenimiento constante de altos niveles proteicos acompañados por niveles constantes de aminoácidos libres.

El tratamiento salino presentó su mayor diferencia metabólica en este sentido durante la fase de madurez, ya que evidenció una proteólisis marcada, con una disminución abrupta del contenido proteico y un aumento constante de aminoácidos libres.

Rubisco es la proteína más abundante en la tierra y contribuye con un alto porcentaje de nitrógeno foliar total de las plantas (Ellis, 1979; Feller *et al.*, 2008). Durante las etapas tempranas de la senescencia, Rubisco representa aproximadamente el 90% de las proteínas degradadas (Miller and Huffaker, 1985). En este sentido en nuestro sistema experimental pudimos observar que los niveles de Rubisco en la condición control fueron constantes hasta el inicio de la fase de madurez donde comenzó una degradación que llevó a niveles indetectables la proteína al día 29. Contrariamente, en la condición de salinidad se presentó una degradación parcial al día 29, esto nos podría estar indicando defectos en los procesos de desensamblado y degradación durante la senescencia inducida por estrés.

Durante la senescencia natural se puede observar la degradación de Rubisco y otras proteínas del cloroplasto, así como también durante o después de estreses abióticos. Esta degradación permite la reutilización del nitrógeno en otros órganos luego de ser translocado a través del floema (Crafts-Brandner and Egli, 1987; Crafts-Brandner *et al.*, 1998; Herrmann and Feller, 1998; Demirevska-Keopva *et al.*, 2004; Thoenen *et al.*, 2007; Feller *et al.*, 2008).

En el caso de que existieran defectos en la proteólisis inducidos por estrés, esto traería consecuencias directas sobre la translocación de nitrógeno en la planta. Teniendo en cuenta que la hoja 2 de soja en este momento está funcionando como fuente de compuestos nitrogenados, el metabolismo del resto de la planta se ve afectado.

En lo que respecta al metabolismo del carbono, los carbohidratos, son utilizados como constituyentes estructurales de las hojas durante la primera fase de la expansión y luego se almacenan. Estos, se utilizarán posteriormente para la exportación a nuevos órganos para apoyar la respiración y para mantener la energía durante la senescencia cuando el proceso fotosintético se ve disminuido. Referente a este aspecto y

contrastando ambas fases del desarrollo foliar pudimos observar que las hojas sometidas a salinidad al día 29 presentaron niveles superiores de almidón respecto de la condición control en cualquiera de sus dos fases. Teniendo en cuenta que el almidón en hojas se acumula durante el día y se degrada durante la noche (Smith and Stitt, 2007; Stitt and Zeeman, 2012) estos resultados nos podrían indicar posibles fallas en los mecanismos de su degradación.

Los azúcares solubles (mono y disacáridos) juegan un importante rol tanto estructuralmente como en las funciones celulares.

Una condición de generación de EROs importante como por ejemplo la alta actividad fotosintética, se asocia con la acumulación de azúcares solubles (Couée *et al.*, 2006). Por otra parte, a la inversa, la acumulación de azúcares solubles regula negativamente la expresión de genes relacionados al proceso fotosintético (Koch, 1996, Pego *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2002).

La molécula de glucosa es el principal precursor (como esqueleto carbonado) en la síntesis de carotenoides (Pallett and Young, 1993), ascorbato (Foyer, 1993; Smirnoff *et al.*, 2001), esqueletos carbonados de aminoácidos, incluyendo Cys, Glu, y Gly, que forman el tripéptido glutatión en su forma reducida (Noctor and Foyer, 1998). Todos estos compuestos están involucrados en el sistema de defensa contra el estrés oxidativo, a través de su implicancia en el ciclo ascorbato-glutatión, la homeostasis redox y en la detoxificación de H₂O₂.

Según nuestros resultados, los niveles de azúcares solubles presentaron diferencias significativas, con aumentos relacionados a la edad foliar en la condición control. Desde el punto de vista del proceso de senescencia, comúnmente se relaciona la acumulación de azúcares con un estado senescente, pero se propone que si bien los azúcares juegan un rol crucial en la regulación de la senescencia, lo hacen dentro de una intrincada red de otras señales (Wingler and Roitsch, 2008). En lo referente al tratamiento salino, al día 15 se observó una mayor concentración de azúcares solubles respecto a la condición control, presentándose niveles similares a los encontrados el día 29. Referente a esto, van Heerden and Kruger, (2002) describieron acumulación de

osmolitos, incluyendo prolina y azúcares solubles, en plantas de soja sometidas a sequía. Por otro lado, en plantas de arroz se ha descrito la acumulación de azúcares solubles en plantas sometidas a salinidad (Dubey and Singh, 1999).

Pero, uno de los conceptos más interesantes en referencias a los azúcares es el de "azúcares como antioxidantes" especialmente aquellos que interactúan con membranas (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010), ya que también pueden actuar como verdaderos *scavengers* de EROs *in planta* (Van den Ende and Valluru, 2009; Van den Ende and Peshev, 2013).

Además pueden actuar como osmoprotectantes, estabilizando las membranas y manteniendo la turgencia celular frente a condiciones de estrés hídrico (Van den Ende and Peshev, 2013).

Entonces, los aumentos observados en las concentraciones de azúcares, principalmente en los tratamientos salinos, y teniendo en cuenta que estos aumentos pueden tener consecuencias sobre el proceso fotosintético, esto se podría estar viendo reflejado en la disminución de la Φ_{FII} , como así también en las disminuciones de los niveles de D1.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los tratamientos ensayados y con la premisa de que las condiciones de estrés pueden inducir una senescencia acelerada, resulta difícil plantear la existencia de un proceso de senescencia foliar.

Si tenemos en cuenta que uno de los cambios más temprano durante la senescencia es la degradación de los cloroplastos, con la consiguiente clorosis, producto de la degradación de clorofilas, entonces en el tratamiento salino podemos proponer una senescencia acelerada por el tratamiento.

Pero, si la evaluación se realiza desde la degradación de Rubisco, entonces el proceso de senescencia estaría mejor representado en las hojas de la condición control ya que al día 29 no se detectó la presencia de esta proteína, contrario a las muestras del tratamiento salino.

CAPITULO II

Desarrollo foliar en soja: estado redox asociado.

INTRODUCCIÓN

EROs en el desarrollo

Las EROs fueron consideradas en un principio como productos secundarios perjudiciales de varios procesos celulares como la respiración aeróbica y la fotosíntesis.

Sin embargo, la investigación sobre estas moléculas ha evidenciado que tienen importantes roles fisiológicos en el desarrollo de la planta. Ciertas EROs actúan como oxidantes, como por ejemplo el H_2O_2 en la formación del reticulado de la pared celular (Fry, 2004; Passardi *et al.*, 2004; Novo-Uzal *et al.*, 2013), como agentes de ablandamiento de la pared celular ($\cdot\text{OH}$) (Kuchitsu *et al.*, 1995; Fry, 1998; Schopfer *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2009) o como moléculas señal, controlando varios procesos biológicos (H_2O_2 y $\cdot\text{O}_2^-$) (Miller *et al.*, 2009; Petrov and van Breusegem, 2012; Wrzaczek *et al.*, 2013; Baxter *et al.*, 2014).

Las EROs se producen por reducción del O_2 , tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés (biótico y abiótico) donde comúnmente se encuentran incrementadas (ver revisión de Suzuki *et al.*, 2011a). A nivel celular, las EROs se producen en las organelas (ej. cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas), y en el apoplasto. De hecho, la existencia de muchas enzimas encargadas de producir EROs a nivel de la pared celular, muestra la importancia de la regulación espacial y temporal de la producción de EROs relacionadas al desarrollo y la defensa (Cona *et al.*, 2006).

Por ejemplo, durante el crecimiento localizado en un tubo polínico o un pelo radical, o durante la infección por patógenos o heridas, se producen picos transitorios de EROs a nivel de pared celular, lo que permite reacciones puntualmente reguladas en el lugar de su producción. Se propone que estas EROs difunden (en la forma H_2O_2) de nuevo en la célula a través de una acuaporina (Bienert *et al.*, 2007; Dynowski *et al.*, 2008), donde actúa como un regulador citosólico (Swanson and Gilroy, 2010; Wrzaczek *et al.*, 2013). Además de la generación de EROs extra protoplásmicas,

también es posible que algunas EROs apoplásticas se originen a partir de fuentes intracelulares (O'Brien *et al.*, 2012a).

Rodríguez *et al.* (2002) han demostrado que durante el desarrollo en hojas de maíz, las mayores concentraciones de EROs se encuentran en la zona de crecimiento foliar y que este crecimiento puede ser inhibido por tratamientos con DPI (inhibidor de NADPH oxidasas). Esto indica que no sólo son las EROs las que se encuentran implicadas en el crecimiento, pero sí, que se requieren flavin-oxidasas (como las NADPH) para la producción de EROs. Además, en coleoptilos tratados con auxina se observó alargamiento acelerado, acompañado de mayores niveles de EROs (Rodríguez *et al.*, 2002; Schopfer *et al.*, 2002). Esto sugiere que la tasa de crecimiento de las células puede ser proporcional a la cantidad de EROs que se produce en órganos en crecimiento. Mientras que la evidencia anterior sugiere que las NADPH oxidasas controlan el crecimiento celular, existe evidencia que sugiere que estas enzimas controlan otros aspectos del desarrollo, tales como la dominancia apical y la forma de la hoja (Sagi *et al.*, 2004). En este trabajo, plantas transgénicas de tomate con constructos antisentido de NADPH oxidasas no sólo presentaron reducción de la actividad NADPH oxidasa (menores niveles de EROs), sino que también exhibieron defectos morfológicos que incluyeron reducción de la dominancia apical, dando lugar a un aumento en el número de ramificaciones, reducción de lobulado de la hoja, y folíolos curvados. Estos fenotipos sugieren que las EROs controlan más procesos que solo la expansión celular. Los mecanismos por los cuales las EROs influyen sobre estas facetas del desarrollo siguen siendo objeto de estudio.

Teniendo en cuenta los distintos lugares de producción de EROs y su control, es posible postular por ejemplo que el $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 producidos en las mitocondrias van a desencadenar diferentes vías de señalización que las mismas moléculas producidas en el cloroplasto. Una diferencia clave bien puede ser el papel de las EROs producidas dentro de la célula (donde la capacidad antioxidante y *buffering* redox son altos), y las producidas a nivel de la superficie celular (Foyer and Noctor, 2009; Miller *et al.*,

2009). El apoplasto es un compartimento significativamente más oxidado que gran parte del interior celular (Pignocchi and Foyer, 2003). Las EROs intracelulares y extracelulares están involucradas en una intrincada red de reacciones que determinan el resultado a nivel metabólico y de señalización del estrés oxidativo (Chaouch *et al.*, 2012). A nivel fenotípico, los efectos comunes del estrés oxidativo son la restricción del crecimiento y, particularmente en hojas puede observarse clorosis. Mientras que la clorosis resulta de una pérdida generalizada de las clorofilas, el estrés oxidativo también puede desencadenar lesiones más localizadas que se asemejan a las observadas en respuesta hipersensible (HR) que se produce en ciertas interacciones planta-patógeno. Por ejemplo, en el mutante *cat2*, las respuestas *HR-like* pueden ser inducidas en algunas condiciones, mientras que, en otras, se activan respuestas reversibles (Mhamdi *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013). Estas observaciones ponen en relieve la complejidad de las respuestas al estrés oxidativo. Así como los procesos oxidativos pueden desencadenar la muerte celular (relacionada a HR), también se los relaciona con los procesos de autofagia (Hackenberg *et al.*, 2013). Sin embargo, las relaciones entre estos diferentes programas celulares y las EROs aún no están del todo claros.

En base a su estabilidad química, el H_2O_2 puede ser distinguido de otras EROs primarias que tienen menos estabilidad y por ende una vida media más corta. Por lo tanto el H_2O_2 podría ser la ERO más adecuada para ser estudiada como molécula señal móvil *in vivo* y la más sencilla de cuantificar, especialmente si se acumula en concentraciones superiores a las demás EROs.

En plantas (y en otros organismos eucariotas) se encuentran una gran variedad de enzimas que producen EROs apoplásticas que intervienen en la transducción de señales y el metabolismo de la pared celular. Entre ellas podemos citar a las NADPH oxidasas, amino oxidasas, quinona reductasas, lipooxigenasas, peroxidadas y oxalato oxidasas.

NADPH oxidasas (Nox)

En plantas las NADPH oxidasas son codificadas por los genes denominados Rboh (*respiratory burst oxidase homolog*) presentes en un amplio rango de especies (Bedard and Krause, 2007; Marino *et al.*, 2012). Presentan roles importantes en numerosos procesos fisiológicos, entre ellos el crecimiento de tubos polínicos, pelos radicales, cierre estomático, y en varias respuestas a estrés (Kurusu *et al.*, 2013). Las NADPH actúan como donadores de electrones citosólicos al O₂ apoplástico, el cual es reducido a O₂⁻.

Su localización subcelular y actividad se encuentran reguladas en algunas plantas mediante fosforilaciones mediadas por varias familias de proteínas kinasas incluyendo kinasas con dominios calcio/calmodulina dependientes (CDPKs) (Kobayashi *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2013; Dubiella *et al.*, 2013).

EROs en el control del estado redox

En los últimos años se ha enfocado la atención sobre la regulación de la vida dependiente del estado redox (Minibaeva *et al.*, 1998; Foyer and Noctor, 2005a; Shao *et al.*, 2008 a y b; Pfannschmidt *et al.*, 2009; Buchanan and Luan, 2005). Los modelos de este control son diversos e incluyen la oxidación/reducción de grupos tiol, centros hierro-azufre, grupos hemo y flavinas (Foyer and Noctor, 2005b; Vranova *et al.*, 2002). Esto concuerda con el hecho de que la homeostasis celular redox está controlada principalmente por la presencia de los grandes grupos de buffer thiol-glutación y NADPH/NADP⁺, y también por la alta concentración de ácido ascórbico (Foyer and Noctor, 2005b). Los tocoferoles (junto con compuestos hidrófilos) pueden funcionar también como buffers lipófilicos redox; protegiendo los lípidos y otros componentes de la membrana de los cloroplastos por secuestro (*scavenging*) e interacción directa con ¹O₂ (Ivanov *et al.*, 2007). La percepción y transducción de señales mediadas por EROs y la inducción de la respuesta transcripcional se encuentran reguladas por varias proteínas sensoras (Shao *et al.*, 2008a, Pfannschmidt *et al.*, 2009). Estas proteínas

sensibles a cambios redox presentan una capacidad de oxidación y reducción reversible y funcionan como un "interruptor" molecular capaz de responder al estado redox en las células. Las EROs pueden oxidar estas proteínas directamente o indirectamente a través de moléculas de bajo peso molecular sensibles a estado redox, tales como glutatión reducido o tioredoxinas que interactúan con Fd (Foyer and Noctor, 2005b, Shao *et al.*, 2008b). Las enzimas sensibles a estado redox son capaces de modular directamente los procesos del metabolismo celular, mientras que las proteínas de señalización sensibles al estado redox interactúan con otros componentes de las vías de señalización, como ser MAP kinasas, fosfatasa, factores de transcripción, etc. (Foyer and Noctor, 2005a, Pfannschmidt *et al.*, 2009).

Algunos grupos de investigación proponen que durante condiciones de estrés, las principales fuentes de EROs en el apoplasto son los reguladores del estado redox (Minibayeva *et al.*, 1998, Minibaeva *et al.*, 2003). Sin embargo, en los organismos fotosintéticos la hipótesis más fuerte de trabajo, propone que las mayores fuentes de EROs se encuentran a nivel de los cloroplastos y principalmente en la CTE fotosintética (Shao *et al.*, 2007). En la actualidad, se conocen varias fuentes posibles de señales cloroplásticas, que pueden afectar la expresión génica a nivel nuclear (Buchanan and Luan, 2005). Entre ellas se encuentran la biosíntesis de compuestos tetrapirrólicos, el cambio en el potencial redox de los componentes de la CTE fotosintética, principalmente plastoquinonas, y también la generación de EROs. Todas estas vías podrían estar interconectadas; por lo tanto, a menudo se consideran como factores acoplados. Debemos tener en cuenta que el mecanismo exacto de la transducción de señales al núcleo dependiente de compuestos sensibles a estado redox y EROs en los cloroplastos está poco estudiado o se desconoce en absoluto (Jaspers and Kangasjarvi, 2010, Pfannschmidt *et al.*, 2009, Buchanan and Luan, 2005; Shao *et al.*, 2007; Fey *et al.*, 2005; Pogson *et al.*, 2008).

Si bien, la participación de las EROs en procesos de crecimiento celular y de órganos en las plantas, como así también su influencia sobre el estado redox celular se encuentra documentado, existe poca información acerca de los cambios en los niveles

de EROs y su sistema de control a lo largo del proceso de desarrollo foliar. Además poco se sabe de la influencia de tratamientos con NaCl como moduladores de la expansión foliar y su efecto sobre el estado redox foliar.

En este capítulo se presentan los resultados de las determinaciones de los niveles de EROs a lo largo de la expansión foliar en soja y su sistema antioxidante en plántulas crecidas en condiciones control y tratamientos con NaCl.

RESULTADOS

1. Determinación de los niveles de EROs (H_2O_2 y $\cdot O_2^-$) durante el desarrollo foliar. Efectos del estrés salino.

Con el objetivo de determinar los cambios en la producción de EROs asociadas al desarrollo foliar, y a sabiendas por bibliografía y resultados de nuestro grupo del marcado efecto del estrés salino sobre esta producción, se realizaron determinaciones histoquímicas *in vivo* para H_2O_2 y $\cdot O_2^-$ sobre el tejido foliar., las que luego fueron cuantificadas por análisis de imágenes.

Niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Los niveles de H_2O_2 durante el desarrollo foliar se comportaron de manera similar en los distintos tratamientos (Fig. 1.2), donde los mayores niveles se evidenciaron durante los primeros días de experimentación (días 13 y 15) concordantes con la fase de expansión, para luego disminuir de manera marcada hasta el día 20 (fin de la expansión). A partir de este día los niveles mostraron un aumento hasta el final de la experimentación. Los tratamientos de estrés salino mostraron menores niveles de H_2O_2 respecto a la condición control el día 15 (Fig. 1.2).

Niveles de anión superóxido ($\cdot O_2^-$)

Los niveles $\cdot O_2^-$ evidenciaron sus menores valores al día 13 (Fig. 2.2A) para luego aumentar hacia el día 15 (fase de expansión) en ambos tratamientos. En los días 18 y 20, los niveles de $\cdot O_2^-$ fueron significativamente mayores en el tratamiento control respecto del tratamientos de estrés salino (Fig. 2.2A). Para la condición control, los niveles de anión superóxido se mantuvieron constantes hasta el día 20 para luego disminuir hacia el día 29 de la experimentación. En los tratamientos de estrés salino, los niveles disminuyeron drásticamente luego del día 15, para mantenerse sin variaciones hasta el final de tratamiento (Fig. 2.2A).

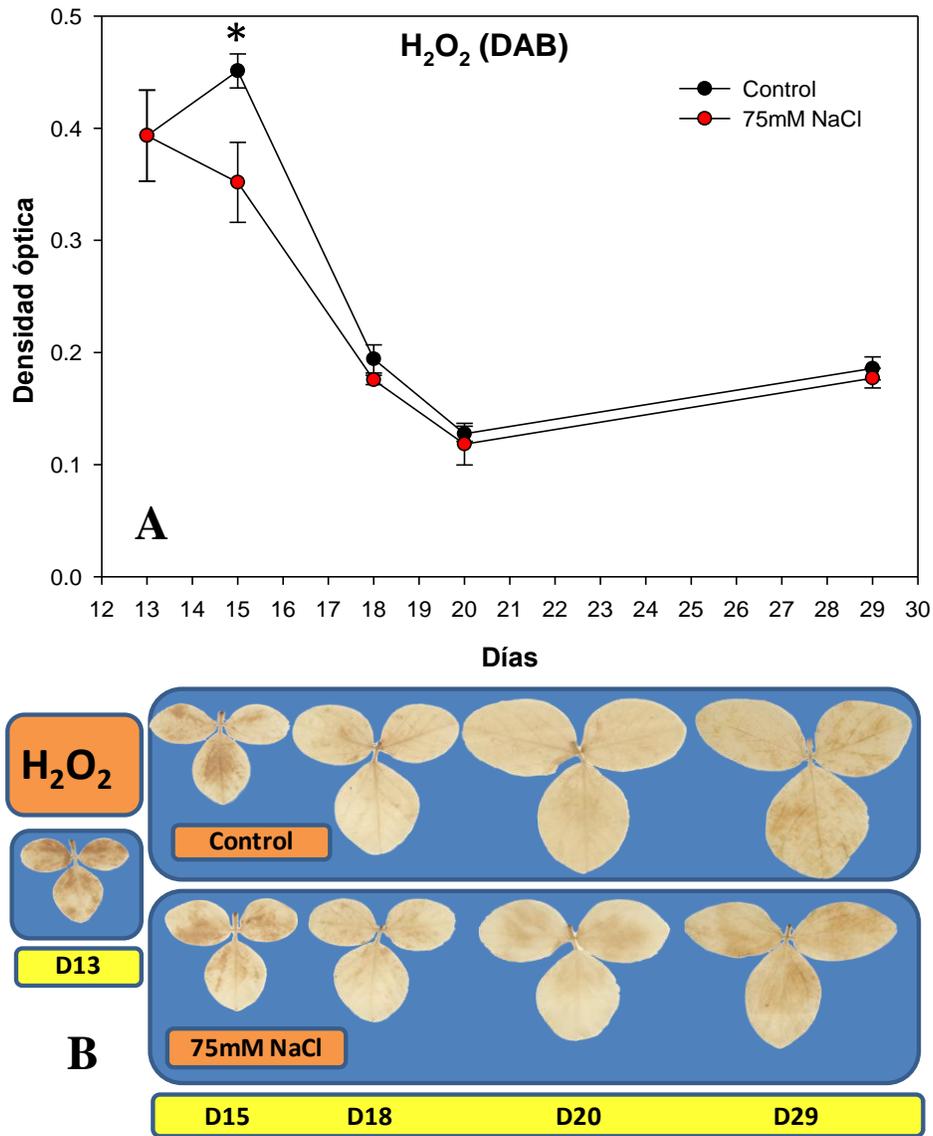


Figura 1.2: Tinciones foliares de H₂O₂ (DAB) en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. **A)** Cuantificación de los niveles de H₂O₂ por imágenes en condiciones control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$). **B)** Imágenes de las tinciones obtenidas para H₂O₂. D13:día 13.

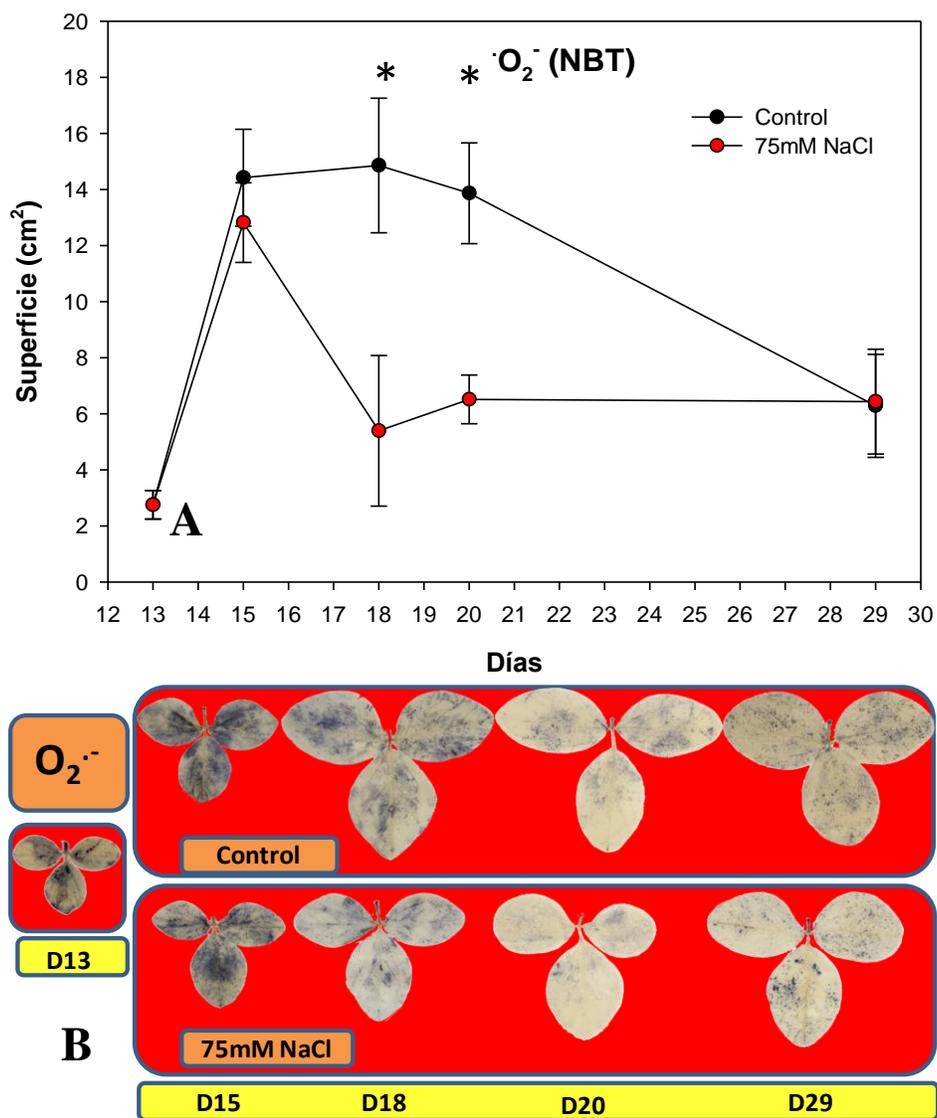


Figura 2.2: Tinciones foliares de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (NBT) en distintos estadios de desarrollo de hoja 2 de soja DM4800. **A)** Cuantificación de los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por imágenes en condiciones control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$). **B)** Imágenes de las tinciones obtenidas para $\text{O}_2^{\cdot-}$. D13: día 13.

Para relacionar los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ y el proceso de desarrollo foliar, se calculó la relación entre la superficie de tinción por NBT y la superficie foliar.

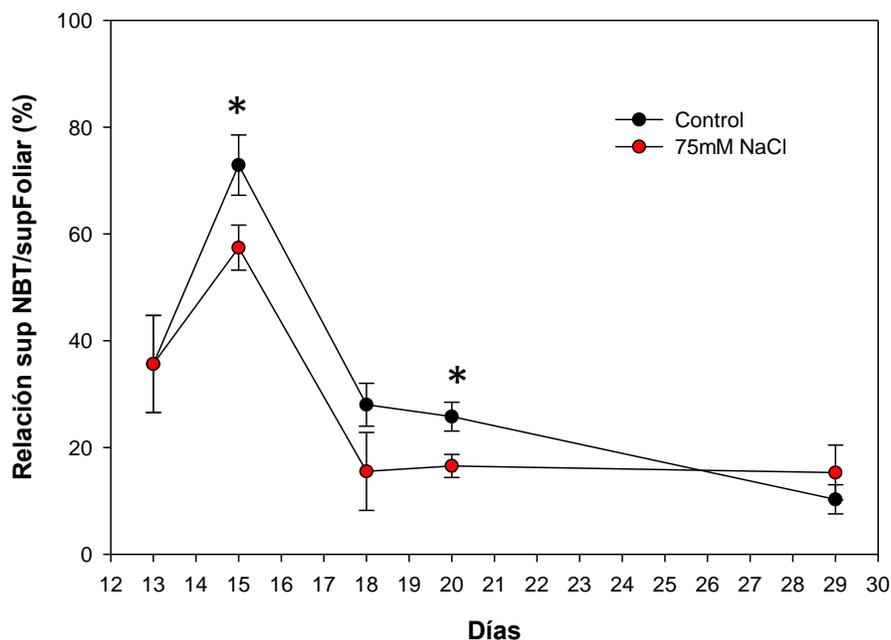


Figura 3.2. Relaciones entre las superficies de tinción de NBT y las superficies foliares en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los resultados que pueden visualizarse en la figura 3.2, muestran que los mayores valores de de esta relación para ambos tratamientos se correspondieron con la fase de expansión (día 15), mostrando valores superiores para la condición control. Hacia el día 18, los valores de la relación disminuyeron marcadamente en ambos tratamientos, manteniéndose casi constantes hasta el final de la experimentación. Al día 20 la condición control presentó valores significativamente superiores a la condición salina. La disminución marcada de las relaciones a partir del día 15, estabilizándose hacia el día 18 concuerda con el final de la fase de expansión e inicio de la fase de madurez de la hoja.

2. Determinación de la actividad/contenido de enzimas del sistema antioxidante durante el desarrollo foliar.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del sistema antioxidante durante el proceso de desarrollo foliar, se procedió a la determinación de actividad/contenido de enzimas implicadas en el control de los niveles de EROs. Para esto se realizaron mediciones espectrofotométricas y actividades en geles ND, a la vez de *western blots* sobre tejidos foliares a lo largo de la expansión en condiciones control y tratadas con NaCl.

2.1 Enzimas que interactúan directamente con las EROs

Actividad y contenido de Superóxido Dismutasa (SOD)

La enzima SOD dismuta el $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 . Esta enzima se considera como la primera barrera de control del sistema antioxidante. En general, las plantas contienen Mn-SOD mitocondrial y peroxisomal, así como Cu/Zn-SOD cloroplástica, citosólica y apoplástica. Se sabe que en los cloroplastos de algunas especies se encuentra además FeSOD (Kanematsu y Asada, 1989; Bowler *et al.*, 1992). En hojas maduras del 60 al 80% de la actividad SOD se encuentra en cloroplastos (Bowler *et al.*, 1992).

Los niveles de actividad de la enzima SOD total se presentan en la figura 4.2. Ambas condiciones experimentales mostraron niveles similares de actividad SOD hasta el día 18 (Fig. 4.2), aumentando en la condición control al día 20 con niveles significativamente superiores al tratamiento salino. Esta respuesta se presentó invertida al día 29 de experimentación, donde los niveles de actividad SOD fueron significativamente superiores en la condición de estrés salino respecto a la condición control (Fig. 4.2). Los mayores valores de actividad se presentaron para ambas condiciones a partir del día 20, concordante con los menores niveles de de la relación de tinción de $\cdot\text{O}_2^-$ (Fig. 3.2), es decir, durante la fase de hoja madura.

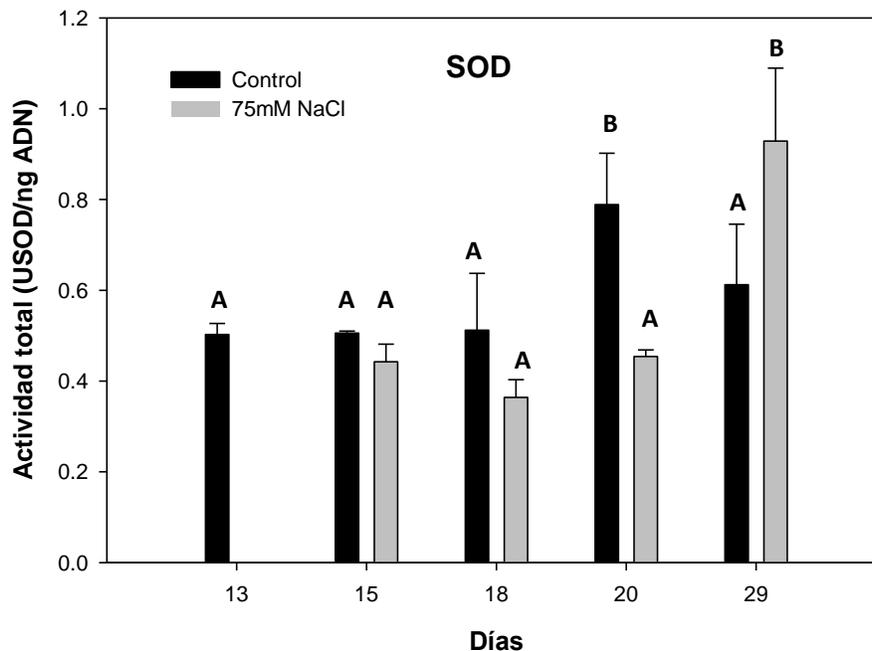


Figura 4.2. Niveles de actividad SOD total en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Zimograma de actividad de SOD

Con el objetivo de discriminar las actividades de las distintas isoformas de SOD (las cuales presentan diferentes ubicaciones subcelulares) se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (ND). En la figura 5.2 se pueden observar las distintas isoformas a lo largo de la expansión foliar.

A partir de geles de inhibición de las distintas isoformas (no se muestran resultados) se pudieron distinguir tres tipos de acuerdo al cofactor metálico al cual se encuentran asociadas: hierro SOD (FeSOD), manganeso SOD (MnSOD) y cobre/zinc SOD (Cu/ZnSOD) (Fig. 5.2). A lo largo del proceso de expansión las distintas isoformas mostraron actividades diferenciales. Para el caso de FeSOD comienza a visualizarse su actividad el día 18 bajo estrés salino manteniéndose la misma con mayores niveles respecto a su control hasta el final de la experimentación, (Fig. 5.2). Las isoformas MnSOD no presentaron variaciones en su actividad a lo largo del

desarrollo ni dependiente del tratamiento. Para el caso de las Cu/ZnSOD, algunas de ellas mostraron una disminución paulatina en sus actividades a partir del día 20 de experimentación, sin diferencias entre tratamientos (Fig. 5.2).

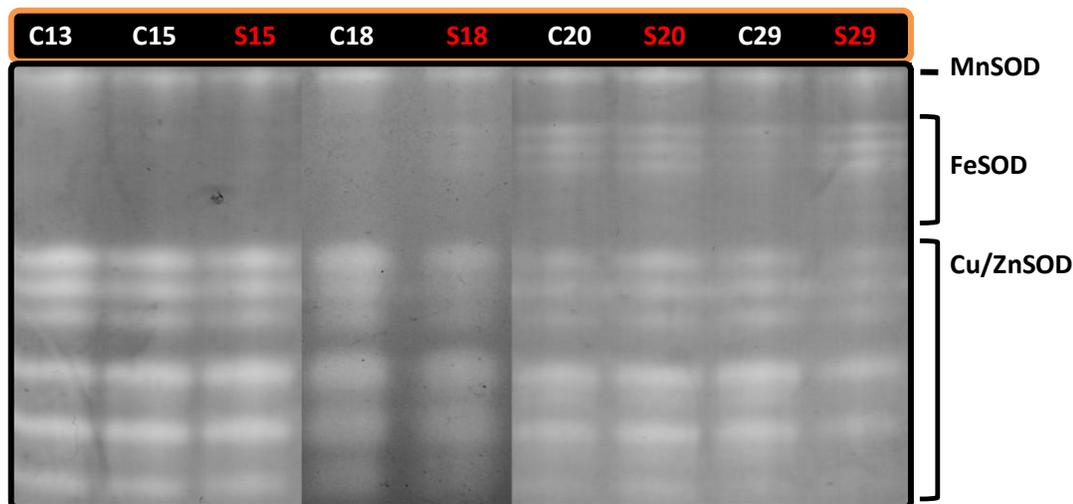


Figura 5.2. Gel de actividad ND de SOD a lo largo del desarrollo foliar en hoja 2 de soja DM4800. C13: control día 13; S15: 75mM NaCl día 15.

Western-blot de isoformas FeSOD y Cu/ZnSOD

Con el objetivo de verificar si los cambios en las actividades de las isoformas FeSOD y Cu/ZnSOD se correlacionan con variaciones en los niveles de sus proteínas, se realizaron hibridaciones con anticuerpos que reconocen específicamente cada isoforma.

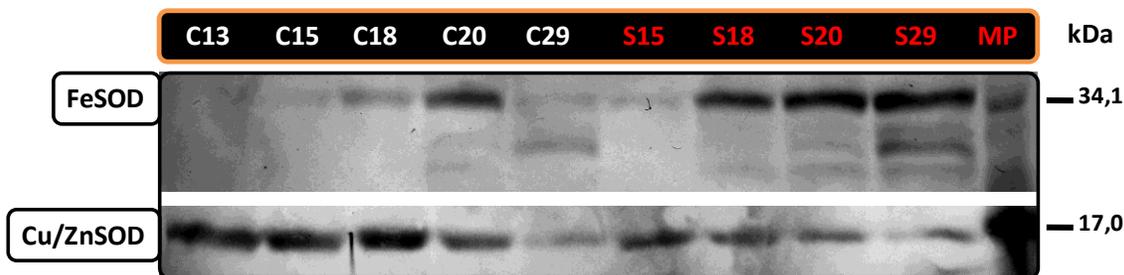


Figura 6.2. Western-blot de isoformas FeSOD y Cu/ZnSOD a lo largo del desarrollo foliar en hoja 2 de soja DM4800. D15C: día 15 control; S15: día 15 75mM NaCl.

Las proteínas FeSOD se detectaron a partir del día 15 en ambas condiciones, observándose para la condición control un aumento paulatino hasta el día 20 de experimentación para luego disminuir el día 29 (Fig. 6.2). Mientras que para la condición de estrés salino los niveles aumentaron de manera más marcada respecto al control, manteniendo niveles superiores hasta el día 29. Particularmente en la condición de salinidad los niveles fueron mayores a partir del día 18 respecto al control y se observó la aparición de un mayor número de bandas (Fig. 6.2).

Para el caso de las isoformas Cu/ZnSOD se observaron los mayores niveles en la condición control, con una disminución marcada a partir del día 20, presentando los menores niveles el día 29 de experimentación (Fig. 6.2). Las determinaciones para la condición de salinidad evidenciaron niveles menores de proteínas respecto a la condición control, mostrando los menores niveles el día 29 (Fig. 6.2).

En términos generales, las variaciones en los niveles de proteínas de las isoformas FeSOD y Cu/ZnSOD se correlacionaron con las actividades determinadas anteriormente (Fig. 5.2).

Actividad de catalasas (CAT)

Las CAT dismutan el H_2O_2 a H_2O y O_2 , sin necesidad de un dador de electrones como sí lo tienen las peroxididasas. Sus isoformas se encuentran, principalmente, en peroxisomas y glioxisomas donde catalizan la degradación del H_2O_2 producido durante el ciclo del glicolato y la β -oxidación de ácidos grasos. Las catalasas se caracterizan por su baja afinidad por el H_2O_2 (Scandalios, 1994).

Los niveles de actividad de CAT a lo largo del desarrollo foliar se muestran en la figura 7.2. Hasta el día 18 de experimentación los niveles de actividad CAT se mantuvieron bajos y sin diferencias entre tratamientos. Se observó un aumento significativo en la actividad el día 20 en ambos tratamientos, donde la condición control presentó valores marcadamente superiores respecto a la condición salina (Fig. 7.2).

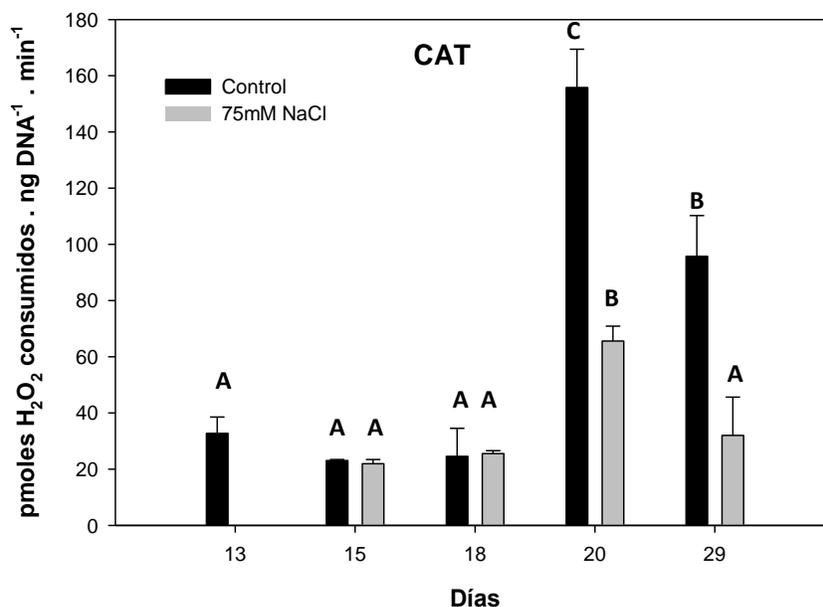


Figura 7.2. Niveles de actividad CAT en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El día 29 los niveles de actividad CAT se mantuvieron altos en la condición control, aunque inferiores a los presentados el día 20, mientras que la condición salina presentó niveles similares a los primeros días de experimentación (Fig. 7.2).

2.2 Actividad de glutatión reductasa (GR).

Además de los componentes enzimáticos, el sistema antioxidante se encuentra formado por antioxidantes no enzimáticos, como el ácido ascórbico (ASC) y glutatión (GSH). ASC y GSH se encuentran en altas concentraciones en cloroplastos y otros compartimentos subcelulares y son cruciales en la remoción de EROs.

Para la protección antioxidante se requieren altos niveles de ASC reducido y el *pool* de reducción de estos compuestos es mantenido por la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR).

Con el objetivo de evidenciar variaciones en los niveles de actividad de esta enzima, se realizaron determinaciones durante el proceso de expansión foliar.

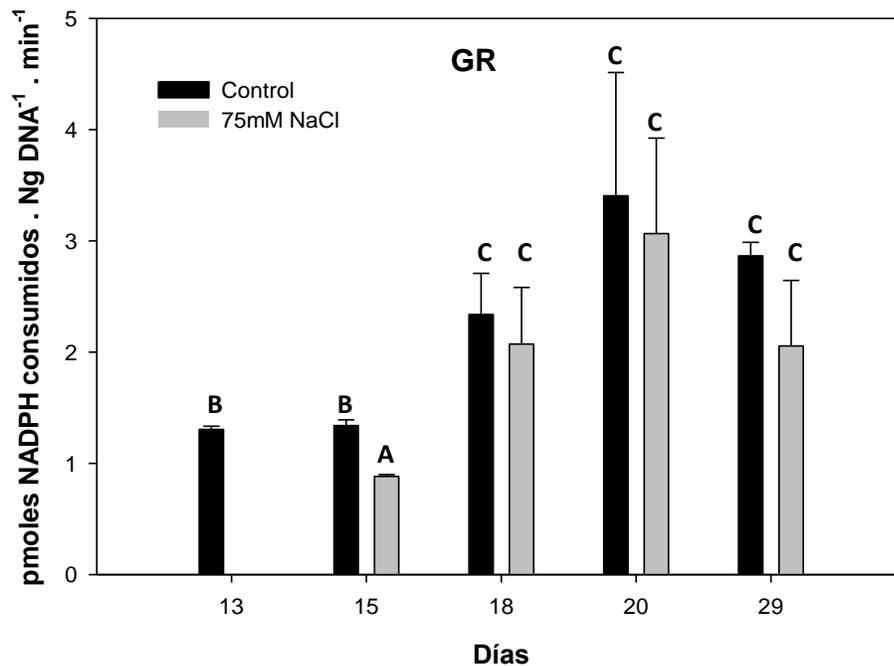


Figura 8.2. Niveles de actividad GR en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los niveles de actividad GR mostraron los menores valores entre los días 13 y 15 de la experimentación, donde al día 15 la condición de 75mM NaCl presentó niveles significativamente menores (Fig. 8.2). A partir del día 18 y hasta el día 29 los niveles de actividad GR aumentaron significativamente, sin diferencias entre los tratamientos ensayados.

3. Cuantificación de contenidos de antioxidantes no enzimáticos en las distintas fases del desarrollo foliar.

La homeostasis celular redox está controlada principalmente por la presencia de los grandes grupos de buffer thiol-glutati6n y NADPH/NADP⁺, como así tambi6n por altas concentraciones de ASC (Foyer and Noctor, 2005a). GSH y ASC (compuestos de bajo peso molecular) pueden interactuar con las EROs, por ejemplo con $\cdot\text{O}_2^-$, donde a partir de su reducci6n, se genera H_2O_2 (Asada, 1994).

Con el objetivo de determinar cambios en el estado de antioxidantes no enzimáticos durante el desarrollo foliar y los efectos producidos por los tratamientos con NaCl, se realizaron mediciones de poder reductor (FRAP) y niveles/estado de óxido reducción de ASC y GSH. Las mediciones se realizaron sobre las muestras correspondientes a los días 15 y 29 de experimentación, coincidentes con las fases de expansión y madurez foliar respectivamente.

Determinaciones de poder reductor total (FRAP)

La técnica de FRAP (siglas en inglés de Capacidad férrico reductora del plasma) permite determinar el poder reductor total, es decir la suma de los compuestos de bajo peso molecular en su estado reducido. Una mayor cantidad en estos compuestos en estado reducido se relaciona con una mayor capacidad de defensa antioxidante.

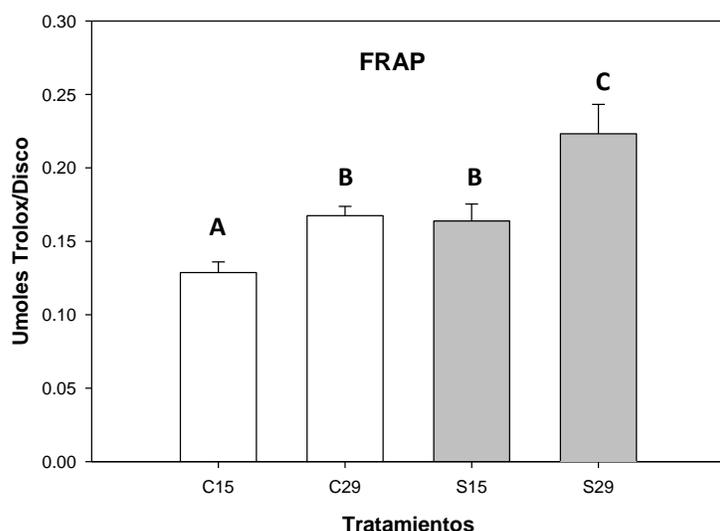


Figura 9.2. Determinaciones de FRAP en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. C15: control día 15; S15: 75mM NaCl día 15. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La condición control en el día 15 presentó los menores niveles de poder reductor total (Fig. 9.2), los cuales aumentaron significativamente al día 29. La condición de estrés salino al día 15 evidenció niveles similares a los de la condición control para el día 29, mientras que exhibió los niveles más elevado el día 29 de experimentación. Estos resultados muestran que existe un cambio en la capacidad reductora de la hoja

asociada a la edad foliar, que puede ser aumentada por un tratamiento con 75mM de NaCl (Fig. 9.2).

Determinación de niveles de ácido ascórbico.

Los resultados de las determinaciones de ASC demostraron un incremento en los niveles tanto en su estado reducido como de ASC total relacionados a la edad foliar (Fig. 10.2, A1 y A2), sin diferencias significativas entre tratamientos para ambas fases de desarrollo. Cuando evaluamos la dupla redox (ASC reducido/ASC total) se observaron mayores niveles de la relación para la condición de salinidad al día 29 (Fig. 10.2, A3), respecto de los demás tratamientos. Teniendo en cuenta que normalmente las concentraciones de ASC son mayores respecto a las de otros antioxidantes no enzimáticos en tejidos vegetales, podemos suponer que el aumento en el poder reductor total (Fig. 9.2) de las hojas sometidas a salinidad en el día 29, se encuentra dado por estos mayores niveles de ASC reducido como así también los niveles de la relación reducido/total (Fig. 10.2, A1 y A2.)

Determinación de niveles de Glutación

Los mayores niveles de GSH reducido también estuvieron relacionados a la edad foliar (Fig. 10.2, B1), sin diferencias significativas entre los tratamientos control y salino. No así los contenidos GSH total (Fig. 10.2, B2) que no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre días de experimentación. Con respecto a las determinaciones de la dupla redox (GSH red/GSH total), los cambios estuvieron asociados a la edad foliar, observándose aumentos de esta relación al día 29 de experimentación para ambos tratamientos (Fig. 10.2, B3). Este aumento en el estado reducido del GSH al día 29 puede deberse al aumento de la actividad GR (Fig. 8.2) respecto del día 15, sin diferencias entre control y salinidad.

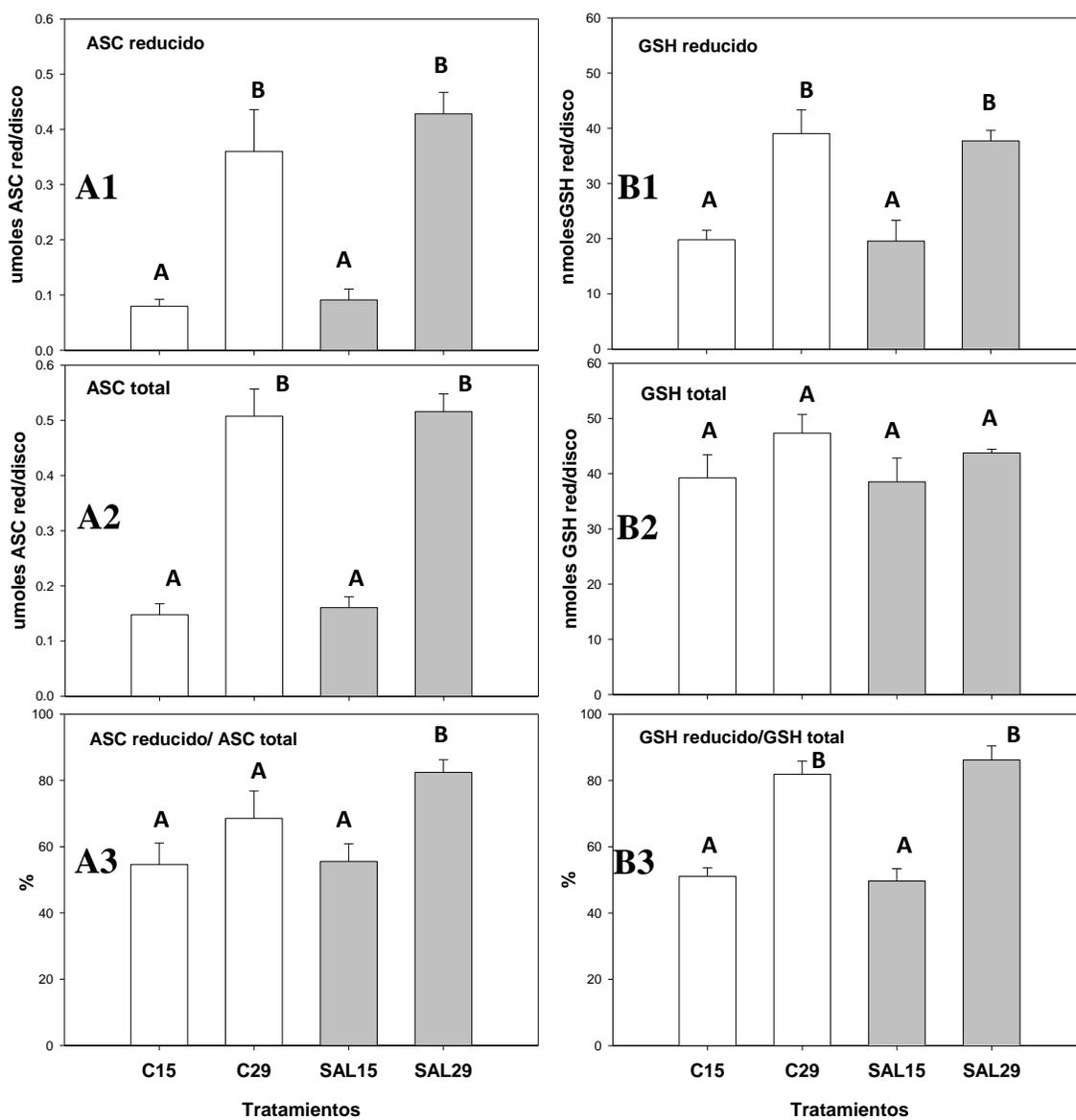


Figura 10.2. Determinaciones de ASC (A) y GSH (B) en sus distintos estados (1: reducido, 2: total y 3: relación reducido/total) en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl. C15: control día 15; S15: 75mM NaCl día 15. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4. Niveles de daño oxidativo

Determinación de niveles de peroxidación lipídica

Una de las variables más utilizadas para la cuantificación de daño oxidativo es la determinación de los niveles de malondialdehído (MDA). Este compuesto se forma como producto de la peroxidación de lípidos, esto es, por la acción directa de EROs sobre los lípidos de membrana. Nuestros resultados no evidenciaron cambios en los niveles de MDA hasta el día 20 (Fig. 11.2), se mantuvieron constantes independientemente del tratamiento aplicado. Al día 29 de experimentación se observaron aumentos significativos en los niveles de MDA respecto de los días anteriores, sin diferencias entre tratamientos (Fig. 11.2).

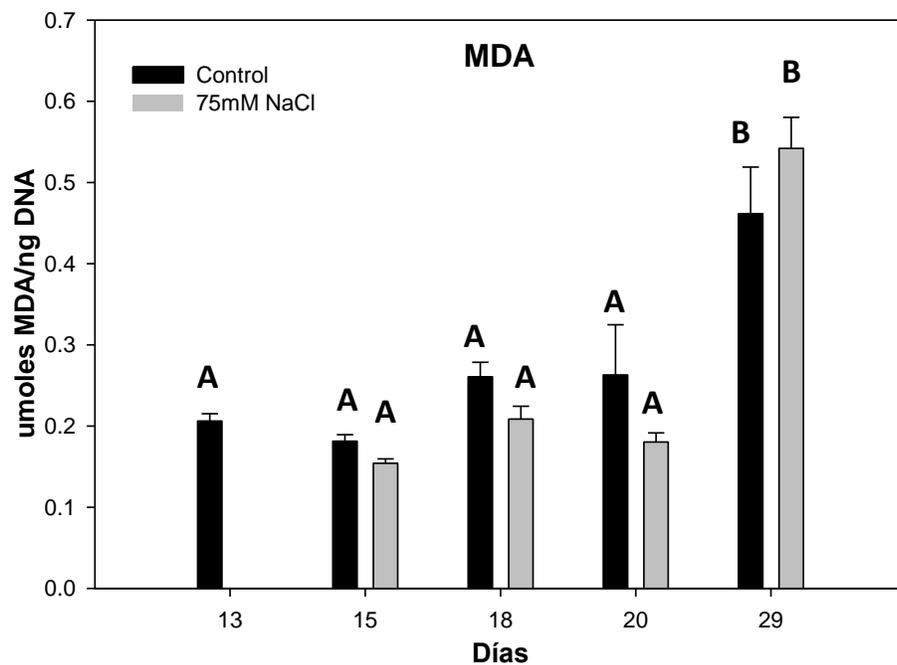


Figura 11.2. Niveles de malondialdehído (MDA) en hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y 75mM NaCl durante su desarrollo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

5. Efectos de tratamientos moduladores del estado redox sobre el proceso de expansión foliar.

Con el objetivo de evaluar los efectos de moduladores del estado redox sobre el proceso de expansión foliar, se realizaron tratamientos de aplicación mediante *spray* en plántulas de soja utilizando H_2O_2 y $MnCl_2$ (secuestrante de $\cdot O_2^-$). Teniendo en cuenta que los niveles de H_2O_2 mostraron un descenso constante desde el comienzo de la expansión foliar (Fig. 1.2) se ensayaron aplicaciones directas en forma de *spray* con distintas concentraciones de H_2O_2 durante el periodo de expansión para evaluando los posibles cambios en la superficie foliar. Por otro lado, teniendo en cuenta que los niveles de $\cdot O_2^-$ presentaron sus mayores valores asociados a la fase de expansión foliar (Fig. 2.2), se ensayaron aplicaciones de $MnCl_2$ (secuestrante de $\cdot O_2^-$) con el objetivo de evaluar su efecto sobre la superficie foliar.

Efectos de la aplicación de H_2O_2

Se ensayaron distintas concentraciones de H_2O_2 , se muestran los resultados de las concentraciones donde se observaron efectos más relevantes.

La aplicaciones con 10mM de H_2O_2 produjeron cambios en el proceso de expansión foliar, observándose un aumento tanto en la velocidad de expansión como así también un mayor tamaño foliar final respecto al control (Fig. 12.2). Contrariamente, al utilizar una concentración mayor de H_2O_2 (25mM) se observó una disminución en la velocidad de expansión foliar y ligado a esto una menor superficie foliar final.

Estos resultados demuestran la dependencia del proceso de expansión foliar con las concentraciones de H_2O_2 y el rol dual que presentan las EAOs.

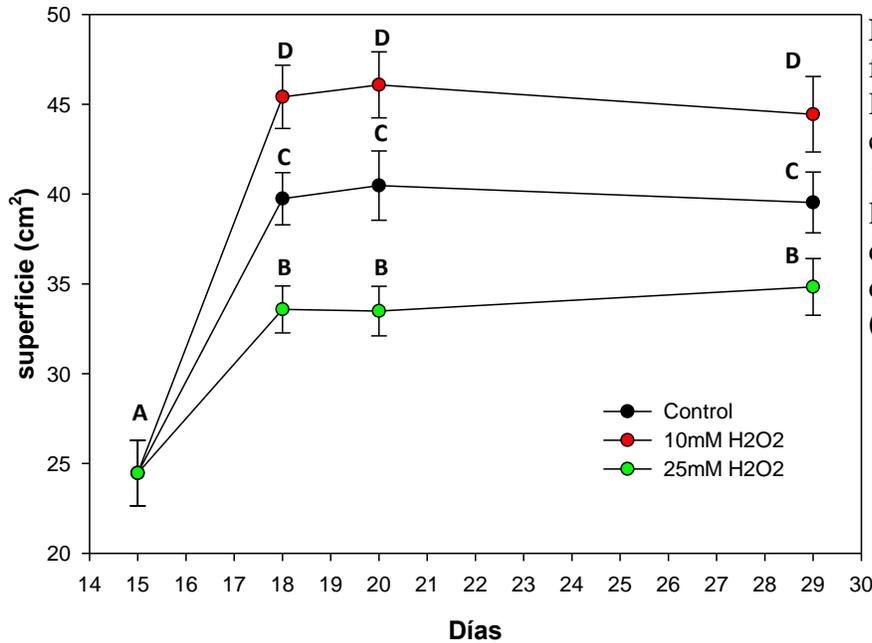


Figura 12.2. Superficie foliar de hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y aplicaciones de 10 y 25mM H₂O₂ durante los días 15 a 20. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Efectos de la aplicación de MnCl₂

Se ensayaron distintas concentraciones de MnCl₂, se muestran los resultados de la concentración que presentó resultados más relevantes. El tratamiento de *spray* con 0,05% de MnCl₂ evidenció un retardo en el proceso de expansión foliar respecto a la condición control (Fig. 13.2), además de presentar una superficie foliar final menor. Este resultado sugiere la necesidad del aumento en la concentración de 'O₂' durante la fase de expansión para un correcto desarrollo foliar.

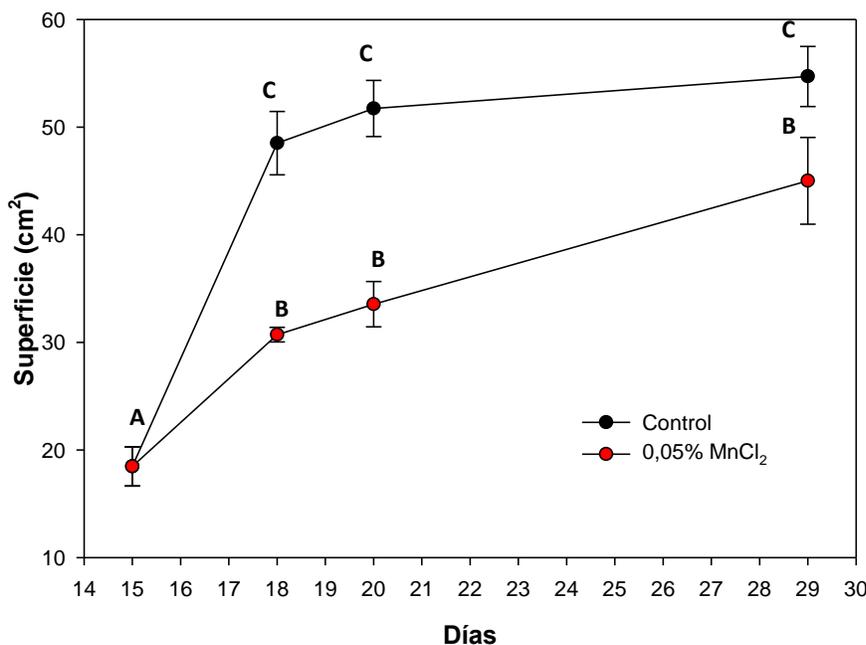


Figura 13.2. Superficie foliar de hoja 2 de soja DM4800 en condiciones control y aplicaciones de 0,05% MnCl₂ durante los días 15 a 20. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Con respecto a la dinámica de generación de H_2O_2 y $\cdot\text{O}_2^-$ en el presente capítulo se dejaron en evidencia los comportamientos diferenciales de estas EROs, durante el proceso de expansión foliar. Si bien se encuentra documentada la relación entre la generación de las EROs y muchos procesos en las plantas, poco se sabe acerca del comportamiento a lo largo del desarrollo foliar en dicotiledóneas.

Los mayores niveles de ambas EROs se relacionaron con el proceso de expansión foliar, esto es, donde se observó el aumento constante de la superficie foliar, concordante con los datos del trabajo de Rodríguez *et al* (2002) donde encontraron los mayores niveles de EROs en la zona de crecimiento de hojas de maíz. Para el caso del H_2O_2 , estos niveles disminuyeron de manera constante a medida que avanzaba el proceso de desarrollo, casi sin diferencias entre tratamientos y encontrando los menores niveles asociados a final de la fase de expansión e inicio de la fase de madurez foliar. Mientras que el $\cdot\text{O}_2^-$ presentó un comportamiento diferencial respecto a los tratamientos, observándose una disminución paulatina de sus niveles a partir del día 15 (expansión) en la condición control, mientras que en salinidad esta disminución fue drástica, acompañada de una disminución de la expansión foliar a partir de ese día. Este comportamiento es concordante con lo reportado en el trabajo de Rodríguez *et al* (2004), donde una disminución en la concentración de EROs contribuye a un menor crecimiento foliar en plantas de maíz sometidas a salinidad.

Sumado a esto, la incidencia de estas EROs sobre el proceso de expansión foliar fue puesta a prueba más adelante donde se utilizaron aplicaciones de H_2O_2 y MnCl_2 como reguladores del proceso. Los resultados evidenciaron que la aplicación de H_2O_2 directamente sobre la planta aceleró el proceso de expansión, obteniéndose hojas con mayor superficie foliar. Y contrariamente, la aplicación del secuestrante de $\cdot\text{O}_2^-$ (MnCl_2) redujo la velocidad de expansión. Estos resultados apoyan la idea de la importancia que tienen los niveles de EROs para que el proceso de expansión se

presente de manera normal. Ligado a esto se encuentra la regulación interna de estos niveles por parte del sistema antioxidante.

Con respecto a las enzimas que interactúan directamente con las EROs, el comportamiento más atractivo estuvo ligado a SOD, donde los niveles de actividad se relacionaron directamente con los niveles de O_2^- . Interesantemente el comportamiento de sus isoformas en lo que respecta a la dinámica tanto de sus actividades como de los niveles proteicos marcaron las fases de expansión y de madurez foliar. Más aún los resultados mostraron la modulación diferencial de estas isoformas frente a condiciones de salinidad.

Un ejemplo claro lo representan las isoformas FeSOD, donde se relacionó el comienzo de su síntesis y actividades asociadas a la finalización de la fase de expansión, con niveles proteicos y actividades mayores asociadas al tratamiento salino. Referente a esto, en el trabajo de Asensio *et al* (2012) se registraron aumentos en dos isoformas de FeSOD (plastidial y citosólica) en hojas de soja sometidas a estrés salino. Más aún, en este mismo trabajo se demostró que existen aumentos de estas isoformas, asociados a la edad foliar, mostrando los mayores niveles en una hoja en estado senescente. Además demostraron la disminución en la actividad de las isoformas Cu/ZnSOD asociados a la edad foliar, este comportamiento es comparable al observado en nuestras determinaciones. El trabajo de Asensio *et al* (2012), es el único registro en hojas de soja acerca del comportamiento de estas isoformas SOD relacionadas a senescencia y estrés. Si bien no realizaron una determinación exhaustiva a lo largo del proceso de desarrollo foliar como presentamos en este capítulo.

La actividad CAT también evidenció los mayores cambios asociados a las distintas fases del desarrollo foliar, esto es, aumentos a partir de la finalización de la expansión e inicio de la madurez, con niveles diferenciales para los tratamientos. Si bien estos mayores niveles de actividad se relacionaron con los menores niveles de H_2O_2 encontrados, en este caso no se observaron diferencias entre los tratamientos.

En este capítulo uno de los mayores controles del estado redox estuvo representado por la determinación de la actividad de GR, además de los niveles de GSH y ASC.

Con respecto GR, las determinaciones de su mayor actividad (durante la fase de madurez) correlacionaron con mayores niveles de GSH reducido, esto asociado principalmente a la edad foliar, ya que no se presentaron diferencias teniendo en cuenta los tratamientos salinos. Los niveles de glutatión total presentaron el mismo patrón relacionando los mayores valores para la fase de madurez. Con respecto a las relaciones GSH reducido/GSH total se mantuvieron constantes, sin diferenciar edad foliar ni tratamientos salinos.

Los niveles de GSH son utilizados ampliamente como marcadores de estrés oxidativo en plantas ya que presenta múltiples facetas en el metabolismo (Grill *et al.*, 2001). A partir de su relación con la detoxificación y por lo tanto el control de los niveles de EROs en que se lo propone junto con el ácido ascórbico como el “corazón del centro redox” (del inglés: The Heart of the Redox Hub) (Foyer and Noctor, 2012). Aunque en diferentes estreses abióticos, por ejemplo en sequía, no se observaron alteraciones en el estado redox de ascorbato (Potters *et al.*, 2010).

El conjunto de estos dos compuestos y las enzimas relacionadas (GR, MDHAR, MDAR y APX) interactúan en el ciclo ascorbato-glutatión, principalmente relacionado a la detoxificación de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 por ejemplo en cloroplastos (Noctor and Foyer, 1998). La capacidad de este ciclo depende de la concentración de los antioxidantes como así también a la actividad de las enzimas asociadas. Los cambios en la velocidad de reducción del GSH, se evidencia en cambios en las relaciones alteradas GSH reducido/GSH oxidado ó ASC reducido/ASC oxidado. Además de esto, el GSH es utilizado como sustrato de APX, una de las principales enzimas encargadas de la detoxificación de H_2O_2 .

Para el caso de las determinaciones de niveles de ASC presentadas en este capítulo, el ASC reducido presentó un comportamiento similar al del GSH reducido, esto es, se evidenciaron los mayores niveles asociados a la fase foliar madura. Lo

mismo sucedió con los niveles de ASC total. Ahora bien, respecto a las relaciones ASC reducido/ASC total, las hojas sometidas a salinidad al día 29 presentaron valores significativamente superiores a las demás condiciones.

Esta diferencia representa un desbalance en la dupla ASC red/ASC oxidado generada como respuesta al tratamiento salino respecto de la condición control.

Teniendo en cuenta que de los antioxidantes de bajo peso molecular presentes en las plantas, el ácido ascórbico es el que se encuentra en una concentración superior de hasta en un orden de magnitud, esto explicaría los valores en las determinaciones de FRAP (poder reductor total) encontrados en las hojas sometidas a salinidad al día 29.

Una de las variables más utilizadas para la cuantificación de daño oxidativo (asociado a estrés oxidativo) es la determinación de los niveles de MDA. En nuestros experimentos solo se observaron cambios significativos asociados a la edad foliar independientemente del tratamiento aplicado. Teniendo en cuenta que los niveles de MDA se relacionan directamente con los balances producción/degradación de EROs, estos resultados nos estarían indicando de manera global dos escenarios diferentes respecto al estadio de desarrollo foliar. Por una parte los menores niveles asociados a la fase de expansión donde las hojas tendrían una mayor capacidad de respuesta frente a condiciones de estrés oxidativo y, por otro lado una fase madura con disminución de estas capacidades. Por otro lado, según los resultados obtenidos, el tratamiento de estrés salino no tuvo efectos significativos sobre los niveles de daño oxidativo, apoyando la idea de este tratamiento solo como modulador de la expansión foliar.

CAPÍTULO III

Desarrollo foliar en soja: regulación transcripcional de los cambios redox de genes del sistema antioxidante y genes asociados a senescencia.

INTRODUCCIÓN

La regulación de la transcripción génica es fundamental tanto a nivel de expresión específica en tejidos como en la regulación de la actividad en respuesta a estímulos particulares. Si bien la regulación de las respuestas se puede dar a distintos niveles (postranscripcional, traduccional, postraduccional, etc.), en la mayoría de los casos la regulación se produce a nivel transcripcional, donde se define qué genes van a ser transcritos a ARN primario. Una vez que esto ha ocurrido, las etapas restantes de la expresión génica (tales como el *splicing* de ARN), en última instancia resultan en la génesis de la proteína correspondiente (Latchman, 1997). Una de las clases más grandes y diversas de las proteínas de unión al ADN responsables de la regulación de la expresión génica son los factores de transcripción (FTs). En gran parte confinados al núcleo, los FTs regulan el desarrollo celular, la diferenciación y el crecimiento celular mediante la unión a un sitio específico de ADN (o un conjunto de sitios) y de esta forma regulan la expresión génica (Pabo and Sauer, 1992).

Estado redox y expresión génica

El metabolismo redox y su red de señalización asociada representan procesos muy importantes para las plantas frente a condiciones de estrés abiótico (Munné-Bosch *et al.*, 2013). Durante el curso de la evolución, las plantas han logrado un alto grado de control sobre los niveles de EROs y las utilizan como moléculas implicadas en señalización. Por ejemplo, en el trabajo de Mittler *et al* (2004) se describe que en *Arabidopsis*, H_2O_2 y $\cdot O_2^-$ pueden actuar como moléculas de señalización, las cuales requieren una enorme red génica que comprende alrededor de 152 genes. Por otra parte, en estudios relacionados se han descripto algunos componentes importantes de la señalización, que involucran proteínas receptoras y factores de transcripción sensibles a cambios redox.

Los antioxidantes juegan un papel fundamental en el control de los niveles de EROs y su activación se correlaciona directamente con la defensa durante el desarrollo

en plantas y frente a estreses abióticos (Foyer and Noctor, 2005b). La supervivencia en un ambiente estresado requiere un estado redox estable, para esto las plantas poseen vías antioxidantes eficaces que mantienen los niveles de EROs en los diferentes compartimentos celulares (Halliwell, 2006; Choudhury and Panda, 2004; Shao *et al.*, 2008a). Las EROs se producen constantemente en las células y cualquier desequilibrio entre éstas y los antioxidantes implica una condición de estrés oxidativo (Scandalios, 2002). Por ejemplo, en el caso de H_2O_2 y $\cdot\text{O}_2^-$ que actúan como segundos mensajeros, su acumulación (altos niveles) causa estrés oxidativo que puede conducir a la muerte celular.

Una de las principales líneas de defensa contra EROs es la enzima superóxido dismutasa (SOD), que junto con otras enzimas como ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) forman parte del sistema antioxidante enzimático. La SOD dismuta el anión superóxido a H_2O_2 , mientras que APX, GPX y CAT descomponen el H_2O_2 (Apel and Hirt, 2004). La conversión de H_2O_2 a H_2O por APX requiere ascorbato y glutatión reducido (GSH). El H_2O_2 se convierte en H_2O por oxidación del ascorbato a monodeshidroascorbato (Apel and Hirt, 2004). Mientras que GPX utiliza GSH como agente reductor para descomponer H_2O_2 a H_2O .

El estado redox organelar se encuentra regulado por diferentes antioxidantes enzimáticos como la glutatión reductasa (GR), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) además de GPX (Suzuki *et al.*, 2011a). Existen evidencias de que estas enzimas reguladoras del estado redox, son co-expresadas junto a los genes relacionados a la producción de EROs en cloroplastos y mitocondrias; éstas relaciones pueden ser importantes para la comprensión del estado redox (Mittler *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2011a; Rouhier and Jacquot, 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión tanto de APX1 como de APX2 depende de una señal generada por el estado redox de la CTE fotosintética (Karpinski *et al.*, 1997)

La generación de EROs en orgánulos celulares como las mitocondrias y cloroplastos son capaces de inducir cambios en el transcriptoma nuclear (Apel and

Hirt, 2004), pero el mecanismo de transducción de señales todavía no está del todo claro.

Datos Farmacológicos y genéticos indican que la mayor parte de las EROs generadas durante las interacciones bióticas y en las respuestas tempranas a estreses abióticos provienen de los complejos de membrana NADPH oxidasas (Wu *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que el H₂O₂ (generado por actividad SOD a partir del $\cdot\text{O}_2^-$ liberado por NADPH ox) es relativamente estable y difunde a través de las membranas es considerado como la principal EROs que dispara mecanismos de defensa.

Como las EROs influyen en la expresión génica, se sugiere que actúan como una señal biológica reguladora de procesos frente a condiciones de estrés (Laloi *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2002). En el trabajo de Laloi *et al.* (2004) se propone que la EROs interactúan selectivamente con la molécula diana. Cuando aumentan las concentraciones de EROs, este cambio se transmite a la expresión génica. Se propone, además, que tales cambios a nivel de expresión de genes se producen a través de la oxidación de algunos componentes de las vías de señalización, resultando en la activación de factores de transcripción o posiblemente factores de transcripción que son redox sensibles (Laloi *et al.*, 2004).

En procariotas y animales se ha determinado una activación directa de vías de transducción de señales mediada por factores de transcripción sensibles a estados redox por ejemplo, OxyR en *Escherichia coli* y YAP1 en *Saccharomyces cerevisiae*. En plantas, Mou *et al.* (2003) describieron la regulación redox de NPR1, un regulador esencial de plantas en la resistencia sistémica adquirida (SAR). En estado no inducido, NPR1 está presente en el citosol como un oligómero que se forma a través de enlaces disulfuro intermoleculares. Durante una respuesta SAR, se produce un cambio bifásico en el potencial de reducción celular (y en presencia de ácido salicílico), lo que resulta en la reducción de NPR1 a una forma monomérica que se acumula en el núcleo y que activa la expresión génica de PR1.

Senescencia y expresión génica

Se postula que en las plantas se presentan dos tipos de senescencia: la senescencia replicativa (o mitótica) y la senescencia post-mitótica (Gan, 2003). La senescencia replicativa se refiere a la pérdida de la capacidad celular de dividirse. En cambio, la senescencia post-mitótica es un proceso degenerativo que ocurre después de la maduración celular o la diferenciación y conduce a la muerte celular. Estas formas de ver la senescencia se utilizan generalmente para describir la senescencia foliar a nivel celular y de órganos (Lim *et al.*, 2003). Los tres factores principales que contribuyen a la senescencia post-mitótica son la edad de desarrollo además de factores internos y ambientales. El envejecimiento durante el desarrollo normal se produce desde el inicio del primordio foliar y ocurre a lo largo del proceso de senescencia y posterior muerte. Conceptualmente, el envejecimiento en el desarrollo determinaría cuando se inicia la senescencia, pero no la progresión de la senescencia en sí (Lim *et al.*, 2007). Mientras que la senescencia foliar se encuentra básicamente gobernada por la edad de desarrollo, ésta integra diversas señales tanto endógenas (principalmente hormonales) como también ambientales (externas) logrando un control fino del desarrollo de la planta.

Durante la senescencia, se produce MCP. La MCP tipo II o proceso de autofagia es esencial para el reciclado y la removilización de nutrientes como así también toma relevancia en las respuestas de las plantas frente a condiciones de estrés. En este sentido, Liu *et al.* (2009) demostraron la participación de autofagia en las respuestas frente a estrés hídrico y salino, donde plantas de *Arabidopsis* con silenciamiento de AtATG18a fueron más sensibles a dichas condiciones. Estudios de mutagénesis en levaduras han identificado varios genes de autofagia (ATG) requeridos para una actividad autofágica adecuada (Levine *et al.*, 2004; Klionsky, 2005), los cuales se encuentran conservados desde levaduras a plantas y animales (Klionsky, 2005; Kourtis and Tavernarakis, 2009). Dentro de los genes asociados a la formación de autofagosomas se encuentran ATG6 y PI3K, los cuales pueden ser utilizados como marcadores del proceso.

Factores de transcripción en la senescencia

El inicio y la progresión de la senescencia van acompañados de cambios globales en la expresión génica (Gepstein *et al.*, 2003; Buchanan- Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; Balazadeh *et al.*, 2008), Se presume que numerosos factores de transcripción participan como elementos centrales de esta red de regulación (Woo *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis* se han identificado 96 genes de FTs que al menos triplican su expresión en hojas senescentes. Estos FTs pertenecen a 20 familias diferentes, de las cuales las más numerosas son NAC, WRKY, de tipo C2H2 zinc finger, AP2 / EREBP, Aux/IAA y proteínas MYB (Lim *et al.*, 2007), dentro de éstos existen ejemplos de FTs que se ha demostrado tienen un papel funcional específico en el proceso de senescencia.

Los factores de transcripción específicos de la familia NAC (por NAM, ATAF1, 2, y CUC2) cuenta con más de 100 representantes en *Arabidopsis* y tienen un papel importante a nivel de desarrollo en meristemas y embriones, la formación de raíces laterales, la señalización por auxinas, y las respuestas de defensa.

Un total de 20 genes que codifican factores de transcripción NAC, (lo que representa casi una quinta parte de los miembros de la familia), mostraron aumentos en su expresión durante procesos de senescencia natural y senescencia inducida por oscuridad (Lim *et al.*, 2007). En el trabajo de Guo and Gan (2006), se demostró mediante una mutación *knockout* de AtNAP (miembro de la familia NAC), que se retrasa la senescencia foliar de modo significativo y que la sobreexpresión de esta proteína causa senescencia temprana, lo que sugiere que las funciones de AtNAP son un elemento positivo en la senescencia foliar. En rasgos generales, los NAC representan una porción apreciable de los genes de senescencia regulados en muchas especies de plantas incluyendo cultivos y árboles, lo que sugiere un papel importante en el control de la senescencia (Andersson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Buchanan- Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen and Holm, 2007; Balazadeh *et al.*, 2008).

Además, la expresión de numerosos genes NAC se encuentra relacionada a las respuestas de las plantas frente a estreses abióticos como ser, sequía, salinidad y frío (Hu *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2010; Nuruzzaman *et al.*, 2012).

Receptores-*like* proteín kinasas en la senescencia

Los Receptores-*like* proteín kinasas (RLKs) son receptores de la superficie celular que típicamente consisten en un dominio extracelular que percibe una señal específica, un dominio transmembrana que ancla la proteína, y un dominio quinasa citoplasmático que traduce la señal aguas abajo vía autofosforilación, seguida de fosforilaciones de sustratos específicos (Stone and Walker, 1995). Esta estructura particular de los RLKs los convierte en componentes críticos en el desarrollo de las plantas y de las vías de transmisión de señales de respuesta a factores ambientales (Walker, 1994; Torii, 2004; Johnson and Ingram, 2005). Un elemento estructural común de éstos RLKs es un dominio extracelular del tipo *leucin-rich repeat* (LRR) mediante el cual se produce la discriminación de unión a ligandos (Kobe and Kajava, 2001; Kinoshita *et al.*, 2005). Como ejemplos de estos RLKs se pueden citar a CLAVATA1, que regula la morfogénesis del meristema apical de *Arabidopsis* (Clark *et al.*, 1997), HAESA, que controla la abscisión de órganos florales (Jinn *et al.*, 2000), y BRI1 y BAK1, ambos implicados en la señalización de brasinosteroides (Li and Chory, 1997; Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002).

Estos LRR-RLKs, además de intervenir en varios estadios de desarrollo de las plantas, también tienen relación directa con el proceso de senescencia. Por ejemplo, se encontraron altos niveles de transcritos de SIKK (LRR-RLK de *Arabidopsis*) y de PvSARK (*Phaseolus vulgaris*), acumulados en hojas senescentes (Hajouj *et al.*, 2000; Robatzek and Somssich, 2002).

Un caso particular que merece atención es el gen GmSARK (Senescence Associated Receptor-*like* Kinase) que tiene un rol importante en la regulación de la senescencia foliar en soja (Li *et al.*, 2006). En este trabajo, se ha demostrado que plantas transgénicas tanto en *Arabidopsis* como en soja en la cuales se ha silenciado el

gen, han evidenciado retrasos en los procesos de senescencia, mientras que su sobreexpresión tuvo el efecto contrario, presentando senescencia acelerada y muerte.

Si bien, la activación de las diversas vías de señalización frente a condiciones de estrés se encuentran estudiadas, como así también la influencia del estado redox sobre esta señalización y el proceso de senescencia, existe escasa información acerca de los cambios en los niveles de transcritos de genes asociados al estado redox durante el proceso de desarrollo foliar. Además poco se sabe de la influencia de tratamientos con NaCl sobre la regulación transcripcional.

En este capítulo se presentan los resultados de la determinación de los niveles de transcritos del sistema antioxidante, NADPH oxidasas y genes asociados a senescencia de plantas de soja crecidas en condiciones control y tratamientos con NaCl.

Concordante con resultados presentados anteriormente, las determinaciones se realizaron sobre la hoja 2 de soja a los días 15 y 29 de cultivo representando la fase de expansión y de madurez foliar respectivamente.

RESULTADOS

La determinación de los niveles de los diferentes transcritos se realizó mediante la técnica de la PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) utilizando cebadores (primers) para cada una de las isoformas posibles. Los resultados se expresan como $2^{-\Delta\Delta cT}$ según Livak and Schmittgen (2001). Esta forma de expresar los resultados nos indica los niveles de expresión de nuestro gen de interés respecto a una condición particular, para este caso los resultados están expresados respecto a la condición control día 15 (C15), tomando ésta un valor de 1 y considerando una diferencia significativa cuando el valor relativo de expresión sea mayor o igual a 2.

Para una mejor comprensión de los resultados los distintos genes se organizaron según grupos de localización subcelular.

1. niveles de transcritos foliares de genes del sistema antioxidante de soja

1.1 Cloroplasto

En el caso del cloroplasto las isoformas FeSOD1 y FeSOD5 presentaron aumentos en sus niveles de transcritos asociados a la edad foliar (Fig. 1.3) y en mayor medida asociados también al tratamiento salino. Las isoformas FeSOD3 y FeSOD4 presentaron aumentos en los niveles de sus transcritos principalmente relacionados al tratamiento salino de larga duración (SAL29), aunque la FeSOD 4 también denotó aumentos en los transcritos luego de 48 horas de tratamiento salino (Fig. 1.3). Este aumento en los transcritos de las isoformas FeSOD asociados a la edad foliar y particularmente al tratamiento salino, se condice con el aumento en la actividad de estas isoformas registrado en el capítulo anterior.

Particularmente, las CuZnSOD mostraron una disminución marcada en los niveles de expresión de las tres isoformas (1, 2 y 3) presentes en cloroplastos (Fig. 1.3). Este proceso de silenciamiento de expresión en los genes se evidenció relacionado

tanto a la edad foliar como al tratamiento salino, con una disminución más marcada en este último (Fig. 1.3).

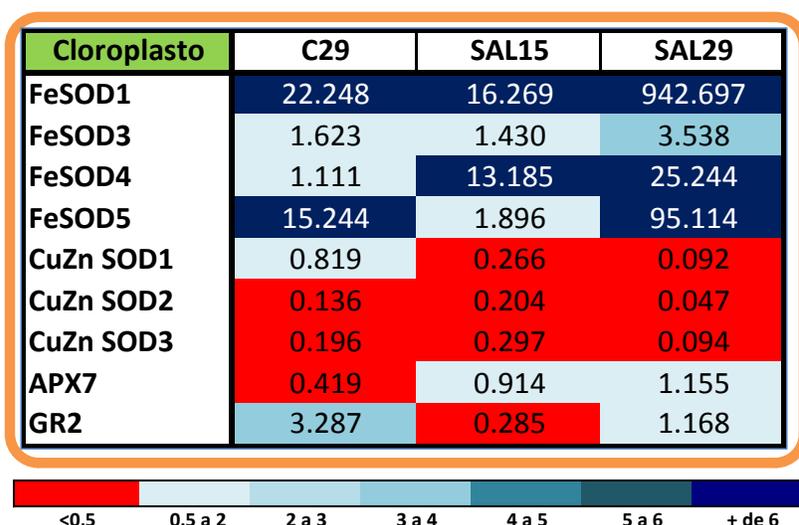


Figura 1.3. Niveles de expresión de genes del sistema antioxidante de cloroplastos en hojas de soja en condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

APX7, la isoforma de esta enzima encargada de dismutar H_2O_2 presentó una disminución marcada en los niveles de transcritos asociada a la edad foliar, mientras que en el tratamiento salino (Días 15 y 29) presentó niveles similares a la condición control para el día 15 (Fig. 1.3).

Para el caso de GR2, en los niveles de transcritos se observaron aumentos asociados a la edad foliar, mientras que se evidenciaron disminuciones marcadas en el tratamiento salino para el día 15 respecto al control (Fig. 1.3). La condición salina para el día 29 presentó valores similares que la condición control para el día 15.

1.2 Mitocondria

Para el caso de los genes determinados en mitocondrias, las isoformas de MnSOD (1 y 2) presentaron el mismo patrón de expresión. Un aumento marcado en sus niveles de transcritos asociado principalmente a la edad foliar (Fig. 2.3), que no fueron afectados por el tratamiento salino.

La Glutación reductasa 2 (GR2) evidenció un aumento en sus niveles de transcritos asociado a la edad foliar, y una disminución marcada en el tratamiento salino al día 15

(Fig. 2.3), mientras que en el tratamiento salino al día 29 los valores fueron similares al control día 15.

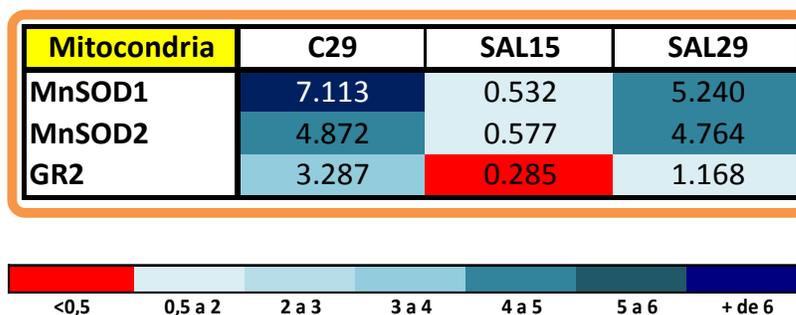


Figura 2.3. Niveles de expresión de genes del sistema antioxidante de Mitocondrias en hojas de soja en condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

1.3 Peroxisoma

En peroxisomas las isoformas de APX2 presentaron comportamientos diferentes. Para el caso de APX2, los niveles de transcritos se vieron afectados en los tratamientos salinos, observándose una disminución marcada a partir del día 15 de experimentación (Fig. 3.3), mientras que la condición control presentó valores similares en sus dos días de experimentación. La isoforma APX4 evidenció una disminución marcada de sus niveles de transcritos principalmente asociada a la edad foliar. El tratamiento salino no afectó los niveles de transcritos (Fig. 3.3).

Las isoformas de Catalasa mostraron aumentos en los niveles de sus transcritos asociados a la edad foliar (Fig. 3.3). CAT1 evidenció una disminución en sus niveles de transcritos en el tratamiento salino para el día 15. Para el caso de CAT3, estos niveles no se vieron afectados por el tratamiento salino, mientras que CAT2 presentó valores similares de expresión en el tratamiento salino respecto a la condición control para el día 15 (Fig. 3.3). Para las 3 isoformas se evidenciaron aumentos de sus transcritos para la condición de salinidad al día 29 respecto al día 15 de condición control.

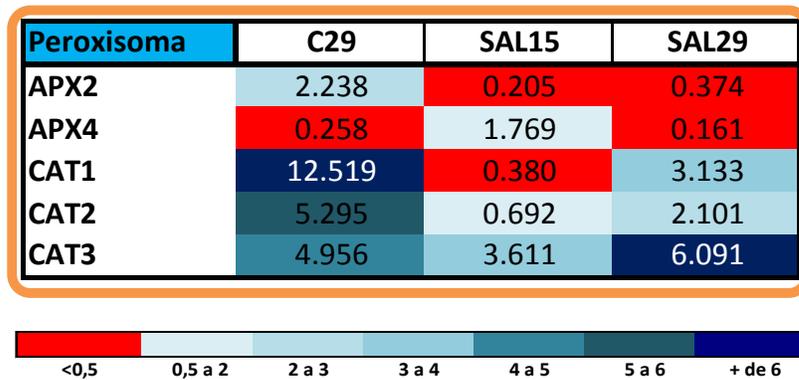


Figura 3.3. Niveles de expresión de genes del sistema antioxidante de Peroxisomas en hojas de soja en condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

1.4 Citosol

Para el caso de las expresiones determinadas en el citosol, La isoforma CuZnSOD4 evidenció incrementos en sus transcritos en relación a la edad foliar (Fig. 4.3), mientras que esos niveles se vieron disminuidos por efecto del tratamiento salino tanto al día 15 como al día 29.

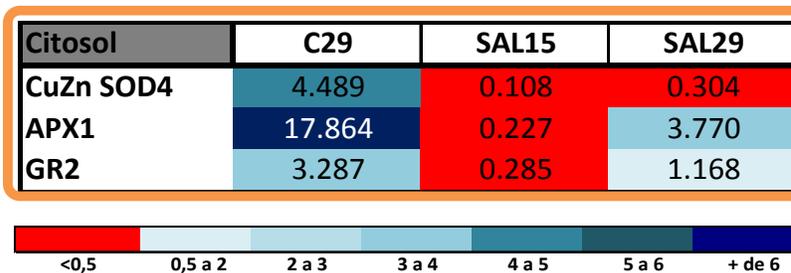


Figura 4.3. Niveles de expresión de genes del sistema antioxidante de Citosol en hojas de soja en condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

La APX1 evidenció un incremento marcado de sus niveles de transcritos asociado a la edad foliar (Fig. 4.3), mientras que el tratamiento salino silenció esa expresión al día 15, para luego aumentar a valores por encima de 3 al día 29 de experimentación.

En el caso de GR2, los niveles de transcritos aumentaron significativamente con la edad foliar mientras que el tratamiento salino al día 15 produjo una disminución

marcada (Fig. 4.3). Al día 29 de experimentación en el tratamiento salino los niveles de expresión fueron similares a los del control día 15.

1.5 Extracelular

La isoforma número 5 de CuZnSOD con actividad en el espacio extracelular presentó niveles de expresión que no variaron con la edad foliar pero si evidenciaron un silenciamiento muy marcado en el tratamiento salino, presentándose esto ya en el día 15 de experimentación y manteniéndose hasta el día 29 (Fig. 5.3).

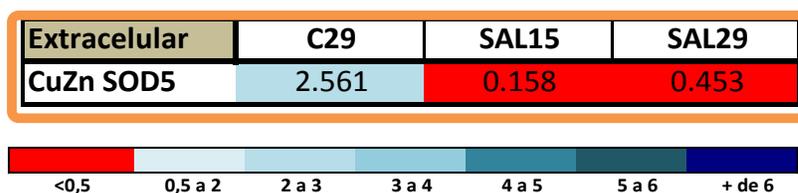


Figura 5.3. Niveles de expresión de genes del sistema antioxidante de espacio extracelular en hojas de soja, condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

2. niveles de transcriptos foliares de NADPH oxidasas de soja

Las NADPH oxidasas se encuentran catalogadas como las principales enzimas productoras de EROs relacionadas a procesos de señalización en morfogénesis, desarrollo y estrés (Marino *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2011a y b).

Se ha demostrado que tanto las condiciones de estrés biótico como las de estrés abiótico son acompañadas por un estallido oxidativo mediado por NADPH oxidasas (Park *et al.*, 1998; Cazalé, 1998). Los cambios en la expresión de NADPH oxidasas provocados a través de la perturbación de la homeostasis de EROs sugieren que la activación transcripcional de ciertas NADPH oxidasas son un paso intermedio esencial en el inicio o la amplificación de las respuestas de defensa (Dat *et al.*, 2003; Rizhsky *et al.*, 2003; Rizhsky *et al.*, 2004; Vandenabeele *et al.*, 2004).

En este trabajo se determinaron los niveles de expresión de 9 de las 18 NADPH oxidasas presentes en las secuencia de soja (Fig. 6.3).

Como característica general, se observó que 8 de las 9 presentaron disminución en sus niveles de expresión en presencia del tratamiento salino para el día 15, en 5 de éstas sus niveles de expresión fueron menores a 0,5 respecto a la condición control día 15 (Fig. 6.3). Además 7 de las NADPH (2, 3, 7, 9, 10, 11 y 13) evidenciaron aumentos en sus niveles de expresión asociados a la edad foliar y 5 de estas (2, 3, 9, 10 y 11) mantuvieron niveles altos de expresión en el tratamiento salino para el día 29 (Fig. 6.3).

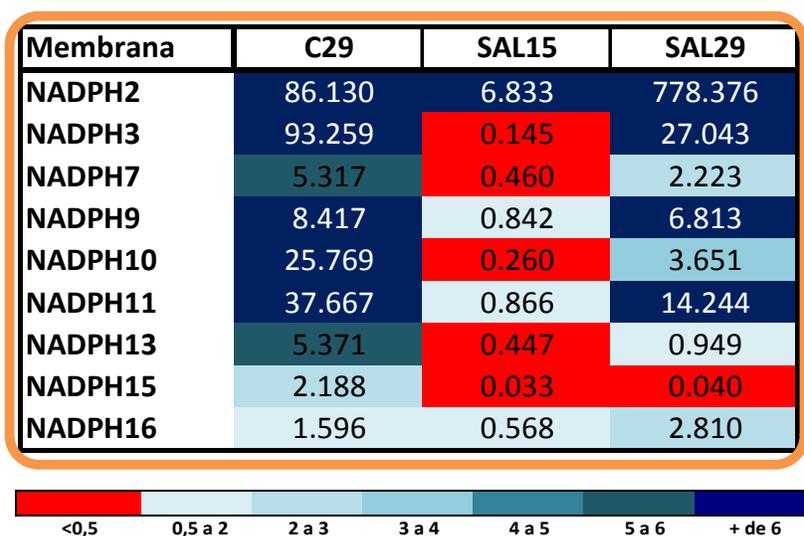


Figura 6.3. Niveles de expresión de genes NADPH oxidasas de membrana en hojas de soja, condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

Como casos particulares podemos destacar a NADPH16, donde sus niveles se mantuvieron casi invariables a lo largo de la experimentación y NADPH2 que presentó aumentos en sus niveles de expresión en todos los tratamientos y particularmente el día 29 para la condición salina, registrando un valor de 778 veces de expresión respecto al control del día 15. El comportamiento diferencial en los niveles de expresión de las distintas NADPHs, apoya la idea de que cada una cumple una función específica según su localización para procesos de señalización.

3. niveles de transcriptos foliares de genes asociados a senescencia de soja.

Los tres factores de transcripción NAC estudiados en el presente trabajo presentaron un aumento significativo en su expresión relacionado a la edad foliar (Fig. 7.3).

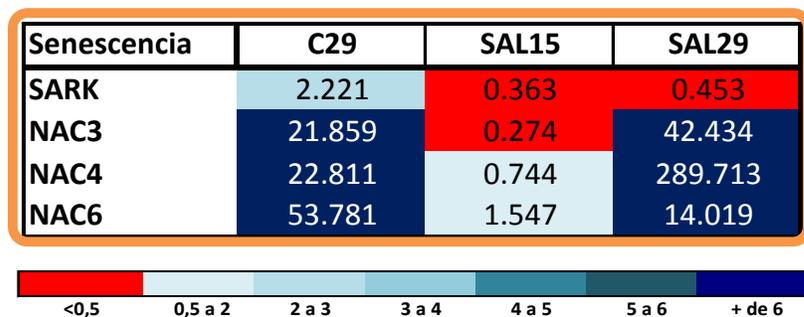


Figura 7.3. Niveles de expresión de genes asociados a senescencia en hojas de soja, condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

Como así también al tratamiento salino para el día 29 respecto a la condición control día 15. Particularmente NAC3 y NAC4 evidenciaron los mayores valores de expresión asociados al tratamiento salino el día 29. Para el caso de NAC3, el tratamiento salino produjo un silenciamiento a nivel de expresión al día 15 (Fig. 7.3). En esta condición, NAC4 y NAC6 presentaron valores similares de expresión respecto al control día 15.

Los niveles de expresión del receptor-*like* proteín kinasa GmSARK se vieron afectados por la condición salina en ambos días de experimentación (Fig. 7.3). Mientras que la condición control al día 29 evidenció valores de expresión similares a la condición control día 15.

4. niveles de transcriptos de genes relacionados al proceso de autofagia y de respuesta sistémica adquirida en hojas de soja

Para el caso de las proteínas evaluadas como marcadoras del proceso de autofagia, los niveles de ATG6 se presentaron similares en el caso de los tratamientos control al día 29 y salino al día 15 respecto al control día 15 (Fig. 8.3), mientras que se

evidenciaron aumentos significativos para la condición salina del día 29, mostrando un efecto de la salinidad a largo plazo.

PI3K presentó aumentos significativos de su expresión en todos los días ensayados, aunque en mayor proporción en las condiciones de salinidad (Fig. 8.3).

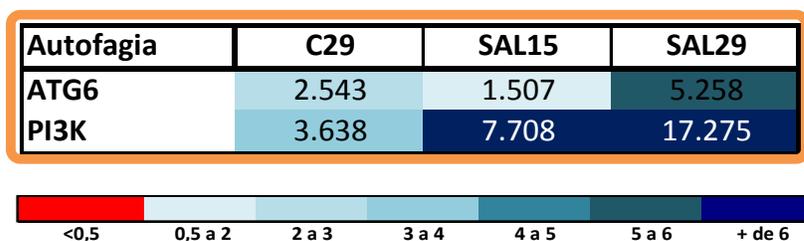


Figura 8.3. Niveles de expresión de genes relacionados a autofagia en hojas de soja, condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

Con respecto a los genes asociados a SAR, NPR1-1 presentó aumentos significativos en su expresión relacionados a la edad foliar (Fig. 9.3), mientras que el tratamiento de salinidad disminuyó marcadamente los niveles de expresión al día 15. El tratamiento salino al día 29 no evidenció cambios significativos.

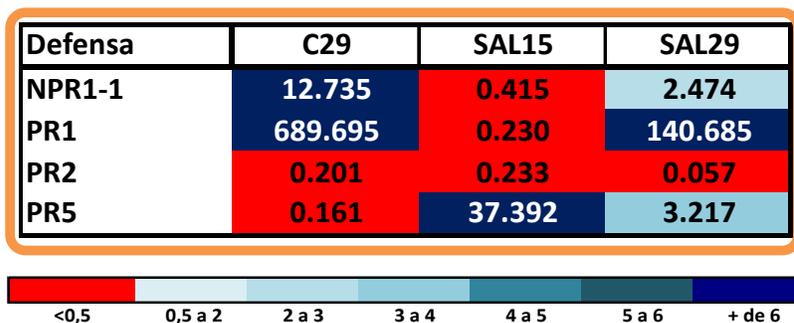


Figura 9.3. Niveles de expresión de genes relacionados a respuesta sistémica adquirida en hojas de soja, condiciones control y salinidad. Los niveles están expresados respecto a la condición control para el día 15. C29: control día 29; SAL15: 75mM NaCl día 15.

Los niveles de expresión de PR2 se vieron afectados en ambos tiempos para ambas condiciones respecto al control día 15, con niveles significativamente menores (Fig. 9.3).

PR1 fue la que evidenció una respuesta más marcada, mostrando los mayores niveles de expresión asociados principalmente a la edad foliar, mientras que la condición salina

al día 15 produjo su silenciamiento, al día 29 los niveles de expresión fueron significativamente superiores (Fig. 9.3).

PR5 evidenció niveles de expresión afectados por la edad foliar y con niveles significativamente mayores inducidos por el tratamiento de salinidad al día 15. Para la condición salina al día 29 los niveles de expresión fueron mayores respecto al control día 15. Los resultados indican una inducción de genes de resistencia (HR) principalmente asociado a la edad foliar, tal es el caso de NPR1-1 y de PR1.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados dejan en evidencia la regulación diferencial de los genes asociados al sistema antioxidante en cada compartimento intracelular en función del desarrollo foliar y en respuesta al estrés

Un caso interesante lo representan las isoformas de FeSOD que se encuentran en cloroplastos. Estas isoformas (particularmente 1, 4 y 5) respondieron tanto al tratamiento salino como al avance de la edad foliar (1 y 5) aumentando sus niveles de expresión. Estos incrementos en los niveles de expresión se ven reflejados en los aumentos de actividades de estas isoformas registrados en el capítulo anterior. En el caso del cloroplasto las isoformas CuZnSOD respondieron de manera contraria, ya que se observaron silenciamientos a nivel transcripcional asociados tanto a la edad foliar como a los tratamientos salinos. Lo mismo ocurrió para la isoformas CuZnSOD4 (citósólica) y CuZnSOD5 (extracelular). Estos cambios también se vieron reflejados en la disminución de las actividades de éstas isoformas evidenciadas en el capítulo anterior. Todo esto nos estaría demostrando un control a nivel transcripcional de las actividades de SOD. Teniendo en cuenta que los cloroplastos son la principal fuente de generación de EROs intracelular en tejidos verdes, principalmente bajo situaciones de estrés y donde estas condiciones combinadas con altas intensidades de luz causan una sobre-reducción de la CTE induciendo la formación de EROs, tales como el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Asada, 1999; Mullineaux and Karpinski, 2002), estaría apoyando la necesidad de respuestas rápidas principalmente de SOD con el fin controlar los niveles de EROs.

Estas respuestas rápidas a nivel de cloroplasto estarían indicando que estos orgánulos juegan un papel preponderante en el sensado de las condiciones a las cuales fueron sometidas las plantas de soja. En este caso probablemente estas respuestas rápidas se encuentran relacionadas con una detección por parte de la planta, de un cambio de potencial hídrico del medio y no tanto de una respuesta asociada al componente iónico

del estrés salino. Más adelante en el desarrollo foliar, seguramente este componente iónico del tratamiento salino toma mayor preponderancia.

Para el caso de las isoformas de APX 2, 4 y 7, independientemente de su ubicación subcelular presentaron silenciamientos en su expresión, o bien no se registraron cambios en los niveles de transcritos. En el trabajo de Karpinski *et al.*, 1997 se ha demostrado que la expresión tanto de APX1 como de APX2 de *Arabidopsis* depende de una señal generada por el estado redox de la CTE fotosintética. En este caso, en las isoformas investigadas no se registraron inducciones en la expresión, por lo tanto podemos proponer que no existió dicha señal de inducción.

Particularmente la isoforma APX1 de ubicación citosólica presentó inducción en los niveles de transcritos influenciado por la edad foliar pero no por la condición de estrés. Indicando que esta isoforma toma mayor relevancia en la detoxificación de H₂O₂ cuando la hoja se encuentra en un estado avanzado de desarrollo.

Con respecto a las isoformas de CAT, de ubicación peroxisomal, mostraron un comportamiento similar relacionado a la edad foliar, esto es, aumentos en sus niveles de expresión en la condición control al día 29. Estos aumentos se correlacionaron con mayores niveles de actividad registrados (a partir del día 20 y hasta el día 29) en el capítulo anterior. Esto nos estaría indicando una regulación a nivel transcripcional, en este caso para controlar los niveles de H₂O₂ en los peroxisomas. Las isoformas 1 y 3 además mantuvieron valores de expresión elevados en el tratamiento salino al día 29. Los tratamientos de salinidad al día 15 tuvieron efectos contrastantes entre las isoformas CAT3 y CAT1 y 2 ya que para el caso de la primera los niveles de transcritos se mantuvieron significativamente altos, mientras que para el caso de las segundas se evidenció un silenciamiento marcado. Este comportamiento nos da la pauta de que aunque sean isoformas pertenecientes al mismo espacio intracelular, tiene distintas vías de inducción de expresión.

La isoforma GR2, enzima encargada de mantener el pool de glutatión reducido, tiene distribución cloroplástica, mitocondrial y citosólica, indicando la importancia de su actividad como parte reguladora del estado redox celular. En este capítulo pudimos

evidenciar que los niveles de expresión aumentaron acorde a la edad foliar, viéndose silenciados al día 15 en la condición de salinidad, para luego (día 29) presentar niveles similares al control. En lo que refiere a los cambios observados respecto a la edad foliar, los aumentos en los niveles de transcritos se correlacionan con la mayor actividad de la enzima como así también con mayores niveles de glutatión reducido según vimos en el capítulo anterior. Mientras que este comportamiento no se reflejó bajo tratamientos salinos, donde, a nivel de expresión al día 15 se observó una disminución en los niveles de transcritos, acompañados de una menor actividad pero con niveles de GSH similares a la condición control. Esto nos estaría indicando una regulación transcripcional de la actividad GR influenciada directamente por la salinidad por lo menos en tratamientos a tiempos cortos. A tiempos mayores de tratamiento salino (día 29), los niveles de transcritos similares a la condición control (día 15) se reflejaron como una mayor actividad GR y un nivel de GSH similar a la condición control día 29. Esto estaría contradiciendo la idea de una regulación transcripcional directa como la observada para tiempos cortos y estaría abonando la idea de un control de actividad postraducciona. Otro posibilidad que se podría plantear en este escenario se refleja en el trabajo de Edwards *et al* (1993), donde demostraron que la enzima GR encontrada en extractos de plantas de arveja sometidas a estrés oxidativo mostraron mayor afinidad por el glutatión oxidado, traduciendo esto quizás en una mayor eficiencia de reducción. Este comportamiento estuvo explicado por cambios en la población de isoformas de GR. En el presente capítulo no se tuvo en cuenta el comportamiento de las distintas isoformas de GR.

Otra de las determinaciones que se realizaron en este capítulo fueron los niveles de transcritos de NADPH oxidasas, principales fuentes de EROs (anión superóxido) a nivel de membrana celular. La mayoría de las isoformas investigadas mostraron aumentos en su transcripción asociados a la edad foliar y al tratamiento salino de mayor duración (día 29). Este comportamiento se relaciona con trabajos previos donde se documentan mayores niveles de EROs asociados al proceso de senescencia y procesos de estrés abiótico. También se postula a las NADPH oxidasas como parte de

los procesos de señalización por cambios en el estado redox. Un ejemplo del papel que cumplen las NADPH oxidasa se ve reflejado en el trabajo de Chen *et al.*, 2013, donde mediante la utilización de DPI (inhibidor de NADPH oxidasas) mitigan los efectos del proceso de senescencia inducido por etefphon en plantas de batata. Si bien la inducción de la transcripción de NADPHs observados en relación a la edad foliar y tratamiento salino no se vio reflejado en los niveles de anión superóxido, debemos tener en cuenta las variaciones observadas tanto en transcripción como en actividad de las isoformas de SOD. Para destacar, los niveles de transcritos de las NADPH oxidasas se vieron afectados por el tratamiento salino a tiempos cortos (día 15), reforzando la idea de que estas enzimas cumplen un rol importante en los procesos de sensado de condiciones estresantes.

En relación a los niveles de expresión de genes relacionados a la senescencia, y teniendo la idea de utilizarlos como marcadores de este proceso es que se intentó abordar el estudio de distintos componentes que influyen en la cadena de señalización. Tal es el caso de GmSARK actuando como receptor, y los diferentes NACs actuando como factores de transcripción. Para el caso particular de GmSARK, se observaron aumentos en sus niveles de expresión (aunque no significativos) en relación a la edad foliar, no así en los tratamientos salinos donde se observó una disminución significativa en sus transcritos. Si bien los aumentos en la expresión de este factor de transcripción se encuentran relacionados al proceso de senescencia, estos aumentos se dan en etapas avanzadas del proceso por ejemplo en poroto (Hajouj *et al.*, 2000). En el caso de soja, en el trabajo de Xu *et al* del año 2011 clonaron un gen GmSARK y transformaron plantas de *Arabidopsis*. Utilizando estas plantas y sumando la evidencia de trabajos previos (Li *et al.*, 2006) donde silenciaron este gen en plantas de soja, demostraron el importante papel que presenta este receptor en el proceso de senescencia. Además de demostrar su participación en el proceso mediado por vías hormonales (etileno y auxinas), la expresión de este gen adelantó senescencia evidenciado el desmantelamiento cloroplástico y una marcada disminución en los niveles de expresión de los genes de síntesis de clorofilas y de ambas unidades de

Rubisco. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, podemos postular que los niveles de expresión aumentada de este gen podrían estar relacionados con la disminución de Rubisco observada en condiciones normales de desarrollo, mientras que en los tratamientos salinos donde observamos un silenciamiento a nivel de transcritos de este gen, encontramos niveles detectables de Rubisco. Esta información es contrastante para el caso de los niveles de clorofilas que presentaron el patrón inverso de comportamiento.

Debemos que tener en cuenta que el proceso de senescencia se encuentra regulado por múltiples vías de señalización.

Con respecto a los genes NAC investigados, éstos actúan más adelante en las vías de señalización ya que se trata de factores de transcripción que van a modular la expresión o represión de genes relacionados al proceso de senescencia. Los tres genes incluidos en este estudio evidenciaron aumentos significativos en sus niveles de transcripción asociados a la edad foliar y a la condición salina.

¿Cuál es el efecto del aumento de transcritos de estos factores de transcripción en nuestro sistema? En el trabajo de Neto *et al.*, 2013 la familia NAC fue la más representada en el grupo de expresión "respuesta al estímulo hormonal" en plantas de soja sometidas a deshidratación. Particularmente la isoforma NAC3 mostró gran modulación tanto en un genotipo tolerante a sequía como en un genotipo sensible. Se ha demostrado la participación de estos FTs en los procesos de la tolerancia al estrés abiótico. Liu *et al* (2013) obtuvieron líneas transgénicas de tabaco transformadas con AhNAC3 (de maní), las que mostraron resistencia a la deshidratación y el estrés por sequía. Llamativamente estas plantas transgénicas acumularon menos anión superóxido (O_2^-) en condiciones de deshidratación y sequía que el tipo salvaje. También observaron que, superóxido dismutasa, sintetasa pirrolina-5-carboxilato, y genes asociados a respuestas tempranas a la sequía, fueron inducidos en las líneas transgénicas. Estos datos sugieren que NAC3 mejora la tolerancia a estrés hídrico mediante el aumento de captación de anión superóxido y la acumulación de diversas moléculas protectoras.

Entonces, podemos concluir que además de poder ser utilizados como marcadores del proceso de senescencia, la presencia de estas proteínas podría estar relacionada a mecanismos de protección frente al estrés salino modulando el estado redox celular.

Otro de los aspectos abordados en este capítulo se refiere a niveles de transcritos de genes relacionados al proceso de autofagia, íntimamente ligado a la senescencia. El proceso de autofagia es la principal vía por la que se degradan organelas y proteínas de vida larga. Este proceso se induce durante la senescencia foliar y ha sido demostrado recientemente que plantas mutantes de autofagia acumulan proteínas solubles y tienen afectado el reciclado y removilización de nitrógeno orgánico desde órganos senescentes hacia los destinos (semillas), impactando sobre la productividad y el rendimiento (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Guiboileau *et al.*, 2012; 2013; Li *et al.*, 2015). Según los resultados expresados en este capítulo, PI3K evidenció aumentos en su transcripción ligados tanto a la edad foliar como a las condiciones de salinidad. En cambio ATG6 solo mostró aumentos en su expresión en condiciones de salinidad al día 29. Estas dos proteínas forman parte del complejo PI3K necesario para que se dé inicio al proceso de autofagia. Relacionando este proceso con la degradación de Rubisco y teniendo en cuenta que en los tratamientos salinos al día 29 solo observamos una degradación parcial de esta proteína, podemos hipotetizar que si bien es posible que este proceso se haya inducido, no tenemos certeza de su progresión. Para esto deberíamos utilizar marcadores más avanzados del proceso de autofagia. Otra estrategia de estudiar la progresión del proceso sería la de cuantificar por lo menos los niveles proteicos de éstos marcadores y otros asociados.

En lo que se refiere a genes asociados a la respuesta sistémica adquirida se ha citado que condiciones de estrés abiótico activa vías de defensa que también incluye inducción de proteínas relacionadas a la patogénesis (Mou *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta que el ácido jasmónico (AJ) se encuentra involucrado en diversos procesos del desarrollo, entre ellos incluido el proceso de senescencia (Wasternack and Hause, 2002), y además activa mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a

insectos, patógenos y estreses ambientales como sequía, baja temperatura y salinidad (Wasternack and Parthier, 1997). Es que propusimos evaluar los niveles de expresión de los genes NPR1-1, PR1, PR2 y PR5.

El resultado más destacable, se refiere al comportamiento de NPR1-1 y PR1, los cuales presentaron niveles de expresión considerablemente altos en relación a la edad foliar ($2^{-\Delta\Delta cT}$ de 12 y 689) y esta inducción fue poco afectada por el tratamiento salino al día 29. Sumado a esto observamos una disminución marcada de sus transcriptos en el tratamiento salino al día 15. Es sabido que la activación de NPR1 es dependiente del estado redox celular (Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008; Lindermayr *et al.*, 2010) y que la activación de muchos genes PR depende de la actividad de NPR1 y, teniendo en cuenta que ambos presentaron el mismo comportamiento respecto a sus niveles de transcripción podríamos entonces postularlos como un par génico sensible al tratamiento salino y principalmente al estado redox celular pudiendo ser utilizados como marcadores del proceso de senescencia. Resta para próximos experimentos realizar la determinación de los niveles hormonales (principalmente AJ) para corroborar la relación directa de modulación por cambios hormonales.

Además observamos el aumento en los niveles de expresión de un gen perteneciente al grupo 5 de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR5) bajo condiciones de salinidad (día 15). Relacionado a esto, en el trabajo de Onishi *et al.*, 2006 se describe la expresión en hojas de soja de un gen denominado *GmOLPa*, también perteneciente a este grupo, a partir de la inducción por tratamiento con NaCl 300mM. La aparición del transcripto de este gen se dio a partir de las 24 horas de tratamiento y presentando altos niveles de expresión a las 48 horas. Los autores además describen el control transcripcional de este gen en tratamientos de deshidratación. A partir de estos resultados se propone a este grupo de genes como genes inducibles por salinidad.

En relación a este capítulo, cabe destacar que un incremento en los niveles de transcriptos relacionados al sistema antioxidante, genes de senescencia o de autofagia en muchos casos no se correlacionan por ejemplo con el nivel de proteínas o

variaciones de actividades enzimáticas. Existe un gran número de trabajos de abordaje transcriptómico donde sucede esto. Además de que esta correlación no necesariamente ocurre en los sistemas biológicos, no descartamos que estos comportamientos ocurran en tiempos que no se abordaron, como así también es posible que exista un incremento en la tasa de degradación de estas proteínas.

CAPÍTULO IV

Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo de tesis se ha abordado parte del complejo proceso de desarrollo foliar, intentando describir algunos de los cambios en el metabolismo redox que subyacen al proceso, y como éstos se ven afectados por condiciones de estrés.

En primer lugar hemos implementado un sistema de cultivo hidropónico, el cual nos permitió generar condiciones de modulación de la expansión foliar, mediadas tanto por estreses abióticos aplicados en raíces, como aplicaciones exógenas sobre la parte aérea de las plantas. Demostramos en este sistema la estabilidad de cultivo, además de poner a prueba variables bioquímico-fisiológicas que nos permitieron establecer distintas etapas en el desarrollo foliar de soja y asociado a esto, distintos estados redox.

De las variables no destructivas, la principal afectada por sufrir cambios relacionados al estrés aplicado, y, teniendo en cuenta lo que representa en el metabolismo vegetal fue, la superficie foliar. En los capítulos posteriores, intentamos caracterizar los cambios redox, y cómo estos cambios pueden influir o ser afectados por condiciones moduladoras del desarrollo foliar. Para responder a la hipótesis principal planteada de que los distintos estadios del desarrollo foliar se caracterizan por cambios en el metabolismo redox y que éstos cambios son influidos por condiciones de estrés abiótico, es que implementamos tratamientos con NaCl en el medio de cultivo al inicio de la expansión foliar. Según los resultados obtenidos en referencia al proceso de desarrollo foliar, definimos dos de las fases planteadas en la bibliografía. Una primera fase definida como de **expansión** foliar entre los días 13 y 18-20 de experimentación y una segunda etapa definida como de **madurez/senescencia** entre los días 20 y 29. En ambas condiciones ensayadas las dos fases definidas presentaron intervalos temporales similares.

Estado redox en la fase de expansión foliar

En esta etapa del desarrollo foliar las EROs estudiadas presentaron un rol importante sobre el proceso de expansión. Los mayores niveles detectados estuvieron asociados a las mayores velocidades de expansión, siendo esto afectado por el tratamiento con NaCl donde una disminución marcada en las concentraciones de las EROs se tradujo a una menor expansión. Los tratamientos de aplicación de H₂O₂ y secuestrante de O₂⁻ (MnCl₂) mostraron el mismo efecto apoyando la idea de una relación causal entre la acción directa de los niveles de EROs (con concentraciones particulares) y el proceso de expansión. El sistema antioxidante acompañó los niveles de estas EROs, resultado particularmente llamativo el comportamiento de las isoformas FeSOD, donde su incremento en expresión, cantidad y actividad se asoció a la finalización de la etapa de expansión en ambas condiciones de cultivo. Opuesto fue el comportamiento de las isoformas Cu/ZnSOD que mostraron decrementos en su expresión, cantidad y actividad durante el proceso de desarrollo foliar. Teniendo en cuenta que esta enzima se presenta como la primer barrera de control de EROs y que estas isoformas se encuentran restringidas a los cloroplastos, estos resultados mostrarían los finos niveles de control y la incidencia del estado redox a nivel de un orgánulo especializado en fotosíntesis y su relación con el proceso de desarrollo; esto apoya más aún la idea de que los cloroplastos son los principales sensores de cambios ambientales. ¿Estará asociado este comportamiento de las isoformas SOD, con los mecanismos implicados en el pasaje de ser una hoja destino a ser una hoja fuente?

A partir de esto podemos postular que en esta etapa, los niveles de EROS además de definir la velocidad de expansión foliar, definen el tamaño final de la hoja, presentándonos la idea de una ventana de tiempo de acción para que el proceso de expansión pueda darse.

Los niveles de los principales antioxidantes no enzimáticos (ascórbico y glutatión particularmente en sus estados reducidos) reflejaron escenarios completamente distintos en ambas fases del desarrollo, con niveles marcadamente menores en la etapa de expansión sin influencia del tratamiento aplicado.

En reglas generales los comportamientos de los parámetros fisiológicos evaluados presentaron el patrón esperado, donde las principales diferencias se relacionaron al tratamiento aplicado. En relación al proceso fotosintético, fueron afectados los niveles de proteína D1 y por consiguiente la Φ_{FII} en el tratamiento salino. Cabe destacar que el verdor fue mayor para el tratamiento con NaCl durante esta etapa del desarrollo. Con respecto al metabolismo de proteínas si bien los tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí, el aumento constante de los niveles de aminoácidos acompañó al aumento de las proteínas solubles. Con respecto a los carbohidratos no estructurales las hojas de plantas bajo el estrés salino presentaron mayores niveles de azúcares solubles.

Estado redox en la fase de madurez/senescencia foliar

El estadio de senescencia es quizás la etapa del desarrollo más estudiada en la fisiología vegetal. La complejidad de los procesos asociados a esta etapa se encuentra representada por una inmensa red de señales recibidas y traducidas entre los distintos compartimentos celulares y el sistema que representa la planta entera.

Sin lugar a dudas el estado redox de esta etapa de madurez/senescencia como así también las variables fisiológicas asociadas fueron influenciadas por el estado redox de la etapa de expansión. Ya que como detallamos antes, el aumento en las EROs gobernaría el proceso de expansión y el progreso de este proceso repercutiría directamente en el comportamiento de la hoja durante la etapa de madurez/senescencia.

Esta etapa se caracterizó por presentar los menores niveles de EROs (tanto para el H_2O_2 como para el $\cdot O_2^-$), especialmente plasmado en la relación superficie NBT/superficie foliar. Particularmente una disminución marcada en los niveles de $\cdot O_2^-$ hacia el final de la expansión se asoció a una menor superficie final en el tratamiento con NaCl. Los bajos niveles de EROs estuvieron acompañados por los mayores valores de actividad del sistema antioxidante enzimático, en este caso representado por SOD y CAT. Lo mismo ocurrió con los niveles de antioxidantes no enzimáticos. Otra vez un

comportamiento particular lo presentaron las isoformas FeSOD que mantuvieron altos niveles de expresión, cantidad y actividad en el tratamiento con NaCl, mientras que en tratamiento control sus cantidades y actividades disminuyeron. Los niveles de expresión de las distintas isoformas FeSOD fueron particulares para cada isoforma y, la edad de la hoja y el tratamiento aplicado. A su vez en esta etapa del desarrollo observamos un aumento marcado del daño oxidativo.

Los parámetros fisiológicos determinados en esta fase del desarrollo, evidenciaron los mayores niveles de afectación por el estrés salino. Para el caso de los asociados al proceso fotosintético encontramos disminuciones marcadas tanto de los niveles de D1 como los de Φ FII y verdor respecto a la condición control. El metabolismo de proteínas mostro una gran diferencia respecto a la fase de expansión. Los niveles de proteínas solubles disminuyeron marcadamente mientras que los aminoácidos libres aumentaron en la condición de estrés salino. Asociado a estas determinaciones es que encontramos un comportamiento particular de la Rubisco. Observamos la degradación total de esta proteína en condiciones control (algo común en un proceso de senescencia), mientras que las plantas en estrés salino mantuvieron niveles detectables. Estos resultados se contraponen con la idea de que una condición de estrés genera una senescencia acelerada, por lo menos en referencia al proceso de degradación de proteínas (y posterior translocación), en este caso cloroplásticas. Esta propuesta se apoya además en la disminución marcada de los niveles de expresión encontrados para SARK y NAC3, (marcadores de senescencia muy utilizados) en estrés salino. Los niveles de genes asociados a autofagia se contraponen en parte, ya que se observaron aumentos tanto en condiciones control como de estrés salino. El par de genes NPR1-1 y PR1, sumado a los factores de transcripción NAC4 y NAC6, representaron un grupo que puede ser utilizado para la determinación de la progresión del proceso de senescencia.

Teniendo en cuenta los altos niveles de almidón detectados (y los niveles de azúcares constantes) podemos proponer una afectación directa sobre los procesos

degradativos y de translocación mediada por el estrés salino, que se dan en una hoja fuente y se encuentran exacerbados en una hoja senescente.

Como conclusión general, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, cabe destacar que en la mayoría de los trabajos analizados donde se aborda el estudio del comportamiento en los niveles de EROS/sistema antioxidante, no se tiene en cuenta la edad del material vegetal utilizado, es decir, en que estadio de desarrollo se encontraba esa hoja al momento de la determinación/tratamiento. Como vimos, en el caso de soja, el estado redox fue particular de la fase de desarrollo, entonces el efecto de la aplicación de condiciones de estrés va a tener consecuencias diferentes, tanto a nivel de hoja como celular/organelar.

A partir del conocimiento generado en la presente tesis, las perspectivas de trabajo planteadas son las siguientes:

- Continuar indagando sobre el proceso de desarrollo hasta la muerte de la hoja, quizás avanzando un poco más en la senescencia, analizando particularmente la distribución intracelular de las EROs que podemos postularlas diferentes a las encontradas en estos estadios más tempranos del desarrollo foliar.
- Estudiar la modulación de la senescencia sobre el proceso de autofagia y su afectación por condiciones de estrés.
- Incidencia de la manipulación de genes asociados con senescencia, ya sea a nivel de factores de transcripción (los que mayores efectos producen, por actuar como llaves maestras de algunos procesos) como así también las isoformas específicas de las enzimas.
- Indagar sobre el comportamiento de hojas de distinta ubicación en la planta, esto nos permitiría extrapolar conocimientos a la planta entera, ya que el conocimiento del funcionamiento de las partes puede llevarnos al conocimiento del funcionamiento de sistemas complejos.
- Analizar otros niveles del control del estado redox, por ejemplo a nivel de miRNA o la incidencia del estado redox sobre controles epigenéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121–126.
- Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandre K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen, M, Jansson S and Peter Nilsson. 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol*. 5:4 R24.
- Apel K and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373-99
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*; 85:235-241.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:601-639.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141:391-396.
- Asada K and Takahashi M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam. 227-287.
- Asai S, Ichikawa T, Nomura H, Kobayashi M, Kamiyoshihara Y, Mori H, Kadota Y, Zipfel C, Jones JD and Yoshioka H. 2013. The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 288, 14332–14340.
- Asensio AC, Gil-Monreala M, Piresa L, Gogorcenac Y, Aparicio-Tejoa PM and Jose FM. 2012. Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *Journal of Plant Physiology*. 169: 1253–1260.

- Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K and Masclaux-Daubresse C. 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany*. 65 (14): 3799-3811
- Balazadeh S, Riano-Pachon DM and Mueller-Roeber B. 2008. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*. 10: 63–75.
- Ball MC and Anderson JM. 1986. Sensitivity of photosystem II to NaCl in relation to salinity tolerance. Comparative studies with thylakoids of the salt-tolerant mangrove, *Avicennia marina*, and the salt-sensitive pea, *Pisum sativum*. *Aust. Journal of Plant Physiology*. 13:689-698.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P and Buchanan BB. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:370-375.
- Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schuurmann P, Droux M and Buchanan BB. 2004. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2642-2647.
- Barber J. 2009. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chemical Society Reviews* 38, 185–196
- Baxter A, Mittler R and Suzuki N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*.. 65, 1229–1240.
- Beauchamp CO and Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta*; 317:50-4.
- Bedard K and Krause KH. 2007. The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 87, 245–313.

- Bernstein N, Silk W and Läuchli A. 1995. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress: possible role of some mineral elements in growth inhibition. *Planta* 196:699–705.
- Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK and Jahn TP. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 282:1183–1192.
- Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Xiang L, Rolland F and Van den Ende W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* 277:2022-2037.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C and Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany*. 53:1367-1376.
- Bowler C, VanMontagu M and Inze´ D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 83-116.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brautigam K, Dietzel L, Kleine T, Stroher E, Wormuth D, Dietz KJ, Radke D, Wirtz M, Hell R, Dormann P, Nunes-Nesi A, Schauer N, Fernie AR, Oliver SN, Geigenberger P, Leister D and Pfannschmidt T. 2009. Dynamic Plastid Redox Signals Integrate Gene Expression and Metabolism to Induce Distinct Metabolic States in Photosynthetic Acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 2715-2732.
- Broughton WJ and Dilworth MJ. 1971. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochemical Journal*. 125,1075-1080.
- Buchanan BB and Luan S. 2005. Redox Regulation in the Chloroplast Thylakoid Lumen: A New Frontier in Photosynthesis Research. *Journal of Experimental Botany*. 56:1439–1447.

- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K and Leaver CJ. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 42: 567–585.
- Buchanan-Wollaston V, Wellesbourne HRI and Warwick UK. 2003. Senescence leaves. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Elsevier Academic Press, Vol. 2. pp 808–816.
- Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf-senescence, *Journal of Experimental Botany*. 48:181–199.
- Casano L, Gómez L, Lascano H, González C and Trippi V. 1997. Active oxygen-induced inactivation and degradation of CuZn-SOD in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* . 38: 433-440.
- Casano L, Gomez L and Trippi V. 1990. Oxygen and light induced proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 31:377-382.
- Cazalé AC, Rouet-Mayer MA, Barbier-Brygoo H, Mathieu Y, and Christiane Laurière. 1998. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology*. 116, 659–669.
- Chaouch S, Queval G and Noctor G. 2012. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 69:613–627.
- Chen HJ, Huang CS, Huang GJ, Chow TJ and Lind YH. 2013. NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium and reduced glutathione mitigate ethenon-mediated leaf senescence, H₂O₂ elevation and senescence-associated gene expression in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Plant Physiology*. 170:1471-83.

- Choudhury S and Panda SK. 2004. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 30:95-110
- Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristema size in *Arabidopsis*. *Cell*. 89:575–585.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R and Tavladoraki P. 2006. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11:80–88.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G and Abdelhak EA. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 57 (3): 449-459.
- Crafts-Brandner SJ and Egli DB. 1987. Sink removal and leaf senescence in soybean. Cultivar effects. *Plant Physiology*. 85:662-666.
- Crafts-Brandner SJ, Hölzer R and Feller U. 1998. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum*. 102:192-200.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D and Van Breusegem F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal*. 33:621–632.
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM and Bolwell GP. 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell*. 24:275–287.
- Davies BJ. 1971. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Annals of the New York Academic Science*. 121:404-427.
- de Azevedo Neto A D, Tarquinio Prisco J, Enéas-Filho J, Braga de Abreu CE and Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and

- lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 56(1):87-94.
- De luca d'ORO and Trippi V. 1987. Effect of stress conditions induced by temperature, water and rain on senescence development. *Plant and Cell Physiology*. 28:1389-1396.
 - de Pinto MC, Francis D and De Gara L. 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*. 299(1):90-97.
 - de Pinto MC and De Gara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2559-2569.
 - del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E and Hernandez JA. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*. 116:1195–1200.
 - del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E and Hernández JA. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*. 116:1195-1200.
 - Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Hölzer R and Feller U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*. 52:253-266.
 - Dubey RS and Singh AK. 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum*. 42:233 – 239.
 - Dubiella U, Seybold H, Duriana G, Komandera E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX and Romeis T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:8744–8749.

- Dykens JA, Shick JM, Benoit C, Buettner GH and Winston GW. 1992. Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *Journal of Experimental Botany*. 168:219-241.
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O and Ludewig, U. 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochemical Journal*. 414:53–61.
- Edge R and Truscott T. 1999. Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. H. Frank, A. Young, G. Britton, R.J. Cogdell (Eds.). *Advances in Photosynthesis: The Photochemistry of Carotenoids*, vol. 8:223–234.
- Edwards EA, Enard C, Creissen GP and Mullineaux PM. 1993. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta*. 192:137-143.
- Efroni I, Eshed Y and Lifschitz E. 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* 22, 1019–1032.
- Egli DB. 2004. Seed-fill duration and yield of grain crops. *Advances in Agronomy* 83: 243-279.
- Ellis RJ. 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*. 4:241-244.
- Elstner EF, Saran M, Bors W and Legfelder E. 1978. Oxygen activation in isolated chloroplasts. Mechanism of ferredoxin-dependent ethylene formation from methionine. *European Journal of Biochemistry*; 89:61-66.
- Essa AT. 2002. Effect of Salinity Stress on Growth and Nutrient Composition of Three Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Cultivars. *Journal of agronomy and crop science*. 188:2 86-93.
- Essa, AT and Al-Ani DH. 2001: Effect of salt stress on the performance of six soybean genotypes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4, 175—177.
- Feller U, Anders I and Mae T. 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany*. 59(7):1615-1624.

- Feller U and Fischer A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13:241–273.
- Fenton HJ. 1894. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of Chemistry Society of London*. 65:899-910.
- Fenton HJ. 1899. Oxidation of certain organic acid in the presence of ferrous salts. *Proceedings of Chemistry Society*. 25:224.
- Fey V, Wagner R, Bräutigam K and Pfannschmidt T. 2005. Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany*. 56:1491–1498.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell J, Mylona P, Miedema H, Torres M, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones J, Davies J and Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422: 442–446.
- Foyer C and Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119:355–364.
- Foyer C.1993. Ascorbic acid. In: Alscher RG, Hess JL, eds. *Antioxidants in higher plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 31–58.
- Foyer CH and Noctor G. 2013. Redox Signaling in Plants. *Antioxidants and Redox Signaling*. 18(16):2087-2090.
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G and Noctor G. 2009. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60:455–484.
- Foyer CH and Noctor G. 2005(a). Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17:1866–1875.
- Foyer CH and Noctor G. 2005(b). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. 28:1056-71

- Foyer CH and Noctor G. 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11:861-905.
- Foyer CH And Noctor G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155:2–18.
- Foyer CH and Noctor G. 2013. Redox signaling in plants. *Antioxidant Redox Signal*. 18:2087–2090.
- Fridovich I. 1991. Molecular oxygen: friend and foe. In: *Active Oxygen/Oxidative stress and Plant Metabolism*. (Pell K, Steffen KL, eds.) American Society of Plant Physiologists, Maryland U.S.A., pp 1-5.
- Fry SC. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*. 332:507–515.
- Fry SC. 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews*. 3:97–111
- Gan S. 2003. Mitotic and Postmitotic Senescence in Plants *Science of Aging. Knowledge Environment*. 38(7):1-10.
- Gan S. 2010. The hormonal regulation of senescence, in *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* P.J. Davies, Editor. Springer Netherlands. pp, 597-617.
- Gan S and Amasino RM. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*. 113:313-319.
- Gan S and Hörtensteiner S. 2013. Frontiers in plant senescence research: from bench to bank. *Plant Molecular Biology* .82:503-504.
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B and Plieth C. 2004. Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiology*. 134:898–908.

- García-Limones C, Dorado G, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM and Tena M. 2009. Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. *Plant Biology*. 11:194-203.
- Geigenberger P. and Fernie AR. 2014. Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20(9):1389-421
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshher MF, Yariv I, Dor C and Bassani, M. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal*. 36:629–642.
- Gepstein S. 1988. Photosynthesis. In: Noode'n LD, Leopold AC (eds) *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press Publishers, San Diego, pp 85–109.
- Gillespie KM and Ainsworth EA. 2007. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols*. 2:871-874.
- Gregersen PL and Holm PB. 2007. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*. 5:192–206.
- Griffith O. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*. 106:207-12.
- Grill D, Tausz M and De Kok LJ. 2001. Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. In: De Kok LJ, ed. *Handbook of plant ecophysiology*, Vol. 2. Dordrecht: Kluwer.
- Grudkowska M and Zagdańska B. 2004 Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*. 51:609–624.
- Guan HP and Janes HW. 1991. Light regulation of sink metabolism in tomato fruit II. Carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiology*. 96:922-927.

- Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J and Masclaux-Daubresse C. 2013. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist*. 199:683–694.
- Guiboileau A, Rodnay S, Meyer C and Masclaux-Daubresse C. 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*. 333: 382–39.1
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataille M-P, Avice JC and 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*. 194:732–740.
- Guo Y, Cai Z and Gan S. 2004. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence *Plant, Cell and Environment*. 27: 521–549.
- Guo Y and Gan S. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*. 46 (4): 601-612.
- Guo Y and Gan S. 2014. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany*. 65(14): 3901-3913.
- Haber F and Weiss JF. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London*. 147:332–351.
- Hackenberg T, Juul T, Auzina A, Gwizdz S, Małolepszy A, Lehmann Nielsen K, Jørgensen JE, Hofius D, Van Breusegem F, Petersen M and Andersen SU. 2013. Catalase and its regulator NO CATALASE ACTIVITY 1 (NCA1) promote autophagy-dependent cell death in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25:4616–4626.
- Hajouj T, Michelis R and Gepstein S. 2000. Cloning and Characterization of a Receptor-Like Protein Kinase Gene Associated with Senescence. *Plant Physiology*. 124(3):1305-1314.

- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141:312-22
- Halliwell B and Gutteridge JMC. 2007. Reactive species can be poisonous. *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th ed, eds. By Halliwell, B and Gutteridge JMC, Oxford University Press, New York, pp. 440–487.
- Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B and Noctor G. 2013. Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18:2087–2090.
- Heath R and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 25:189-198.
- Herrmann B and Feller U. 1998. CO₂, light and temperature influence senescence and protein degradation in wheat leaf segments. *Physiologia Plantarum*. 103:320-326.
- Hideg E, Kálai T, Hideg K and Vass I. 1998. Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry*. 37:11405–11411
- Himelblau E. And Amasino RM. 2001. Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during senescence. *Journal of Plant Physiology* 158:1317–1323.
- Hohl M and Schopfer P. 1991. Water relations of growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiology*. 95:716–722.
- Hopkins M, Taylor C, Liu ZD, Ma FS, McNamara L, Wang TW and Thompson JE. 2007. Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytologist*. 175:201–214.

- Horemans N, Foyer CH, Potters G and Asard H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38(7): 531-540.
- Hörtensteiner S and Feller U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*. 53:927–937.
- Hosein B and Palmer G. 1983. The kinetics and mechanism of reduced ferredoxin by molecular oxygen and its reduced products. *Biochemical Biophysical Acta*. 723:383-390.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q and Xiong L. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt Tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. U.S.A. 103:12987–12992.
- Jammes F, Song C, Shin D, Munemasa S, Takeda K, Gu D, Cho D, Lee S, Giordo R, Sritubtim S, Leonhardt N, Ellis BE, Murata Y and Kwak JM. 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106.20520–20525.
- Jaspers P and Kangasjarvi J, 2010. Reactive Oxygen Species in Abiotic Stress Signaling. *Physiologia Plantarum*. 138:405–413.
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, DoChoi Y, Kim M. Reuzeau C and Kim JK. 2010. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*. 153:185–197.
- Jimenez MS, Gonzalez-Rodriguez AM, Morales D, Cid M.C, Socorro AR and Caballero M. 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for salt stress detection in roses. *Photosynthetica*. 3:291-301.

- Jinn TL, Stone JM and Walker JC. 2000. HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development*. 14:108–117.
- Johnson K and Lenhard M. 2011. Genetic control of plant organ growth. *New Phytologist*. 191:319–333.
- Johnson KL and Ingram GC. 2005. Sending the right signals: regulating receptor kinase activity. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:648–656.
- Juvany M, Müller M and Munné-Bosch S. 2013. Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image?. *Journal of Experimental Botany*. 64:3087–3098.
- Kanematsu S and Asada K. 1989. Cu/Zn superoxide dismutase in rice: Occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiology*. 30:381-391.
- Kao WY and Tsai TT. 1998. Tropic leaf movements, photosynthetic gas exchange, leaf $\delta^{13}C$ and chlorophyll a fluorescence of three soybean species in response to water availability. *Plant, Cell & Environment*. 21:1055-1062.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G and Mullineaux P. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *The Plant Cell*. 9: 624–640.
- Karpinski S, Szechynska-Hebda M, Wituszynska W and Burdiak P. 2013. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell & Environment*. 36:736–744.
- Katerji N, van Hoorn JW, Hamdy A and Mastrorilli M. 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management*. 43(1):99-109.
- Kinoshita T, Caño-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S and Chory J. 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433:167–171.

- Kliionsky DJ. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science*, 118, 7–18.
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N and Yoshioka H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*. 19:1065–1080.
- Kobe B and Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*. 11:725–732.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:509–540.
- Kolbe A, Oliver SN, Fernie AR, Stitt M, van Dongen JT and Geigenberger P. 2006. Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism. *Plant Physiology*. 141:412-422.
- Kourtis N and Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation*, 16(1):21-30.
- Krieger-Liszkay A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 56:337–346.
- Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T and Shibuya N. 1995. EPR evidence of generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor and protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*. 188:138–142.
- Kurusu T, Kimura S, Tada Y, Kaya H and Kuchitsu K. 2013. Plant signaling networks involving reactive oxygen species and Ca²⁺. In: Suzuki, M., Yamamoto, S. (Eds.), *Handbook on Reactive Oxygen Species (ROS): Formation Mechanisms, Physiological Roles and Common Harmful Effects*. Nova Science Publishers, Inc., NY, pp. 315–324.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.

- Laloi C, Apel K and Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:323-8.
- Lascano H, Casano L, Melchiorre M and Trippi V. 2001. Biochemical and Molecular Characterization of wheat leaf Glutathione Reductase. *Biologia Plantarum*. 44: 509-516.
- Lascano H, Melchiorre M, Luna C and Trippi V. 2003. Effect of photooxidative stress induce by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Science*. 164: 841-846.
- Latchman DS. 1997. Transcription factors: an overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 12(1):305-312.
- Lazof D and Bernstein N. 1998. The NaCl-induced inhibition of shoot growth: the case for disturbed nutrition with special consideration of calcium nutrition. *Advances in Botanical Research*. 29:113–189.
- Levine B, Klionsky DJ and Arbor A. 2004. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Autophagy*. 6:463-477.
- Li F, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS and Vierstra RD. 2015. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant cell*. 27:1389–1408.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE and Walker JC. 2002. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*. 110:213–222.
- Li J and Chory J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. 90:929–938.
- Li XP, Gan R, Li PL, Ma YY, Zhang LW, Zhang R, Wang Y and Wang NN. 2006. Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. 61:829–844.

- Li ZR, Wakao S, Fischer BB and Niyogi KK. 2009. Sensing and Responding to Excess Light. *Annual Review of Plant Biology*. 60:239–260.
- Lim PO, Kim HJ and Nam HG. 2007. Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58:115–136.
- Lim PO, Woo HR and Nam HG. 2003. Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 8(6):272-278.
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D and Durner J. 2010. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *The Plant Cell*. 22:2894–2907
- Liu X, Liu S, Wu J, Zhang B, Li X, Yan Y and Li L. 2013 Overexpression of *Arachis hypogaea* NAC3 in tobacco enhances dehydration and drought tolerance by increasing superoxide scavenging. *Plant Physiology and Biochemistry*. 70:354-359.
- Liu Y, Xiong Y and Bassham DC. 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*. 5(7):954-963.
- Livak J and Schmittgen D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. 4:402-408.
- Lobell DB, Sibley A and Ortiz-Monasterio JI. 2012. Extreme heat effects on wheat senescence in India. *Nature Climate Change*. 2(3):186-189.
- Marino D, Dunand C, Puppo A and Pauly N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science*. 17:9–15.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L and Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*. 105:1141-1158.
- McInnis SM, Desikan R, Hancock JT and Hiscock SJ. 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling cross-talk. *New Phytologist*. 172:221–228.

- Mehta RA, Fawcett TW, Porath D and Mattoo AK. 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*. 267:2810–2816.
- Menezes-Benavente L, Kernodle SP, Margis-Pinheiro M and Scandalios JG. 2004. Salt induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Redox Report*. 9:29–36.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F and Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61:4197–4220.
- Miller A, Schlagnhauser C, Spalding M and Rodermel S. 2000. Carbohydrate regulation of leaf development: prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco. *Photosynthesis Research*. 63:1–8.
- Miller BL and Huffaker RC. 1985. Differential induction of endoproteinases during senescence of attached and detached barley leaves. *Plant Physiology*. 78:442-446.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL and Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*. 2(84):45.
- Minibaeva FV and Gordon LK. 2003. Superoxide Production and the Activity of Extracellular Peroxidase in Plant Tissues under Stress Conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*. 50:411–416.
- Minibayeva F, Kolesnikov OP and Gordon LK. 1998. Contribution of a Plasma Membrane Redox System to the Superoxide Production by Wheat Root Cells. *Protoplasma*. 205:101–106.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7:405–410.
- Mittler RS, Vanderauwera M, Gollery F and Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9:490–498

- Moan J. 1990. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 6:343–347.
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C and Gilroy S. 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:20996–21001.
- Moore S and Stein W. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatographic of amino acid. *Journal of Biological Chemistry*. 176: 367-388.
- Mou Z, Fan WH and Dong XN. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113:935-944.
- Mulisch M and Krupinska K. 2013. Ultrastructural analysis of senescence associated dismantling of chloroplasts revisited. In *Plastid Development In Leaves During Growth and Senescence*. Springer Netherlands pp, 307-335.
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszkay A and Leubner-Metzger G. 2009. In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 150:1855–1865.
- Mullineaux P and Karpinski S. 2002. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:43–48.
- Munné-Bosch S, Queval G and Foyer CH. 2013. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiology*. 161:5–19.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Munns R and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59:651–681
- Muñoz, N, González C, Molina A, Zirulnik F and Luna C. 2008. Cadmium-induced early changes in $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 and antioxidative enzymes in soybean (*Glycine max L.*) leaves. *Plant Growth Regulation* 56: 159-166.

- Nam KH and Li J. 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203–212.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD and Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53:1237-47.
- Neto FJRC, Pandolfi V, Guimaraes FCM, Benko-Iseppon AM, Romero C, Silva RL, Rodrigues FA, Vilela Abdelnoor R, Lima Nepomuceno A and Akio Kido E. 2013. Early Transcriptional Response of Soybean Contrasting Accessions to Root Dehydration. *PLOS ONE* 8(12):83466.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT and Mitchison TJ. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 459:996–999.
- Nishimura MT and Dangl JL. 2010. Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant Journal*. 61:1053–1066.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H and Foyer C. 2002. Glutathione homeostasis and signaling: the influence of biosynthesis, compartmentation and transport. *Journal of Experimental Botany*. 53:1283–1304.
- Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, cell and environment*. 29(3):409-425
- Noctor G and Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:249–279.
- Noodén LD, Guiamét JJ and Isaac J. 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*. 101:746–753
- Novo-Uzal E, Fernández-Pérez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Bernal MA, Díaz J, Cuello J, Pomar F and Pedreño MA. 2013. From Zinnia to Arabidopsis: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*. 64:3499–3518.

- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Satoh K, Moumeni A, Venuprasad R and Serraj R. 2012. Comprehensive gene expression analysis of the NAC gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near isogenic lines(NILs) generated from crossing A day Selection (drought tolerant) and IR64. *Molecular Genetics and Genomics*. 287:389–410.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS and Bolwell GP. 2012 (b). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*. 236:765–779.
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM and Bolwell GP. 2012(a). A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*. 158:2013–2027.
- Onishi M, Tachi H, Kojima T, Shiraiwa M and Takahara H. 2006. Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 44:574-580.
- op den Camp RG, D. Przybyla, C. Ochsenbein, C. Laloi, C. Kim, A. Danon, D. Wagner, E. Hideg, C. Gobel, I. Feussner, M. Nater and Apel K. 2003. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15:2320–2332
- Pabo CO and Sauer RT. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*. 61:053-95.
- Pallett KE and Young AJ. 1993. Carotenoids. In: Alscher RG, Hess JL, eds. *Antioxidants in higher plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 91–110.
- Panchuk II, Volkov RA and Schöffl F. 2002. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 129:838-853.

- Papiernik SK, Grieve CM, Lesch SM and Yates SR. 2005. Effects of salinity, imazethapyr, and chlorimuron application on soybean growth and yield. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 36:951–967.
- Park, HJ, Miura Y, Kawakita K, Yoshioka H and Noriyuki Doke. 1998. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant and Cell Physiology*. 39:1218–1225.
- Parker MB, Gascho GJ, Gains TP. 1983. Chloride toxicity of soybeans grown on Atlantic Coast flatwoods soils. *Agronomy Journal*. 75:439–443.
- Passardi F, Penel C and Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*. 9:534–540.
- Pastori GM and del Rio LA. 1997. Natural senescence of pea leaves an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiology*. 113:411–418.
- Pazdernik DL, Killam AS and Orf JH. 1997. Analysis of amino and fatty acid composition in soybean seed, using near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*. 89:679–685.
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C and Smeekens S. 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*. 51:407–416.
- Petrov VD and Van Breusegem F. 2012. Hydrogen peroxide – a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*, pls014.
- Pfannschmidt T, Bräutigam K, Wagner R, Dietzel L, Schröter Y, Steiner S and Nykytenko A. 2009. Potential Regulation of Gene Expression in Photosynthetic Cells by Redox and Energy State: Approaches towards Better Understanding. *Annals of Botany*. 103:599–607.
- Pfannschmidt T. 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*. 8: 33-41.
- Phang TH, Shao GH and Lam HM. 2008. Salt tolerance mechanisms in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50:1196–1212.

- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD and Foyer CH. 2003. Function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*. 132:1631-1641
- Pignocchi C and Foyer CH. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* . 6:379–389.
- Pitman MG and Läuchli A. 2002. Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems in Salinity: Environment - Plants – Molecules. Pp 3-20.
- Pitzschke A, Forzani C and Hirt H. 2006. Reactive oxygen species signalling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8:1757-1764.
- Pogson BJ, Woo NS, Förster B and Small ID. 2008. Plastid Signalling to the Nucleus and beyond. *Trends in Plant Science*.13:602–609.
- Potters G, Horemans N and Jansen MAK. 2010. The cellular redox state in plant stress biology -A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48:292-300.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y and Jansen MAK. 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell and Environment*. 32:158–169.
- Purvis AC and Shewfelt RL. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?. *Physiologia Plantarum*: 88:712-718.
- Rao MV, Beverley AH and Ormrod DP. 1995. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiology*. 109:421-432.
- Rengasamy P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*. 57:1017–1023.
- Rizhsky L, Davletova, S, Liang, H and Mittler R. 2004. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*. 279:11736–11743.

- Rizhsky L, Liang H and Mittler R. 2003. The water–water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *Journal of Biological Chemistry*. 278:38921–38925.
- Robatzek S and Somssich IE. 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development*. 16:1139–1149.
- Rodriguez A, Grunberg K and Taleisnik E. 2002. Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology*. 129:1627–1632.
- Rodriguez A, Ortega L, Cordoba A and Taleisnik E. 2004. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *Journal of Experimental Botany*. 53:1383–1390.
- Rolland F, Moore B and Sheen J. 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell*. 14:S185–S205.
- Rouhier N and Jacquot JP. 2005. The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. 38:1413- 21
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW and Fluhr R. 2004. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell*. 16: 616–628
- Sagi M and Fluhr R. 2006. Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology*. 141:336-340
- Salim ML. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*. 72:681-689.
- Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. 101:7-12.
- Scandalios JG. 1994. Regulation and properties of plant catalases. In *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Foyer CH and Mullineaux P, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 275-315.

- Scandalios JG. 2002. Oxidative stress responses-what have genome scale studies taught us? *Genome Biol.* 3:1019.1-1019.6
- Schaedle M and Bassham J. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology and Biochemistry.* 59:1011-2.
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G and Wagner A. 2002. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214: 821–828.
- Schopfer P. 2001. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal.* 28:679–688.
- Schreiber U, Bilger W and Neubauer C. 1995. Chapter Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis in *Ecophysiology of Photosynthesis.* A 49-70. Springer Berlin Heidelberg.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH and Kang CM. 2008(a). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences.* 4(1):8-14.
- Shao N, Beck CF, Lemaire SD and Krieger Liskay A., 2008(b). Photosynthetic Electron Flow Affects H₂O₂ Signaling by Inactivation of Catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta.* 228:1055– 1066.
- Shao N, Krieger Liskay A, Schroda M and Beck CF. 2007. A Reporter System for the Individual Detection of Hydrogen Peroxide and Singlet Oxygen: Its Use for the Assay of Reactive Oxygen Species Produced In Vivo. *The Plant Journal.* 50:475–487.
- Shi YC, Fu YP and Liu WQ. 2012. NADPH oxidase in plasma membrane is involved in stomatal closure induced by dehydroascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry.* 51:26–30.
- Siddique S, Matera C, Radakovic ZS, Hasan MS, Gutbrod P, Rozanska E, Sobczak M, Torres MA and Grundler FM. 2014. Parasitic worms stimulate host

NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science Signaling*. 7(320):33.

- Singh MP, Singh DK and Rai M. 2007. Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidative enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 193:398–412.
- Skelly MJ and Loake GJ. 2013. Synthesis of redox-active molecules and their signaling functions during the expression of plant disease resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 19:990–997.
- Smillie RM and Nott R. 1982. Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiology*. 70:1049-1054.
- Smirnoff N, Conklin PL and Loewus FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52:437–467.
- Smith AM and Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment*. 30:1126–1149
- Stitt M and Zeeman SC. 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:282–292.
- Stone JM and Walker JC. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*. 108:451–457.
- Sumner JB and Somers GF. 1944. The water soluble polysaccharides of sweet corn. *Archives of Biochemistry*. 4:4-7.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R and Miller G. 2011(a). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*. 35:259-270
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA and Mittler R. 2011(b). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:691–699.

- Swanson S and Gilroy S. 2010. ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*. 138:384– 392.
- Szechyńska-Hebda M, Kruk J, Gorecka M, Karpinska B and Karpinski S. 2010 Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 22:2201–2218.
- Tada M, Shiraishi T, Yokoyama H, Ohya H, Ogata T and Kamada H. 2001. Nondestructive real-time monitoring of the redox status in a potted plant by using a surface-coil-type ESR resonator. *Chemistry Letters*. 30:1122-1123.
- Tada M, Shiraishi T, Takashine T, Ohya H and Ogata T. 2003. Direct observations of the redox states of frozen cherry buds by a unique in vivo ESR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310:72-77.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J and Dong X. 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*. 321:952–956.
- Tegeder M and Rentsch D. 2010. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular Plant*. 3:997–1011.
- Telfer A, Bishop SM, Phillips D and Barber J. 1994. Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*. 269:13244–13253.
- Telfer A. 2002. What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 357:1431–1439.
- Thoenen M, Herrmann B and Feller U. 2007. Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiologiae Plantarum*. 29:339-350.
- Tilman D, Balzer C, Hill J and Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:20260–20264.

- Torii KU. 2004. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology*. 234:1–46.
- Torres MA, Dangl JL and Jones JDG. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:517–522.
- Trippi V, Gidrol J and Pradet A. 1989. Effect of oxidative stress caused by oxygen and hydrogen peroxide on energy metabolism and senescence in oat leaves. *Plant and Cell Physiology*. 30:157-163.
- Trippi V and De luca d'ORO. 1985. The senescence process in oat leaves and its regulation by oxygen concentration and light irradiance. *Plant and Cell Physiology*. 26:1303-1311.
- Van Breusegem F and Dat J. 2006. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology*. 141:384-390
- Van den Ende W and Peshev D. 2013. Sugars as antioxidants in plants. In: Tuteja N, Gill SS, eds. *Crop improvement under adverse conditions*. New York: Springer Science + Business Media, 285–308.
- Van den Ende W and Valluru R. 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*. 60:9–18.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI and Kunze R. 2006. Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*. 141:776–792.
- Van Hardeen PDR and Kruger GHJ. 2002. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *Journal of Plant Physiology*. 159:1077–1086.

- Van Lijsebettens M and Clarke J. 1998. Leaf development in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 47–60.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D and Van Breusegem F. 2004. Catalase deficiency drastically affects high light-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 39:45–58
- Vanlerberghe GC. 2013. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:6805-6847
- Vierstra RD. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*. 32:275–302.
- Vranova E, Inze D and van Breusegem F. 2002. Signal Transduction during Oxidative Stress. *Journal of Experimental Botany*. 53:1227–1236.
- Walker JC. 1994. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*. 26:1599–1609.
- Wang Y and Nil N. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 75:623–627.
- Wasternack C and Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 72:165-221.
- Wasternack C and Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*. 2:302-307.
- Wilson KE, Ivanov AG, Öquist G, Grodzinski B, Sarhan F and Huner NPA. 2006. Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Canadian Journal of Botany*. 84:1355-1370.

- Wingler A, Purdy S, Edwards S, Chardon F and Masclaux-Daubresse C. 2010. QTL analysis for sugar-regulated leaf-senescence supports flowering-dependent and -independent senescence pathways. *New Phytologist*. 185:420–33.
- Wingler A and Roitsch T. 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*. 10:50-62.
- Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*. 322:681–692.
- Woo HR, Kim JE, Kim J, Kim J, Lee U, Song IJ, Kim JH, Lee HY, Nam HG and Lim PO. 2010. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 61(14): 3947–3957.
- Wrzaczek M, Brosché M and Kangasjärvi J. 2013. ROS signaling loops – roduction, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology*. 16:575–582.
- Wu J, Wang L, Wünsche H and Baldwin IT. 2013. Narboh D, a respiratory burst oxidase homolog in *Nicotiana attenuata*, is required for late defence responses after herbivore attack. *Journal of Integrative Plant Biology*. 55:187–198.
- Xie Q, Michaeli S, Peled-Zehavi H and Galili G. 2015. Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends in plant science*. 20(5):264-265.
- Xu F, Meng T, Li P, Yu Y, Cui Y, Wang Y, Gong Q and Wang NN. 2011. A Soybean Dual-Specificity Kinase, GmSARK, and Its *Arabidopsis* Homolog, AtSARK, Regulate Leaf Senescence through Synergistic Actions of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology*. 157:2131–2153.
- Yamaguchi T and Blumwald E. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*. 10:615–620.
- Zavaleta-Mancera HA, Franklin KA, Ougham HJ, Thomas H and Scott IM. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. Reappearance of NADPH-

protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* 50(340):1677-1682.

- Zhong H and Lauchli A. 1994. Spatial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition rates in the growth zone of primary cotton roots: effects of NaCl and CaCl₂. *Planta*. 194:34–41.
- Zhu XG, Long SP and Ort DR. 2010. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annual Review of Plant Biology*. 61:235–261
- Zimmermann P and Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 10: 515–534.