



**Universidad Nacional de Córdoba.
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.**

Tesina de grado para optar por el título de Biólogo

**PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN PROGRAMAS DE
RESISTENCIA SISTÉMICA EN *Arabidopsis thaliana***

Tesinista: Lacase Vendramini Luz A.

Firma:

Director: Dr. Robert German

Firma:

Co- director: Dr. Lascano Ramiro

Firma:

2023

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

*Participación de la autofagia en programas de resistencia sistémica en
Arabidopsis thaliana*

Alumno/a: Lacase Vendramini Luz Ariadna

Director/a: Dr. Robert German

Co-director/a: Dr. Lascano Ramiro

Tribunal Examinador

- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Nombre y Apellido: Firma:
- Calificación:.....
- Fecha:

Índice

Resumen	4
Palabras clave.....	4
Summary	5
Keywords.....	5
Introducción	6
Hipótesis	13
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	19
Discusión	30
Conclusión	33
Bibliografía	34

Resumen

Las plantas, luego de ser desafiadas por microorganismos (patógenos o benéficos) o compuestos derivados de los mismos, tienen la capacidad de inducir respuestas de resistencia sistémica de amplio espectro a interacciones posteriores, basadas en mecanismos de memoria o *priming* inmunológico. La autofagia, proceso de degradación y reciclado intracelular, desempeña un papel clave en las respuestas inmunes de las plantas. Sin embargo, su participación en el *priming* y respuestas de resistencia sistémica aún no ha sido completamente explorada. En este trabajo investigamos la respuesta de autofagia en *Arabidopsis thaliana* al ácido pipecólico (PIP), un metabolito inductor de *priming* y resistencia sistémica en plantas. Tratamientos con PIP afectaron la expresión de genes *Atg*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad autofágica en plantas reporteras de flujo autofágico. Asimismo, la inducción por PIP de la resistencia sistémica contra *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) se vio parcialmente afectada en mutantes autofágicos, en comparación con plantas silvestres. Esta respuesta podría deberse a que las mutantes *atg* presentan síntomas de senescencia foliar acelerada. En este sentido, la inducción de resistencia sistémica contra Psm en respuesta a PIP en plantas silvestres fue menor en hojas maduras/senescentes. Finalmente, resultados preliminares indican que los tratamientos con PIP confieren una mayor capacidad de homeostasis redox frente a un estrés oxidativo posterior, otra vez en forma dependiente de la etapa de desarrollo foliar. Estos primeros resultados sientan las bases para continuar investigando la participación de autofagia en el establecimiento y mantenimiento/duración del *priming* frente a microorganismos promotores de crecimiento vegetal y/o otros compuestos inductores de memoria inmunológica.

Palabras clave

Autofagia, Resistencia sistémica adquirida, Resistencia sistémica inducida, *Priming*, memoria inmunológica, Estado redox.

Summary

After being challenged by microorganisms (pathogenic or beneficial) or compounds derived from them, plants have the ability to induce broad-spectrum systemic resistance responses to subsequent interactions, based on mechanisms of memory or immunological priming. Autophagy, the process of intracellular degradation and recycling, plays a key role in plant immune responses. However, its involvement in priming and systemic resistance responses has not been fully explored. In this study, we investigated the autophagic response in *Arabidopsis thaliana* to pipercolic acid (PIP), a priming and systemic resistance-inducing metabolite in plants. PIP treatments affected the expression of Atg genes; however, no significant differences were found in the autophagic activity in reporter plants for autophagic flux. Similarly, PIP-induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) was partially affected in autophagic mutants compared to wild-type plants. This response could be attributed to the fact that *atg* mutants exhibit symptoms of accelerated leaf senescence. In this regard, the induction of systemic resistance against Psm in response to PIP in wild-type plants was lower in mature/senescent leaves. Finally, preliminary results indicate that PIP treatments confer enhanced redox homeostasis capacity against subsequent oxidative stress, again in a leaf development stage-dependent manner. These initial findings lay the groundwork for further investigating the involvement of autophagy in the establishment and maintenance/duration of priming against plant growth-promoting microorganisms and/or other inducers of immunological memory.

Keywords

Autophagy, Acquired systemic resistance, Induced systemic resistance, Priming, immunological memory, Redox state.

Introducción

Los mecanismos de defensa de las plantas incluyen aspectos físicos y químicos constitutivos, como la cutícula cerosa, la pared celular y las saponinas (Agrios, 2005); como así también señales moleculares que componen la inmunidad innata o basal, basada en el reconocimiento de moléculas foráneas (Spoel & Dong, 2012; Baggs et al., 2017), y la adquirida o inducible (Fu & Dong, 2013). El reconocimiento de los microorganismos patógenos o no; está principalmente mediado por dos tipos de proteínas: los receptores de reconocimiento de patrones (**PRRs**), localizados en la membrana plasmática y responsables de detectar los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs; o PAMPS cuando se refieren específicamente a patógenos) (Macho & Zipfel, 2014), y las proteínas de resistencia (**proteínas R**), usualmente intracelulares, que reconocen efectores específicos utilizados por patógenos para promover su virulencia (Jones & Dangl, 2006). Los patrones moleculares asociados a microbios (**MAMP**), como la quitina y la flagelina, son elicitores microbianos genéricos. Dado que los componentes MAMP son estructurales, no son específicos de la cepa o especie, no contribuyen a la virulencia y se encuentran tanto en organismos patógenos como no patógenos (Jones & Dangl, 2006; Thomma et al., 2011). La activación de los PRRs induce la inmunidad desencadenada por PAMPs (**PTI**) (Eitas & Dangl, 2010). La activación de la inmunidad de tipo PTI inicia una cascada de señales que conduce a una respuesta de resistencia basal, lo que restringe el crecimiento del patógeno (Ausubel, 2005). Algunos patógenos pueden superar este nivel de resistencia secretando proteínas efectoras que interfieren con el metabolismo del hospedero y promueven su virulencia (Jones & Dangl, 2006). Sin embargo, las plantas que han desarrollado la inmunidad activada por efectores (**ETI**), son capaces de reconocer estos efectores o sus acciones y responder a los mismos, lo que conduce a la resistencia completa, denominada respuesta hipersensible, sin producir ningún síntoma extra de la enfermedad (Burbano-Figueroa, 2020). Las proteínas en la planta capaces de reconocer los efectores son conocidas como proteínas R. La mayoría de estas proteínas R son intracelulares del tipo receptores abundantes en leucina con dominios de unión a nucleótidos (NBS-LRR o NLRs).(Jones & Dangl, 2006, Jones et al., 2016). La respuesta hipersensible culmina en la muerte celular programada rápida del tejido infectado y del tejido circundante que restringe la dispersión del patógeno (Caplan et al., 2008). Si los efectores no son reconocidos por la planta, son capaces de suprimir la respuesta del primer nivel, facilitando así el proceso de infección y colonización.

La percepción de los microorganismos no solo induce respuestas locales sino también una resistencia sistémica persistente y de amplio espectro (Fu & Dong, 2013; Pieterse et al., 2014; Klessig et al., 2018). La resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) son programas de resistencia sistémica activados en función del lugar de inducción y el estilo de vida del microorganismo inductor. En términos generales, la SAR es inducida por patógenos que interactúan con las hojas (Conrath et al., 2015), mientras que la ISR es inducida por microbios beneficiosos que interactúan con las raíces (Fu & Dong, 2013). La activación de los receptores PRR y NLR desencadenan tanto respuestas locales como la activación de las vías SAR dependientes de ácido salicílico (SA) (Malamy et al., 1990) y ácido pipecólico (PIP). La SAR puede ser desencadenada por la generación de señales móviles, la acumulación de ácido salicílico y la secreción de proteínas antimicrobianas relacionadas con la patogénesis (**PR**), caracterizadas por promover la supervivencia celular (Fu & Dong, 2013). A nivel celular, la aparición de SAR se asocia con una reprogramación transcripcional masiva, que depende del cofactor de transcripción NPR1 (Pieterse et al., 2004). En la vía SAR dependiente de SA (Gaffney et al., 1993), este compuesto se acumula tanto a nivel local como sistémico, moviéndose a través de la ruta apoplástica y contribuyendo así a la propagación de la señalización de defensa a larga distancia. Esta cooperación en la señalización de defensa se lleva a cabo en conjunto con otras moléculas señalizadoras, donde las especies reactivas del oxígeno y el calcio juegan un rol clave (Baxter et al., 2014).

La vía dependiente de PIP en la SAR es de mayor complejidad. Se sugiere que esta vía podría estar influenciada por la luz, ya que el PIP se sintetiza en los cloroplastos mediante un proceso en dos pasos mediado por las enzimas ALD1 y SARD4 (Ding et al., 2016; Hartmann et al., 2017). Luego de ello es convertido fuera del cloroplasto en N hidroxipip (NHP), derivado bioactivo, por acción de la enzima FMO1 (Hartmann et al., 2018). Se ha establecido que ALD1 no es esencial para la SAR a nivel local, pero juega un papel crucial en la percepción o propagación de las señales SAR en los tejidos sistémicos. Por otro lado, se ha constatado que la función de SARD4 es exclusivamente distal (Wang et al., 2018). Se ha determinado que PIP opera aguas arriba del óxido nítrico (NO) → especies reactivas de oxígeno (ROS) → ácido azelaico (AzA) → gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en funciones sistémicas (Chanda et al., 2011; Yu et al., 2013; Wang et al., 2014; Gao et al., 2014). Asimismo, Wang et al. (2018) indican que PIP es capaz de trasladarse desde el tejido local hacia el distal durante la señalización de la SAR, sin embargo, por sí solo no es suficiente para inducir la respuesta sistémica completa. Los roles sistémicos de G3P y SA podrían

contribuir al establecimiento de la SAR mediante la estimulación del PIP en el tejido sistémico. Concluyen que es posible que la SAR se base en un fortalecimiento mutuo de las vías SA y Pip/NHP.

La inmunidad sistémica usualmente está asociada a un estado de alerta de la planta denominado "priming" o memoria inmunológica, lo que permite a la planta reactivar sus defensas de manera más rápida y eficiente ante infecciones futuras (Parker, 2009; Jung et al., 2009; Cecchini et al., 2015; Conrath et al., 2015), sin mantener la inducción constitutiva de estas vías lo que requeriría un alto consumo de energía (Martinez-Medina et al., 2016) (Fig. 1). Esto confiere una mayor resistencia sin una reducción significativa del crecimiento de la planta o la producción de semillas (van Hulst et al., 2006), colocando al priming como un sistema regulatorio importante para aumentar el *fitness* bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, mientras que genera un menor costo energético (Flors et al., 2008; Martinez-Medina et al., 2016; Mauch-Mani et al., 2017). En la actualidad, muchos esfuerzos se dirigen a estudiar cómo distintos inductores logran un "priming" efectivo para así mejorar la productividad y sanidad de los cultivos y lograr una agricultura sostenible mediante el uso de bioinsumos (Balmer et al., 2015).

La inmunidad no autónoma de amplio espectro o "priming" consiste en una serie de mecanismos fisiológicos, transcripcionales, metabólicos y epigenéticos por los cuales diversos tipos de estímulos, biológicos y químicos, desencadenan señales de advertencia sin una inducción específica de genes de defensa (Mauch-Mani, 2017). Es posible inducir el estado de priming mediante el tratamiento exógeno con algunos compuestos (Shah et al., 2013; Ádám et al., 2018). Muchas de estas moléculas son posibles señales móviles requeridas para establecer SAR y/o ISR (Vlot et al., 2021), entre los que se encuentran el ácido β -aminobutírico (BABA), AzA, G3P, PIP o su derivado activo NHP (Zimmerli et al., 2000; Ton et al., 2005; Jung et al., 2009; Wu et al., 2010; Návarová et al., 2012; Chen et al., 2018; Hartmann et al., 2018; Wang et al., 2018; Cecchini et al., 2019). Se reconoce a PIP como un inductor químico del priming (Návarová et al., 2012) e impulsor significativo de los cambios transcripcionales que ocurren durante la SAR (Hartmann et al., 2018). Asimismo, estudios recientes destacan el rol clave de la señalización redox sistémica rápida en la mediación de la aclimatación y defensa de la planta durante diferentes estreses abióticos y bióticos (Fichman & Mittler, 2020; Bleau & Spoel, 2021).

Martinez-Medina et al. (2016) presentan un modelo de preparación de las defensas o *priming*, evaluando el equilibrio costo-beneficio asociado a las defensas de las plantas (Fig. 1). En él definen 4 criterios para establecer si el primeado está presente: (A)

Memoria: es necesario el estímulo de priming y luego el de estrés para afirmar la memoria en ausencia de marcadores moleculares. Durante el primeado y en el estado de priming (antes del estrés desencadenante), se espera que las defensas de las plantas sean sólo transitorias y débilmente inducidas. (B) Bajos costos de aptitud: el mantenimiento del estado primeado tiene bajos costos de fitness en comparación con la activación directa de la defensa. Midiendo al fitness como producción de semillas, número de flores, calidad y número de granos de polen, crecimiento de la planta, entre otros. (C) Una respuesta de defensa más sólida: en respuesta al estrés desencadenante, las plantas preimeadas movilizan las defensas celulares de una manera más rápida, temprana, fuerte y/o más sostenida que las plantas no preimeadas. (D) Mejor rendimiento: se espera que las plantas preparadas se defiendan mejor contra un factor estresante determinado.

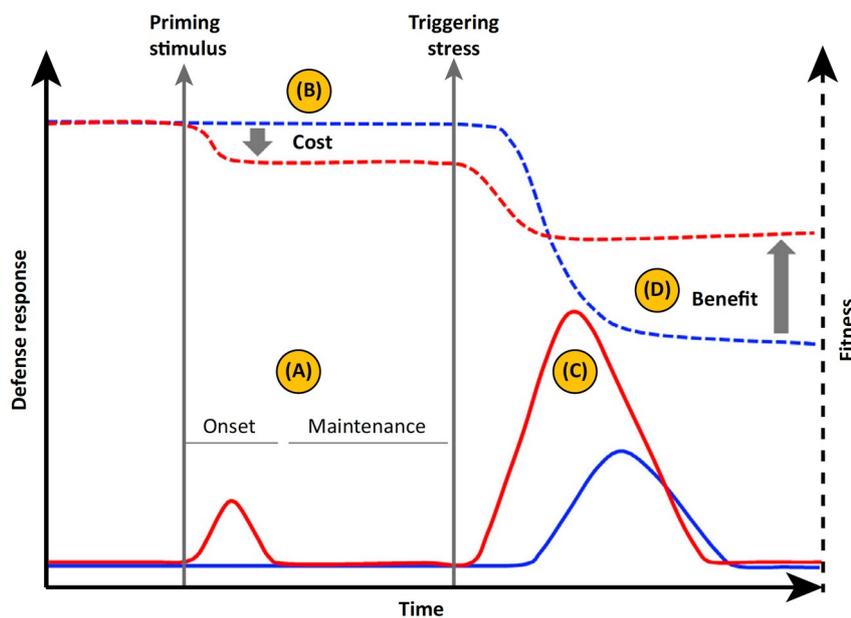


Fig. 1. Esquema de la relación entre las respuestas de defensa (líneas continuas) y la aptitud (líneas discontinuas) en plantas imprimadas (rojas) versus no imprimadas (azules).
 Extraído de Martínez-Medina et al. (2016)

En la estabilización y mantenimiento de la memoria celular y *priming* están involucrados procesos como la alteración de cromatina, niveles de metilación del ADN y modificaciones en las histonas, eventos de fosforilación secuencial, acumulación de formas inactivas de hormonas relacionadas con la defensa, quinasas señal inactivas (MAPKs), cambios en la expresión de genes de factores de transcripción y cambios en abundancia y localización de receptores de reconocimiento de patrones para una mayor eficiencia en respuestas de defensa (Conrath et al., 2006; Beckers et al., 2009; Tateda et al.,

2014; Gamir et al., 2014; Cecchini et al., 2015a; Conrath et al., 2015; Tsuda & Somssich, 2015; Baum et al., 2019). Además, ha sido reportada la relevancia de procesos implicados en la degradación de componentes celulares -específicamente la autofagia- en el restablecimiento de la bioquímica celular una vez que el estrés desaparece y, por lo tanto, cumpliendo funciones críticas en la memoria celular (Sedaghatmehr et al., 2019; Rodriguez et al., 2020).

La autofagia es un proceso intracelular de degradación en células eucariotas que transporta proteínas, complejos proteicos, y organelas hacia la vacuola. Bajo condiciones favorables, el flujo autofágico permanece en niveles basales correspondientes a las funciones de “limpieza interna” pero durante periodos de estrés o hambre, aumenta el flujo para promover la supervivencia celular, el reciclado de proteínas y organelas dañadas y la redistribución de nutrientes y energía (Rabinowitz & White, 2010; Mathew & White, 2011). La autofagia se clasifica en dos tipos, macroautofagia y microautofagia. En esta Tesina, nos centramos en macroautofagia, proceso al cual denominaremos de ahora en más como autofagia. Durante la autofagia los componentes y orgánulos citoplasmáticos se encapsulan en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana vacuolar, liberando una estructura de membrana interna conocida como cuerpo autofágico en el lumen vacuolar, donde se degrada mediante hidrolasas residentes (Han et al., 2011). Este proceso es mediado por 32 genes de autofagia (genes ATG) (Barth et al., 2001; Klionsky et al., 2003; Kanki et al., 2009; Nakatogawa et al., 2009; Okamoto et al., 2009), que se pueden dividir en tres grupos funcionales: el sistema de reciclaje ATG9, el complejo de nucleación ATG6/Beclin1 y PI3K/VPS34, y dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina (Xie & Klionsky, 2007; Avin-Wittenberg et al., 2011). En términos generales, el proceso de autofagia se compone de tres pasos generales:

Iniciación: La proteína AtTOR, que actúa aguas abajo o en una vía paralela a la NADPH oxidasa, inicia este proceso al desasociarse del complejo ATG13-ATG1 (Seay et al., 2009; Liu & Bassham, 2010).

Nucleación: El complejo PI3K contiene una subunidad catalítica esencial para la actividad quinasa (Bassham et al., 2006). ATG6/Beclin1 es necesaria para la nucleación de las vesículas autofagosómicas y actúa como andamio para la actividad de PI3K (Liu et al., 2005).

Formación del autofagosoma: Los sistemas de conjugación ATG8-PE y ATG5-12-16 son las dos vías similares a la ubiquitina que operan durante la expansión de la membrana del

autofagosoma y la captura de la carga (Klionsky, 2005; Thompson & Vierstra, 2005). La conjugación de ATG8 con fosfatidil etanolamina (PE) se inicia por la acción de ATG4, una cisteína proteasa que escinde el extremo C de ATG8 exponiendo los residuos de glicina, luego ATG7 activa la transferencia de ATG8 a la enzima ATG3 para formar finalmente ATG8-PE (Ichimura et al., 2000). El sistema de conjugación ATG5-12-16 es catalizado por ATG7 y ATG10 (Ichimura et al., 2000; Phillips et al., 2008)

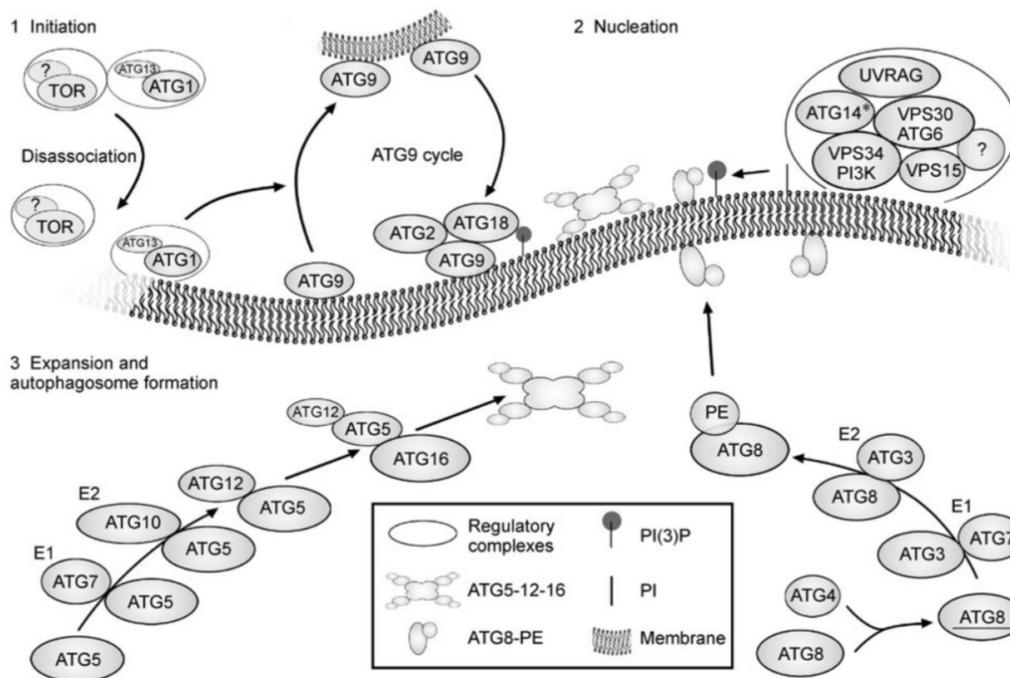


Fig. 2. Extraída de S. Han et al. (2011)

Existe un tipo de autofagia denominada autofagia selectiva, la misma consiste en la eliminación de “blancos” específicos: peroxisomas (pexofagia), retículo endoplásmico (ER, erfagia), ribosomas (ribofagia), lípidos (lipofagia), microorganismos (xenofagia) y mitocondrias (mitofagia) (Klionsky et al., 2016), en ella participan receptores tipo sequestosoma-1 (SLR)(Deretic, 2012). Las SLR se unen al cargo a degradar y pueden facilitar la expansión de la membrana del autofagosoma (fagóforo) mediante interacciones multivalentes con proteínas ATG8 (Johansen y Lamark, 2020), un ejemplo de éstas es NBR1 (Kirkin et al., 2009; Waters et al. , 2009).

Al inhibir los sistemas de conjugación se genera una autofagia deficiente lo que genera una reducción en la resistencia al estrés y una senescencia acelerada. Los mutantes con

sobreexpresión constitutiva ATG5 y ATG7 de *Arabidopsis* desarrollan actividad de los dos sistemas de conjugación, formación de autofagosomas y flujo autofágico, derivando en la supresión del envejecimiento y estimulación fuerte del crecimiento y resistencia al estrés (Minina et al., 2018). Se conoce que la autofagia tiene participación frente a diferentes tipos de estreses bióticos. Desempeña un papel en las respuestas de las plantas a los patógenos necrotrofos; en mutantes de autofagia *Arabidopsis* (*atg5*, *atg7* y *ATG18a*) se vio que en la muerte celular necrótica inducida por patógenos facilita un mayor crecimiento de estos (Lenz et al., 2011a; Lai et al., 2011). Lenz et al. (2011b) muestra un rol de autofagia como regulador negativo de la inmunidad dependiente de SA al patógeno hemibiotrófico Pst DC3000. Estos estudios sumados a los de Wang et al. (2011a, 2011b) indican que la autofagia podría estar contribuyendo a la resistencia basal aunque su rol sería dependiente del entorno y tipo de patógeno. Es conocido el rol de la autofagia en el control de la muerte celular durante la respuesta hipersensible (HR). La autofagia regula negativamente la muerte celular a través de la señalización de SA dependiente de NPR1 durante la senescencia y la respuesta inmunológica innata (Yoshimoto et al., 2009). Lenz et al. (2011b) informaron que las mutantes *atg* tienen niveles más altos de SA y una mayor expresión génica dependiente de SA. Asimismo, el fenotipo de muerte celular en expansión se encuentra presente en los mutantes de autofagia mayoritariamente en las hojas más maduras de las plantas. La dependencia de la edad parece estar relacionada con los niveles diferenciales de ácido salicílico (SA) y de ROS (Yoshimoto et al., 2009). Sin embargo, a pesar de las evidencias que vinculan a la autofagia con los mecanismos de inmunidad en plantas, el rol de este procesos en la resistencia sistémica está aún inexplorado.

Hipótesis

En función de lo expuesto anteriormente, planteamos como hipótesis que el proceso de autofagia está implicado en los programas de resistencia sistémica/priming en plantas de *Arabidopsis*.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la participación del proceso de autofagia durante la inducción de programas de resistencia sistémica/priming en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el proceso de autofagia durante la inducción de programas de resistencia sistémica/priming en plantas transgénicas reporteras de autofagia en diferentes estados de desarrollo.
2. Caracterizar el estado redox del citoplasma y de cloroplastos en diferentes estados de desarrollo de plantas de *Arabidopsis* durante la inducción de programas de resistencia sistémica/priming.
3. Investigar la inducción de programas de resistencia sistémica en plantas silvestres y líneas mutantes de autofagia en diferentes estados de desarrollo.

Materiales y métodos

Análisis in silico de expresión de genes relacionados a autofagia en tratamientos con ácido piperónico e hidroxí ácido piperónico

Se realizó una búsqueda de trabajos científicos en repositorios públicos de datos de expresión de genes de tipo microarray, de tratamientos con PIP e Hidroxí PIP en plantas *Arabidopsis thaliana*. Se seleccionaron datos de expresión de aquellos genes que codifican la maquinaria autofágica o están reportados como reguladores del proceso, se utilizaron los trabajos de Hartmann et al. (2018) y Yildiz et al. (2021).

- **Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamiento con PIP** (Hartmann et al., 2018)

Utilizaron plantas *Arabidopsis thaliana* Col-0 individuales tratadas con 1 mM PIP. Determinaron la respuesta transcripcional en hojas un día después a nivel del genoma completo mediante análisis de secuenciación de ARN en relación con plantas no tratadas.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron cultivadas individualmente en macetas que contenían una mezcla de tierra, vermiculita y arena (8:1:1) en una cámara de cultivo controlado con un día de 10 h (9 AM a 7 PM; densidad de flujo de fotones 100 mol/ m².s) / ciclo nocturno de 14 h y una humedad relativa del 70 %. Las temperaturas diurnas y nocturnas se fijaron en 21°C y 18°C, respectivamente.

Los experimentos se realizaron con plantas de 5 a 6 semanas de edad que presentaban una apariencia uniforme.

Los tratamientos con PIP se realizaron esencialmente como se detalla en Návarová et al. (2012). Se pipetearon 10 ml de una solución acuosa 1 mM de PIP sobre el suelo de plantas cultivadas individualmente. En los tratamientos testigo se aplicaron 10 ml de agua. Se realizaron tres experimentos replicados biológicamente independientes. En cada experimento, se agruparon al menos 4 hojas completamente desarrolladas de 6 plantas diferentes 24 horas después del tratamiento con PIP o agua para una réplica biológica. De esta forma se obtuvieron 3 muestras replicadas biológicamente independientes por tratamiento.

- **Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos con NHP y PIP** (Yildiz et al., 2021)

Cultivaron plantas individuales de *Arabidopsis thaliana* en macetas llenas de una mezcla de tierra, vermiculita y arena (8:1:1) con un ciclo de 10 h-día /14 h-noche con una densidad de flujo de fotones de 100 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ durante el día y una humedad relativa del 60%. Las temperaturas diurnas y nocturnas se fijaron en 21°C y 18°C, respectivamente.

Los experimentos se realizaron con plantas de 5 semanas de edad. Las plantas individuales se regaron con 10 mL de 1 mM NHP, 10 mL de 1 mM PIP o 10 mL de H₂O, y se cosecharon tres hojas por planta un día después para los análisis de RNA-seq. El análisis se basó en tres muestras independientes de ARN de hojas por tratamiento.

- **Análisis estadísticos** (se repite en los demás experimentos)

Para el análisis de resultados se utilizó el software R y los estadísticos T- student

Flujo autofágico con inducción de SAR

- **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron plántulas *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, pCAMV35s:GFP-ATG8a (N39996), reporteras de autofagia (Thompson & Vierstra, 2005). Las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 2% en agitación constante por 10 minutos, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril. Se sembraron en placas de Petri conteniendo aproximadamente 25 ml medio MS sólido (1% p/v agar) con nitrato, sin sacarosa. Fueron crecidas en cámara de cría 7 días bajo condiciones controladas de luz 120 $\mu\text{moles/m}^2\text{s}^2$ (continua, a fin de evitar las oscilaciones de autofagia, propias de los ciclos luz/oscuridad) y temperatura 22 ± 2 °C.

- **Tratamientos**

En plántulas de 7 días post siembra se realizaron tratamientos de inmersión durante una hora, en PIP (1mM) y H₂O como control. Para ello se extrajeron las plantas del medio y colocaron en recipientes con el respectivo contenido. Luego se pasaron a agua por 24hs para propiciar la inducción de autofagia. Por último se congelaron en nitrógeno líquido para los análisis de inmunoblot.

- **Extracción de proteínas, electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e westernblot.**

Se cuantificaron las proteínas mediante método Lowry (Lowry et al., 1951) con lector de placa BioTek Synergy H1, para ello se homogeneizaron las muestras en buffer de extracción de proteínas y centrifugaron a 12.000 rpm / 10 min / 4°C.

En la corrida electroforética se utilizó gel de poliacrilamida al 12% donde se sembraron 40 y 50 μg de proteína por calle. La corrida se realizó a 100V durante 40 min y 130 V una hora. Luego se transfirió a una membrana de PBDF durante 1h 30 min a 80 V cte o 400 mA cte. Para el inmunoblot se utilizó un anticuerpo primario anti-GFP de conejo y anticuerpo secundario anti conejo marca Agrisera.

Se reveló con fosfatasa alcalina y se realizó Coomassie Gel Staining como control de carga de los carriles.

Medición de crecimiento de raíz

- Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas Col-0 y mutantes constitutivas *atg5-2* y *atg2* y selectivas *nbr-1* de autofagia. Se replicaron las condiciones de crecimiento descritas en “Flujo autofágico con inducción de SAR” con modificación del ciclo de luz 12/12 (12 horas de luz/12 horas de oscuridad).

- Tratamientos

Los medios de crecimiento fueron suplementados con PIP 1 mM o H₂O, como control.

- Análisis de los datos

Se utilizó el software ImageJ para determinar el largo de la raíz principal.

Análisis de resistencia sistémica adquirida

- Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para cada ensayo se analizaron y promediaron 6 plantas individuales por tratamiento de los genotipos *nbr-1*, *atg5*, *atg2* y Col-0. Las semillas se estratificaron 3 días y sembraron en macetas llenas de una de tierra y vermiculita 1:1 a 22 ± 2 °C en condiciones de crecimiento de día estándar (ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad).

- Tratamientos

Al día 31 post siembra se realizó tratamiento de subirrigación, durante una hora, con PIP 1 mM y agua como control (300 ml x bandeja). Luego de 24 h de los tratamientos se infectaron las hojas 3, 4, 7 y 8 con la bacteria virulenta *P. syringae pv. maculicola* (5x10⁵ UFC/ml) por la cara abaxial. Luego de 72hs se cortaron discos de estas hojas luego de 72 h, se homogeneizaron en MgCl₂ 10mM y plaquearon realizando diluciones seriadas. Las placas de petri se colocaron a 28 ± 2 °C para realizar determinación de UFC/cm de hoja a las 72 h post infección.

Caracterización de la expansión foliar

- Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se analizaron entre 17 y 19 plantas de *Arabidopsis thaliana* correspondientes a los genotipos silvestre Col-0 y mutantes *nbr-1* y *atg5-2*. Se replicaron las condiciones de crecimiento descritas en “Análisis de resistencia sistémica adquirida”. Se tomaron

fotografías de las plantas los días 21, 24, 27 y 31 post-siembra junto con una escala de referencia para su posterior medición.

- **Análisis de los datos**

Se utilizó el software ImageJ para determinar el área foliar de todas las hojas de nuestras plantas y determinar nuestras hojas de interés para el estudio.

Caracterización del estado redox

- **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se analizaron 8 plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para caracterizar el estado redox de citoplasma y cloroplasto se utilizaron plantas transgénicas que expresan la construcción GRX-roGFP2 dirigida a esas localizaciones subcelulares (Schwarzländer et al., 2016). Estos sensores se basan en una proteína GFP modificada capaz de emitir fluorescencia en las longitudes del 405 (oxidada) o 488 (reducida) dependiendo de la formación de puentes disulfuro en la misma (Schwarzla et al., 2015). Se replicaron las condiciones de crecimiento descritas en “Análisis de resistencia sistémica adquirida”.

- **Tratamientos**

Al día 31 post siembra se realizaron tratamiento de subirrigación con ácido pipercolico (1 mM) y agua (400 ml x bandeja) durante una hora a cada uno de los genotipos. Luego de 24 h se cortaron discos de hojas 3, 4, 7 y 8 y colocaron en placas multiwell con la cara adaxial hacia arriba, procediendo a medir su absorbancia mediante lector de placa BioTek Synergy H1. Se realizaron mediciones sucesivas en tratamientos con H₂O, 20 mM H₂O₂ a tiempo cero y 150 mM H₂O₂ a los 20 min.

Flujo autofágico diferencial por estado de desarrollo

- **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, pCAMV35s:GFP-ATG8a (N39996), reporteras de autofagia (Thompson & Vierstra, 2005). Se replicaron las condiciones de crecimiento descritas en “Análisis de resistencia sistémica adquirida”.

- **Tratamientos**

Al día 31 post siembra se realizó tratamiento de subirrigación con ácido pipercolico (1 mM) y agua (300 ml x bandeja) durante una hora a cada uno de los genotipos. Luego de 24 h de los tratamientos se inocularon las hojas 3, 4, 7 y 8 con la bacteria virulenta *P. syringae* pv. *maculicola* (5x10⁵ UFC/ml) por la cara abaxial. Se cortaron 2 discos de estas hojas luego de 24 h y se cuantificaron las proteínas mediante lector de placa BioTek

Synergy H1, para ello se homogeneizaron las muestras en buffer de extracción de proteínas y centrifugaron a 12.000 rpm / 10 min / 4°C.

Para la corrida se utilizó gel de poliacrilamida 12% donde se sembraron 30 µg de proteína por well. La corrida se realizó a 100 V durante 40 min y 130 V una hora. Luego se transfirió a una membrana de MDF durante 1h 10min a 80 V cte o 400 mA cte. Se utilizó el anticuerpo primario anti-GFP de rabbit y anticuerpo secundario anti rabbit marca Agrisera.

Por último se reveló con fosfatasa alcalina. Se realizó Ponceau Stain como control de carga de los carriles.

Análisis de flujo autofágico en plantas tratadas con ácido pipecólico.

Para continuar con el estudio de los efectos del PIP sobre el proceso de autofagia, se realizó una cuantificación de flujo autofágico en plántulas de *Arabidopsis thaliana* reporteras del proceso que expresan la construcción 35S:GFP-ATG8a (GFP-ATG8), en respuesta a tratamientos con PIP 1 mM. Plantas transgénicas GFP-ATG8 de siete días de edad fueron sometidas a tratamientos de inmersión en PIP 1 mM o H₂O como control, durante 1 h. Luego, las plántulas fueron transferidas a cápsulas con agua durante 24 h. Éste último paso tuvo el objetivo de propiciar la inducción de autofagia, ya que se conoce que el flujo autofágico en plantas crecidas en condiciones control es bajo, y por lo tanto, potenciales efectos inhibitorios del tratamiento no serían fácilmente visualizados, tal como el grupo ha reportado recientemente (Enet et al., 2023). El flujo autofágico fue estimado mediante análisis de Western Blot con anticuerpo anti-GFP, analizando la relación entre los niveles de la fusión GFP-ATG8 (~40 kDa) y GFP libre (~25 kDa). No se observaron diferencias significativas en el flujo autofágico entre plantas tratadas con PIP y el control (Fig 5).

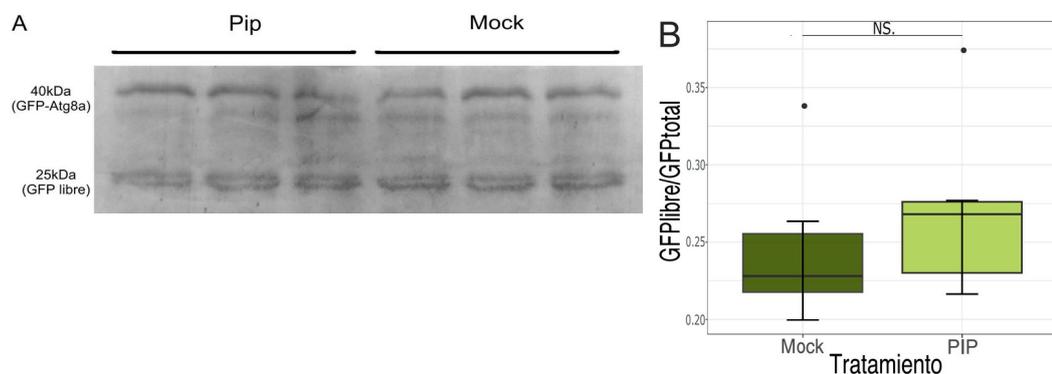


Fig. 5: Efecto del tratamiento con ácido pipecólico en el flujo autofágico. Plantas transgénicas que expresan 35:GFP-ATG8a de 7 días sembradas y crecidas en placas de Petri en medio MS sólido, con tratamientos de inmersión en ácido pipecólico 1 mM y H₂O como control durante una hora. Se realizaron 3 réplicas biológicas y dos experimentales, con un total de 6 réplicas por tratamiento. A. Análisis de Western Blot con anticuerpo anti-GFP, mostrando la relación entre la fusión GFP-ATG8a (~40 kDa) y GFP libre (~25 kDa). B. Densitometría del ensayo de clivaje de GFP-ATG8a en A. GFP libre fue expresado como porcentaje del contenido de GFP total en cada muestra. La estadística realizada fue Test-t entre tratamientos, NS indica diferencia no significativa.

Evaluación de la acción de PIP en el crecimiento de la raíz

En *Arabidopsis thaliana*, se ha reportado que tratamientos con AZA, BABA y PIP tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz primaria (Wu et al., 2010; Bouain et al., 2018; Cecchini et al., 2019; De la Torre et al., 2023). Con la finalidad de evaluar la capacidad de respuesta a PIP en las mutantes autofágicas, se sembraron plantas *Arabidopsis* Col-0 y mutantes *nbr-1*, *atg5-2* y *atg2* crecidas en medio MS con nitrógeno y sin sacarosa. Las mismas fueron suplementadas con PIP 1 mM o H₂O, como control. Se realizaron mediciones del largo de raíz principal a los 7 y 14 días post siembra mediante el programa Image J. Se encontró efecto del tratamiento de PIP respecto al control tanto a la semana 1 como semana dos de edad en todos los genotipos analizados.

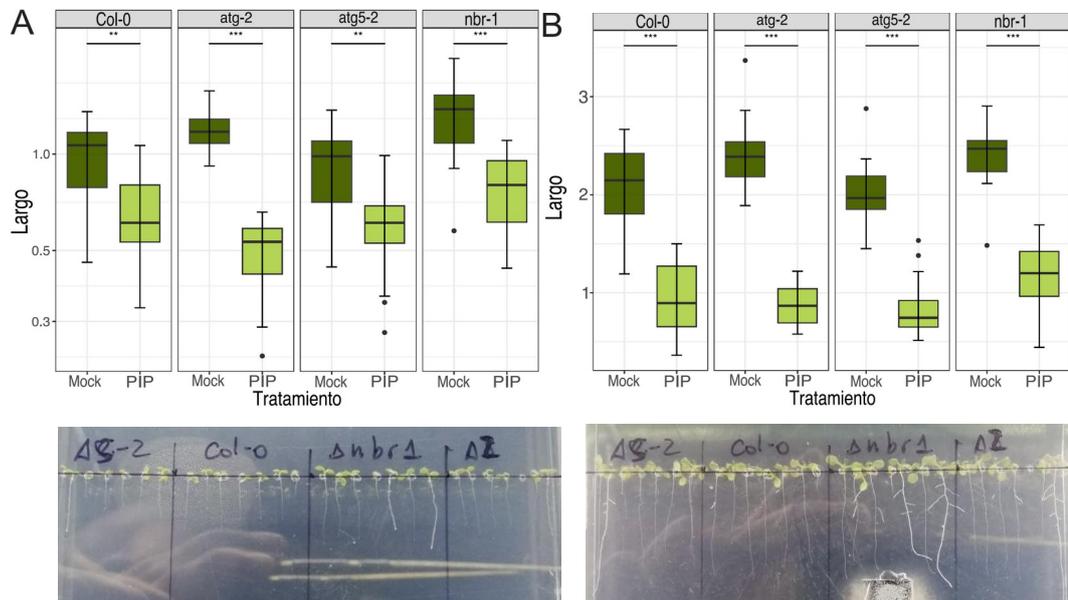


Fig. 6: Efecto del tratamiento con ácido pipecólico en el crecimiento de la raíz principal. Plantas Col-0 y mutantes *nbr-1*, *atg5-2* y *atg2* crecidas en medio MS con nitrógeno y sin sacarosa, suplementadas con PIP 1 mM o H₂O, como control. A) Medición del largo de la raíz principal a una semana de edad. B) Medición del largo de la raíz principal a dos semanas de edad. La estadística realizada fue Test-t. Los asteriscos indican diferencias significativas de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, mientras que NS. indica valor no significativo.

Evaluación de la resistencia sistémica contra *Pseudomonas* sp. en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes de la vía autofágica.

Para profundizar en el estudio de la participación de la autofagia en los programas de resistencia sistémica, investigamos los efectos de la inducción de priming sobre la

resistencia contra la infección bacteriana en plantas mutantes afectadas en el proceso de autofagia. Plantas de *Arabidopsis* silvestres (Col-0) y mutantes constitutivas (*atg2*) y selectivas (*nbr1*) de autofagia de 4 semanas de edad fueron subirrigadas con 300 mL de PIP 1 mM o 300 mL de H₂O como control, durante 1 h. Luego de 24 h, fueron infectadas las hojas 7 y 8 con *P. syringae* pv. *maculicula* (5×10^5 UFC/ml) tal como se describe en metodología. Las muestras de estas mismas hojas fueron recolectadas 72 h post infección y se procesaron para el análisis de unidades formadoras de colonia (UFC). Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas biológicas. El tratamiento con el inductor de priming redujo significativamente el número de UFC respecto al tratamiento control, tanto en el genotipo silvestre como en las mutantes de autofagia (*atg2* y *nbr1*) (Fig. 6A). Asimismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de UFC entre los distintos genotipos cuando las plantas fueron infectadas sin el tratamiento con PIP (Fig. 6A). Sin embargo, la respuesta al tratamiento con el inductor de priming fue mayor en plantas Col-0 que en las mutantes de autofagia (Fig. 7A y B).

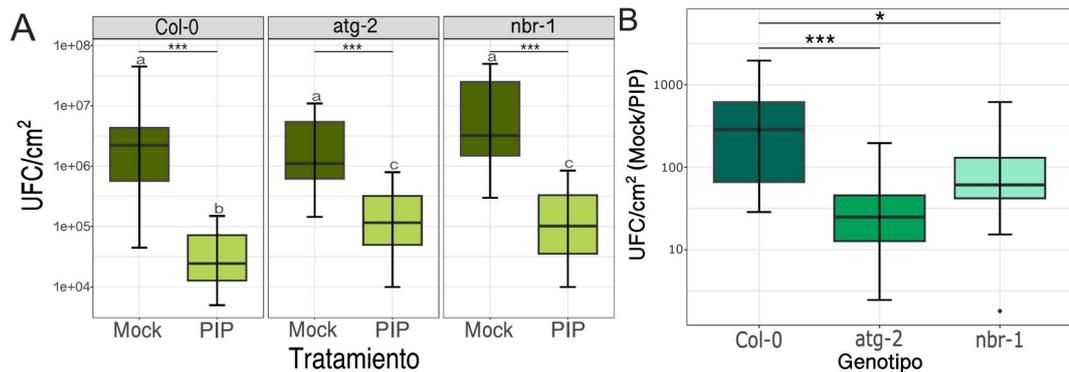


Fig. 7: Caracterización de resistencia sistémica, a partir de aplicación de Pip, en genotipo silvestre y mutantes de la vía autofágica. Plantas Col-0 y mutantes *nbr-1* y *atg2* de 4 semanas fueron tratadas con PIP 1 mM o H₂O, y luego de 24 h fueron infectadas con *P. syringae* pv. *maculicula*. Las muestras de las hojas fueron recolectadas 72 h después de la infección. Se realizaron tres réplicas experimentales, cada uno con seis réplicas biológicas. A) Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por cm² comparativo entre tratamientos y genotipos. La estadística realizada fue Test-t. Las letras a, b y c fueron utilizadas para indicar diferencias significativas entre los genotipos. Los asteriscos indican diferencias significativas de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, mientras que NS. indica valor no significativo. B) Cociente entre tratamiento control y PIP. Test-t * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, las diferencias no significativas no fueron marcadas.

Efectos de la edad fisiológica foliar en los programas de resistencia sistémica.

Caracterización de la expansión foliar durante el desarrollo de *Arabidopsis*.

Ha sido descrito previamente que los mutantes *atg* presentan un fenotipo de defensa activa e incrementada producción de ROS asociado a una desregulación en el control de los niveles del ácido salicílico (SA). Los niveles de esta hormona se acumulan en las hojas de las plantas mutantes *atg*, siendo más evidente en hojas maduras que en hojas jóvenes (Yoshimoto et al., 2009). Dados estos antecedentes, investigamos las respuestas de resistencia sistémica y el desencadenamiento de mecanismos de defensa en diferentes etapas de desarrollo foliar. Inicialmente, se realizó la medición de la expansión foliar en hojas de diferentes edades con el objetivo de diferenciar las hojas que aún están experimentando crecimiento (jóvenes) de las hojas que ya han cesado su expansión (maduras). Se realizaron mediciones de plantas Col-0, mutantes *atg5* y *nbr-1*, sembradas y crecidas en macetas. Se realizaron mediciones a los 21, 24, 27 y 31 días. Se utilizaron entre 18 y 20 réplicas biológicas por genotipo. Las curvas de expansión foliar fueron similares en todos los genotipos (Fig. 8). Hasta los 31 días de crecimiento se encontró expansión foliar exponencial de las hojas 7 y 8, mientras que las hojas 3 y 4 mostraron un cambio en la curva de crecimiento alrededor de los 27 días, observándose una expansión desacelerada (Fig. 8). De esta forma identificamos a las hojas 3 y 4 de *Arabidopsis thaliana* como hojas maduras y 7 y 8 como hojas jóvenes a los 31 días de edad.

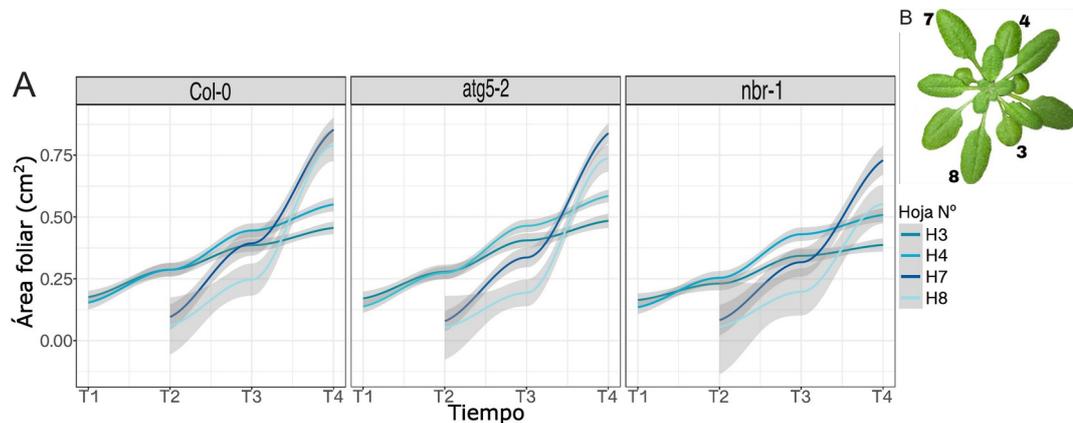


Fig. 8: Caracterización de expansión foliar en plantas *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0) y mutantes de autofagia (*atg5* y *nbr1*). Se realizaron mediciones a T1= 21 días, T2= 24 días, T3= 27 días y T4= 31 días. A. Diagrama de expansión foliar genotipo Col-0, se grafica la media de 20 réplicas biológicas. Diagrama de expansión foliar genotipo *atg5-2*, se grafica la media de 18 réplicas biológicas. Diagrama de expansión foliar genotipo *nbr-1*, se grafica la media de 20 réplicas biológicas. B. Esquema indicando las hojas analizadas.

Caracterización del estado redox de citoplasma y cloroplasto en hojas de diferente edad.

Para caracterizar el estado redox de citoplasma y cloroplasto se utilizaron plantas transgénicas que expresan la construcción GRX-roGFP2 dirigida a esas localizaciones subcelulares (Schwarzländer et al., 2016). Estas plantas transgénicas expresan proteínas fluorescentes verdes sensibles a los cambios redox (roGFP). La intensidad relativa de los dos máximos de excitación de fluorescencia depende del estado redox de la GFP modificada, lo que permite mediciones ratiométricas, independientemente de la concentración de la sonda (Schwarzländer et al., 2016). Las mismas fueron sembradas y crecidas en macetas durante 4 semanas. Se extrajo un disco por hoja de cada planta y se midieron las emisiones de fluorescencia de la GFP redox sensible mediante espectrofluorimetría. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estado redox del citoplasma y cloroplastos entre las hojas de diferentes edades de desarrollo (Fig. 9). Asimismo, los cloroplastos mostraron un estado redox más oxidado que el citoplasma (Fig. 9).

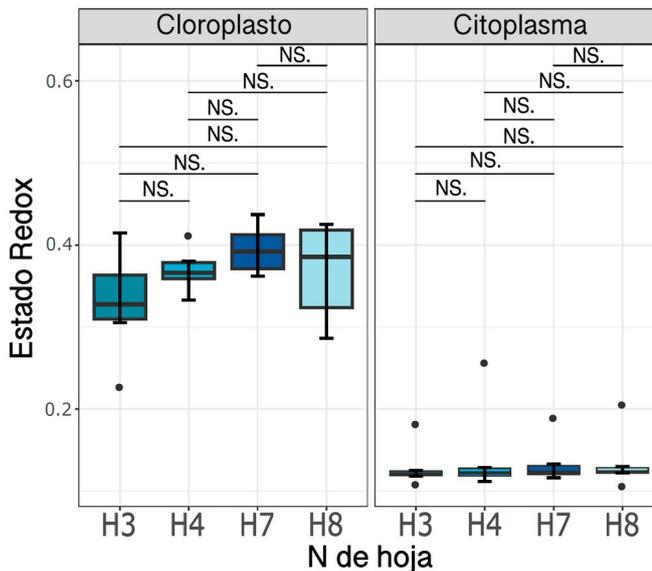


Fig. 9.: Caracterización del estado redox de citoplasma y cloroplasto en hojas de distinta edad de plantas de Arabidopsis sensoras redox. Se extrajeron discos de hojas de plantas GRX-roGFP2 de cuatro semanas de edad y se cuantificó la fluorescencia mediante espectrofluorimetría. Se realizaron 6 réplicas biológicas. Las siglas H3, H4, H7 y H8 refieren a hoja 3, 4, 7 y 8 respectivamente. La estadística realizada fue Test-t. Los asteriscos indican diferencias significativas de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, mientras que NS. indica valor no significativo.

Efectos del PIP sobre la infección bacteriana en hojas de distinta edad.

Con el objetivo de conocer la influencia de la edad foliar en los programas de resistencia sistémica, plantas Col-0 de cuatro semanas de edad fueron sometidas a tratamientos con 300 mL de PIP 1 mM o 300 mL de H₂O por subirrigación. Luego de 24 h se infectaron hojas jóvenes y maduras con *P. syringae pv. maculicola* (5×10^5 UFC/ml) tal como se describe en metodología. Las muestras de las hojas fueron recolectadas 72 h después de la infección. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas biológicas. En la figura 9 se observa que el inductor de priming confirió resistencia a la infección con la bacteria en hojas jóvenes, pero no se observó efecto en las hojas maduras comparado con el control (Fig.10).

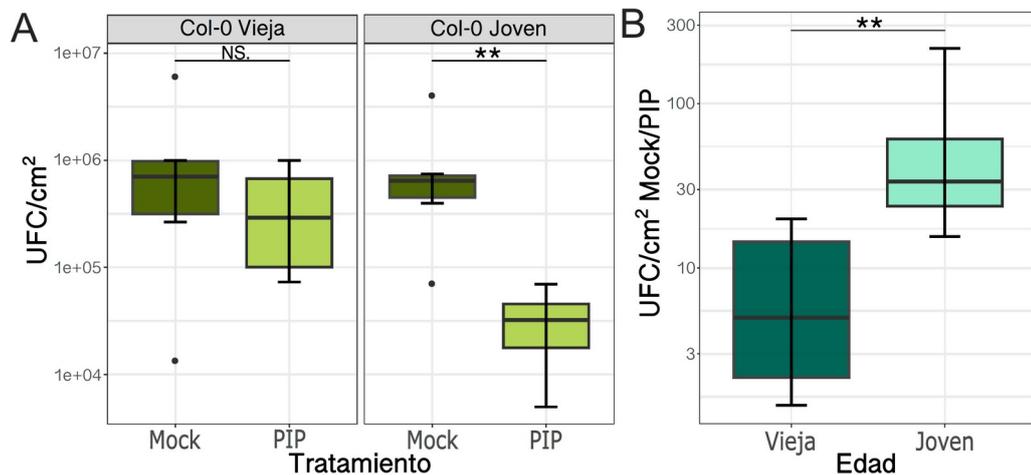
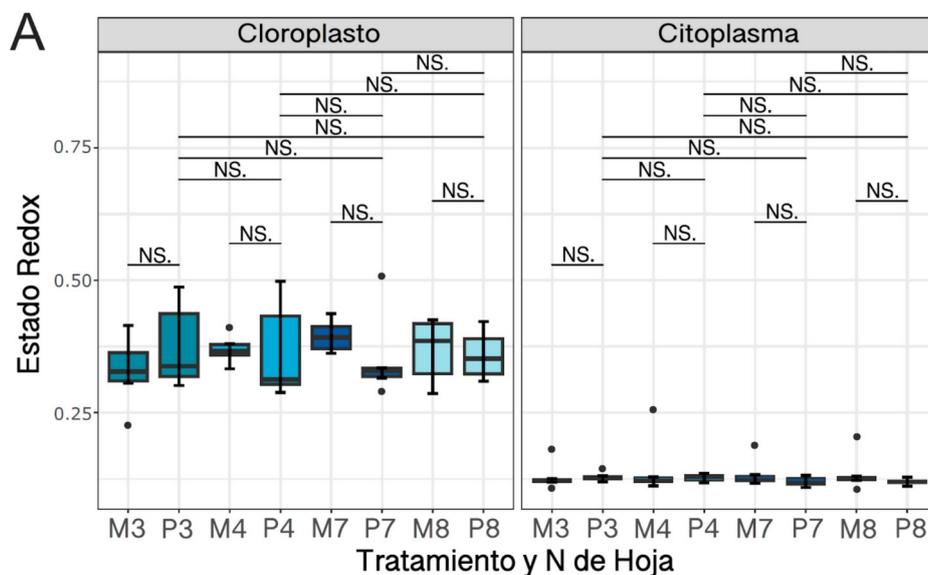


Fig. 10: Resistencia sistémica adquirida en diferentes estados de desarrollo, a partir de aplicación de PIP. Plantas Col-0 de 4 semanas de edad fueron sub irrigadas con 300 mL de PIP 1 mM o 300 mL de H₂O como control e infectadas luego de 24 h con *P. syringae pv. maculicola* (5×10^5 UFC/ml). 72 h después de la infección se realizó la extracción de bacterias de las hojas para el análisis de unidades formadoras de colonias (UFC) por cm². A) Cuantificación de unidades formadoras de colonia por cm² de hoja comparativo entre tratamientos B) Cociente entre las medias de UFC/cm² en plantas control y tratadas con ácido pipecólico. La estadística realizada fue Test-t, los asteriscos indican diferencias significativas de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, mientras que NS. indica valor no significativo.

Efectos del PIP sobre el estado redox celular en hojas de diferente edad.

Trabajos previos han reportado que el orquestado de la inmunidad sistémica inducida por tratamientos con PIP depende en parte de la producción de radicales libres (Wang et al., 2018), los cuales a su vez tienen efectos sobre el flujo autofágico según resultados recientes del grupo (Enet et al., 2023). En este contexto, y con el objetivo de profundizar en el estudio del impacto de la edad foliar en los programas de resistencia sistémica, se investigaron los efectos de los tratamientos con PIP sobre el estado redox celular en hojas de distintas edades. Plantas transgénicas sensoras redox de cuatro semanas de edad fueron subirrigadas con 300 ml de PIP 1 mM o H₂O como control, y luego de 24 h se muestrearon hojas jóvenes y maduras para el análisis de fluorescencia mediante espectrofluorimetría. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estado redox de cloroplastos y citoplasma entre plantas tratadas y no tratadas con ácido piperólico (Fig. 11A). Sin embargo, tras la exposición a tratamientos con 150 mM de H₂O₂ por 20 min, las hojas jóvenes de plantas tratadas con PIP mostraron un nivel de oxidación cloroplástico menor que las hojas jóvenes de plantas control, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hojas maduras de plantas inducidas con PIP y control (Fig. 11B). Se observó que las plantas control mostraron aumento de oxidación en todas sus hojas. En contraste, las plantas tratadas con PIP muestran un aumento menor del estado oxidativo en las hojas 7 y 8 clasificadas antes como jóvenes. También podemos ver que los niveles de oxidación de las hojas maduras tratadas con PIP son similares a los niveles en plantas no tratadas (Fig. 11C).



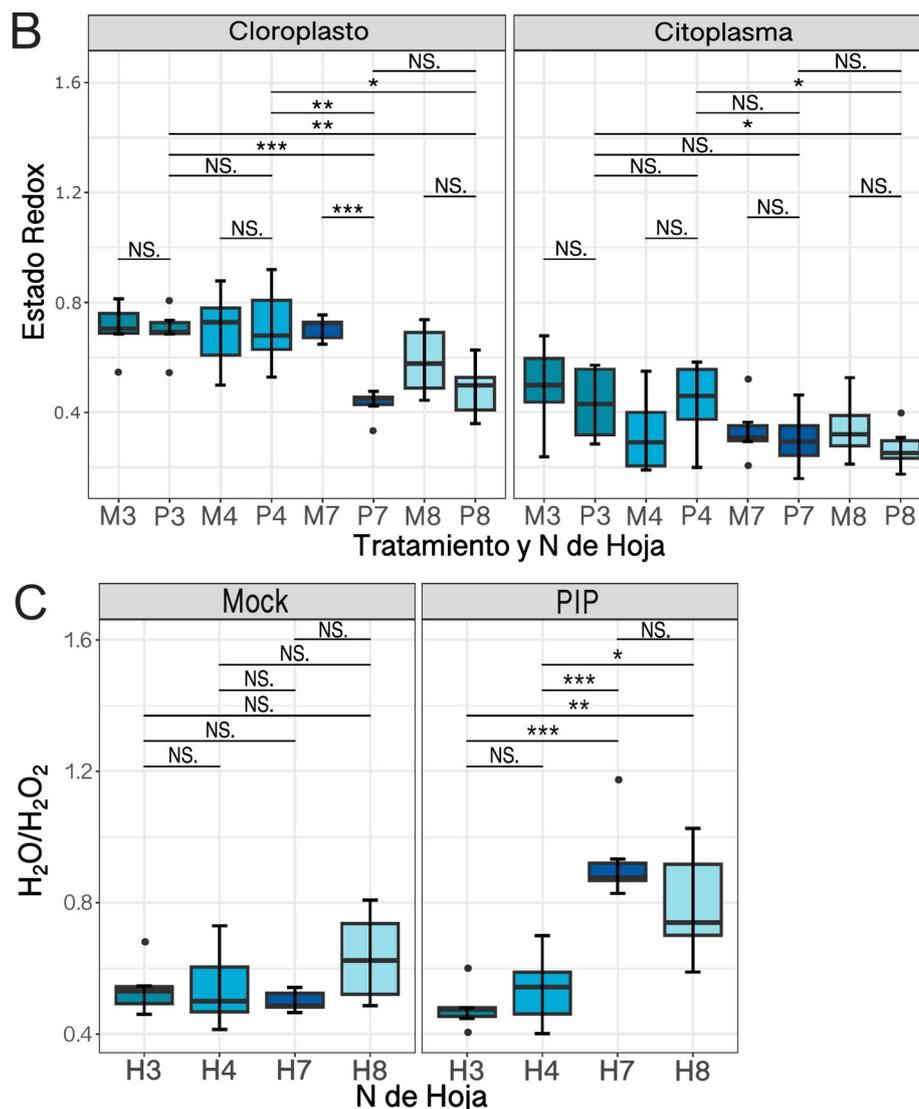


Fig. 11: Medición de estado redox de citoplasma y cloroplastos. A) Medición del estado redox en hojas de distinta edad de plantas tratadas con PIP y plantas control. B) Medición de estado redox en hojas de distinta edad de plantas tratadas con PIP y plantas control luego de 20 min de exposición a H₂O₂ 150 mM. C) Cociente entre el estado redox del cloroplasto antes y después de la exposición a H₂O₂, diferenciación entre hojas de plantas control y tratadas con PIP 1 mM. La estadística realizada fue Test-t, los asteriscos indican diferencias significativas de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, mientras que NS. indica valor no significativo.

Efectos del PIP sobre el flujo autofágico en hojas de diferente edad.

Plantas de *Arabidopsis* reporteras de autofagia de cuatro semanas de edad fueron sometidas a tratamientos por subirrigación con 300 mL de PIP 1 mM o 300 mL de H₂O. Luego de 24 h se infectaron hojas jóvenes y maduras con *P. syringae* pv. *maculicula* (5×10^5 UFC/ml) tal como se describe en metodología. Se tomaron 4 discos de hojas 24 h

posterior a la infección y se extrajeron las proteínas para el análisis de flujo autofágico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y las distintas edades foliares (Fig. 12)

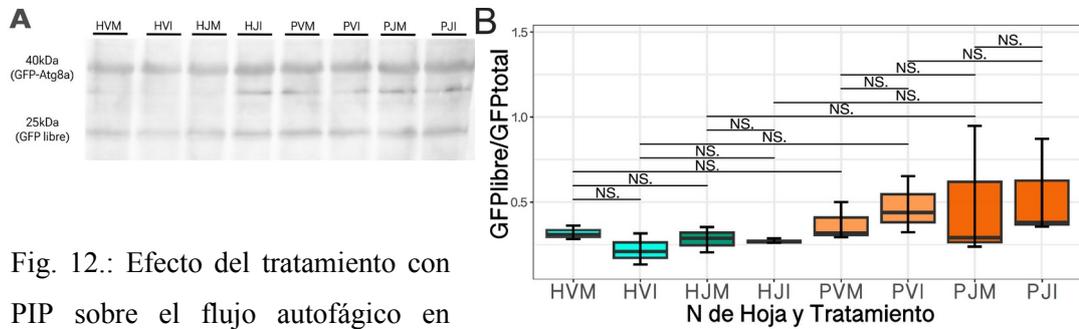


Fig. 12.: Efecto del tratamiento con PIP sobre el flujo autofágico en hojas de diferente edad. Plantas

Arabidopsis reporteras del proceso, 35S:GFP-ATG8a, sometidas a tratamiento por subirrigación con 30 mL de PIP 1 mM o 30 mL de H₂O a las 4 semanas de edad e infectadas 24 h posterior con *P. syringae* pv. *maculicola* (5×10^5 UFC/ml). Por muestra se utilizaron 4 discos de hojas clasificadas como jóvenes/maduras y PIP/Mock, los mismos fueron cortados 24 h posterior a la infección. Las iniciales utilizadas en el gráfico corresponden a H=Agua, P=PIP, V=Madura, J=Joven, M=sin infectar, I=Infectada. A. Análisis de Western Blot con anticuerpo anti-GFP, mostrando la relación entre la fusión GFP-ATG8a (~40 kDa) y GFP libre (~25 kDa). B. Densitometría del ensayo de clivaje de GFP-ATG8a en A. GFP libre fue expresado como porcentaje del contenido de GFP total en cada muestra. La estadística realizada fue Test-t entre tratamientos, NS indica diferencia no significativa.

Discusión

La autofagia es un proceso de degradación intracelular implicada en el control de calidad de proteínas y orgánulos. Este proceso, es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, particularmente durante la senescencia, y en las respuestas a diferentes condiciones de estrés abiótico y biótico (Klionsky & Ohsumi, 1999; Klionsky, 2005, 2007). Recientemente, diversos reportes han demostrado las implicancias de la autofagia en el “reprogramado celular”, una función clave tanto para el desarrollo de las plantas como para las respuestas a las fluctuaciones del ambiente (Sedaghatmehr et al., 2019; Rodriguez et al., 2020; Kanne et al., 2021). La "reprogramación celular" se refiere a un proceso complejo que involucra múltiples mecanismos moleculares por el cual las células cambian su estado o función original para adoptar una nueva función o comportamiento. La producción de ROS y el estado redox juegan un rol crucial en la reprogramación celular, tanto a nivel local (el sitio donde ocurre el sensado del estrés o estímulo) como a nivel sistémico (Zandalinas et al., 2020c, b,a; Peláez-Vico et al., 2022). Asimismo, distintas vías catabólicas cumplen un rol clave en la reconfiguración del estado celular, acompañando a la dinámica de vías biosintéticas en el reprogramado temporal de la célula en respuesta a los cambios en el ambiente. En este sentido, la autofagia, uno de los principales procesos celulares de degradación altamente conservado en eucariotas, cumple funciones cruciales en la dinámica del proteoma durante el desarrollo de las plantas y en respuesta al ambiente, participando en las respuestas de tolerancia al estrés eliminando organelas y proteínas dañadas, modulando así la producción de ROS (Yoshimoto et al., 2009). Además, las evidencias indican que la autofagia se activa rápidamente tras la percepción de diversos estímulos para mantener la competencia celular al mediar en la limpieza celular durante diversos eventos de reprogramación en las plantas (Sedaghatmehr et al., 2019; Rodriguez et al., 2020). No obstante, a pesar de los avances en el conocimiento de sus diferentes funciones, su rol en el priming y la resistencia sistémica sigue estando poco explorado. Con el objetivo de profundizar en este interrogante, en este trabajo comenzamos a abordar diferentes estrategias para investigar la participación de la autofagia en los programas de resistencia sistémica.

Trabajos previos muestran que algunos targets de NPR1, tal como algunos factores de transcripción TGAs y WRKYs, son moduladores del priming y a su vez son recluidos a la región promotora de los genes Atg (Atg8 y Atg18 particularmente) (Zhou et al., 2014; Baum et al., 2019; Wang et al., 2020). En línea con estos antecedentes, observamos que luego de 24 h de exposición a PIP a nivel radical, algunos genes Atg, entre ellos Atg8s y

Atg18, mostraron una expresión diferencial en hojas respecto a lo observado en condición control en los experimentos de RNA-seq analizados in silico (Fig. 3). No obstante, el análisis de flujo autofágico post-tratamiento con PIP no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (Fig. 5). Es necesario considerar que a diferencia de las plantas utilizadas en los experimentos de RNA-seq (plantas de 5 semanas), el ensayo de flujo fue realizado sobre plántulas de 1 semana. A fin de tener un análisis más completo de la respuesta al PIP, como perspectiva futura se plantea realizar una cinética de flujo autofágico hasta las 72 h luego de la aplicación de PIP en plantas de 4 semanas, tiempo en que las plantas son infectadas en los ensayos de SAR.

El análisis de unidades formadoras de colonia (UFC) luego de la infección de hojas con bacterias patogénicas en plantas sometidas a tratamientos con moléculas implicadas en la memoria inmunológica constituye una de las herramientas más ampliamente utilizadas para la evaluación de la inducción de programas de resistencia sistémica (Üstün, et al., 2018; Miranda de la Torre et al., 2023). Asimismo, la inducción de priming por PIP está relacionado con su efecto inhibitor del crecimiento de la raíz (Miranda de la Torre et al., 2023). Con estos sistemas experimentales, en este trabajo evaluamos la capacidad de plantas mutantes defectuosas constitutivas (*atg*) o selectivas (*nbr1*) del proceso de autofagia en generar una respuesta de resistencia sistémica. En condiciones control (sin tratamiento con PIP), y a diferencia de lo reportado previamente (Üstün et al., 2018), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia contra la infección de Psm entre los diferentes genotipos (Fig. 7). En ese trabajo previo, los autores reportaron que plantas mutantes *atg* fueron más resistentes a la infección por *P. syringae* DC3000 que plantas silvestres, mientras que la mutante *nbr1* mostró una mayor susceptibilidad a la infección (Üstün et al., 2018). Si bien se observa una tendencia en nuestros resultados similar a lo reportado, cabe destacar que las condiciones de fotoperíodo que nosotros utilizamos (12/12) difieren de las utilizadas por Üstün y colaboradores (8/16). Luego del tratamiento con PIP, se observó inducción de resistencia sistémica a Psm en todos los genotipos, aunque esta fue menos pronunciada en las mutantes *atg* y *nbr1* que en las plantas Col-0 (Fig. 7). Estos resultados sugieren que la autofagia está implicada en, pero no es fundamental para los programas de resistencia sistémica. A continuación de esta Tesina, el grupo de trabajo proseguirá con el análisis de la participación de autofagia en el mantenimiento/duración del priming y la reconfiguración del estado celular.

Resulta importante destacar que las mutaciones en genes *atg* conducen a alteraciones en los niveles de SA y acumulación de ROS, componentes claves implicados en las respuestas de defensa y la senescencia foliar (Yoshimoto et al., 2009). Las primeras investigaciones relacionadas con la autofagia y la defensa en las plantas determinaron que defectos en este proceso degradativo resultan en una muerte celular programada excesiva relacionada con la inmunidad durante la respuesta hipersensible (Liu et al., 2005), fenotipos que dependen de la señalización de SA, incluido NPR1, pero independientes de las vías de ácido jasmónico y etileno (Yoshimoto et al., 2009). Estos hallazgos implican a la autofagia en un mecanismo de retroalimentación que modula la señalización de SA y la producción de ROS para regular negativamente la senescencia y la muerte celular programada relacionada con la inmunidad (Yoshimoto et al., 2009). Particularmente, la acumulación de SA y ROS en las mutantes *atg*, y consecuentemente la muerte celular exacerbada durante la HR, incrementan significativamente en estadios de desarrollo avanzados (Yoshimoto et al., 2009). A fin de investigar los efectos de la edad foliar (y de los procesos complejos asociados, tales como el estado redox y la actividad autofágica) sobre los programas de resistencia sistémica, se investigaron los efectos de los tratamientos con PIP en hojas de diferente edad, evaluando UFC, estado redox celular y actividad autofágica. Previamente, se identificó a las hojas 3 y 4 como hojas maduras las cuales han cesado su crecimiento a las 4 semanas, y las hojas 7 y 8 como hojas jóvenes aún en expansión (Fig.8). Si bien no se llegó a realizar en el marco de esta Tesina, está planteado evaluar el estado redox de plantas mutantes de autofagia, como así también analizar los niveles hormonales en las hojas de diferentes estadios (tanto en plantas silvestres como mutantes *atg* y *nbr1*).

La inducción de resistencia sistémica por PIP fue significativamente mayor en hojas jóvenes respecto de hojas maduras (Fig. 10), y estuvo acompañada por una mayor capacidad redox en respuesta a tratamientos oxidativos (Fig. 11), pero sin diferencias significativas en la actividad autofágica (Fig. 12). Trabajos previos han descrito un fenotipo de resistencia a enfermedades relacionado al envejecimiento, denominada Resistencia Relacionada a la Edad, la cual no está asociada con la transición de la floración ni senescencia, pero aún se conoce poco sobre sus componentes (Kus et al., 2002). Como se mencionó en los antecedentes planteados en esta Tesina, la vía de señalización por PIP estaría influenciada por la luz, ya que este se sintetiza en los cloroplastos. Nuestros resultados aportan evidencias en este sentido, sugiriendo un rol clave del estado funcional de cloroplastos en los programas de resistencia mediados por

PIP. Justamente, una de las perspectivas que se desprenden de este trabajo es estudiar en profundidad la funcionalidad y respuesta de la maquinaria fotosintética frente a tratamientos con inductores inmunológicos, como así también investigar las respuestas de resistencia sistémica en diferentes regímenes de luz (intensidad). Otra perspectiva que emerge de nuestros resultados está relacionada con el movimiento del PIP, y de otras señales sistémicas, asociado a los flujos en sentido fuente-destino en la planta, explicando, al menos en parte, los efectos observados en hojas en expansión y maduras.

Conclusión

Los resultados de este estudio proporcionan evidencias que sugieren la implicancia de la autofagia en los programas de resistencia sistémica en plantas, aunque no es un factor esencial. Además, los resultados respaldan la idea de que la edad de las hojas desempeña un papel significativo en la efectividad de la resistencia sistémica mediada por PIP. Este estudio plantea nuevas preguntas y áreas de investigación, como la relación entre la autofagia, la señalización redox, el movimiento sistémico de señales y la resistencia relacionada con la edad en los programas de resistencia sistémica. Estos hallazgos ofrecen una base sólida para futuras investigaciones que puedan profundizar en estos aspectos y aumentar nuestra comprensión de la interacción entre la autofagia y la respuesta inmunológica en las plantas.

Bibliografia

- ÁDÁM, A. L., Z. NAGY, G. KÁTAY, E. MERGENTHALER & O. VICZIÁN. 2018. Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1–21.
- AGRIOS, G. N. 2005. How plants defend themselves against pathogens. In *Plant Pathology*, pp. 207–248. San Diego, CA: Academic. 5th ed.
- AUSUBEL, F. M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6: 973-979.
- AVIN-WITTENBERG, T., A. HONIG, & G. GALILI. 2011. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 248: 439–446.
- BAGGS, E., G. DAGDAS & K. V. KRASILEVA. 2017. NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDentity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38: 59–67.
- BALMER, A., V. PASTOR, J. GAMIR, V. FLORS & B. MAUCH-MANI. 2015. The “prime-ome”: towards a holistic approach to priming. *Trends Plant Sci.* 20: 443–452.
- BARTH, H., K. MEILING-WESSE, U. D. EPPLE, & M. THUMM. 2001. Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Lett* 508: 23–28.
- BASSHAM, D.C., M. LAPORTE, F. MARTY, Y. MORIYASU, Y. OHSUMI, L.J. OLSEN, & K. YOSHIMOTO. 2006. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2: 2–11.
- BAUM, S., et al. 2019. Isolation of Open Chromatin Identifies Regulators of Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* 181: 817–833.
- BAXTER, A., R. MITTLER, & N. SUZUKI. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany* 65, 1229-1240.
- BECKERS, G. J. M., M. JASKIEWICZ, Y. LIU, W. R. UNDERWOOD, S. Y. HE, S. ZHANG, et al. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 944–953. doi: 10.1105/tpc.108.062158.
- BOLLER, T. & G. FELIX. 2009. A renaissance of elicitors: perceptions of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 379–406.

- BURBANO-FIGUEROA, O. 2020. Plant resistance to pathogens: A review describing the vertical and horizontal resistance concepts. *Revista Argentina de Microbiología* Volume 52, Issue 3, July–September, Pages 245-255
- CAPLAN, J., M. PADMANABHAN & S. P. DINESH-KUMAR. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 3: 126–135.
- CECCHINI, N. M., K. STEFFES, M. R. SCHLAPPI, A. N. GIFFORD & J. T. GREENBERG. 2015a. Arabidopsis AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nat. Commun.* 6.
- CECCHINI, N. M., H. W. JUNG, N. L. ENGLE, T. J. TSCHAPLINSKI, J. T. GREENBERG & P. SOCIETY, et al. 2015b. ALD1 regulates basal immune components and early inducible defense responses in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28: 455–466. doi: 10.1094/MPMI-06-14-0187-R .
- CECCHINI, N. M., S. ROYCHOUDHRY, D. Q. J. SPEED, K. STEFFES, A. TAMBE, K. ZODROW, K. KONSTANTINOFF, H. W. JUNG, N. L. ENGLE, T. J. TSCHAPLINSKI & J. T. GREENBERG. 2019. Underground Azelaic Acid-Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 32: 86–94.
- CHANDA, B., Y. XIA, M. K. MANDAL, K. YU, K. T. SEKINE, Q.-M. GAO, et al. 2011. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat. Genet.* 43: 421–427.
- CHEN, Y. C., E. C. HOLMES, J. RAJNIAK, J. G. KIM, S. TANG, C. R. FISCHER, et al. 2018. N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115: E4920–E4929. doi: 10.1073/pnas.1805291115.
- CONRATH, U., G. J. M. M. BECKERS, C. J. G. G. LANGENBACH & M. R. JASKIEWICZ. 2015. Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53: 97–119.
- DERETIC, V. 2012. Autophagy as an innate immunity paradigm: Expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 24:21–31. 10.1016/j.coi.2011.10.006
- DING, P., D. REKHTER, Y. DING, K. FEUSSNER, L. BUSTA, S. HAROTH, S. XU, X. LI, R. JETTER, I. FEUSSNER, & Y. ZHANG. 2016. Characterization of a

- pipecolic acid biosynthesis pathway required for systemic acquired resistance. *Plant Cell* 28: 2603–2615.
- DONG, J., & W. CHEN. 2013. The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during Pst DC3000 (AvrRps4) infection. *PLoS ONE*. 8: e73091. doi: 10.1371/journal.pone.0073091.
- DURRANT, W. E. & X. DONG. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185–209.
- EITAS, T. K. & J. L. DANGL. 2010. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 472–477.
- FLORS, V., J. TON, R. VAN DOORN, G. JAKAB, P. GARCÍA-AGUSTÍN & B. MAUCH-MANI. 2008. Interplay between JA, SA and ABA signaling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 54: 81–92.
- FU, Z. Q. & X. DONG. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 839–863.
- GAFFNEY, T., L. FRIEDRICH, B. VERNOOIJ, D. NEGROTTO, G. NYE, S. UKNES, et al. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754–756.
- GAMIR, J., P. SANCHEZ-BEL & V. FLORS. 2014. Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental challenges. *Plant Cell Rep.* 33: 1935–1949.
- GAO, Q.-M., K. YU, Y. XIA, M. B. SHINE, C. WANG, D. NAVARRE, et al. 2014. Mono- and digalactosyldiacylglycerol lipids function nonredundantly to regulate systemic acquired resistance in plants. *Cell Rep.* 9: 1681–1691.
- HAN, S., B. YU, Y. WANG & Y. LIU. 2011. Role of plant autophagy in stress response. *Protein Cell* 2(10): 784–791. DOI 10.1007/s13238-011-1104-4.
- HARTMANN, M., D. KIM, F. BERNSDORFF, Z. AJAMI-RASHIDI, N. SCHOLTEN, S. SCHREIBER, T. ZEIER, S. SCHUCK, V. REICHEL-DELAND, & J. ZEIER. 2017. Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity. *Plant Physiol.* 174: 124–153.
- HARTMANN, M., T. ZEIER, F. BERNSDORFF, T. HOLZEL, V. REICHEL-DELAND, D. KIM, M. HOHMANN, N. SCHOLTEN, S. SCHUCK, A. BRAUTIGAM, T. HOLZEL, C. GANTER & J. ZEIER. 2018. Flavin Monooxygenase-Generated N-

- Hydroxypipicolinic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* 173: 456–469.
- HOFIUS D., T. SCHULTZ-LARSEN, J. JOENSEN, D.I. TSITSIGIANNIS, N.H.T. PETERSEN, O. MATTSSON, L.B. JØRGENSEN, J.D.G. JONES, J. MUNDY, & M. PETERSEN. 2009. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell* 137: 773–783.
- HUO, L., X. SUN, Z. GUO, X. JIA, R. CHE, Y. SUN, Y. ZHU, P. WANG, X. GONG, & F. MA. 2020. MdATG18a overexpression improves basal thermotolerance in transgenic apple by decreasing damage to chloroplasts. *Horticulture Research*, Volume 7, 21.
- ICHIMURA, Y., T. KIRISAKO, T. TAKAO, Y. SATOMI, Y. SHIMONISHI, N. ISHIHARA, N. MIZUSHIMA, I. TANIDA, E. KOMINAMI, M. OHSUMI, T. NODA, & Y. OHSUMI. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipitation. *Nature*. 408(6811): 488-92. doi: 10.1038/35044114.
- JOHANSEN, T., & T. LAMARK. 2020. Selective autophagy: ATG8 family proteins, LIR motifs and cargo receptors. *J. Mol. Biol.* 432:80–103. 10.1016/j.jmb.2019.07.016
- JONES, J. D. G. & J. L. DANGL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- JONES, J. D. G., R. E. VANCE, & J. L. DANGL. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Sci.* (80-). 354. doi: 10.1126/science.aaf6395.
- JUNG, H. W., T. J. TSCHAPLINSKI, L. WANG, J. GLAZEBROOK & J. T. GREENBERG. 2009. Priming in systemic plant immunity. *Science* 324: 89–91.
- KANKI, T., K. WANG, Y. CAO, M. BABA, & D. J. KLIONSKY. 2009. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* 17: 98–109.
- KANNE J V., M. ISHIKAWA, S. BRESSENDORFF, J. ANSBØL, M. HASEBE, E. RODRIGUEZ, & M. PETERSEN. 2021. Overexpression of ATG8/LC3 enhances wound-induced somatic reprogramming in *Physcomitrium patens*. *Autophagy* 18: 1463–1466.
- KIRKIN, V., T. LAMARK, Y.S. SOU, G. BJORKOY, J.L. NUNN, J.A. BRUUN, E. SHVETS, D.G. MCEWAN, T.H. CLAUSEN, et al.. 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell.* 33:505–516. 10.1016/j.molcel.2009.01.020

- KLESSIG, D. F., H. W. CHOI & D. A. DEMPSEY. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31: 871–888.
- KLIONSKY, D. J., & Y. OHSUMI. 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 1–32.
- KLIONSKY, D. J., J. M. CREGG, W. A. DUNN JR, S. D. EMR, Y. SAKAI, I. V. SANDOVAL, et al. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5: 539–545.
- KLIONSKY, D.J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118: 7–18.
- KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 931–937.
- KLIONSKY, D. J., K. ABDELMOHSEN, A. ABE, et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1-222.
- KUS, J. V., K. ZATON, R. SARKAR, & R. K. CAMERON. 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 14: 479–490. doi: 10.1105/tpc.010481.tions.
- LAI, Z., F. WANG, Z. ZHENG, B. FAN, & Z. CHEN. 2011a. A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* 66: 953–968. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04553.x.
- LENZ, H. D., R. D. VIERSTRA, T. NURNBERGER, & A. A. GUST. 2011a. ATG7 contributes to plant basal immunity towards fungal infection. *Plant Signal Behav.* 6: 1040–1042. doi: 10.4161/psb.6.7.15605.
- LENZ, H.D., E. HALLER, E. MELZER, K. KOBER, K. WURSTER, M. STAHL, D.C. BASSHAM, R.D. VIERSTRA, J.E. PARKER, J. BAUTHOR, et al. 2011b. Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J* 66: 818–830.
- LIU, Y., M. SCHIFF, K. CZYMEK, Z. TALLÓCZY, B. LEVINE, & S.P. DINESH-KUMAR. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121: 567–577.
- LIU, Y., & D.C. BASSHAM. 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 5: e11883.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, & R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193, pp. 265-275.

- LUNA, E., T. J. A. BRUCE, M. R. ROBERTS, V. FLORS & J. TON. 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158: 844–853.
- MACHO, A. P., & C. ZIPFEL. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* 54: 263–272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028.
- MALAMY, J., JP. CARR, DF. KLESSIG & I. RASKIN. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002–1004.
- MARTINEZ-MEDINA, A., V. FLORS, M. HEIL, B. MAUCH-MANI, C. M. J. J. PIETERSE, M. J. POZO, et al. 2016. Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci.* 21: 818–822. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
- MATHEW R. , & E.WHITE. 2011. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Current Opinion in Genetics and Development* 21: 113–119.
- MAUCH-MANI, B., I. BACCELLI, E. LUNA & V. FLORS. 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68: 485–512. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132.
- MININA, E.A., P.N. MOSCHOU, R.R. VETUKURI, V. SANCHEZ-VERA, C. CARDOSO, Q. LIU, P.H. ELANDER, K. DALMAN, M. BEGANOVIC, J. LINDBERG YILMAZ, et al. 2018. Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *Journal of Experimental Botany*, Volume 69, Issue 6, Pages 1415–1432.
- MISHINA, T. E. & J. ZEIER. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J.* 50: 500–513.
- MUNCH D., E. RODRIGUEZ, S. BRESSENDORFF, O.K. PARK, D. HOFIUS, & M. PETERSEN. 2014. Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in Arabidopsis. *Autophagy* 10: 1579–1587.
- NAKAMURA, S. & M. IZUMI. 2018. Chlorophagy is ATG gene-dependent microautophagy process. *Plant Signaling & Behavior*. 10.1080.
- NAKATOGAWA, H., K. SUZUKI, Y. KAMADA, & Y. OHSUMI. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 458–467.
- NÁVAROVÁ, H., F. BERNSDORFF, A.-C. DÖRING, & J. ZEIER. 2012. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator

- of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24: 5123–5141. doi: 10.1105/tpc.112.103564.
- OKAMOTO, K., N. KONDO-OKAMOTO, & Y. OHSUMI. 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17: 87–97.
- PARKER, J. E. 2009. The quest for long-distance signals in plant systemic immunity. *Sci. Signal.* 2: pe31.
- PATEL, S., & S. P. DINESH-KUMAR. 2008. Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*. 4: 20–27. doi: 10.4161/auto.5056.
- PELÁEZ-VICO, M. A., Y. FICHMAN, S. I. ZANDALINAS, F. VAN BREUSEGEM, S. M. KARPINSKI, & R. MITTLER. 2022. ROS and redox regulation of cell-to-cell and systemic signaling in plants during stress: ROS and redox regulation of stress responses. *Free Radical Biology and Medicine* 193, 354–362.
- PHILLIPS, A. R., A. SUTTANGKAKUL, & R. D. VIERSTRA. 2008. The ATG12-Conjugating Enzyme ATG10 Is Essential for Autophagic Vesicle Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 178(3): 1339–1353. doi: 10.1534/genetics.107.086199.
- PIETERSE, C. M. & LC. VAN LOON. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 456–464.
- PIETERSE, C. M. J., et al. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 347–375.
- RABINOWITZ J.D. , & E. WHITE. 2010. Autophagy and metabolism. *Science* 330: 1344–1348.
- RIGAULT M., S. CITERNE, C. MASCLAUX-DAUBRESSE, & A. DELLAGI. 2021. Salicylic acid is a key player of Arabidopsis autophagy mutant susceptibility to the necrotrophic bacterium *Dickeya dadantii*. *Sci. Rep.* 11: 3624.
- RODRIGUEZ, E., J. CHEVALIER, J. OLSEN, et al. 2020. Autophagy mediates temporary reprogramming and dedifferentiation in plant somatic cells. *The EMBO Journal* 39: 1–11.
- SALMERON, J. M., G. E. OLDROYD, C. M. ROMMENS, S. R. SCOFIELD, H. S. KIM, et al. 1996. Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell* 86: 123–133.

- SEAY, M., A.P. HAYWARD, J. TSAO, & S.P. DINESH-KUMAR. 2009. Something Old, Something New: Plant Innate Immunity and Autophagy. In: *Autophagy in Infection and Immunity*. Levine B, Yoshimori T, and Deretic V, eds. Berlin Heidelberg: Springer. 287–306.
- SEDAGHATMEHR, M., V. P. THIRUMALAIKUMAR, I. KAMRANFAR, A. MARMAGNE, C. MASCLAUX-DAUBRESSE, & S. BALAZADEH. 2019. A regulatory role of autophagy for resetting the memory of heat stress in plants. *Plant Cell and Environment* 42: 1054–1064.
- SHAH, J. & J. ZEIER. 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4: 30.
- SPOEL, S. H. & X. DONG. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 89–100.
- TATEDA, C., Z. ZHANG, J. SHRESTHA, J. JELENSKA, D. CHINCHILLA, & J. T. GREENBERG. 2014. Salicylic acid regulates Arabidopsis microbial pattern receptor kinase levels and signaling. *Plant Cell* 26: 4171–4187. doi: 10.1105/tpc.114.131938.
- THOMMA, B. P., T. NURNBERGER, & M. H. JOOSTEN. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4–15.
- THOMPSON, A.R., & R.D. VIERSTRA. 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 165–173.
- TON, J., G. JAKAB, V. TOQUIN, V. FLORS, A. IAVICOLI, M. N. MAEDER, et al. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 987–999. doi: 10.1105/tpc.104.029728.
- TSUDA, K., & I. E. SOMSSICH. 2015. Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol.* 206: 932–947. doi: 10.1111/nph.13286.
- VAN HULTEN, M., M. PELSER, L. C. VAN LOON, C. M. J. PIETERSE & J. TON. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 103: 5602–5607.
- VLOT, A. C., J. H. SALES, M. LENK, K. BAUER, A. BRAMBILLA, A. SOMMER, et al. 2021. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol.* 229: 1234–1250. doi: 10.1111/nph.16953.
- WANG, C., M. EL-SHETEHY, M. B. SHINE, K. YU, D. NAVARRE, D. WENDEHENNE, et al. 2014. Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Rep.* 7: 348–355.

- WANG, C., R. LIU, G. LIM, L. DE LORENZO, K. YU, K. ZHANG, A. G. HUNT, A. KACHROO & P. KACHROO. 2018. Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals. *Sci. Adv.*
- WANG, P., T. M. NOLAN, Y. YIN, & D. C. BASSHAM. 2020. Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in Arabidopsis. *Autophagy* 16: 123–139.
- WANG, P., Q. LUO, W. YANG, G. J. AHAMMED, S. DING, X. CHEN, J. WANG, X. XIA, & K. SHI. 2021. A Novel Role of Pipecolic Acid Biosynthetic Pathway in Drought Tolerance through the Antioxidant System in Tomato. *Antioxidants*, 10: 1923. <https://doi.org/10.3390/antiox10121923>.
- WANG, Y., M.T. NISHIMURA, T. ZHAO, & D. TANG. 2011a. ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in Arabidopsis. *Plant J.* 68: 74–87.
- WANG, Y., Y. WU, & D. TANG. 2011b. The autophagy gene, ATG18a, plays a negative role in powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 6: 1408–1410.
- WATERS, S., K. MARCHBANK, E. SOLOMON, C. WHITEHOUSE, & M. GAUTEL. 2009. Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett.* 583:1846–1852. [10.1016/j.febslet.2009.04.049](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.049)
- WU, C. C., P. SINGH, M. C. CHEN & L. ZIMMERLI. 2010. L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 61: 995–1002.
- XIE, Z., & D. J. KLIONSKY. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102–1109.
- YILDIZ, I., M. MANTZ, M. HARTMANN, T. ZEIER, J. KESSEL, C. THUROW, C. GATZ, P. PETZSCH, K. KOHRER, & J. ZEIER. 2021. The mobile SAR signal N-hydroxypipicolinic acid induces NPR1-dependent transcriptional reprogramming and immune priming. *PLANT PHYSIOLOGY* 186: 1679–1705.
- YOSHIMOTO, K., Y. JIKUMARU, Y. KAMIYA, M. KUSANO, C. CONSONNI, R. PANSTRUGA, Y. OHSUMI, & K. SHIRASU. 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21: 2914–2927. doi: [10.1105/tpc.109.068635](https://doi.org/10.1105/tpc.109.068635).

- YU, K., J. M. SOARES, M. K. MANDAL, C. WANG, B. CHANDA, A. N. GIFFORD, et al. 2013. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Rep.* 3: 1266–1278.
- ZANDALINAS, S.I., I.H. COHEN, F.B. FRITSCHI, & R. MITTLER. 2020a Coordinated Systemic Stomatal Responses in Soybean. *Plant Physiology* 183, pp.00511.2020.
- ZANDALINAS, S.I., Y. FICHMAN, A.R. DEVIREDDY, S. SENGUPTA, R.K. AZAD, & R. MITTLER. 2020b. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 13810–13820.
- ZANDALINAS, S.I., Y. FICHMAN, & R. MITTLER. 2020c. Vascular bundles mediate systemic reactive oxygen signaling during light stress. *Plant Cell* 32, 3425–3435.
- ZHANG, B., S. HUANG, Z. GUO, Y. MENG, X. LI, Y. TIAN, & W. CHEN. 2023. Salicylic acid accelerates carbon starvation-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by inhibiting autophagy through Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1. *Plant Science*. Volume 336, November.
- ZHANG, H., Y. QIU, M. LI, F. SONG, & M. JIANG. 2020. Functions of pipecolic acid on induced resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in tomato plants. *J. Phytopathol.* 168: 591–600.
- ZHOU, J., J. WANG, Y. CHENG, Y. CHI, B. FAN, J. YU, & Z. CHEN. 2013. NBR1-Mediated Selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet.* 9: 19.
- ZHOU, J., J. WANG, J. Q. YU, & Z. CHEN. 2014. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front. Plant Sci.* 5: 1–12.
- ZIMMERLI, L., G. JAKAB, J. P. METRAUX, & B. MAUCH-MANI. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 12920–12925. doi: 10.1073/pnas.230416897.